

**Proteininteraktionsdomänen
in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

ACHIM BRINKER

Tag der mündlichen Prüfung:

5. November 2001

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Probst

Prof. Dr. P. Bohley

Prof. Dr. FU Hartl.

Prof. Dr. W. Neupert

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis März 2001 am Max-Planck-Institut für Biochemie, in Martinsried angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. F. Ulrich Hartl** (MPI für Biochemie) für seine freundschaftliche Kollegialität, seine intensive Förderung und Unterstützung, weiterhin für die Bereitstellung des spannenden Themas und der hervorragenden Arbeitsbedingungen;

ebenfalls sehr herzlich möchte ich **Prof. Dr. Peter Bohley** (Universität Tübingen) für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, für zahlreiche konstruktive Anregungen sowie für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät danken;

Prof. Dr. Günther Jung, Dr. Burkhard Fleckenstein und **Florian von der Mülbe** (Universität Tübingen) danke ich für die erfolgreiche Kooperation und für Hilfestellungen im Zusammenhang mit der Synthese kombinatorischer Peptidmischungen;

Prof. Dr. Luis Moroder und Mitarbeitern (MPI für Biochemie) danke ich für den kontinuierlichen und reichhaltigen Peptidstrom, der eine wesentliche Voraussetzung für das Gelingen der vorliegenden Arbeit darstellte;

Dr. Ismail Moarefi und **Clemens Scheufler** (MPI für Biochemie) bin ich für die gewinnbringende Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch im Rahmen des p60/Hop-TPR Projektes dankbar; **Dr. Reinhard Albrecht** (MPI für Biochemie) danke ich für die sehr fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des CDC37-Projektes;

Dr. Christian Herrmann (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) danke ich für eine Einführung in die Isotherme Titrationskalorimetrie und zahlreiche Diskussionen;

José Barral und **Alex Hutagalung** (Baylor College of Medicine, Houston, USA) danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des Unc45 Projektes;

Holger Sondermann, Dr. Jason Young und **Dr. Manajit Hayer-Hartl** (MPI für Biochemie) danke ich für zahllose Stunden anregender Diskussionen, uneingeschränkter Hilfestellungen und für das überaus motivierende Arbeitsumfeld; allen Mitarbeitern der Abteilung Zelluläre Biochemie danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre;

Tonie Luise Baars (Universität Tübingen) danke ich für Hilfestellungen im Rahmen Ihres Laborpraktikums (Martinsrieder Jahr); **Dirk Wischnewski** (MPI für Biochemie) danke ich für zahlreiche technische Hilfestellungen;

Last but not least möchte ich dem **Boehringer Ingelheim Fonds** für die Bewilligung eines Promotionsstipendiums, für zahlreiche sehr stimulierende Zusammenkünfte und für die großzügige Ermöglichung mehrerer USA- und Konferenzbesuche danken. Insbesondere danke ich **Dr. Hermann Fröhlich** und **Monika Beutelspacher** für die sehr persönliche Betreuung und die stete Ansprechbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Konzepte und Mechanismen molekularer Chaperone	1
1.1.1	Proteinfaltung <i>in vitro</i>	1
1.1.2	Proteinfaltung <i>in vivo</i>	1
1.1.3	Aufgaben und Zusammenspiel molekularer Chaperone . . .	3
1.1.4	Molekulare Mechanismen der Hsp60 und Hsp70 Familien .	7
1.2	Die Hsp90-Familie molekularer Chaperone	9
1.2.1	Funktionen von Hsp90	9
1.2.2	Kooperation der Hsp70 und Hsp90 Maschinerien	12
1.2.3	Strukturelle und mechanistische Aspekte von Hsp90 . . .	14
1.2.4	Kofaktoren in Hsp70/Hsp90 Multichaperonkomplexen . .	16
1.3	TPR Motive und ihre Funktionen	20
1.4	Aufgabenstellung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	26
2.2	Bakterienstämme, Vektoren, Primer, Konstrukte	28
2.3	Proteine und Peptide	32
2.4	Medien und Puffer	33
2.5	Molekularbiologische Methoden	35
2.5.1	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	35
2.5.2	DNA-analytische Methoden	36
2.5.3	Zielgerichtete Mutagenese	36
2.5.4	Klonierung von Cyp40 und Cyp40(TPR)	37
2.6	Proteinbiochemische Methoden	40
2.6.1	Proteinexpression und Reinigung	40
2.6.2	Proteinanalytische Methoden	44
2.7	Synthese der Ac-O/X ₄ -VD-COOH-Peptidbibliothek	44
2.8	Biochemische und biophysikalische Methoden	46

2.8.1	Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	46
2.8.2	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	53
2.8.3	Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)	54
2.8.4	CD-Spektroskopie	55
2.8.5	ATPase Assays	56
3	Ergebnisse	58
3.1	TPR vermittelte Interaktionen des Adapterproteins p60	58
3.1.1	... im Hsp70-p60-Hsp90 Komplex	58
3.1.2	Bindung von EEVD-Peptiden durch p60 TPR-Domänen	66
3.1.3	Screening von Ac-O/X ₄ -VD-COOH-Peptidmischungen	78
3.1.4	Modifizierte Peptidliganden	88
3.1.5	Bedeutung der Zweifachen Carboxylatklammer	92
3.1.6	TPRIIB und die Hsp82 ATPase	93
3.2	TPR vermittelte Interaktionen weiterer Hsp70/Hsp90-Kofaktoren	103
3.3	Die Hsp90-CDC37-Interaktion	107
4	Diskussion	112
4.1	TPR vermittelte Proteininteraktionen	112
4.2	Kooperation von Hsp90 mit CDC37	121
4.3	Biologische Implikationen und Ausblick	124
5	Zusammenfassung	126
6	Literatur	128
7	Anhang	159
7.1	Veröffentlichungen, Vortrag, Preis, Patent	159
7.2	Liste akademischer Lehrer	162
7.3	Lebenslauf	163

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Aca	Aminocaprinsäure
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
ÄKTA	FPLC Nachfolgemodell (Pharmacia)
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
Apaf	<i>engl.</i> : Apoptotic protease activating factor
APC	<i>engl.</i> : Anaphase Promoting Complex
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäurenanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	<i>engl.</i> : Bcl-2 binding athanogene eukaryotischer Nukleotidaustauschfaktor von Hsp70
BIA(core)	<i>engl.</i> : Biomolecular Interaction Analysis
Biot	Biotin
BiP	<i>engl.</i> : Luminal Binding Protein Hsp70 Protein im ER, auch Kar2
BisA	Bis-Acrylamid
BLAST	<i>engl.</i> : Basic Local Alignment Search Tool
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
CCT	<i>engl.</i> : Chaperonin containing TCP1 eukaryotisches Hsp60 Chaperonin des Zytosols, auch TRiC
CD	Cirkular Dichroismus
CDC	<i>engl.</i> : Cell Division Cycle
CDK	<i>engl.</i> : Cyclin Dependent Kinase
CDTA	<i>engl.</i> : trans-1,2-Diaminocyclohexane- N,N,N',N'-tetraacetic acid
C. elegans	Caenorhabditis elegans, Nematode
CFTR	<i>engl.</i> : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CheA	<i>engl.</i> : Chemotaxis Protein A Histidinkinase
CHIP	<i>engl.</i> : Carboxyl Terminus Hsp70 Interacting Protein
CIP	<i>engl.</i> : Calf Intestinal Phosphatase
Clp	bakterielle Hsp100 Proteine
CNS1	<i>engl.</i> : Cyclophilin Seven Suppressor 1, PPIase

C_p	molare Wärmekapazität
Cpr	große Immunophiline der Hefen
C-terminal	carboxyterminal
Cyp	<i>engl.</i> : Cyclophiline
C70/C90	C-terminale Domänen von Hsp70/Hsp90
C70-12	Tridekapeptid Ac-C-GSGSGPTIEEVD-COOH
C90-12	Tridekapeptid Ac-C-GDDDTSRMEEVD-COOH
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DE(AE)	Diethylaminoethyl
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> : Desoxyribonucleic Acid
DnaJ	bakterielles Hsp40 Chaperon
DnaK	bakterielles Hsp70 Chaperon
dNTP	Didesoxynucleosidtriphosphate
DSC	<i>engl.</i> : Differential Scanning Calorimetrie
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid -Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor der Translation
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>engl.</i> : Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FKBP	<i>engl.</i> : FK-506 Binding Protein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>engl.</i> : Fast Protein Liquid Chromatography
GA	Geldanamycin
Gim(C)	<i>engl.</i> : Genes involved in microtubule biogenesis, Proteinkomplex GimC, auch 'Prefoldin'-Chaperon
G-Protein	Guaninnukleotide bindendes Protein
Gp96	Hsp90 Chaperon im ER
GR	Glucocorticoid Receptor
GroEL	bakterielles Hsp60 Chaperonin
GroES	bakterielles Hsp10 Cochaperonin (GroEL Kofaktor)

GrpE	bakterieller Nukleotidaustauschfaktor von DnaK
HBS	<i>engl.</i> : Hepes buffered saline
Hcp	<i>engl.</i> : Hsp70-Hsp90 coordinating protein
Hdj2/3	humanes Hsp40 Chaperon
HEAT	<i>engl.</i> : Huntingtin-Elongation A-TOR-Motif
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
hHsp70/hHsp90	humanes Hsp70, humanes Hsp90 Chaperon
Hip	<i>engl.</i> : Hsc70 Interacting Protein
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hop	<i>engl.</i> : Hsp70-Hsp90 Organizing Protein (p60)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hsc	<i>engl.</i> : Heat Shock Cognate
HSF	<i>engl.</i> : Heat Shock Factor
Hsp	<i>engl.</i> : Heat Shock Protein, Hitzeschockprotein
Hsp10, 40, 70, ...	Hsps mit der molekularen Masse von 10, 40, 70, ... kDa
HtpG	bakterielles Hsp90 Chaperon
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration bei 50% Inhibition
IMAC	<i>engl.</i> : Immobilized Metall Affinity Chromatography
IP	Immunophilin
IPK	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythriol Kinase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRSP	<i>engl.</i> : Infertility Related Sperm Protein
ITC	<i>engl.</i> : Isothermal Titration Calorimetrie
J-Domäne	ATPase stimulierende Domäne des Hsp70 Kofaktors Hsp40
k	kilo
K _A	thermodynamische Assoziationskonstante
KAc	Kaliumacetat
Kar2	Hsp70 Protein im ER, auch BiP
kb	Kilobasen
K _D	thermodynamische Dissoziationskonstante
kDa	kilo Dalton
k _{off}	kinetische Dissoziationskonstante
k _{on}	kinetische Assoziationskonstante
LB	Luria Bertani
Lck	<i>engl.</i> : Lymphoid Cell Kinase
MBHA	Methylenbenzhydrylamin
MDJ1	mitochondriales Hsp40 Chaperon
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm

MgAc ₂	Magnesiumacetat
mGrpE	mitochondriales GrpE
mHsp70	mitochondriales Hsp70 Chaperon
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μM	mikromolar
MonoQ	Anionenaustauscherharz mit quartären Aminfunktionen
Mos	zytosolische Proteinkinase
mRNA	<i>engl.</i> : Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
mSTI1	p60/Hop Homologes aus Nagern
MutL	bakterielles DNA Reparaturenzym
NAC	<i>engl.</i> : Nascent Chain Associated Complex
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
OGT	tRNA prozessierendes G-Protein
O-Position	definierte Position
O/X _n	Positional Scanning Format
OtBu	tert.-Butylester
OX _n	Peptidkolektionen mit einer definierten Aminosäure
PBS	<i>engl.</i> : Phosphate buffered saline
PCR	<i>engl.</i> : Polymerase Chain Reaction
PDB	<i>engl.</i> : Protein Data Bank
PDI	<i>engl.</i> : Protein Disulfite Isomerase
PDZ	<i>engl.</i> : Protein Domain Z
PEI	Polyethylenimin
PEX	Peroxisomaler Import Faktor
P _i	anorganisches Orthophosphat (H ₂ PO ₄ ⁻)
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchromansulfonyl
PNK	Polynukleotidkinase
PP5	Protein-Ser/Thr-Phosphatase 5
PS bzw. PS/DVB	Polystyrol mit 1% Divinylbenzol quervernetzt
p23, p60, ...	Protein der molekularen Masse 23, 60, ... kDa
Q-Sepharose	Anionenaustauscherharz mit quartären Aminfunktionen
RA	Radicicol
Rac	kleines G-Protein
Raf	zytosolische Proteinkinase
Rb	Retinoblastoma Protein

R_{eq}	SPR Bindungssignale im Bindungsgleichgewicht
RPC	<i>engl.</i> : Reversed Phase Column
RTK	<i>engl.</i> : Receptor Tyrosine Kinase
RU	<i>engl.</i> : Response Units, relative Einheiten bei SPR Messungen
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
SCJ1	Hsp40 Chaperon im ER
SDS-PAGE	<i>engl.</i> : Sodiumdodecylsulfat -Polyacrylamidgelelektrophorese
Sec63	J-Domänenprotein der ER-Translokationsmaschinerie
SGT	<i>engl.</i> : Small Glutamine-rich Tetratricopeptides containing protein
SHR	<i>engl.</i> : Steroid Hormone Receptor
SIS1	Hsp40 Chaperon in Hefen
SMART	System zur Auftrennung geringer Proteinmengen
SPR	<i>engl.</i> : Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
Src (v,c-Src)	<i>engl.</i> : Sarcoma virale und zytosolische Form einer Proteinkinase
Ssa, Ssb, Ssc	Hsp70 Chaperone der Hefe
SV	<i>engl.</i> : Simian Virus
RNA	<i>engl.</i> : Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
T-Antigen	Tumorantigen
TB	<i>engl.</i> : Terrific Broth
tBu	tert. -Butyl
TCP-1	<i>engl.</i> : Tailles Complex Polypeptide 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>engl.</i> : Tobacco Etch Virus
TF	<i>engl.</i> : Trigger Factor
TFA	Trifluoressigsäure
TIM	<i>engl.</i> : Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane
TOM	<i>engl.</i> : Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane
TPR	<i>engl.</i> : Tetratricopeptide Repeat
TRiC	<i>engl.</i> : TCP-1 containing Ring Complex eukaryotisches Hsp60 Chaperonindes Zytosols, auch CCT

Tris	Trishydroxyethylaminoethan
tRNA	<i>engl.</i> : Transfer RNA
Trt	Trityl
TTC(1-4)	<i>engl.</i> : Tetratricopeptide Containing Protein
Θ_M	Molare Elliptizität bezogen auf das Gesamtprotein
Θ_R	Molare Elliptizität bezogen auf die einzelne Aminosäure
U-Box	Charakteristisches Sequenzmotif von Ubiquitin Ligasen
Unc	<i>engl.</i> : Gene locus of unknown function in <i>C. elegans</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
Wee1	zytosolische Proteinkinase
w/v	Gewicht/Volumen
X-Position	randomisierte Position
YDJ1	Hsp40 Chaperon in Hefen
Z	Benzyloxycarbonyl

1 Einleitung

1.1 Konzepte und Mechanismen molekularer Chaperone

1.1.1 Proteinfaltung *in vitro*

Christian Anfinsen zeigte bereits in den 50er und 60er Jahren in seinen klassischen *in vitro* Experimenten mit reduzierter und chemisch denaturierter Ribonuklease A, daß Proteine die Fähigkeit zur spontanen Faltung besitzen [1] [2] [3]. Sie sind damit unter geeigneten experimentellen Bedingungen auch **ohne die Hilfe weiterer Faktoren** in der Lage, ihre native, dreidimensionale Struktur einzunehmen. Diese Struktur wird allein durch die Aminosäuresequenz der Proteine definiert. Die spontane Proteinfaltung erfolgt zudem auch im Reagenzglas in biologisch sinnvollen Zeiträumen [4]. Aufgrund theoretischer Modellrechnungen wurde bereits früh die Meinung vertreten, dass zum Erreichen der nativen Proteinstruktur nicht alle theoretisch denkbaren konformationellen Zustände von der faltenden Polypeptidkette durchlaufen werden können, da ein solcher ungerichteter Faltungsprozeß nur in astronomischen zeitlichen Dimensionen möglich wäre (Levinthal Paradoxon). Stattdessen sollte die Proteinfaltung entlang eines fest vorgegebenen Faltungsweges über definierte Faltungsintermediate erfolgen [5] [6]¹. Gemäß gegenwärtiger Vorstellungen können die Prozesse der Proteinfaltung energetisch als Bewegungen auf einer dreidimensionalen Energielandschaft beschrieben werden [11]. Die Faltung ist demnach auf das Erreichen der nativen Struktur im absoluten Energieminimum ausgerichtet. Zum Erreichen dieses Ziels können viele verschiedene Wege eingeschlagen werden. Teile der Proteinpoptulation durchlaufen hierbei auch unproduktive Seitenwege sowie metastabile, sog. 'kinetisch gefangene' Intermediate [12] [13] [14]. Produktive Proteinfaltung und Proteinaggregation laufen immer als Konkurrenzreaktionen ab, deren relative Bedeutung unter den gewählten *in vitro* Versuchsbedingungen von der Anreicherung produktiver oder unproduktiver Faltungsintermediate abhängt.

1.1.2 Proteinfaltung *in vivo*

Die *in vitro* Bedingungen üblicher Proteinfaltungsexperimente unterscheiden sich erheblich von den Rahmenbedingungen, unter denen sich die Proteinfaltung *in vivo* vollzieht. Zum einen besitzt das zelluläre Milieu eine wesentlich

¹Solche Faltungsintermediate konnten zudem für eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, siehe z. B. [7] [8] [9] [10]

komplexere Zusammensetzung als die wohldefinierte Reagenzglassituation. Zum anderen gilt es in der lebenden Zelle neben der posttranslationalen Proteinfaltung einer vollständig synthetisierten Polypeptidkette, vor allem die vektorielle, kotranslationale Proteinfaltung naszierender Proteine am Ribosom zu gewährleisten. Die Notwendigkeit zum Transport entfalteter Proteine durch Biomembranen und über Organellgrenzen hinweg kompliziert die Faltungsereignisse *in vivo* in vielen Fällen zusätzlich.

Das intrazelluläre Milieu hat nicht die Eigenschaften solcherart verdünnter Proteinlösungen, wie sie aus pragmatischen Gründen in typischen *in vitro* Proteinfaltungsexperimenten eingesetzt werden. Es handelt sich vielmehr um eine makromolekular sehr dichtgedrängte Umgebung mit Proteinkonzentrationen² von 200-300 mg/ml [15] [16]. Theoretische Überlegungen lassen einen starken Einfluß von aus dermaßen hohen Makromolekülkonzentrationen resultierenden Volumenausschlußeffekten³ auf molekulare Assoziationskinetiken und Bindungsgleichgewichte erwarten. Insbesondere sollten die Assoziationskonstanten von Makromolekülen unter diesen Bedingungen um mehrere Größenordnungen ansteigen [17] [18].

Nicht-native Proteine exponieren in frühen Faltungsstadien⁴ hydrophobe Oberflächen, die im Verlauf der Faltung zur nativen Struktur zunehmend im Molekülinneren verborgen werden [19]. Diese hydrophoben Oberflächen neigen besonders zur unspezifischen Assoziation und verursachen die irreversible Aggregation ungefalteter Proteine. Solche unproduktive Prozesse sollten nach der **Theorie des 'molekularen Crowdings'** unter *in vivo* Bedingungen gegenüber der Situation in verdünnter Lösung wesentlich begünstigt ablaufen⁵. *In vivo* sind entsprechend dieser theoretisch fundierten Erwartungshaltung Faltungshelferproteine, sog. **molekulare Chaperone**⁶, bedeutende Faktoren der Proteinfaltung und essentiell für das Überleben der Zelle [20] [21] [22] [23] [24] [25]. Molekulare Chaperone verhindern die unproduktive intra- und intermolekulare Zusammenlagerung ungefalteter Polypeptidketten, indem sie die exponierten, hydrophoben Oberflächen ihrer Substrate in regulierter Form maskieren und wieder freisetzen [20] [21]. Molekulare Chaperone wirken nicht formgebend auf ihre Substrate ein und beschleunigen

²Der Proteingehalt z. B. der mitochondrialen Matrix wird auf 60-70% geschätzt, entsprechend dem Proteingehalt eines Proteinkristalls.

³*engl.*: molecular crowding, crowding effects;

⁴sog. 'molten globules'; diese Faltungsstadien zeichnen sich durch einen variablen Gehalt an Sekundärstruktur aus, es fehlt ihnen jedoch noch die für das native Protein charakteristische Tertiärstruktur;

⁵Unter Annahme der Gleichverteilung von Ribosomen in der Zelle errechnet sich für in das Zytosol entlassene, naszierende Proteinketten eine Konzentration von ca. 35 μ M.

⁶*engl.*: molekulare Anstandsdamen;

typischerweise nicht deren Faltungskinetiken⁷, sondern steigern die Ausbeute der produktiven Proteinfaltung durch Abreicherung aggregationsanfälliger Faltungsintermediate und Unterdrückung der Proteinaggregation⁸.

1.1.3 Aufgaben und Zusammenspiel molekularer Chaperone

Zur Bewältigung vielfältiger komplexer Aufgaben existieren in der Zelle verschiedene Familien molekularer Chaperone, welche unterschiedliche molekulare Strategien verfolgen, sich funktionell ergänzen und zur Bewältigung gemeinsamer Aufgaben auf eine gegenseitige Kooperation angewiesen sind (Tab. 1) [30].

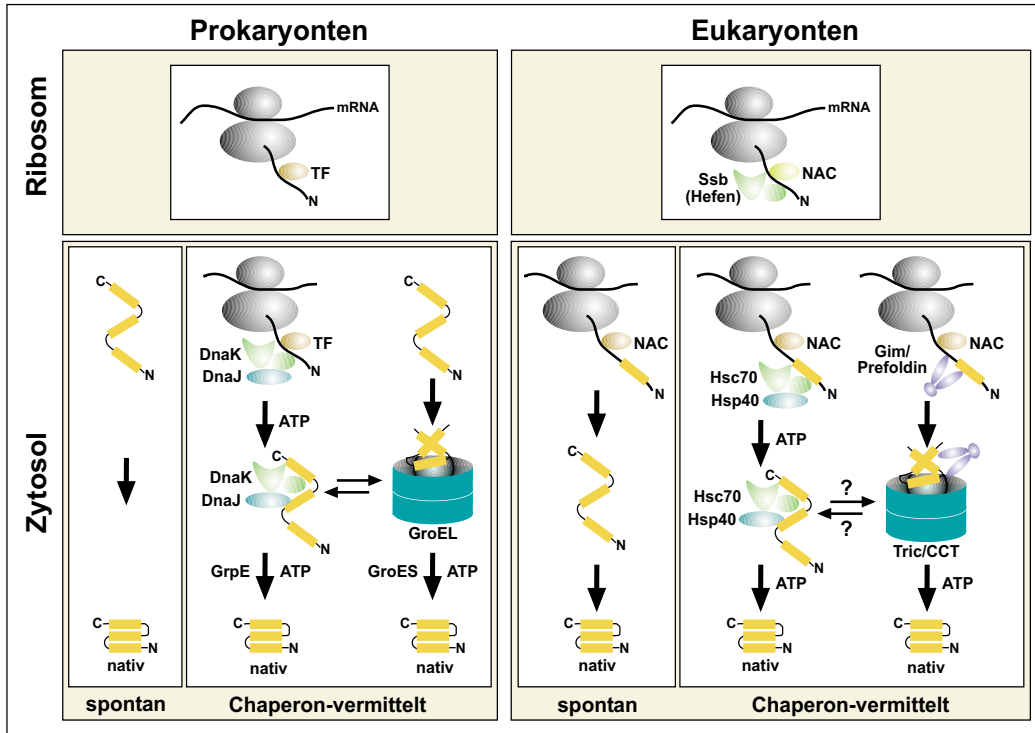
Abb. 1 (A) zeigt die Interaktion neusynthetisierter Polypeptidketten mit den bestuntersuchten Vertretern der zellulären Chaperonmaschinerie. Molekulare **Chaperone der Hsp70 und Hsp40 Familien** assistieren der *de novo*-Faltung naszierender Proteine am Ribosom [32] in Kooperation mit dem Faltungshelferenzym Trigger Faktor⁹ (in *E. coli*) [33] [34], bzw. in Gegenwart des sog. Nascent Chain Associated Complex (NAC, in Hefen und höheren Eukaryoten) [35]. Während Hsp70 Chaperone, wie das bakterielle DnaK, lineare Polypeptidketten früher Faltungsstadien stabilisieren und vor Aggregation schützen [36] [37] [38] [39], erkennen zylinderförmige Chaperonine vom Typ I, wie das bakterielle GroEL-System, Strukturen höherer Ordnung [40] [41] (Kapitel 1.1.4). **Das GroEL/ES-System** übernimmt neusynthetisierte Substrate vom DnaK/J-System und assistiert deren Faltung bis zur nativen Struktur [42] (Kapitel 1.1.4). In Abwesenheit zellulärer Streßbedingungen nehmen 10-15% aller cytosolischen *E. coli* Proteine das GroEL/ES System in Anspruch [42]. Die natürlichen GroEL-Substrate erfüllen ein breites Spektrum zellulärer Funktionen von grundlegenden Stoffwechseleistungen bis zur Transkriptionsregulation. Strukturell fallen sie durch einen statistisch erhöhten Gehalt an $\alpha\beta$ -Faltungseinheiten auf [41]. Auch DnaK besitzt ein sehr breites Substratspektrum *in vivo* [43]. Einige Proteine nehmen im

⁷Die Wirkungsweisen molekularer Chaperone sind Gegenstand der aktuellen Forschung und der wissenschaftlichen Diskussion. Alternative Modelle wurden vorgeschlagen [26]. Proteinfaltungsenzyme wie die Proteindisulfitisomerase (PDI) oder Peptidylprolylisomerasen (PPIasen), welche eine katalytische Wirkung auf geschwindigkeitsbestimmende Faltungsschritte ihrer Substrate entfalten, werden durch den Begriff 'molekulares Chaperon' nicht beschrieben.

⁸Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die spontane Faltung aggregationsanfälliger Modellproteine auch *in vitro* unter Bedingungen makromolekularen Crowdings stark beeinträchtigt ist, die Aktivität molekularer Chaperone dagegen jedoch gegenüber der Situation in verdünnter Lösung ansteigt [27] [28] [29].

⁹Trigger Faktor besitzt eine Peptidylprolylisomerase Aktivität.

A)



B)

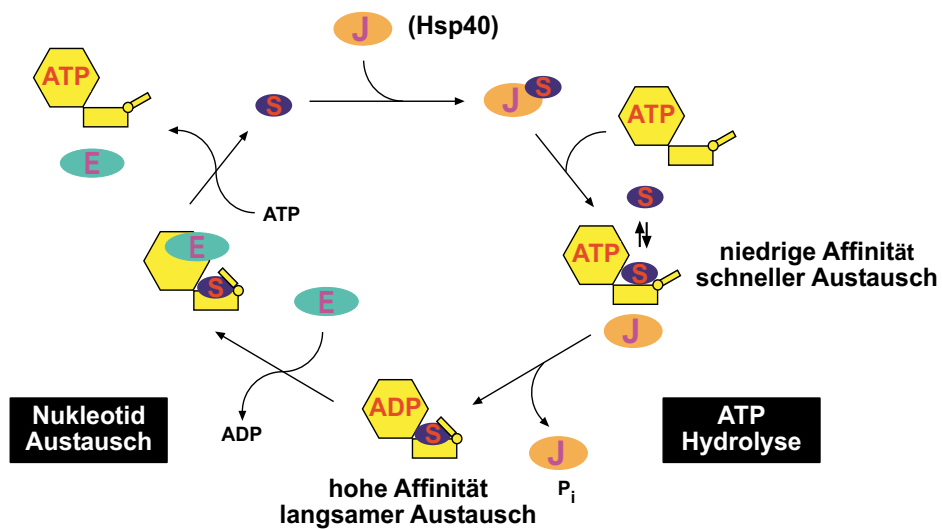


Abbildung 1: Kooperation molekularer Chaperone *in vivo* und *in vitro* (A) Zelluläres Zusammenspiel molekularer Chaperone bei der *de novo* Proteinfaltung (modifiziert nach [31]). (B) Reaktionszyklus von Hsp70 und Nukleotidregulation der Substratbindung. S = Substrat, E = Nukleotid-Austauschfaktoren, J = J-Domänenprotein (Hsp40-Familie).

Lauf ihres 'Lebenszyklus' [44] die Hilfe molekularer Chaperone auch wiederholt in Anspruch [41] [45].

Die Chaperon-assistierten Proteinfaltungswege verlaufen in eukaryotischen Zellen über ähnliche Zwischenstadien wie in Bakterien. Gegenüber prokaryotischen Zellen besteht in Eukaryoten jedoch eine größere Tendenz zur kotranslationalen Faltung neusynthetisierter Polypeptidketten, da eukaryotische Proteine im Mittel größer sind als prokaryotische Proteine und sich aus einer größeren Anzahl unabhängiger Faltungseinheiten zusammensetzen [46]. Die gegenüber Bakterienzellen in Eukaryoten stark verlangsamte Translationsgeschwindigkeit fördert die Tendenz zur kotranslationalen, domänenweisen Faltung der naszierenden Polypeptidketten zusätzlich. Die Chaperonine des eukaryotischen Zytoplasmas (Typ II Chaperonine), wie TRiC, sind funktionell und mechanistisch wesentlich schlechter verstanden als das bakterielle GroEL/ES-System [47] [48] [49]. Sie besitzen keinen 'klassischen' GroES ähnlichen Kofaktor, sondern kooperieren mit dem erst kürzlich entdeckten Chaperon GimC/Prefoldin, welches naszierende Aktin- und Tubulinketten bindet und sie an TRiC weiterreicht [50] [51] [52].

Hefen und höhere eukaryotische Zellen besitzen mit der **Hsp90 Familie** eine weitere essentielle Klasse von Faltungshelferproteinen (Kapitel 1.2)¹⁰. Im Gegensatz zur Hsp70 Familie sowie dem GroEL/ES System besitzen die Hsp90 Proteine ein sehr enges Spektrum an Substraten, die überwiegend in funktionellem Zusammenhang mit Prozessen der Signaltransduktion und Zellzyklusregulation stehen (Kapitel 1.2.1). Hsp90 kooperiert sehr eng mit der Hsp70 Maschinerie, indem es, ähnlich dem GroEL/ES-System in *E. coli* Zellen, seine spezifischen Substrate von Hsp70 übernimmt. Hsp90 assistiert daraufhin der Reifung dieser Signalmoleküle und stabilisiert sie in einem metastabilen aktivierungskompetenten Zustand. (Kapitel 1.2.2, Abb. 2).

Nach Einwirkung zellulärer Streßbedingungen, wie z. B. Hitzeschock, werden molekulare Chaperone verstärkt exprimiert [91], eine Beobachtung, die für ihre Bezeichnung als **Hitzeschockproteine** (Hsp) ausschlaggebend gewesen ist. Unter Bedingungen von Zellstreß sind insbesondere die sog. 'kleinen' und ATP-unabhängig wirkenden Hitzeschockproteine mit ihrer sog. 'generellen' Chaperonaktivität von Bedeutung für die Unterdrückung der Proteinaggregation *in vivo* [54] [55] [56] [57]. Chaperone der Hsp100 Familie sind zudem unter diesen Bedingungen in der Lage, Proteinaggregate zu modulieren und in Kooperation mit Hsp70 zu deren Auflösung beizutragen [87] [88] [89].

Weitere Aufgaben erfüllen Chaperone im Rahmen des intrazellulären Pro-

¹⁰Der bakterielle Vertreter HtpG ist nicht essentiell, seine zelluläre Funktion sowie seine Substrate sind unbekannt.

Tabelle 1: Familien Molekularer Chaperone

Eine Einführung in die einzelnen Klassen molekularer Chaperone bietet auch [53].
Mt. : Mitochondrien, Chlp. : Chloroplasten, Zyt. : Zytosol.

Familien	Kofaktoren	Referenzen
'Kleine Hsps'	keine	[54] [55] [56] [57]
Hsp60 / Chaperonine		
<i>Typ I:</i>		
GroEL (<i>E. coli</i>)	GroES	[58] [59] [60] [61]
Hsp60 (Mt., Chlp.)	Hsp10	[62] [63]
<i>Typ II:</i>		
TRiC (<i>Eukaryoten</i> , Zyt.)	GimC/Prefoldin	[47] [48] [49] [50]
Hsp70		
<i>E. coli:</i>		
DnaK	DnaJ GrpE	[38] [39] [64] [65] [66] [67]
Hsc66	Hsc20	[24]
Hsc62	nicht bekannt	[24]
<i>Hefen:</i>		
SSA1-4, SSB1,2 (Zyt.)	YDJ1 (Hsp40), SIS1	[32] [68]
SSC1 (Mit.)	MDJ1, TIM44, mGrpE	[69]
Kar2/BiP (ER)	SCJ1 Sec63	[68] [70] [71] [72]
<i>Höhere Eukaryoten:</i>		
Hsp72 (Zyt., induzierbar)	Hsp40, Hdj2/3, BAG1 Hop, Hcp, CHIP, Hip	[73] [74] siehe Tabelle 3
Hsp73 (Zyt., konstitutiv)	wie Hsp72	
mHsp70 (Mit.)	TIM44	[69]
BiP (ER)	Sec63	[36] [37] [70]
Hsp90		
<i>E. coli:</i> HtpG	nicht bekannt	[75]
<i>Hefen:</i> Hsp82 (Zyt.)	siehe Tabelle 3	[76] [77] [78]
<i>Höhere Eukaryoten:</i>		
Hsp90 α (Zyt., induzierbar)	siehe Tabelle 3	[76] [79] [80]
Hsp90 β (Zyt., konstitutiv)	siehe Tabelle 3	[81]
Hsp75 (Mit.)	nicht bekannt	[81]
Gp96 (ER)	nicht bekannt	[82] [83] [84]
Hsp100		
<i>E. coli:</i> Clps	(ClpP)	[85] [86] [87] [88]
<i>Hefen:</i> Hsp104	keine	[89] [90]

teintransports sowie des Proteinimports in verschiedene Zellorganellen [69] [71] [72] [92]. Auch eine Rolle im Rahmen der Antigenpräsentation wird diskutiert. Hier sollen molekulare Chaperone als intra- sowie extrazelluläre Überträger antigener Peptide eine Adjuvantwirkung entfalten [82] [84] [93] [94]. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Modulation von Aggregationsprozessen wird einigen Chaperonklassen ein Einfluß im Zusammenhang mit solchen neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington und den Prionenerkrankungen [95] [96] [97] zugesprochen, die mit Proteinmißfaltung einhergehen [96] [97] [98] [99].

Ungefaltete und mißgefaltete Proteine sind Substrate nicht nur molekularer Faltungshelferproteine, sondern auch zelluärer Proteasen. Die Einstellung eines ausgewogenen Gleichgewichts von Chaperon- und Proteaseaktivitäten in der Zelle ist somit von essentieller Wichtigkeit. Mechanismen der Qualitätskontrolle von Proteinkonformationen, bzw. der Sortierung fehlgefalteter Proteine in Rückfaltungs- oder Abbauege wurden postuliert [100] [101] (Kapitel 1.2)¹¹. Molekulare Chaperone begegnen ihren vielfältigen zellulären Aufgaben durch Differenzierung, Spezialisierung und Aufgabenteilung. Daraus resultiert die Notwendigkeit zur funktionellen Kooperation, die sich in der Ausbildung definierter Proteinfaltungswege und -netzwerke sowie der Zusammenlagerung von Faltungshelfern zu Multichaperonkomplexen niederschlägt und die Kanalisierung nicht nativer Polypeptidketten durch die Faltungssysteme der Zelle zur Folge hat [103]. Ein solches produktives Zusammenspiel zahlreicher Komponenten ist nicht ohne ein hohes Maß an Spezifität und Regulation der erforderlichen Proteininteraktionen denkbar (Kapitel 1.3).

1.1.4 Molekulare Mechanismen der Hsp60 und Hsp70 Familien

Die mechanistisch und strukturell am besten verstandenen Chaperonfamilien sind die der Hsp70 Proteine sowie die Typ I Chaperonine der Hsp60 Familie [21] [104]. Hsp70 und Hsp60 zeichnen sich durch zwei sehr unterschiedliche Wirkmechanismen aus.

Das zentrale **Wirkprinzip der Hsp70-Familie** besteht in der durch ATP-Bindung und -Hydrolyse regulierten Maskierung und Freisetzung ausgestreckter hydrophober Bereiche ihrer Substratmoleküle [36] [37] [38] [39] [105]. Die C-terminale Domäne von Hsp70 dient hierbei der Substratbindung [64] [106]

¹¹In diesem Zusammenhang sei insbesondere auf den Zusammenhang zwischen der Oberflächenhydrophobizität auch nativer Proteine und ihrem Turnover in der lebenden Zelle hingewiesen [102].

[107]¹² (Abb. 1 (B)). Hsp70 erkennt hierbei im Substratprotein ein lineares Konsensusmotiv hydrophober Ankerreste [39]. Durch ATP-Hydrolyse wandelt sich die 'offene' Hsp70-Konformation, welche die Substrate mit schnellen k_{on} - und k_{off} -Raten bindet, in eine 'geschlossene' Form, welche die Substrate nur sehr langsam bindet und entläßt. Der ATPase-Zyklus von Hsp70 ermöglicht hierdurch die regulierte Abschirmung und Freisetzung aggregationsanfälliger Regionen des Substrats, welches jeweils nach Ablösung von Hsp70 die Möglichkeit zur weiteren schrittweisen Faltung und zum Einschluß der hydrophoben Hsp70-Bindungsstelle im Inneren der nativen Proteinstruktur bekommt. Der Reaktionszyklus von Hsp70 wird durch eine Reihe von Kofaktoren reguliert. So stimulieren die Mitglieder der Hsp40-Familie die ATPase-Aktivität von Hsp70 mittels ihrer J-Domäne um ein Vielfaches [73] [108] und fördern die Substratbindung durch Überführung von Hsp70 aus der geöffneten in die geschlossene Konformation. Der Kofaktor Hip festigt die Substratbindung an Hsp70 durch Stabilisierung der geschlossenen Form [109] [110]. Die Nukleotidaustauschfaktoren GrpE und BAG1 schließen den Zyklus und erlauben die Freisetzung des Substrates von Hsp70 [66] [67] [111] [112] [113] [114] [115].

Die **Chaperonine der Hsp60-Familie** besitzen einen gänzlich anderen Faltungsmechanismus, der insbesondere im Fall des bakteriellen Chaperonins vom Typ I, GroEL, gut untersucht ist [58] [59] [61]. GroEL formt einen zylindrischen Doppelring, welcher zwei zentrale Kavitäten umschließt. Die GroEL Substrate binden in einer kollabierten Form [40] an den äußeren Rand einer solchen Kavität. Induziert durch die Bindung von ATP und des Kofaktors GroES an dieselbe 'cis-Seite' des Doppelrings, wird ein einzelnes Substratprotein in einer Kavität eingekapselt und kann in dem entstehenden 'Anfinsen-Käfig' wie in einer unendlich verdünnten Lösung vor Aggregation geschützt zum nativen Protein falten¹³ [116]. Nach ATP-Hydrolyse und Bindung von ATP am gegenüberliegenden 'trans-Ring' wird GroES abgelöst. Native Substratproteine werden freigesetzt. Im Gegensatz zum Mechanismus der TypI Chaperonine ist die Funktionsweise der Chaperonine des eukaryotischen Zytoplasmas (Typ II) nur ansatzweise aufgeklärt [47] [48] [60].

¹²Hsp70 besteht aus einer hochkonservierten, N-terminalen Domäne (44kDa), welche die ATP-Hydrolyse katalysiert, sowie einer C-terminalen Domäne (25 kDa). Die C-terminale Domäne von Hsp70 gliedert sich in eine stark konservierte, substratbindende Subdomäne (15 kDa) und eine weitere, weniger konservierte C-terminale Region (10 kDa).

¹³vgl. jedoch auch [26];

1.2 Die Hsp90-Familie molekularer Chaperone

1.2.1 Funktionen von Hsp90

Der Hsp90 Familie molekularer Chaperone werden *in vivo* grundsätzlich verschiedene Funktionen zugeschrieben, je nachdem, ob normale Lebensbedingungen vorherrschen oder Bedingungen zellulären Stresses [45] [117] [118] [119] (Abb. 2 (A)). Unter Streßbedingungen wirkt Hsp90 demnach als 'generelles', aber passives, d. h. ATP-unabhängiges Chaperon auf ein sehr breites Substratspektrum, z. B. hitzedenaturierte Proteine. Es verhindert deren Aggregation und erhält sie in einem löslichen Zustand. Nach Transfer dieser 'generellen' Hsp90-Substrate auf Hsp70 erfolgt daraufhin die durch Hsp70 und seine Kofaktoren vermittelte aktive, d. h. ATP-abhängige Rückfaltung [120] [121] (Kapitel 1.1.4). Hsp90 allein besitzt die Fähigkeit zur aktiven Rückfaltung mißgefalteter Proteine nicht. *In vitro* kann Hsp90 jedoch in einer ATP-unabhängigen Reaktion die Aggregation zahlreicher Modellsubstrate unterdrücken [122] [123] [124] [125]. Für Hefen konnte eine Beteiligung von Hsp90 bei der Reaktivierung hitzedenaturierter Proteine auch *in vivo* gezeigt werden [126]. Entsprechend der generellen Bedeutung von Hsp90 bei Hitzestreß wird dessen Expression unter diesen Bedingungen stark erhöht¹⁴ [81]. Dies gilt sowohl für die zytosolischen Formen von Hsp90 als auch für das nur in höheren eukaryotischen Zellen auftretende, im ER lokalisierte Homologe GP96 [127] [128]. Auch unter normalen Wachstumsbedingungen liegt Hsp90 jedoch in sehr hohen Konzentrationen vor und macht 1-2% des zytosolischen Gesamtproteins aus. Eukaryotische Hsp90-Varianten treten zudem ubiquitär in allen Zellen des Organismus auf und sind unter allen Wachstumsbedingungen essentiell [81] [129]. Das eubakterielle Hsp90-Homologe (HtpG) konnte zwar in bislang allen untersuchten Genomen identifiziert werden, ist aber unter normalen Wachstumsbedingungen entbehrlich.

Zytosolisches Hsp90 eukaryotischer Zellen besitzt in Abwesenheit von Zellstreß zudem eine **sehr spezifische Chaperonaktivität**, die durch ATP reguliert wird und vom orchestrierten Zusammenspiel mit Hsp70 und einer Vielzahl von Kofaktoren abhängig ist (Tabelle 3, Abbildung 2 (A))¹⁵. Die ATPase-Aktivität von Hsp90 ist für dessen spezifischen Chaperonfunktionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* essentiell [78] [130] [131] [132]. Während Hsp90 *in vivo* für die *de novo* Faltung der meisten Proteine nicht erforderlich zu sein scheint [126], ist es für die Reifung und Aktivierung eines sehr

¹⁴in eukaryotischen Zellen treten zwei zytosolische Hsp90-Isoformen, Hsp90 α und Hsp90 β auf, wobei die Expression von Hsp90 α wesentlich stärker durch Hitze induziert wird als die Expression von Hsp90 β .

¹⁵Kofaktoren des *E. coli* Homologen HtpG konnten bislang nicht identifiziert werden.

definierten Satzes von Substratproteinen absolut notwendig. Auffälligerweise handelt es sich bei der überwiegenden Anzahl dieser spezifischen Hsp90 Substrate um Signaltransduktoren und Zellzyklusregulatoren ([45], Tab. 2). Steroidhormonrezeptoren und Proteinkinasen sind klassische Beispiele spezifischer Hsp90 Substrate (Tab. 2). Nach gegenwärtigen Vorstellungen übernimmt Hsp90 späte Faltungsstadien dieser Moleküle von Hsp70¹⁶ und fördert die Einstellung und Erhaltung einer metastabilen, aktivierungskompetenten Konformation. Derart gereifte Signalproteine erreichen nach Ligandenbindung¹⁷ oder in Folge kovalenter Proteinmodifikationen¹⁸ ihre stabile, aktive Konformation, deren Erhaltung nicht länger von Hsp90 abhängt.

Aufgrund seiner Beteiligung bei der Aktivierung einer Vielzahl von Signaltransduktionskomponenten und Zellzyklusregulatoren ist Hsp90 ein pharmakologisches **Zielmolekül für die Krebstherapie**. Ansamycinantibiotika wie Geldanamycin, Herbimycin A und Radicol [136] [137] [138], die als spezifische Inhibitoren der Hsp90 ATPase-Aktivität wirken [76] [77] [79] [139], zeigen eine Antitumoraktivität in Zellkulturexperimenten [140] [141] [142] [143] und wurden bereits in präklinischen Studien als Antitumoragentien getestet [144]. Geldanamycin verdrängt ATP aus seiner Bindungstasche in der aminoterminalen Domäne von Hsp90 [79] (Kapitel 1.2.2) und bewirkt die Dissoziation von Hsp90 Multichaperon-Substratkomplexen sowohl in Zellysaten als auch *in vivo* [139] [140] [145] [146] [147]. Die unreifen Hsp90 Substrate werden dem proteasomalen Proteinabbau zugeführt. Geldanamycin erzwingt daher die Verschiebung des zellulären Gleichgewichtes von Proteinfaltung und Proteindegradation in Richtung der Degradation [148] [149]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird für Hsp90 auch eine Rolle im Rahmen von Qualitätskontrollmechanismen diskutiert, welche den Abbau, bzw. die Rückfaltung nicht-nativer Proteinsubstrate regulieren [100] [149]. Für den gemeinsamen Kofaktor von Hsp70 und Hsp90 CHIP wird in diesem Zusammenhang eine Brückenfunktion zwischen der zellulären Proteinfaltungs- und Proteindegradationsmaschinerie diskutiert [150] [151] [152] (siehe auch Kapitel 1.2.4).

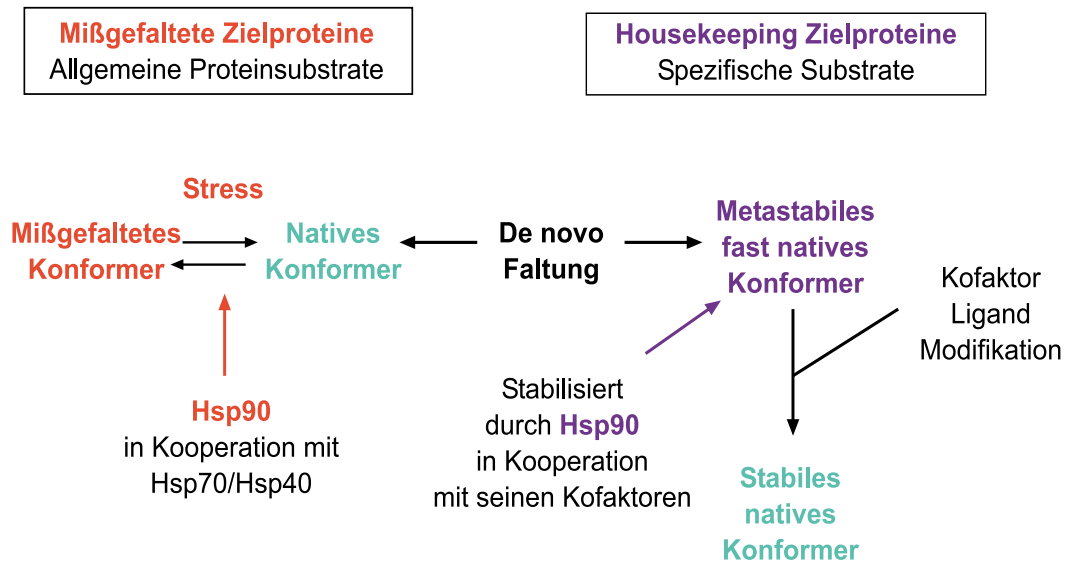
Weiterhin wurden der Hsp90 Familie Funktionen im Rahmen des Centrosomen-Zyklus [153] [154] sowie des apoptotischen Zelltods zugesprochen [155] [156]. Bei der Antigenpräsentation fungieren Hsp90 und insbesondere GP96

¹⁶im Gegensatz zum Modell der Hsp90 Aktivität unter Zellstressbedingungen: Hier erfolgt der Substratfluß umgekehrt von Hsp90 auf Hsp70 mit dem Ziel der durch Hsp70 vermittelten Substratrückfaltung [120] [121];

¹⁷z. B. Bindung von Hormonen an Steroidhormonrezeptoren [133], Bindung von Häm an die eIF-2 α -Kinase [134], Bindung von CyclinD an die Cdk4-Kinase [80]

¹⁸z. B. Phosphorylierung von Src-Kinasen [135]

A)



B)

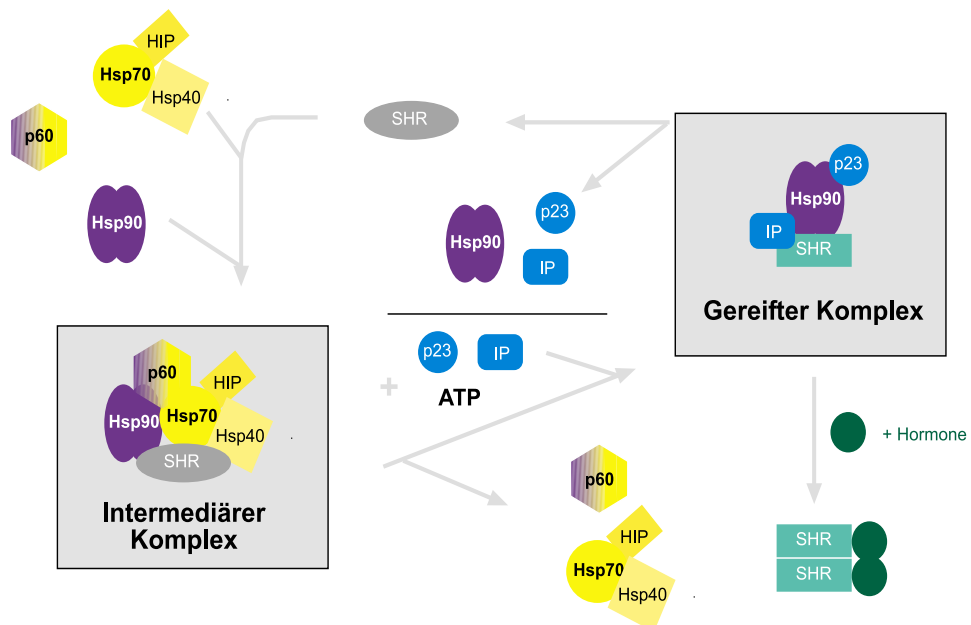


Abbildung 2: Funktionen der Hsp90 Multichaperon Maschinerie
 (A) Hsp90 Funktionen nach Zellstreß (rot) und in der ungestreßten Zelle (violett) (modifiziert nach [80]). (B) Der Hsp90 Reaktionszyklus zur Reifung von Steroidhormonrezeptoren (modifiziert nach [119]).

als intra- und extrazelluläre Überträger immunogener Peptide. Chaperon-Peptidkomplexe werden durch rezeptorvermittelte Endozytose von professionellen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, welche die gebundenen Antigene auf ihrer Oberfläche repräsentieren und eine spezifische Immunantwort einleiten [82] [83] [84] [93] [94] [157]. Eine Verbindung zwischen der zellulären Funktion von Hsp90 bei der Faltung von Signaltransduktionsmolekülen und den Mechanismen morphologischer Evolution in *Drosophila melanogaster* wurde hergestellt [158].

1.2.2 Kooperation der Hsp70 und Hsp90 Maschinerien

Am besten ist der **Reaktionszyklus von Hsp90** für Steroidhormonrezeptoren (SHRs) als Substrate charakterisiert [133] [181] [182] (Tab. 2 (B)). Neusynthetisierte, monomere apoSHRs assoziieren zunächst mit Hsp70 und seinen Kofaktoren Hsp40, Hip und BAG1 unter Ausbildung des sog. **frühen Komplexes**. Das Adapterprotein p60/Hop¹⁹ rekrutiert daraufhin Hsp90 in den **intermediären Komplex** (Abbildung 3 (A)). p60 optimiert das funktionelle Zusammenspiel von Hsp70 mit Hsp90 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ohne selber unter ansonsten optimalen Randbedingungen für die Kooperation von Hsp70 und Hsp90 notwendig zu sein [183] [184] [185] [186] [187] [188] [189]. Ein regulatorischer Einfluß von p60 auf die Hsp90 ATPase Aktivität wurde beschrieben [190]. Die funktionelle Konsequenz dieser Beobachtung ist jedoch bislang unklar. Die ATPase Aktivität von Hsp70 wird durch p60 nicht beeinflusst [185] [191]. Nach Ausbildung des intermediären Komplexes werden die apoSHRs von Hsp70 auf Hsp90 übertragen. Im Anschluß an den Substrattransfer dissoziiert p60 mitsamt der Hsp70-Maschinerie. Aus dem intermediären Hsp90 Komplex geht der sog. **gereifte Komplex** hervor. Im gereiften Komplex ist der weiterhin monomere Steroidhormonrezeptor an Hsp90 gebunden und liegt im Komplex mit weiteren Hsp90 Kofaktoren, wie den großen Immunophilinen FKBP51, FKBP52 oder Cyp40 und p23 [133] [192] [193] [194] [195], vor. Die genannten großen Immunophiline besitzen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften [196] [197]. Die Ausbildung des gereiften Komplexes und die Bindung von p23 an Hsp90 ist ATP-abhängig [182] [198] [199] [200]. Ausgelöst durch ATP Hydrolyse und unterstützt durch den Substratfreisetzungsfaktor p23 wird der monomere Steroidhormonrezeptor in einer hormonbindungsfähigen Konformation aus dem gereiften Komplex freigesetzt. Der Rezeptor dimerisiert nach der Hormonbindung, tritt in den Zellkern ein und initiiert die DNA Transkription [133] [198] [199] [200] [201]. In Abwesenheit von Steroidhormonen verlieren die SHRs nach Zerfall

¹⁹Hop: Hsp70-Hsp90 organisierendes Protein.

Tabelle 2: Hsp90 Substrate

Substrat Protein	Referenz
Steroidhormonrezeptoren	
Ecdyson Rezeptor	[159]
Glucocorticoid Rezeptor	[160]
Progesteron Rezeptor	[161]
Östrogen Rezeptor	[162]
Androgen Rezeptor	[162]
Mineralocorticoid Rezeptor	[163]
Andere Transkriptionsfaktoren	
p53	[164]
HSF1	[165]
Protein Kinasen	
v-Src, c-Src	[166] [167] [168]
Lck	[135] [169]
Wee1	[170]
Sevenless RTK	[171]
Raf	[172]
Mos-Kinase	[173]
CDK2/4	[174] [175]
Häm-regulierte eIF-2 α Kinase	[134]
Polo Kinase	[154]
Weitere	
Rb	[176]
Telomerase	[177]
NO-Synthase	[178]
CFTR	[179]
Apaf-1	[155]
SV40 Large T Antigen	[180]

des gereiften Komplexes ihre Hormonbindungskompetenz, assoziieren erneut mit Hsp70 und treten in einen weiteren Reifungszyklus ein.

Die Reifung anderer Hsp90 Substrate als der SHRs verläuft voraussichtlich ebenfalls über die beschriebenen frühen, intermediären und gereiften Komplexe als Zwischenstadien. So wurde eine Beteiligung der Kofaktoren p60, p23 und der Immunophiline auch bei der Aktivierung von Src-Kinasen [193] [187] und der Telomerase [177] nachgewiesen. Zudem treten weitere, teilweise substratspezifische Hsp90 Kofaktoren auf. CDC37 z. B. gilt als spezifischer Kofaktor der Proteinkinasenreifung [174] (Kapitel 1.2.4)²⁰. Andere Kofaktoren, wie z. B. die Proteinphosphatase PP5 [203] (Kapitel 1.2.4), weisen eine geringere Substratspezifität auf. Ihr funktioneller Beitrag zur Hsp90 vermittelten Proteinfaltung ist unbekannt.

1.2.3 Strukturelle und mechanistische Aspekte von Hsp90

Hsp90 besteht aus einer aminoterminalen, einer mittleren und einer carboxyterminalen Domäne [79] [204] (Abb. 3 (A)). **Die N-terminale Domäne von Hsp90 (N90)** enthält die Bindungstasche für ATP [77] [205], bzw. für Antibiotika wie Geldanamycin [79] und Radicol [76] (Abb. 3 (B)). Während N90 keine strukturellen Übereinstimmungen mit dem klassischen 'Walker'-Motif ATP-bindender Proteine [206] aufweist, bestehen große Ähnlichkeiten mit den ATP-bindenden Domänen der Topoisomerase GyraseB [207], des DNA Reparaturenzyms MutL [208] sowie der Histidinkinase CheA [209]. Die Struktur von N90 besteht aus einem $\alpha + \beta$ -Sandwich. Acht antiparallel verlaufende β -Faltblätter formen den Boden der durch neun α -Helices geformten ATP-Bindungstasche. Strukturvergleiche zwischen den ATP-bindenden Domänen der GyraseB und von Hsp90 deuten eine 'Deckel'-Funktion zweier α -Helices²¹ an. Diese Helices regulieren möglicherweise im Verlauf des Hsp90-ATPasezyklus die Zugänglichkeit der ATP-Bindungstasche [77].

Der mittleren Domäne von Hsp90 (M90) konnte bislang keine Funktion zugeordnet werden. Die **carboxyterminale Domäne (C90)** dagegen enthält wesentliche Komponenten der für die Hsp90 Dimerisierung verantwortlichen Strukturen [210] [211]. Ferner ist die Andockstelle für TPR-Kofaktoren in C90 lokalisiert [183] [212] [213] [214] [215]. Sowohl der isolierten N-terminalen Domäne als auch der C-terminalen Domäne wurden *in vitro* generelle Chaperonaktivitäten zugeschrieben [123] [124] [125], was als

²⁰siehe jedoch [202]

²¹Aminosäuren 94-124 und insbesondere die Region zwischen den als Scharnieren wirkenden Glycinresten Gly100 und Gly118 in der Sequenz des Hefeproteins Hsp82 (Brookhaven ID: 1AMW);

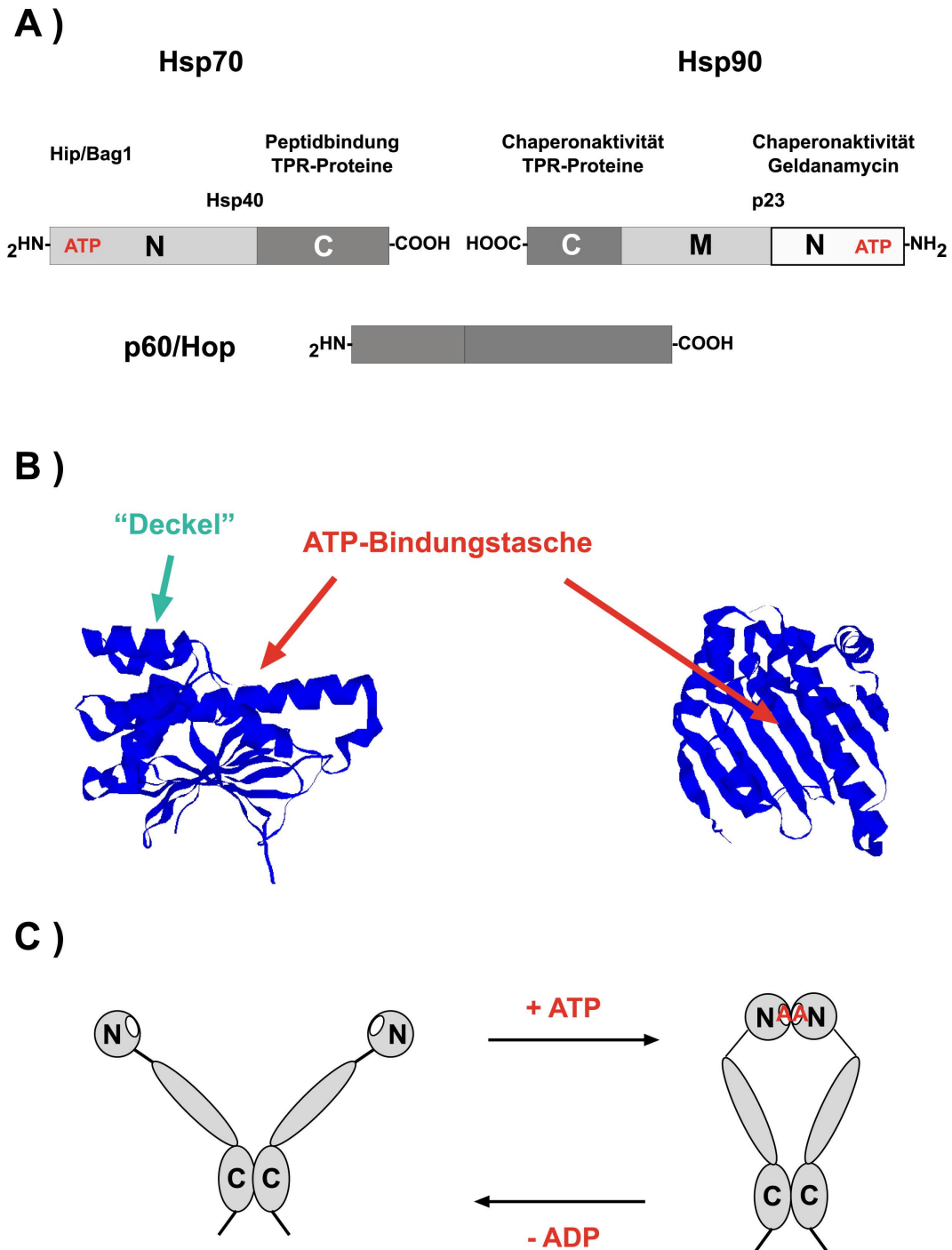


Abbildung 3: Strukturelle und mechanistische Aspekte von Hsp90
 (A) Der intermediäre Hsp70-p60/Hop-Hsp90-Komplex. Die Grenzen und Funktionen der Hsp70 und Hsp90 Domänen sind angegeben. Die TPR Motive in p60 sind durch gelbe Kästen symbolisiert. (B) 'Molekulares Klammermodell' konformationeller Änderungen im Hsp90 ATPase-Zyklus [78]. (C) Röntgenkristallstruktur der aminoterminalen Hsp90 Domäne [79] (ID der Brookhaven Datenbank: 1YET)

Hinweis auf deren Beteiligung an der Substratbindung durch Hsp90 gedeutet wird (Abb. 3 (A)).

Hsp90 bildet ein Schwanz-Schwanz-Homodimer [210] [211]. In Abwesenheit von Nukleotiden ist Hsp90 gestreckt und zigarrenförmig, wobei die carboxy-terminalen Dimerisierungsdomänen zentral und die aminoterminalen Regionen außen zu liegen kommen [216]. Nach Zugabe von ATP wurden elektronenmikroskopisch deutlich sichtbare konformationelle Veränderungen festgestellt. Hsp90 bildet in Gegenwart von ATP ringförmige Strukturen aus, welche auf eine Annäherung der aminoterminalen Regionen schließen lassen [204] (Abb. 3 (C)). Die Dimerisierung der Hsp90 N-Termini ist zudem eine notwendige Voraussetzung der ATP-Hydrolyse [78] [217]. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde für Hsp90 ein ähnlicher Mechanismus der 'molekularen Einklammerung' von Substraten vorgeschlagen, wie er bereits für die strukturell verwandte GyraseB etabliert worden war [207]. Die ATP-bindende, N-terminale Domäne der GyraseB reguliert die Öffnung, bzw. die Schließung einer **molekularen Klammer** zur reversiblen Bindung von DNA-Doppelhelices. Nach ATP-Bindung assoziieren die N-Termini der GyraseB; auf die ATP-Hydrolyse folgt deren Dissoziation [218]. Die C-terminalen Domänen der GyraseB bilden wie auch bei Hsp90 ATP-unabhängige Dimerisierungseinheiten mit potentieller Scharnierfunktion, so dass die zusätzliche, regulierte Dimerisierung der N-terminalen Enden die molekulare Klammer schließt. Für die GyraseB wird zudem ein Mechanismus diskutiert, nach dem die Bindung von ATP die Schließung der Bindungstaschen durch Deckelstrukturen bewirkt. Die im geschlossenen Zustand neu exponierten Proteinoberflächen der Deckel stellen dann die kritischen Kontaktflächen der ATP-abhängigen N-terminalen Dimerisierung dar [207].

1.2.4 Kofaktoren in Hsp70/Hsp90 Multichaperonkomplexen

Für die spezifische Chaperonaktivität von Hsp90 ist ein streng koordiniertes Zusammenspiel mit der Hsp70 Maschinerie notwendig [80] [118] [119]. Die Regulation und Koordination der Chaperonaktivitäten von Hsp70 und Hsp90 werden durch eine Reihe von Kofaktoren gewährleistet (Tabelle 3). Im wesentlichen lassen sich **drei funktionelle Gruppen von Kofaktoren** unterscheiden. Als **Vertreter der ersten Klasse** üben die etablierten Kofaktoren der Hsp70 Maschinerie Hsp40, Bag1 und Hip, bzw. die Hsp90-Kofaktoren p23 sowie möglicherweise auch p60 und CDC37 ihre Wirkung direkt auf die molekularen Chaperone aus. Sie beeinflussen die Substratbindung oder die Freisetzung der Substrate durch Regulation der ATPase-

Aktivitäten von Hsp70 oder Hsp90²² [21] [104] [109] [111] [190]. Kofaktoren wie Hsp40 und CDC37 besitzen zudem selber die Fähigkeit zur Substratbindung. Ihnen kommt daher auch eine aktive Rekrutierungsfunktion zu [21] [65] [104] [174] [219].

CDC37 gilt als substratspezifischer Rekrutierungsfaktor eukaryotischer Organismen im Rahmen der Hsp90 vermittelten **Reifung von Proteinkinasen**²³ [174] [175] [219] [220] [221] [222] [223]. CDC37 vermag einerseits Hsp90 und andererseits Proteinkinasen wie z. B. Cdk4 *in vitro* und *in vivo* sowohl unabhängig voneinander als auch gemeinsam in einem ternären Komplex zu binden. Die Proteininteraktion zwischen CDC37 und seinen Kinasesubstraten wird einerseits durch die aminoternale CDC37-Domäne und andererseits, auf Seiten der Substrate, durch die Kinasedomäne vermittelt [221] [222]. Die Interaktionsflächen zwischen CDC37 und Hsp90 wurden bislang noch nicht lokalisiert. Die ternären Hsp90/CDC37/Proteinkinase-Komplexe liegen *in vivo* ausschließlich cytosolisch vor. Die aktivierten Kinasen, z. B. Cdk4 im Komplex mit CyclinD, sind dagegen vornehmlich im Zellkern lokalisiert. Aus diesen und weiteren Beobachtungen wurde ein **Modell der Hsp90 vermittelten Kinasenreifung** abgeleitet, nach dem CDC37 die Proteinkinasen in einem unvollständig gefalteten Zustand bindet und in einen Komplex mit Hsp90 rekrutiert. Hsp90 assistiert daraufhin der Faltung der Kinasen in einen aktivierungskompetenten Zustand. Nach Bindung von CyclinD dissoziieren CDC37 und Hsp90 von der aktiven Kinase und der Cdk4/CyclinD-Komplex wird in den Zellkern importiert. Dieses Modell ähnelt der Hsp90 vermittelten Reifung von Steroidhormonrezeptoren. In beiden Fällen erhält Hsp90 seine Substrate in einem metastabilen, durch Ligandenbindung aktivierbaren Zustand (siehe Abb. 2). Für die mechanistische Ähnlichkeit der Hsp90 vermittelten Reifung von Proteinkinasen und Steroidhormonrezeptoren spricht zudem die Beteiligung der in intermediären und gereiften Hsp90-SHR Komplexen aufgefundenen Kofaktoren auch bei der Kinasenreifung [220]. CDC37 ist einerseits als bedeutender Faktor für die Reifung onkogener Proteinkinasen von medizinischem Interesse, besitzt jedoch andererseits auch selber Eigenschaften eines Onkogens [224] [225] [226].

Eine **zweite Klasse von Hsp70 und Hsp90 Kofaktoren** lagert an die molekularen Chaperone wie an eine 'Werkbank' an und 'bearbeitet' die dort

²²Der molekulare Mechanismus des ATP-abhängigen Hsp90-Substratfreisetzungsfaktors p23 ist bislang unbekannt. Obwohl p23 die ATPase Aktivität von Hsp90 nicht stimuliert, fördert es die durch die ATP-Hydrolyse ausgelöste Substratfreisetzung von Hsp90 [201].

²³Im Rahmen einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine Beteiligung von CDC37 jedoch auch im Rahmen der Hsp90 vermittelten Reifung von Androgenrezeptoren nachgewiesen [202].

Tabelle 3: Kofaktoren der Hsp70 und Hsp90 Maschinerie

Hsp70		
Kofaktor	Funktion / Aktivität	TPR Motive (Anzahl)
Hsp40	Stimulierung der ATPase Aktivität [21] [104]	NEIN
BAG-1	Nukleotidaustauschfaktor [21] [104] [111] [112]	NEIN
Hip	Stabilisierung des ADP Zustands [109]	JA (3)
CHIP	Ubiquitin Ligase [151] [152] [227]	JA (3)
p60	Hsp70-Hsp90-Adapter Protein [184] [185] [187]	JA (5-7)
TPR2/Hcp	J-Domänen-TPR-Protein [228] unbekannter Funktion	JA (6-9)
Hsp90		
Kofaktor	Funktion / Aktivität	TPR Motive (Anzahl)
p60	Hsp70-Hsp90-Adapter Protein [184] [185] [187]	JA (5-7)
p23	Substratfreisetzungsfaktor [201]	NEIN
Immunophiline		
FKBP51	PPlase [133]	JA (3)
FKBP52	PPlase [133]	JA (3)
Cyp40	PPlase [133]	JA (3)
CNS1	Cyp40-Funktionen <i>in vivo</i> [229] [230] [231]	JA (3)
PP5	Ser/Thr-Protein Phosphatase [203] [232] [233]	JA (3)
p50 ^{CDC37}	Bindung von Protein Kinasen [174] [219] [220]	NEIN
CHIP	Ubiquitin Ligase [151] [152] [227]	JA (3)
TPR2/Hcp	J-Domänen-TPR-Protein [228] [234] unbekannter Funktion	JA (6-9)
TOM34	TPR-Protein unbekannter Funktion [213]	JA (6-8)

fixierten Substrate. Diese zweite Klasse von Kofaktoren enthält typischerweise TPR Motive zu ihrer Verankerung sowie weitere Domänen mit spezifischen Enzymaktivitäten²⁴. Zu dieser Klasse von Kofaktoren gehören die Hsp90 bindenden Immunophiline [133] (Tabelle 3), welche eine Peptidylprolylisomeraseaktivität aufweisen, das essentielle und *in vivo* Cyclophilin40-Funktionen vermittelnde Hefeprotein CNS1, die Proteinphosphatase PP5 [203] [232] [233] sowie die Ubiquitin Ligase CHIP [150] [151] [152] [227]²⁵. Während sowohl die zelluläre Rolle der ubiquitär exprimierten PP5 als auch deren molekulare Funktion in Hsp90-Multiproteinkomplexen unklar ist [203] [232], wurde dem Hsp70 und Hsp90 gemeinsamen Kofaktor CHIP eine Funktion bei der Qualitätskontrolle von Proteinkonformationen [100] zugeschrieben [151] [152]. CHIP ist ein cytosolisches U-Box Protein²⁶ mit einer Polyubiquitylierungsaktivität. Nach vorherrschender Meinung fungiert CHIP als Sensor für Faltungszustände von Hsp70 Substraten, wie CFTR, oder Hsp90 Substraten, wie dem Glucocorticoidrezeptor (GR). Es löst deren Ubiquitylierung aus und leitet die proteasomale Degradation ein [151] [152]. Dadurch verschiebt CHIP das Gleichgewicht von Proteinfaltung und -degradation in Richtung der Proteindegradation und fördert so die Beseitigung dauerhaft fehlgefalteter Chaperonsubstrate. CHIP würde nach dieser Vorstellung u. a. den Abbau derjenigen Hsp90 Substrate bewirken, deren Faltung in Gegenwart von Geldanamycin oder anderer spezifischer Hsp90 Inhibitoren gehemmt ist (siehe auch Kapitel 1.2.1).

Einer **dritten funktionellen Klasse** von Hsp70 und Hsp90 Kofaktoren gehören die Proteine p60, Hcp/TPR2/TTC2²⁷ sowie möglicherweise TOM34 an. Diese Faktoren besitzen mehrere TPR-Domänen, bzw. eine Kombination aus TPR- und J-Domänen. Aus diesem Grunde haben sie zumindest das Potential, gleichzeitig mit Hsp70 und Hsp90 zu interagieren und als Adapterproteine allein durch die Herbeiführung räumlicher Nähe das Zusammenspiel der Chaperone positiv zu beeinflussen. Zusätzlich ist die Regulation des Substrattransfers zwischen Hsp70 und Hsp90 durch solche Kofaktoren denkbar, die beide Chaperone verbrücken können und deren Substratbindungseigenschaften beeinflussen. Während die Funktion des Adapterproteins p60 *in vitro* und *in vivo* gut untersucht ist [185] [186] [187] [190], sind die moleku-

²⁴Ob diese Aktivitäten jedoch in allen Fällen ausschließlich der Substratmodifikation und nicht auch zur Modifikation und Regulation der Chaperone dienen, ist bislang unklar [81].

²⁵CHIP: Mit dem Carboxyterminus von Hsc70 interagierendes Protein. [227]

²⁶Die U-Box stellt eine modifizierte Form des Ring-Finger Motifs [235] dar, welches in Ubiquitin-Ligasen gefunden wird und die E4-Familie der Polyubiquitinierungsfaktoren kennzeichnet [236].

²⁷Hcp, engl.: Hsp70-Hsp90 coordinating protein. [234]

laren und zellulären Funktionen des Hsp70 Kofaktors Hcp [228] [234] sowie des Hsp90 Kofaktors TOM34 [237] unklar. Interessanterweise wurde das J-Domänenprotein Hcp neben dHDJ1²⁸ im *Drosophila melanogaster* Modell als genetischer Suppressor der Toxizität von Aggregaten polyglutaminhaltiger Proteine identifiziert. Dieser Befund unterstreicht die Fähigkeit molekularer Chaperone zur Modulation pathogener Proteinaggregate *in vitro* und *in vivo* [98] [99].

1.3 TPR Motive und ihre Funktionen

Protein-Proteininteraktionsdomänen, die sog. *Tetratrico-Peptide-Repeat* (TPR)-Motive enthalten, sind **zentrale Elemente der Assemblierung von Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen**. Sie ermöglichen das optimale Zusammenspiel von Hsp70 und Hsp90 ebenso wie zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Chaperonen und ihren Kofaktoren. TPR-Motive sind seit ca. zehn Jahren bekannt als Module zur Vermittlung spezifischer Protein-Protein-Interaktionen [238] [239] [240]. Während sie zunächst in Komponenten des Anaphase Promovierenden Komplexes (APC) [241] [242] und in Proteinen der RNA-Synthese identifiziert wurden [243] [244], konnten TPR-Motive seitdem auch in weiteren zellulären Kontexten nachgewiesen werden. Dazu zählen der peroxisomale Proteinimport [245] [246] [247], der mitochondriale Proteinimport [69] [92] [248], die Hsp70-Hsp90-Multichaperon Komplexe [118] [119], der NADPH-Oxidase Multiproteinkomplex [249] sowie eine Reihe weiterer Fälle [240].

Die **Primärstruktur** von TPR Modulen ist charakterisiert durch tandemartig aneinandergereihte Wiederholungen von Sequenzmotiven, die aus jeweils 34 Aminosäuren bestehen (Abb. 4 (A) und (B)). In Abhängigkeit vom betrachteten Protein befinden sich 3-16 solcher Motive entweder in direkter Abfolge oder sind von kurzen Sequenzeinschüben unterbrochen. Innerhalb der einzelnen 34er Sequenzen existieren keine streng konservierten Positionen (Abb. 4 (B)). Die Konservierung beschränkt sich auf die Größe und Hydrophobizität einzelner Aminosäuren, deren Position innerhalb der 34er-Sequenzen jedoch festgelegt ist [243].

An den folgenden acht Positionen ist die Konservierung relativ hoch, und die genannten Aminosäuren liegen besonders gehäuft vor [243]:

²⁸dHDJ1 ist das Hsp40 Homologe aus *Drosophila melanogaster*;

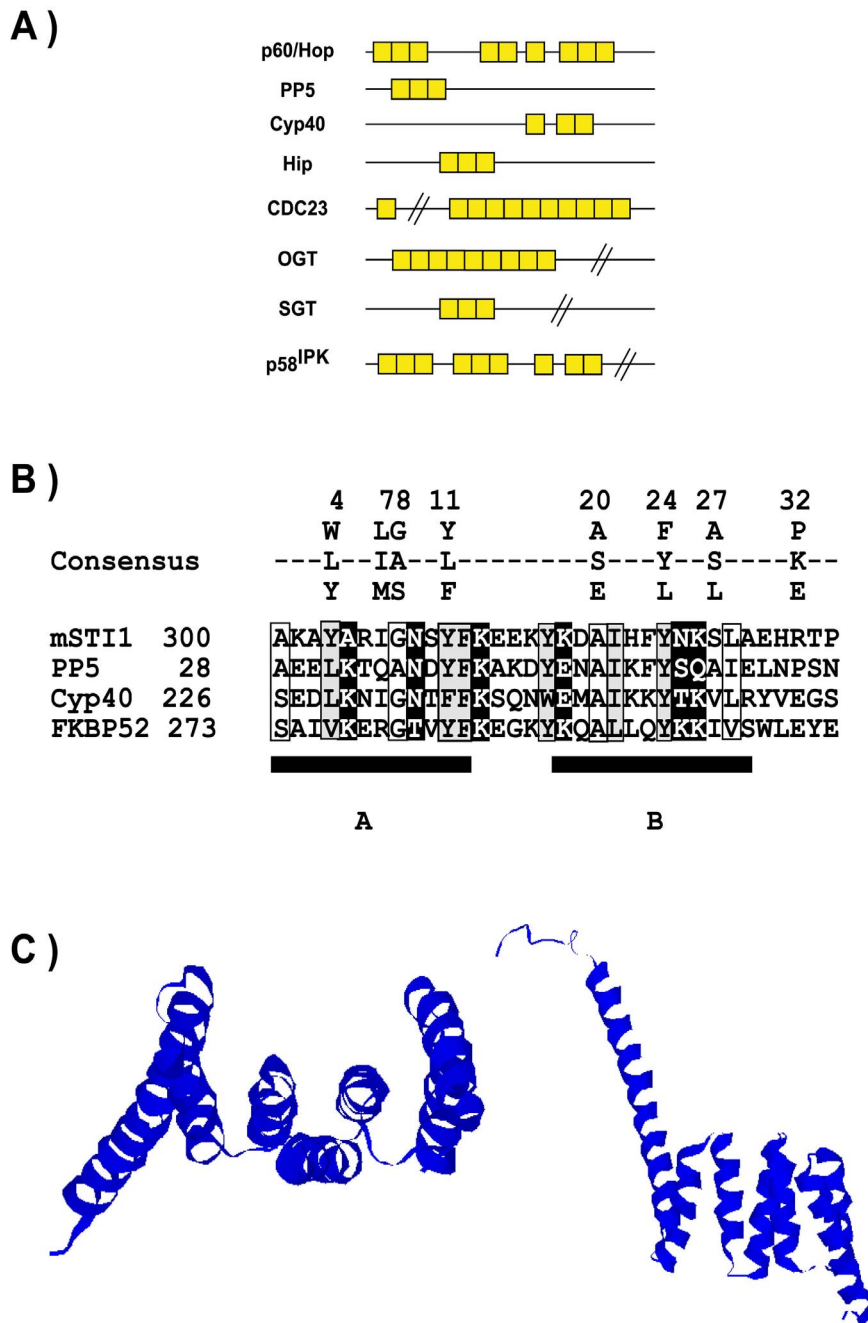


Abbildung 4: Strukturelle Aspekte von TPR-Motiven.

(A) Anordnung von TPR-Motiven in Clustern in einer Reihe unverwandter Proteine [240]. Einzelne TPR-Motive sind als gelbe Kästchen dargestellt. (B) Sequenzvergleich der ersten TPR-Motive Hsp90 bindender Regionen von p60 (Ratte), PP5 (Mensch), Cyp40 (Rind) und FKBP52 (Hase) sowie TPR Konsensus [243]. *Weißer, grauer, bzw. schwarzer Rahmen* markieren konservierte Reste mit folgenden Eigenschaften: klein und hydrophob, voluminös und hydrophob, bzw. geladen oder polar [240]. (C) Struktur der N-terminalen Domäne der PP5 (3 TPR Motive) [250].

Position 4	W, L, F
Position 7	L, I, M
Position 8	G, A, S
Position 11	Y, L, F
Position 20	A, S, E
Position 24	F, Y, L
Position 27	A, S, L
Position 32	P, K, E

Der chemische Charakter der konservierten Reste und ihre definierte Anordnung bilden die Grundlage des charakteristischen TPR-Proteinfaltungsmusters [251] (Abb. 4 (C)). Jede 34er-Sequenz formt ein antiparallel verlaufendes Paar von α -Helices (A, B). Die Packung der beiden Helices A und B wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des TPR-Konsensus bestimmt. Die tandemartige Wiederholung solcher TPR-Sequenzmotive resultiert in einer regelmäßigen Abfolge antiparallel verlaufender α -Helices. Zusammen mit jeweils einer flankierenden C-terminalen Helix entstehen superhelikale Strukturen, die einen zentralen Ligandenbindungsgraben umfassen. Eine solche Struktur wurde erstmalig in der N-terminalen Domäne der Proteinphosphatase PP5 beobachtet [250] (Abb. 4 (C)). Die Sequenzen außerhalb des TPR-Konsensus weisen in TPR-Domänen unterschiedlicher Herkunft i. a. keine ausgeprägten Ähnlichkeiten auf²⁹. Sie formen für jede TPR-Domäne eine charakteristische Proteinoberfläche und garantieren die Spezifität der Ligandenerkennung. Erste Mutagenesestudien wiesen auf die Bedeutung des von den TPR-Helices eingeschlossenen zentralen Grabens für die Ligandenbindung hin [252].

Während die von TPR-Motiven ausgebildeten dreidimensionalen Strukturen gut charakterisiert sind, blieb die Natur der TPR-Liganden sowie die Prinzipien TPR-vermittelter Ligandenerkennung lange unklar³⁰. Als **Mechanismen TPR-vermittelter Protein-Proteinwechselwirkungen** wurden Interaktionen der TPR-Module untereinander nach Art von 'Druckknöpfen' (**'knob and hole' Modell**) oder die Auslesung komplexer Proteinoberflächen und zumindest einzelner ausgeprägter Sekundärstrukturelemente, wie

²⁹siehe aber: Kapitel 3.1.5

³⁰Im Rahmen dieser Arbeit und der Promotionsarbeit von C. Scheuffler wurden die zentralen TPR-Liganden innerhalb von Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen identifiziert [253] [254]. Später wurden von K. Lapouge et. al. , bzw. G. D. Gatto et. al. TPR Module aus anderen funktionellen Kontexten im Komplex mit ihren jeweiligen Liganden und Interaktionspartnern publiziert (siehe Kapitel 4) [246] [249].

z. B. exponierter α -Helices, diskutiert [239] [244] [250]. Einem lange vorherrschenden Modell zufolge sollten TPR-Motive intermolekulare Wechselwirkungen durch ähnliche hydrophobe Packungen ermöglichen, wie sie zwischen den zwei antiparallel verlaufenden Helices einzelner TPR-Motive gefunden wurden [238] [239]. Die Liganden könnten hierbei ebenfalls TPR-Motive darstellen³¹ oder einzelne α -Helices, die dem TPR Konsensus nicht folgen müßten.

In Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen wurden die Andockstellen der TPR-Kofaktoren durch Deletionsstudien und semiquantitative Kopräzitationsexperimente in den C-terminalen Domänen von Hsp70 (C70, 25 kDa) und Hsp90 (C90, 12 kDa) lokalisiert [184] [212] [213] [214] [215] [228] [255] [256]. Die Bindung der TPR-Kofaktoren wurde, den geläufigen Vorstellungen folgend, komplexen Proteinoberflächen zugeschrieben³². Als einzige Ausnahme bindet der Hsp70 TPR-Kofaktor Hip nicht an C70, sondern interagiert mit der N-terminalen ATPase-Domäne [109] [256] [257].

Die meisten TPR-Kofaktoren von Hsp70 und Hsp90 wie Hip, die Immunophiline und die Proteinphosphatase PP5 enthalten klar definierte TPR-Module mit je drei TPR Motiven. Die Anzahl der TPR Motive anderer Kofaktoren wie Hcp, TOM34 und p60³³ ist dagegen weitaus weniger gesichert, da die Voraussage von TPR-Sequenzen aufgrund ihrer geringen Konserviertheit sehr unsicher ist. Entsprechend schwierig ist die Voraussage akkurater Domänengrenzen und die Angabe der Anzahl von TPR Motiven pro Proteindomäne. Für **das Adapterprotein p60** wurden 5-9 TPR Motive vorausgesagt. Während die aminoternale Region von p60, welche drei TPR-Motive enthält, für die Interaktion mit Hsp70 notwendig ist, [184] [258] sind die mittleren und carboxyterminalen Regionen von p60 (2-6 TPR Motive) für die Interaktion mit Hsp90 hinreichend [184] [190].

Die **Funktion von TPR Modulen** besteht in den meisten bisher untersuchten Fällen allein in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. TPR-Domänen begünstigen, wie auch Proteininteraktionsdomänen anderer Klassen [251], die Annäherung zweier Proteine und ermöglichen deren funktionelle Wechselwirkung, welche durch weitere, enzymatisch aktive Proteindomänen realisiert wird. Einige TPR-Domänen haben neben dieser reinen

³¹Ein Beispiel für die Interaktion zweier TPR-Proteine wäre die Wechselwirkung von CDC27 mit CDC23 [239].

³²Hinweise auf die Relevanz des konservierten EEVD-COOH-Motifs in Hsp70 und Hsp90 für die TPR-Kofaktorbindung lagen vor [255] [215]. Für das EEVD-Motiv wurde entweder eine strukturelle Funktion bei der Stabilisierung der C70, bzw. der C90-Domäne diskutiert [215] oder es wurde als Teil einer größeren Proteinoberfläche betrachtet ('Minidomäne') [255].

³³bzw. dem p60 Homologen der Hefen STI1

Verankerungsfunktion auch regulatorische Einflüsse auf ihre Zielmoleküle. So beeinflusst Hip den ATPase-Zyklus von Hsp70 [109] und p60 hat einen inhibitorischen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 [190]. *In vivo* komplementiert die Überexpression der isolierten TPR-Domäne des Cyp40 Analogons CNS1 den Wachstumsphänotyp von $\Delta cpr7$ Hefezellen.

Insgesamt bilden somit TPR Motive funktionell vielseitige Proteinmodule, die sich voraussichtlich durch vielfältige Mechanismen der Ligandenerkennung auszeichnen.

1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die **Identifizierung der Liganden** von TPR-Proteininteraktionsmodulen in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen sowie die **Analyse genereller Prinzipien** TPR-vermittelter Proteininteraktionen in diesem Kontext. Ein Schwerpunkt sollte auf der Untersuchung bimolekularer Wechselwirkungen des TPR Adapterproteins p60 im ternären Hsp70-p60-Hsp90 Komplex liegen. Insbesondere galt es, eine Arbeitshypothese zu überprüfen, der zufolge Proteininteraktionsmodule mit TPR Motiven kurze ausgestreckte Aminosäuresequenzen erkennen. Die Beobachtung eines Kristallpackungseffektes der ligandenfreien TPRI Domäne von p60 bildete die Grundlage dieser Hypothese. Im Proteinkristall von TPRI tritt ein hochgeordneter Kontakt zwischen dem ansonsten flexiblen C-terminalen Ende eines TPRI Moleküls und dem putativen Ligandenbindungsgraben des Nachbarmoleküls auf. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung für die Erkennung natürlicher TPR-Liganden war zu diesem Zeitpunkt unklar.

Die vorrangige Aufgabe war die Etablierung biophysikalischer Methoden zur Quantifizierung und Eingrenzung bimolekularer Wechselwirkungen im Hsp70-p60-Hsp90 Komplex. Die Selektivität präferentiell Hsp70, bzw. Hsp90 bindender p60 TPR Domänen sollte definiert und die molekularen Ursachen dieser Selektivität ergründet werden. Durch Mutagenesestudien war die allgemeine Bedeutung des beobachteten Kristallpackungseffektes für TPR vermittelte Wechselwirkungen zu bewerten. In einem darauffolgenden Schritt sollte das Potential kurzer, definierter Peptide mit Hsp70 und Hsp90 Sequenzen zur Imitation natürlicher TPR-Liganden getestet werden. Auch ein Screening kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Peptidkollektionen zur generellen Beschreibung der Ligandenerkennungsmotive von p60 TPR Domänen war geplant.

In einem **zweiten Teilprojekt** sollte als Beispiel einer nicht durch TPR-Module vermittelten Proteininteraktion die Wechselwirkung zwischen **Hsp90** und dem für Proteinkinasen substratspezifischen Kofaktor **CDC37** untersucht werden. Das Ziel dieses Teilprojektes war die Reduktion der Vollängen-proteininteraktion auf die Wechselwirkung von Proteindomänen.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien

Amersham (Freiburg, BRD) $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$, $\alpha(^{32}\text{P})\text{ATP}$;

BIAcore (Freiburg, BRD) Biosensor Chips B1, CM5, SA, Maintenance Kit;

BioMol (Hamburg, BRD) IPTG, HEPES;

Biorad (Herkules, USA) Ethidiumbromid;

BMA (Rockland, ME, USA) LE Agarose;

Difco (Detroit, MI, USA) Baktotrypton, Baktoyeast Extrakt, Bactoaagar;

Fluka (Deisenhofen, BRD) TB/LB-Medien (vorgemischt), DMSO (für die UV-Spektroskopie);

Invitrogen (Groningen, Schweiz) pCR T7 TOPO TA Cloning Kit;

Life Technologies/Gibco (Karlsruhe, BRD) pPROEX Vector, TEV-Protease, Gibco T4-DNA-Ligasepuffer (5x), GibcoBRL (10kDa Protein Leiter);

Merck (Darmstadt, BRD) Ampenicillin, Benzonase, PEI-Zellulose F Dünnschichtchromatographiemembranen, EDTA, CDTA, Neutralit pH Streifen, N-Hydroxysuccinimid, Ethylendiamin, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, NaCl, KCl, KH_2PO_3 , K_2HPO_3 , NaOH, KOH, Tris, SDS, β -Mercaptoethanol, APS;

New England Biolabs (Beverly, MA, USA) *E. coli* Zellen DH5 α F', Restriktionsenzyme und -Puffer, T4-DNA-Ligase und -Puffer, Deep Vent DNA Polymerase und Thermopol Puffer, T7-DNA-Polymerase;

Novagene (Bad Soden, BRD) *E. coli* Stämme BL21(DE3), BL21 (DE3) pLysS, pET Vektoren;

Perkin Elmer (Weiterstadt, BRD) ABI Prism Big Dye Cycle Sequencing Kit;

Pierce (Rockford, IL, USA) Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Sulfo-GMBS, EDC;

Quiagen (Hilden, BRD) Ni-NTA-Agarose, Plasmid Mini und Midi Kits, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAexII Gelextraktions Kit, PCR Purification Kit;

Roche (Basel, Schweiz) ADP, ATP, Complete Protease Inhibitor Cocktail (ohne EDTA), DTT, DNA Standardmarker;

Roth (Karlsruhe, BRD) KAc;

Sigma (Deisenhofen, BRD) Kanamycin, AntiFoam Se-35, Protein Standardmarker, Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* (affinitätsgereinigt), Lysozym, Didesoxynukleosidtriphosphat Kit;

Stratagene (La Jolla, CA, USA) Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit, *E. Coli* XL1-Blue Supercompetente Zellen.

Zur Synthese der Peptidbibliothek wurden zudem folgende Reagenzien verwendet:

Die N_{α} -Fmoc-Aminosäurederivate mit Seitenschutzgruppen Asp(OtBu), Glu(OtBu), Gln(Trt), Asn(Trt), Cys(Trt), His(Trt), Ser(tBu), Thr(tBu), Tyr(tBu), Arg(Pmc), Trp(Boc), Lys(Boc) wurden von den Firmen Novabiochem (Bad Soden, BRD), Senn (Dielsdorf, Schweiz), Orpegen (Heidelberg, BRD) und Millipore (Eschborn, BRD) bezogen. Das Wang-Harz stammte von der Firma RAPP Polymere GmbH (Tbingen, BRD). 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), Thioanisol, Phenol, Ethandithiol (EDT), Trifluoressigsäure (TFA), Diisopropylcarbodiimid (DIC), Salz-, und Eisessig (alle *purum*) wurden von Fluka (Neu-Ulm, BRD) bezogen. Piperidin (zur Synthese), Acetanhydrid (zur Analyse), tert.-Butanol (tBut) und n-Heptan stammten von Merck (Darmstadt, BRD).

Soweit nicht anders vermerkt, wurden weitere zur Synthese verwendeten Substanzen von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, BRD) und Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD) bezogen und besaßen mindestens den Reinheitsgrad *pro analysi*. Wässrige Lösungen wurden mit deionisiertem und filtriertem Wasser aus einer Deionisierungsanlage der Firma Millipore (Eschborn, BRD) angesetzt. Konzentrationsangaben sind für Flüssigkeiten in (v/v), für Feststoffe in (w/v) angegeben.

Geräte

Amersham/Pharmacia (Freiburg, BRD) FPLC-System, ÄKTA-Explorer 100, SMART-System, Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalting, MonoQ Säule (20 ml), 5ml HiTrap Heparin-Säule, Gelfiltrationssäulen HiLoad 26/60 Superdex 200, (HighPrep) 26/60 S300, HR 30/10 Superdex200, Superdex200 PC 3.2/10, Superose PC 3.2/10, Resource RPC (1 ml), Sephadex G25 Säulen (NAP-5, NAP-10), Säulenmaterialien: Q-Sepharose, DE52, Phenylsepharose CL-4B;

Amicon (Beverly, MA, USA) Vakuumfiltrationseinheit (0.2 μm), Konzentrationskammern zur Zentrifugation (Centriprep, Centricon);

Beckman (München, BRD) DU 640 Spektrophotometer, GS-6R Zentrifuge mit GH-3.8 (204mm) Ausschwingrotor, Avanti J-25 Zentrifuge, J6 MI Zentrifuge mit SS30 Rotor, Optima LE-80K Ultrazentrifuge mit 70Ti und 45Ti Rotoren;

BIAcore (Freiburg, BRD) BIAcore2000 Biosensor;

Bio-Rad (München, BRD) Elektrophoresekammer MiniProtean II, Econo-Q-Säulen;

Branson (Heusenstamm, BRD) Ultraschallbad RK103H;

Eppendorf (Hamburg, BRD) Zentrifugen 5415C und 5417R;

Fuji (Tokio, Japan) FLA 2000 Phosphoimager, Evaluationssoftware;

Jasco (Groß-Umstadt, BRD) J-715 Spektropolarimeter;

Life Science (Frankfurt, BRD) Gelrockner SGD2000, Lyophilisator;

Mettler-Waagen (Gießen, BRD) Elektronische Feinwaage AE160, Laborwaage Toledo PB602;

MicroCal (Northhampton, USA) MCS und VP-ITC Titrationskalorimeter, VP-DSC Differential Scanning Calorimeter;

Millipore (Eschborn, BRD) Deionisierungsanlage MilliQplus PF, Sterilfilter 0.45 μm Millex-HA;

Misonix (Rockland, ME, USA) Ultraschallstab Ultrasonic Converter CL4, Ultrasonic Processor XL;

MultiSynTech (Bochum, BRD) Syro-Pipettierroboter;

Perkin Elmer (Weiterstadt, BRD) GenAmp2400 und Cycler480 Thermocycler;

2.2 Bakterienstämme, Vektoren, Primer, Konstrukte

Bakterienstämme

DH5 α F'	(Novagen)
<i>E. Coli</i> XL1-Blue (superkompetent)	(Stratagen)
BL21 DE3 [259]	(Novagen)
BL21 DE3 (pLysS) [259]	(Novagen)

Plasmide/Konstrukte

Folgende Konstrukte entstammten dem Plasmidstock der Abteilung Zelluläre Biochemie, MPI für Biochemie, Martinsried.

Konstrukt	Vektor	Klonierung	Reste	Referenz
Hsp82	pPROEX HTa	NcoI/XhoI	1-709	[260]
hHsp90 α	pPROEX HTa	NcoI/KpnI	1-731	[261]
N90	pET3d	NcoI/BamH1	9-236	[79]
C90	pET3d	NcoI/BamH1	625-731	[123]
hHsp70	pPROEX HTa	EcoRI/XhoI	1-641	[261]
C70	pPROEX HTa	EcoRI/XhoI	382-641	[261]
hHop/p60	pET28a	EcoRI/HindIII	1-543	[213]
TPRI	pPROEX HTa	EheI/HindIII	1-118	[254]
TPRIIA	pPROEX HTa	EheI/HindIII	223-352	[254]
TPRIIB	pPROEX HTa	EheI/HindIII	353-477	[254]
TPRIIL	pPROEX HTa	EheI/HindIII	190-481	[254]
hTOM34	pPROEX HTa	EcoRI/XhoI	209-335	
TEV				[262] [263]

Primer

Folgende Primer wurden zur Mutagenese der p60 **TPRIIA** Domäne eingesetzt:

TPRIIA K229A (a):

5'GCA GGC ACT GAA AGA **AGC** AGA GCT GGG GAA CGA TGC C3'

TPRIIA K229A (b):

5'GGC ATC GTT CCC CAG CTC **TGC** TTC TTT CAG TGC CTG C3'

TPRIIA N264A (a):

5'CCC ATC AAC ATG ACT TAC ATT ACC **GCT** CAA GCA GCG G3'

TPRIIA N264A (b):

5'CCG CTG CTT **GAG** CGG TAA TGT AAG TCA TGT TAG TGG G3'

TPRIIA K301A (a):5'CTA TCG ACA GAT TGC **CGC** AGC ATA TGC TCG AAT TGG C3'**TPRIIA K301A (b):**5'GCC AAT TCG AGC ATA TGC **TGC** GGC AAT CTG TCG ATA G3'**TPRIIA R305A (a):**5'GAT TGC CAA AGC ATA TGC **TGC** AAT TGG CAA CTC CTA C3'**TPRIIA R305A (b):**5' GTA GGA GTT GCC AAT **TGC** AGC ATA TGC TTT GGC AAT C 3'**TPRIIA K301A/R305A (a):**5'GAC TAT CGA CAG ATT GCC **GCA** GCA TAT GCT **GCA** ATT GGC AAC TCC3'**TPRIIA K301A/R305A (b):**5'GGA GTT GCC AAT **TGC** AGC ATA TGC **TGC** GGC AAT CTG TCG ATA GTC3'

Folgende Primer wurden zur Mutagenese der p60 **TPRIIB** Domäne eingesetzt:

TPRIIB K364A (a):5'CCC CGA CCT GGC TTT GGA GGA **GGC** GAA CAA AGG CAA CG3'**TPRIIB K364A (b):**5'CGT TGC CTT TGT **TCG** CCT CCT CCA AAG CCA GGT CGG GG3'**TPRIIB N368D (a):**5'GGA GGA GAA GAA CAA AGG **CGA** CGA GTG TTT TCA GAA AGG GGA CTA TCC C3'**TPRIIB N368D (b):**5'GGG ATA GTC CCC TTT CTG AAA ACA CTC **GTC** GCC TTT GTT CTT CTC CTC C3'**TPRIIB N399A (a):**5'CCC GAA AGA TGC CAA ATT ATA CAG **CGC** T CG AGC TGC CTG CTA CAC C3'**TPRIIB N399A (b):**5'GGT GTA GCA GGC AGC TCG **AGC** GCT GTA TAA TTT GGC ATC TTT CGG G3'**TPRIIB N399D (a):**5'GCC AAA TTA TAC AGC **GAT** CGA GCT GCC TGC TAC ACC AAA CTC CTG G3'

TPRIIB N399D (b):

5'CCA GGA GTT TGG TGT AGC AGG CAG CTC GAT CGC TGT ATA
ATT TGG C3'

TPRIIB K429A/R433A (a):

5'GCC GAC CTT CAT CGC GGG TTA TAC AGC GAA AGC CGC
TGC GCT GG3'

TPRIIB K429A/R433A (b):

5'CCA GCG CAG CGG CTT TCG CTG TAT AAC CCG CGA TGA
AGG TCG GC3'

Folgende Primer wurden zur Klonierung des Vollängen Cyp40 ORF, bzw. der Cyp40-TPR Domäne (185-370) verwendet:

Cyp40start1:

5'ATG TCG CAC CCG TCC CCC C3'

Cyp40start185:

5'AAG GAA GGA GAT GAC GGG GG3'

Cyp40start370:

5'CCC CCC AAG CTT CTA AGC AAA CAT TTT TGC ATA TAC TGC
C3'

Sämtliche Primer wurden von Metabion (Martinsried, BRD) bezogen. Die fett gedruckten Basen markieren die mutagenen Triplets.

2.3 Proteine und Peptide

Proteine

Folgende Proteine entstammen dem Proteinstock der Abteilung Zelluläre Biochemie des MPI für Biochemie, Martinsried.

Konstrukt	Referenz
Hsc70 (Ratte)	[114]
Hsp90 (Rind)	[213]
Hsp90 (Mensch)	[261]
M90 (Hsp90-273-617)	[123]
$\Delta N90$ (Hsp90-236-731)	[123]
$\Delta C90$ (Hsp90-1-624)	[123]
PP5 (Mensch)	
CHIP (Mensch)	
Hcp/TTC2 (Mensch)	[234]
Unc45, Unc45(TPR) (<i>C. elegans</i>)	[264]
TOM70Δ (Mensch, lösliche Domäne)	
CDC37 (Mensch)	[260]
CDC37-39-119	[260]
CDC37-147-270	[260]
CDC37-147-349	[260]
CDC37-273-349	[260]

Bovines Hsp90 wurde aus Rinderhirn isoliert [123] [213], alle übrigen Proteine wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. In einem Fall wurde durch mit Baculoviren infizierte Insektenzellen (SF9-Linie) exprimiertes Hsp70 verwendet³⁴ [114]. Die CDC37-Konstrukte wurden von Dr. Reinhard Albrecht in pPROEX HTa Vektoren kloniert und analog den p60 TPR-Domänen (Kapitel 2.6.1) exprimiert und gereinigt [260]. Ich danke Dr. Irene Boche für die Bereitstellung der PP5- und CHIP-Proben und Alexander Brychzy und

³⁴Ich danke Prof. Jörg Höfeld (Universität Bonn) für die Bereitstellung der Probe.

Dr. Wolfgang Obermann (Universität Bonn) für die Bereitstellung des Hcp-Proteins. Alexander Huatagalung (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA) präparierte die Unc45-TPR Domänen sowie das Unc45 Vollängenprotein [264].

Definierte Peptide

Sämtliche definierten Peptide (Tab. 4) wurden synthetisiert vom Peptidservice des Max-Planck Institutes für Biochemie (Abtlg. Prof. L. Moroder). Alle Peptide wurden durch präparative HPLC gereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Die Reinheit betrug $>95\%$.

2.4 Medien und Puffer

Kulturmedien

Die Protokolle der Bakterienkulturmedien wurden entnommen aus [265]:

Luria-Bertani (LB) Medium pro Liter: 10g Bactotrypton, 5g Bactoyeast Extrakt, 5g NaCl auf 1000ml mit H₂O auffüllen und einstellen auf pH 7.0.

Terrific Broth (TB) Medium pro Liter: 12g Bactotrypton, 24g Bactoyeast Extrakt, 4ml Glycerol, 2.2g KH₂PO₄, 9.4g K₂HPO₄ auf 1000ml mit H₂O auffüllen und einstellen auf pH 7.0.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium 15 g/L Bactoagar zugesetzt.

Puffer

G 25mM Hepes pH 7.5, 100mM KAc, 5mM MgAc₂;

HBS 10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween20;

HBS50 10mM Hepes pH 7.4, 50mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween20;

IMAC_A 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM Imidazol, einstellen auf pH 8.0;

IMAC_B 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM Imidazol, einstellen auf pH 8.0;

Tabelle 4: Definierte Peptide

Hsp70-Sequenzen	Hsp90-Sequenzen	Weitere
	Ac-EEVD-COOH	
Ac-IEEVD-COOH	Ac-MEEVD-COOH	Ac-DVEEM-COOH
Ac-VEEVD-COOH		
Ac-TIEEVD-COOH	Ac-RMEEVD-COOH	Ac-DVEEI-COOH
Ac-PTIEEVD-COOH	Ac-SRMEEVD-COOH	
Ac-GPTIEEVD-COOH	Ac-TSRMEEVD-COOH	Ac-AKKAK-COOH
Ac-SSGPTIEEVD-COOH	Ac-DDTSRMEEVD-COOH	Ac-TKRRESKL-COOH
Ac-GSGPTIEEVD-COOH	Ac-GDDDTSRMEEVD-COOH	
Ac-GSGSGPTIEEVD-COOH		
Ac-NYPQGPTVEEVD-COOH	Ac-AEEDASRMEEVD-COOH	
Ac-CGSGSGPTIEEVD-COOH	Ac-CGDDDTSRMEEVD-COOH	
Ac-APTIEEVD-COOH	Ac-ASRMEEVD-COOH	Ac-SEMEEVD-COOH
Ac-GATIEEVD-COOH	Ac-TARMEEVD-COOH	Ac-PEMEEVD-COOH
Ac-GPAIEEVD-COOH	Ac-TSAMEEVD-COOH	
Ac-GPTAEEVD-COOH	Ac-TSRAEEVD-COOH	Ac-VYIEEVD-COOH
Ac-GPTIAEVD-COOH	Ac-TSRMAEVD-COOH	Ac-VYILDVD-COOH
Ac-GPTIEAVD-COOH	Ac-TSRMEAVD-COOH	Ac-PTILDVD-COOH
Ac-GPTIEEAD-COOH	Ac-TSRMEEAD-COOH	Ac-YYILDVD-COOH
Ac-GPTIEEVA-COOH	Ac-TSRMEEVA-COOH	
Ac-GPTIEEVD-NH ₂	Ac-TSRMEEVD-NH ₂	

2xLadungspuffer (SDS-PAGE) 120mM Tris pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 20% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau;

SDS-Laufpuffer 50mM Tris/HCl pH 8.3, 380mM Glycin, 0.1% SDS (w/v);

TAE 40mM Tris/HAc, 1mM EDTA, pH 8.0;

TB1 100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM KAc, 10mM CaCl₂, 15% Glycerol, pH-Einstellung auf pH 5.8 mit 0.2M Essigsäure, Sterilfiltration, Lagerung bei -20°C;

TB2 75mM CaCl₂, 10mM RbCl₂, 10mM Mops, 15% Glycerol, pH-Einstellung auf pH 6.5 mit 3M KOH, Sterilfiltration, Lagerung bei -20°C

TEV Protease Puffer 30mM Tris/HCl pH 8.0, 0.5mM EDTA, 1mM DTT;

PBS 137.0mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.4 mM Na₂HPO₄xH₂O, 1.5mM KH₂PO₄, mit HCl_{aq} einstellen auf pH 7.4;

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Zur **Herstellung** chemisch kompetenter *E. coli* Zellen [266] wurden ca. 55ml LB Medium mit einer Einzelkolonie von Zellen angeimpft und diese Kultur bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0.25-0.5 herangezogen. Die Zellen wurden pelletiert (10min, 2.500g, 4°C), in eisgekühltem TB1-Puffer resuspendiert, weitere 5min auf Eis gehalten und erneut 10min bei 2.500g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in 2ml eisgekühltem TB2 Puffer aufgenommen, auf Eis aliquotiert, in N₂(fl) schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur **Transformation** wurden ~50µl chemisch kompetenter *E. coli* Zellen mit ~0.2-0.4µg DNA aus Ligationsreaktionen oder ~0.05-0.2µg DNA aus gereinigten Plasmidpräparationen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und weitere 3min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 1ml LB Medium erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf antibiotikahaltige LB Agarplatten ausgestrichen und bis zur Entstehung gut sichtbarer Bakterienkolonien für 10-16h bei einer Temperatur von 37°C gehalten.

2.5.2 DNA-analytische Methoden

DNA-Konzentrationen wurden durch Absorptionsmessungen bei 260nm bestimmt, wobei für eine $\sim 50\mu\text{g/ml}$ haltige Lösung doppelsträngiger DNA eine $\text{OD}_{260}=1$ angenommen wurde.

Agarose Gelelektrophorese wurde in TAE Puffer bei 50-100V durchgeführt. Die Gele enthielten 1-2% Agarose und $0.5\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid. Die Größe linearer DNA Fragmente wurde durch Vergleich mit DNA Standardmarkern bestimmt.

DNA Sequenzierung: Die Sequenzierreaktion wurde als zyklische Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode angesetzt. Hierzu wurde das 'Cycle Sequencing Kit' von Perkin-Elmer/ABImed nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung und Fluoreszenzdetektion der entstandenen DNA-Fragmente wurden vom Sequenzierservice des Max-Planck-Institutes für Biochemie durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte durch BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.5.3 Zielgerichtete Mutagenese

Die Punktmutagenese der p60-Domänen TPRIIA und TPRIIL wurde durch PCR-Amplifikation der vollständigen pPROEX HTa Expressionsplamide unter Verwendung von zueinander vollständig komplementären Primern durchgeführt, welche mutagene Basenfehlpaarungen gegenüber den Wildtypsequenzen aufwiesen (Kapitel 2.2).

Beim **Design der Mutageneseprimer** wurde darauf geachtet, dass

1. beide Mutageneseprimer zueinander exakt komplementär sind;
2. die Länge der Primer zwischen 25 und 45 Basenpaaren und die Schmelztemperatur nach folgender Formel $\geq 78^\circ\text{C}$ beträgt:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarungen$$

N entspricht der Primerlänge in Basenpaaren;

3. die mutagenen Basenfehlpaarungen in der Mitte der Primer lagen und sich ~ 10 -15 Basen der korrekten Sequenz zu beiden Seiten der Fehlpaarung befanden;
4. der GC-Gehalt der Primer mindestens 40% betrug und die Primer in mehreren Guanin oder Cytosin Basen endeten.

Tabelle 5: Zielgerichtete Mutagenese: Ansatz und Reaktion

Reaktionsansatz		
5	μl	TurboPfu-Reaktionspuffer (10x)
X	μl	dsDNA Templat (5-50ng)
X	μl	Mutageneseprimer a (125ng)
X	μl	Mutageneseprimer b (125ng)
1	μl	dNTP Lösung (25mM/dNTP)
1	μl	TurboPfu-Polymerase
X	μl	H ₂ O auf ein Endvolumen von 50 μl
Mutagenese PCR-Reaktion		
	Temperatur	Dauer
Start	95°C	30s
16 Zyklen	95°C	30s
	55°C	60s
	68°C	2min/kb Plasmidlänge
Ende	4°C	∞

Die Mutagenese-PCR wurde nach dem in Tabelle 5 angegebenen Schema durchgeführt. 10 μl eines jeden Reaktionsansatzes wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Entstehung des PCR-Produktes kontrolliert. Das methylierte Wildtypemplant wurde nach Zugabe von 1 μl DpnI (20.000 U/ml) zu jedem PCR Ansatz während einer einstündigen Inkubation bei 37°C verdaut. 1 μl einer jeden Reaktion wurde darauf zur Transformation superkompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen eingesetzt. Erfolgreich mutagenisierte Klone wurden durch DNA Sequenzierung identifiziert.

2.5.4 Klonierung von Cyp40 und Cyp40(TPR)

Humanes Cyp40 wurde unter Verwendung der PCR-Primer Cyp40start1 und Cyp40stop370 (Kapitel 2.2) und dem in Tabelle 7 aufgeführten Protokoll aus dem IMAGE cDNA Klon IMAGp998J1929 amplifiziert und unter

Tabelle 6: Primerphosphorylierung

3.0 μ l	Cyp40start1 Stocklösung (95 μ M)
3.0 μ l	PNK-Puffer (10x)
0.5 μ l	ATP (100mM)
0.3 μ l	PNK (10.000 U/ml)
24 μ l	H ₂ O
4°C, 12h	

Verwendung der EheI/HindIII Schnittstellen in den pPROEX HTa Vektor kloniert. Der Cyp40start1-Primer wurde hierzu zuvor phosphoryliert (Tabelle 6). Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung eines PCR-Purification Kits (Qiagen) gereinigt und quantitativ durch HindIII verdaut (30 μ l PCR Fragment, 4 μ l Tango-Puffer (10x), 1 μ l HindIII (20.000 U/ml), 2h, 37°C). ~10 μ g pPROEX HTa Vektor wurden ebenfalls durch EheI und HindIII verdaut (30 μ l Vektor (10 μ l), 4 μ l Tango-Puffer (10x), 1 μ l HindIII, 1 μ l EheI (jeweils 20.000 U/ml), 2h, 37°C). Der Vektor wurde im Anschluß an den Verdau mit CIP (1 μ l CIP (10.000 u/ml), 15min, 37°C) behandelt. Nach Reinigung der Verdauprodukte durch Gelextraktion erfolgte die Ligation von Vektor und Insert bei 16°C über Nacht (2 μ l Ligasepuffer (Gibco, 5x), 1 μ l T4-DNA-Ligase (NEB, 10.000 U/ml), 2 μ l Vektorlösung, 5 μ l Insertlösung). Zur Identifizierung positiver Klone wurden Testexpressionen in 5ml LB-Kulturen durchgeführt.

Die **Cyp40-TPR Domäne** (Cyp(TPR), Aminosäuren 185-370) wurde unter Verwendung des pCR T7 TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in den pCR T7/NT-TOPO Vektor kloniert. Ausgehend von diesem Konstrukt konnte Cyp40(TPR) um einen nicht abspaltbaren, N-terminalen Polyhistidinschwanz erweitert, exprimiert und mittels Metallchelatchromatographie gereinigt werden. Die PCR-Reaktion wurde analog zu der in Tabelle 7 dargestellten Reaktion, jedoch mit Taq-Polymerase und der Primerkombination Cyp40start185/Cyp40stop370 durchgeführt. Die Ligation unter Verwendung von Topoisomerase-assoziiertem pCR-Vektor sowie des nicht weiter bearbeiteten PCR-Reaktionsmixes erfolgte innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur. Hierbei wurden die durch die Taq-Polymerase generierten, einfachen Desoxyadenosinüberhänge im PCR-Produkt zur Anlagerung von Insert und Vektor ausgenutzt. Das Ligationsprodukt wurde

Tabelle 7: PCR-Amplifikation von Cyp40 und Cyp40(TPR)

Reaktionsansatz		
10 μ l	Thermopol-Puffer (10x)	
2 μ l	dsDNA Templat (IMAGp998J1929, 40ng/ μ l)	
6 μ l	Primer Cyp40start1 oder Cyp40start185 (0.2 μ g/ μ l)	
6 μ l	Primer Cyp40stop370 (0.2 μ g/ μ l)	
1 μ l	dNTP Lösung (25mM)	
1 μ l	Vent-Polymerase	
74 μ l	H ₂ O	
PCR Reaktion		
	Temperatur	Time
Start	95°C	3min
25 Zyklen	95°C	1.5min
	50°C	1min
	72°C	1min/kb PCR-Fragment
Ende	72°C	10min
	4°C	∞

in superkompetente 'One-Shot' *E. coli*-Zellen (Invitrogen) transformiert und Klone mit in Leserichtung orientierten Inserts durch Testexpressionen in 5ml-LB-Kulturen identifiziert.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Proteinexpression und Reinigung

TEV Protease, Cyp40, hHsp70, hHsp90, Hsp82, TPR Domänen von p60/Hop, Cyp40 und TOM34

Die *TEV Protease*, die p60 TPR Domänen *TPRI*, *TPRIIL*, *TPRIIA*, *TPRIIB* sowie deren Mutanten, die *TPRII Domäne con TOM34 (TOM34-TPRII)* sowie *Cyp40*, *Hsp70*, *C70* und *Hsp90* wurden in BL21(DE3)pLysS-Zellen von einem pPROEX-Plasmid mit einer N-terminalen His₆-Sequenz exprimiert. 6x1L TB Medium wurden in 2.8L Schikanekolben mit jeweils 300 μ l AntiFoam Se-35 versetzt und mittels einer Übernachtskultur auf eine $OD_{600} \approx 0.1$ eingestellt. Im Fall der *TEV Protease* wurde dem Medium 50 μ g/ml Kanamycin und in allen anderen Fällen 100 μ g/ml Ampecillin zugegeben. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer $OD_{600} \approx 0.6$ bei einer Temperatur von 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Expression der *TEV Protease* sowie von *Cyp40*, *Hsp70* und *Hsp90* wurde die Temperatur vor Induktion auf 18°C gesenkt. Nach einer weiteren Stunde wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (1mM) für einen Zeitraum von 10-12h induziert. Die Expression sämtlicher *TPR Domänen von p60* erfolgte bei 37°C über 5h, die *Cyp40 TPR Domäne* sowie die *TOM34(TPRII)* wurden für 3h exprimiert. Danach wurden die Zellen durch 30min Zentrifugation bei 2.500g und 4°C pelletiert, das Zellpellet in 100ml IMAC_A Puffer resuspendiert und in N₂(fl) zur Lagerung bei -80°C schockgefroren.

Die Zellyse erfolgte durch 3-4maliges Einfrieren in N₂(fl) und Auftauen bei 30°C. Zum Verdau der DNA wurden nach dem ersten Auftauzyklus 1 μ l Benzozonase (250.000 U/ml) und eine Tablette Complete Proteaseinhibitionscocktail pro 25ml Zellsuspension zugesetzt.

Die löslichen Bestandteile des Zelllysates wurden durch Ultrazentrifugation (30min, 100.000g, 4°C) vom Zelldebris getrennt und auf eine 10-20ml Ni-NTA Metallchelatomatrix geladen. Nach Waschen der Säule mit 2x25-50ml IMAC_A Puffer wurde die Matrix mit 3x10-20ml IMAC_B Puffer eluiert. Die *TEV Protease* wurde gegen TEV-Protease-Puffer dialysiert und nach Schockgefrieren in N₂(fl) bei -80°C gelagert. *Cyp40(TPR)* sowie die *TOM34(TPRII)* wurden gegen Puffer G dialysiert, durch Ultrafiltration konzentriert und nach Schockgefrieren bei -80°C gelagert. Die *TPR Domänen von p60* sowie *C70* wurden ebenfalls gegen TEV Protease Puffer dialysiert, zur Abspaltung der His₆-Sequenz mit TEV Protease versetzt (1:20 OD₂₈₀) und für 3-6h bei 25-30°C inkubiert. Daraufhin wurde der Salzgehalt des Verdauansatzes auf 300mM

NaCl erhöht und die Proteinlösung erneut einer Ni-Chelatchromatographie unterzogen. Proteine mit abgetrennter His₆-Sequenz wurden im Durchfluß der Ni-Säule aufgefangen. Die *p60 TPR Domänen* wurden teilweise gegen Puffer G dialysiert und nach Konzentration und Schockfrieren bei -80°C gelagert. Die *Reinheit der TPR Domänen* betrug nach der Ni-Chromatographie bereits >90%. Proteine dieses Reinheitsgrades wurden für Bindungsstudien eingesetzt. Zum Einsatz in ATPase Assays wurden die Proteine wie unten beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die His₆-Sequenzen von *Hsp70 und Hsp90* wurden nicht entfernt, um die relativ harschen und potentiell inaktivierend wirkenden Bedingungen der Verdaureaktion zu vermeiden.

Cyp40, Hsp70, Hsp90 und C70 sowie die *p60/Hop TPR Domänen* wurden daraufhin gegen 30mM Tris/HCl pH 8.5, 0.5mM EDTA dialysiert. Nach Dialyse wurden die Proteine auf eine 50ml SourceQ Säule geladen, nur im Fall von *Cyp40* wurde eine 10ml MonoQ Säule verwendet. Die Säulen wurden mit 250ml, bzw. 50ml 30mM Tris/HCl pH 8.5, 0.5mM EDTA gewaschen und die Proteine durch einen 500ml (100ml) Gradienten von 0-1M NaCl bei einer Fließgeschwindigkeit von 4ml/min (2ml/min) eluiert. Der Pool relevanter Fraktionen wurde mittels Centriprep Ultrafiltrationskammern konzentriert und auf in Puffer G äquilibrierte Gelfiltrationssäulen aufgetragen. Lediglich *Cyp40* wurde direkt gegen Puffer G dialysiert, konzentriert und schockgefroren. Zur Reinigung von *Hsp70 und Hsp90* wurde eine HiLoad 16/60 Superdex200 und zur Reinigung der *p60 TPR Domänen* sowie von *C70* eine HiLoad 26/60 Superdex75 Säule eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit der Gelfiltrationsläufe betrug 0.25-0.5ml/min. Die relevanten Fraktionen wurden gepoolt und durch Ultrafiltration konzentriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Reinigung von *Hsp82* wurde analog der Präparation des humanen *Hsp90* durchgeführt. Um die Isolierung des labilen Proteins jedoch innerhalb von 24 Stunden durchführen zu können, erfolgte nach Ni-Chelatchromatographie zunächst die Gelfiltration in Puffer G und dann ohne weiteren Pufferwechsel die Anionenaustauschchromatographie. Die *Hsp82* enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt, gegen Puffer G dialysiert und schockgefroren.

Die *Reinheit von Hsp70 und Hsp90* lag bei ca. 80-90%. Durch N-terminale Sequenzierung konnten die wesentlichen Kontaminationsbanden der *Hsp90* Präparationen als Proteolysefragmente von *Hsp90* identifiziert werden. Die *p60 TPR Domänen* sowie *C70* konnten als >95% rein dargestellt werden. Die *Ausbeuten* pro Präparation lagen, ausgehend von einer 6L TB-Expressionskultur, bei 10-20mg für *Hsp70* und *Cyp40*, 50-100mg für *Hsp90*, TOM34 (TPRII) und *C70* sowie mehreren 100mg für die *p60 TPR Domänen*. Die

Konzentrationen der Proteinstocklösungen betragen ca. 10mg/ml für Cyp40, Cyp40(TPR), Hsp70 und Hsp90, 30-50mg/ml für C70 und 40-160mg/ml für die p60 TPR Domänen.

N-terminale Domäne von Hsp90 (N90)

Die Expression von N90 erfolgte in BL21DE3 pLysS Zellen von einem pET3d Vektor [259] in TB-Medium und in Gegenwart von IPTG (1mM) bei 37°C über einen Zeitraum von 3h. Die Zellyse wurde, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Nach Ultrazentrifugation (30min, 100.000g, 4°C) wurde der Überstand auf eine 50ml SourceQ Säule aufgetragen und die Säule mit 250ml 30mM Tris/HCl pH 8.5, 0.5mM EDTA gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen 500mL Gradienten von 0-1M NaCl in 30mM Tris/HCl pH 8.5, 0.5mM EDTA bei einer Fließgeschwindigkeit von 4ml/min. Der Pool N90-haltiger Fraktionen wurde gegen 30mM Tris/HCl pH 8.0 dialysiert und das Dialysat auf eine 20ml MonoQ Säule aufgetragen. Die Elution dieser Säule erfolgte wie im vorhergehenden Chromatographieschritt. Das Volumen des Gradienten betrug 200ml. Der Pool N90 haltiger Fraktionen wurde durch Ultrafiltration konzentriert und auf eine in Puffer G äquilibrierte HiLoad 26/60 Superdex75 Säule aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit der Gelfiltration betrug 0.5ml/min. N90-haltige Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Ausbeuten der N90 Präparationen betragen 100-1500mg, ausgehend von einer 6L Expressionskultur. Die Reinheit der Domäne betrug >90%, Stocklösungen besaßen Proteinkonzentrationen zwischen 30-50mg/ml.

C-terminale Domäne von Hsp90 (C90)

Die Expression von (C90) erfolgte, ausgehend von einem pET3d Vektor, in BL21DE3 Zellen [259]. 6x1L TB Medium wurden mit 300µl Antifoam-SE35 und 50µg/ml Ampecillin versetzt, durch eine Übertagkultur angeimpft ($OD_{600} \approx 0.1$) und bei einer Temperatur von 37°C bis zum Erreichen einer $OD_{600} \approx 0.6$ geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Zugabe von IPTG (1mM) für 3h bei 37°C. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert (2.500g, 30min, 4°C), die Zellpellets in PBS resuspendiert und in N₂(fl) zur Lagerung bei -80°C schockgefroren.

Die Zellyse erfolgte durch Lysozymverdau (80ug/ml Suspension) über 30min auf Eis und darauffolgendes mehrmaliges Einfrieren in N₂(fl) und Auftauen

bei 30°C sowie einminütiger Ultraschallexposition auf Eis. Je 35ml Zellsuspension wurde eine Tablette Complete Proteaseinhibitionscocktail zugesetzt. Auf die Ultrazentrifugation (30min, 100.000g, 4°C) folgte eine Ammoniumsulfatpräzipitation, wobei der Überstand der Zentrifugation bei 4°C langsam mit dem gleichen Volumen einer gesättigten 3.9M (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt wurde. Nach Zugabe der (NH₄)₂SO₄-Lösung wurde die Mischung für 30min bei 4°C gerührt und anschließend 30min bei 20.000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20ml 20mM Tris/HCl pH 8.5 resuspendiert und mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 150ml verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde auf eine 50ml SourceQ Säule geladen und die Säule mit 200ml 20mM Tris/HCl pH 8.5 gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen 500ml Gradienten von 0-1M NaCl in 20mM Tris/HCl pH 8.5 bei einer Fließgeschwindigkeit von 4ml/min. C90 haltige Fraktionen wurden in mehreren Durchgängen auf eine 1ml Resource Reversed Phase Säule aufgetragen und eluiert. Die Säule wurde äquilibriert in 0,1M NH₄Ac pH 6.5. Die Elution erfolgte durch einen linearen 20ml Gradienten von 0-66% Acetonitril in 0,1M NH₄Ac pH 6.5 bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.5ml/min. C90 haltige Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer G dialysiert. Das Dialysat wurde durch Ultrazentrifugation konzentriert und auf eine in Puffer G äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex75 Säule aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit des Laufes betrug 0.5ml/min. C90 haltige Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Ausbeuten der C90 Präparationen betragen 50-80mg, ausgehend von einer 6L TB-Expressionskultur. *Die Reinheit der Domäne* betrug >90%, die Stocklösungen hatten Proteinkonzentration von 20-30mg/ml.

p60

p60 wurde von einem pET28 Vektor in BL21DE3 pLysS Zellen analog zu C90 exprimiert [259]. Die Zellen wurden in 30mM Tris/HCl pH 8.5, 0.5mM EDTA, 1mM DTT resuspendiert und, wie für die C90 Präparation beschrieben, lysiert.

Nach Ultrazentrifugation (30min, 100.000g, 4°C) wurde der Überstand einer 10minütigen PEI Präzipitation auf Eis unterzogen (0.005% PEI Endkonzentration, PEI Stock: 10% PEI pH 8.5). Nach erneuter Ultrazentrifugation (30min, 100.000g, 4°C) wurde der Überstand auf eine 20ml SourceQ Säule aufgetragen und die Säule mit 100ml 20mM Tris/HCl pH 8.5 gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen 200ml Gradienten 0-300mM NaCl in 20 mM Tris/HCl pH 8.5 mit einer Fließgeschwindigkeit von 2ml/min. Der Pool p60

haltiger Fraktionen wurde durch Ultrafiltration konzentriert und auf eine in Puffer G äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex75 Säule aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit der Gelfiltration betrug 0.5ml/min. p60 haltige Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. *Die Ausbeuten der p60 Präparationen* betragen 50-100mg ausgehend von einer 6L Expressionskultur. *Die Reinheit* betrug ca. 90%, die Stocklösungen hatten eine Proteinkonzentration zwischen 30-50mg/ml.

2.6.2 Proteinanalytische Methoden

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden als UV-Absorptionsmessungen und unter Verwendung des Beer-Lambert'schen Gesetzes durchgeführt. Die Proteinstocklösungen wurden verdünnt und Absorbtionen bei 280nm zwischen 0.8 und 1.2 zur Berechnung der Proteinkonzentrationen herangezogen. Die molalen Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Vollängenproteine und Proteindomänen wurden mit Hilfe des ProtParam -Programms berechnet (www.expasy.ch).

Die *Reinheit von Proteinpräparationen* wurde durch SDS-PAGE mit diskontinuierlichem Puffersystem [267] analysiert. 5-10µl der Proben wurden mit 5µl 2xGelladungspuffer versetzt, für 1-3min auf 95°C erhitzt und auf 12.5%ige oder 15%ige SDS-PAGE Minigele (0.75 mm Geldicke) aufgetragen (Tabelle 8). Die Elektrophorese wurde unter einer Spannung von 200V in BioRad Gelkammern mit SDS-Laufpuffer durchgeführt. Zur Identifizierung der Proteinbanden wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 0.25% Coomassie BlueR250 in H₂O) inkubiert und darauf mit Entfärbelösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure in H₂O) gewaschen.

2.7 Synthese der Ac-O/X₄-VD-COOH-Peptidbibliothek

Die Synthese der kombinatorischen Peptidbibliothek Ac-O/X₄-VD-COOH wurde als *automatisierte Festphasensynthese* durchgeführt, wie in [268] [269] beschrieben. Die randomisierten Positionen wurden nach der *Premix-Methode mit Hilfe vorgemischter Aminosäuren eingeführt* [270] [271] [272].

Zur multiplen Synthese der 96 kombinatorischen Mischungen³⁵ wurde ein vollautomatisierter Syntheseroboter (SYRO, MultiSynTech, Bochum, BRD)

³⁵Für die Beschreibung des Bibliotheksdesigns siehe Kapitel 3.1.3;

Tabelle 8: Zusammensetzung von SDS-PAGE Gelen

Die Prozentwerte der Stammlösungen sind in (w/v) angegeben.

% Acrylamid	Trenngel		Sammelgel
	12.5	15	5
30% AA / 0.6% BisA (ml)	6.8	8.5	0.83
1.875 M Tris/HCl pH 8.8 (ml)	3.5	3.5	
0.6 M Tris/HCl pH 6.8 (ml)			0.5
H ₂ O (ml)	6.4	4.74	3.6
10% SDS (μ l)	167	167	50
10% AMPS (μ l)	100	100	50
TEMED (μ l)	10	10	5

eingesetzt. Als Synthesgefäße dienten mit Filterfritten ausgelegte Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg). Um die Peptide als freie Säuren zu erhalten, wurde ein mit der definierten Fmoc-Aminosäure Asp(OtBu) vorbelegtes Wang-Harz eingesetzt. Der Ansatz betrug $15\mu\text{mol}$ Peptid, entsprechend 30mg Harz (Belegung: 0,5mmol/g). Die Harze wurden dreimal mit DMF (jeweils $300\mu\text{l}$) gewaschen und zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen $2 \times 7\text{min}$ mit 20% Piperidin/DMF (v/v, jeweils $220\mu\text{l}$) inkubiert und abfiltriert. Nach achtmaligem Waschen mit DMF (jeweils $400\mu\text{l}$) wurde die Peptidsynthese gestartet.

N_{α} -Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden als 0,5M Lösung in 0,5M HOBt/DMF und DIC in 1,5M Lösung in DCM/DMF (2:1) angesetzt. Zur Herstellung der Fmoc-Aminosäuren-Mischung (X-Mix) wurden *alle proteino-genen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein in äquimolaren Verhältnissen zueinander eingewogen* und in einer Gesamtkonzentration von 0,1M in einem Gemisch aus DCM,DMF, DMSO und HOBt (3:1:1; 0,1 M) gelöst. Zur Kupplung wurden zunächst fünf Äquivalente DIC pipettiert. *Die randomisierten Positionen wurden durch Zugabe einer bezogen auf die freien Aminofunktionen des Harzes äquimolaren Menge der Fmoc-Aminosäurenmischung ($150\mu\text{l}$ 0,1M X-Mix) eingeführt.* Zur Kupplung der definierten Positionen mit proteino-genen Aminosäuren wurden $150\mu\text{l}$ der 0.5M Aminosäurelösung pipettiert, entsprechend jeweils fünffachen Überschüssen gegenüber den $15\mu\text{mol}$ Harzfunktionen pro Synthesgefäß. Die Kupplungsdauer betrug für alle Positionen insgesamt $2 \times 3\text{h}$. Nach jeweils 2,5h erfolgte Zugabe von $30\mu\text{l}$ 1,5M

DIPEA in DCM/DMF (1:1) und 30 min Inkubation. Darauf folgte dreimaliges Waschen mit DMF (jeweils 300 μ l) und Zugabe von 20% Piperidin/DMF (v/v, 220 μ l) sowie 15 min Inkubation. Zum Abschluß des Synthesesyklus wurden die Harze noch achtmal mit DMF (jeweils 400 μ l) gewaschen.

Zur *N-terminalen Acetylierung* wurden die peptidbelegten Harze mit 150 μ l 1,5M DIPEA in DCM/DMF (1:1) und 150 μ l 1,5M Acetanhydrid in DCM/DMF (1:1) 30min inkubiert. Nach Absaugen der Reaktionslösungen wurden die Harze je zweimal mit DCM, MeOH und Diethylether gewaschen. Die Vollständigkeit der Acetylierung wurde durch einen Kaiser-Test [273] überprüft. Die *Abspaltung* der Peptidkolektionen vom Wang-Harz erfolgte parallel zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen.

Als *Abspaltungslösung* wurde eine Mischung aus TFA/Scavenger-Mix/Wasser (33:5:2, v/v/v) eingesetzt. Der Scavenger-Mix enthielt Thioanisol, Ethandithiol und Phenol (2:1:3, v/v/v). Nach 30min Inkubation wurden die Peptidlösungen abfiltriert und nach insgesamt 3h Abspaltungsdauer durch Zugabe von vorgekühltem Diethylether/n-Heptan (1:1, v/v; 5 ml) gefällt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Die Peptide wurden 3min bei 3000rpm abzentrifugiert (Rotanta/RPC, Hettich, Tuttlingen, BRD), die Überstände dekantiert, die Pellets in vorgekühltem Diethylether/n-Heptan (1:1, v/v; 2 ml) resuspendiert und anschließend 1h bei -20°C gelagert. Dieser Waschzyklus wurde dreimal wiederholt. Die Peptidniederschläge wurden schließlich in tert. -Butanol/Wasser (4:1, v/v; 5ml) aufgenommen und nach Homogenisieren (Vortex) sowie 15min Ultrabeschallung bei 50°C gefriergetrocknet.

Repräsentative Peptidmischungen wurden mit Hilfe von *Massenspektrometrie und Poolsequenzierung* analysiert, um die Gleichverteilung aller Aminosäuren an randomisierten Positionen sicherzustellen [274] [275]. Die Analytik der Peptidmischungen wurde von Dr. Burkhard Fleckenstein (Universität Tübingen) durchgeführt.

2.8 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.8.1 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Sämtliche Oberflächenplasmonresonanzexperimente (*engl.* : Surface Plasmon Resonance, SPR) wurden mit einem BIAcore2000 Gerät durchgeführt. Es wurden die Biosensorchips B1, CM5 und SA verwendet.

Immobilisierungsstrategien

Hsp70, C70, Hsp90, Hsp90 Δ N, Hsp90 Δ C, N90, M90 und C90 wurden chemisch biotinyliert und auf mit Streptavidin derivatisierte Biosensorchips aufgetragen. Mit Streptavidin belegte Biosensorchips wurden entweder als SA Chips kommerziell erworben oder nach dem in Tabelle 9 angegebenen Immobilisierungsprotokoll, ausgehend von CM5 Chips, hergestellt. Streptavidin wird hierbei kovalent über seine Aminfunktionen an die carboxymethylderivatisierte Dextranmatrix der CM5 Chips gekuppelt [276]. Nach dem in Tabelle 9 angegebenen Protokoll werden 5.000-6.000RU Streptavidin auf CM5 Chips, bzw. 2.000-3.000RU Streptavidin auf B1 Chips³⁶ immobilisiert. 5.000RU Streptavidin haben eine Kapazität zur Bindung von ca. 3000RU Hsp90(biot), 2500RU Hsp70(biot), 600RU C90(biot) oder 1100RU C70(biot). Die Kapazität der SA Chips beträgt ungefähr ein Drittel dieser Werte. Üblicherweise wurden alle vier Fließzellen eines Chips gleichzeitig mit Streptavidin belegt. Hierbei verminderte sich die Menge immobilisierten Streptavidins um ca. 200RU von Fließzelle zu Fließzelle. Streptavidin-derivatisierte Chips waren über einen Zeitraum von Wochen stabil ohne erhebliche Einbußen ihrer Bindungskapazitäten für biotinylierte Proteine.

Die Biotinylierung sämtlicher Proteine wurde unter sehr milden Bedingungen durchgeführt. Aktiviertes Biotin wurde in mindestens dreifachem molaren Unterschuß gegenüber den Proteinen eingesetzt, um zu gewährleisten, dass i. a. ein einzelnes Protein durch nicht mehr als ein Biotin modifiziert wird. Eine Quervernetzung der zu immobilisierenden Proteine auf der Chipoberfläche sollte hierdurch unterdrückt und die Aktivität der immobilisierten Proteine optimiert werden. Ein typischer Biotinylierungsansatz ist in Tabelle 10 für Hsp90 angegeben. Die biotinylierten Proteine wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 μ l/min auf die mit Streptavidin-derivatisierten Sensorchips aufgetragen. Die Beladung kann bei hinreichend niedrigen Proteinkonzentrationen (<150 μ g/ml) sehr langsam und kontrolliert durchgeführt werden, so dass die Menge immobilisierten Proteins mit einer Genauigkeit von \pm 50RU (bei Signalstärken von \sim 3000 RU) eingestellt werden kann. Die Aktivität der auf diese Weise biotinylierten und immobilisierten Hitzeschockproteine zur Bindung von TPR-Proteinen betrug 60-80%, ca. 30% der immobilisierten Proteine waren zur Interaktion mit CDC37 befähigt.

³⁶B1 Chips besitzen gegenüber CM5 Chips eine dünnere Dextranmatrix, die zudem einen geringeren Derivatisierungsgrad bezüglich Carboxymethylgruppen aufweist. Dies führt zu einer Verminderung der Kapazität der B1 Chips hinsichtlich der Proteinimmobilisierung, bewirkt aber gleichfalls eine Verminderung unspezifischer Matrixinteraktionen der in Lösung befindlichen Interaktionspartner.

Tabelle 9: Immobilisierungsstrategien für Streptavidin und Cys-Peptide

Aminkupplung von Streptavidin		Kupplung von Cys-Peptiden	
35 μ l	1:1 Mischung aus 0.2M EDC/0.05M NHS	75 μ l	1:1 Mischung aus 0.2M EDC/0.05M NHS
35 μ l	300 μ g/ml Streptavidin in 10mM KAc pH 6.0	50 μ l	0.1M Ethylendiamin pH 8.5
35 μ l	1M Ethanolamin pH 8.5	50 μ l	50mM Sulfo-GMBS
		50 μ l	0.1mM Peptid
		50 μ l	0.1M NaOH
Temperatur: 25°C			
Laufpuffer: HBS			
Fließgeschwindigkeit: 5 μ l/min			

Tabelle 10: Biotinylierung von Hsp90

20 μ l	Hsp90 (9mg/ml; 50 μ M Dimer) Endkonzentration: 20 μ M Dimer
1 μ l	Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (0.2mg/ml; 333 μ M) Endkonzentration: 7 μ M
29 μ l	50mM NaHCO ₃ pH 8.5
50 μ l	Reaktionsvolumen
10min Inkubation auf Eis	
Abtrennung von freiem Biotin und Umpuffern in Puffer G mittels NAP5 Säulen	

Die **Immobilisierung von Cys-Peptiden** erfolgte durch den heterobifunktionalen Crosslinker Sulfo-GMBS, der eine Reaktivität gegen Aminofunktionen mit einer Reaktivität gegen Sulfidrylgruppen verbindet. Das Immobilisierungsprotokoll wurde modifiziert nach [277] und ist in Tabelle 9 angegeben. Aufgrund der geringen Masse von Peptiden kann die Menge immobilisierten Materials nicht beobachtet und die Aktivität der immobilisierten Peptide daher nicht bestimmt werden. Die maximalen Signalintensitäten (R_{max}), die nach Befolgung des angegebenen Immobilisierungsprotokolls durch eine absättigende Bindung von p60 TPR-Domänen (13-16 kDa) erreicht wurden, lagen im Bereich mehrerer tausend relativer Bindungseinheiten (RU).

Bindungsstudien

Sämtliche Experimente betreffend die *Bindung von TPR Proteinen an Hsp70 und Hsp90* wurden in Puffer G bei 25°C durchgeführt; die *Bindung von CDC37 an Hsp90* wurde in HBS(50) Puffer untersucht. Die Fließgeschwindigkeit betrug 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ in allen Experimenten. 30 μl Proteinlösungen wurden unter Verwendung des Befehls KINJECT injiziert und die Fließzellen nach Ende der Injektion mindestens 5min mit Laufpuffer gespült, bevor Regeneration der Chipoberfläche erfolgte. Waren Proteine auf den Chips immobilisiert, erfolgte die Regeneration durch einen zweimaligen, einminütigen Puls mit 0.5M NaCl Lösung; im Fall von immobilisierten Peptiden wurde mit 6M Guanidiniumchloridlösung pH 3.0 gewaschen. Im Anschluß an jedes Bindungsexperiment wurde die Waschroutine EXTRACLEAN durchgeführt und, um Verschleppungsartefakte auszuschließen, wurde vor Beginn des darauffolgenden Bindungszyklus die Routine WASH NEEDLE durchlaufen. Ein Zyklus aus Bindung, Dissoziation und Regeneration dauerte nach diesem Protokoll ca. 20min. Im Falle von immobilisierten Hitzeschockproteinen konnten 100-150 dieser Bindungszyklen mit TPR Proteinen oder CDC37 durchgeführt werden unter Aktivitätseinbußen von <20%. Sensorchips mit immobilisierten Peptiden waren über einen Zeitraum von Wochen und >500 Bindungszyklen ohne erkennbare Aktivitätseinbußen stabil.

Die **Titrationsexperimente** wurden automatisiert als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Verdünnungsreihen der zu injizierenden Proteine umfaßten typischerweise 10-12 Proteinkonzentrationen, sie wurden ausgehend von der höchsten Konzentration als kontinuierliche 1:2 Verdünnungen angelegt. Proteine wurden im Konzentrationsbereich zwischen 40nM und 200 μM auf den Sensorchip injiziert. Die Titrationsexperimente wurden mit aufsteigenden Proteinkonzentrationen durchgeführt. Ein als Dreifachbestimmung durchgeführtes Titrationsexperiment dauerte 10-12h.

Die **Auswertung der Titrationsexperimente** erfolgte mit Hilfe des BIAevaluation 3.0 Programms. Zur Ermittlung der durch die Proteinbindung an der Chipoberfläche hervorgerufenen spezifischen Bindungssignale wurden die Signale einer nur mit Streptavidin belegten oder völlig unbelegten Kontrollzelle als sog. 'Puffersprünge' von den Signalen der mit Hitzeschockproteinen belegten Meßzellen abgezogen. Die zeitlichen Mittel der spezifischen Bindungssignale nach Einstellung der konzentrationsabhängigen Bindungsgleichgewichte (R_{eq}) wurden berechnet und gegen die entsprechenden Proteinkonzentrationen aufgetragen. Zur Berechnung der thermodynamischen Assoziationskonstanten wurde das folgende, Bindungsgleichgewichte an Oberflächen beschreibende Modell an die Datenpunkte angepaßt (*Langmuirsche Adsorptionsisotherme* [278]):

$$R_{eq} = \frac{K_A * C * R_{max}}{1 + K_A * C * n}$$

Mit:

R_{eq}	Bindungseinheiten (RU) im Bindungsgleichgewicht;
K_A	Thermodynamische Assoziationskonstante;
R_{max}	R_{eq} bei Bindungssättigung;
C	Konzentration des in Lösung befindlichen Proteins
n	Stöchiometriefaktor der Bindung.

Kompetitionsstudien mit definierten Peptiden

Definierte Peptide wurden zur *Kompetition der Wechselwirkungen von Hsp70 und Hsp90 mit TPR Proteinen eingesetzt*. Hsp70 oder Hsp90 wurde, wie oben beschrieben, nach Biotinylierung auf Streptavidin-derivatisierte Sensorchipmatrizen geladen und die Bindung der TPR-Proteine an die Sensoroberfläche in Gegenwart und Abwesenheit definierter Peptide verfolgt. *Während die Konzentration der auf den Sensorchip injizierten TPR-Proteine konstant gehalten wurde, wurden die Peptidkonzentrationen innerhalb einer Meßreihe von Messung zu Messung erhöht*. Das in Abwesenheit von Peptiden erreichte spezifische Signal der TPR-Protein Bindung im Bindungsgleichgewicht (R_{eq}) wurde als 100% Bindung betrachtet und zur Normierung der in Gegenwart von Peptidkompetitoren reduzierten Bindungssignale eingesetzt. Die TPR-Proteine wurden mit den Peptiden mindestens 15min bei 8°C vorinkubiert und anschließend als Protein-Peptidmischungen auf den Sensorchip injiziert. Sämtliche Konkurrenzexperimente wurden in Puffer

G bei 25°C durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug in allen Fällen 20 µl/min; das Injektionsvolumen betrug 30 µl. 5min nach Beendigung der Injektion wurde der Chip durch einen zweimaligen einminütigen Puls mit 0.5M NaCl-Lösung gewaschen. Im Anschluß an jeden Bindungs- und Regenerationszyklus wurden die Waschroutinen EXTRACLEAN und WASH NEADLE durchgeführt. Jede Meßreihe umfaßte einen 100% Wert und 8-10 Bindungszyklen mit ansteigenden Konzentrationen der Peptidinhibitoren. Für jedes Peptid wurden drei solcher Meßreihen direkt aufeinanderfolgend durchgeführt, jeweils mit dem Bindungsexperiment ohne Peptid (100% Bindung) beginnend. Die Gesamtdauer eines jeden als Dreifachbestimmung durchgeführten Wettbewerbsexperimentes betrug pro Peptid und untersuchter Protein-Proteininteraktion 10-12 h.

In den Wettbewerbsexperimenten zur p60-Hsp70 Interaktion wurde p60 in einer Konzentration von 0.54 µM eingesetzt, in den Experimenten zur p60-Hsp90-Interaktion in einer Konzentration von 1.8 µM. TPRI wurde in den Wettbewerbsexperimenten in einer Konzentration von 5.4 µM eingesetzt, TPRIIA in einer Konzentration von 1.8 µM. Die Sensorchips waren mit 2000-3000RU Hsp70 und Hsp90 beladen. Die Peptidkonzentrationen wurden zwischen 100nM und 2mM Endkonzentration variiert.

Alle Peptide wurden direkt in Puffer G gelöst und die pH Werte der Stocklösungen auf pH 7.5 eingestellt. Mit Ausnahme des Peptids Ac-RMEEVD-COOH waren alle verwendeten EEVD-Peptide (Kapitel 2.3) in Puffer G in einer Konzentration von 20mM löslich; die Stocklösung von Ac-RMEEVD-COOH hatte eine Konzentration von 10mM. Ausgehend von diesen Stocklösungen wurden Verdünnungsreihen angelegt und die Peptidlösungen im Volumenverhältnis 1:10 in die TPR Proteinlösungen verdünnt.

Zur **Auswertung der Wettbewerbsexperimente** wurden die normalisierten Bindungssignale von p60, TPRI und TPRIIA gegen die Peptidkonzentration aufgetragen. Folgende Formel beschreibt eine einfache kompetitive Bindung von zwei um dieselbe Bindungsstelle konkurrierenden Liganden [279]:

$$r = \frac{n*[A]}{[A] + K_A * (1 + \frac{[B]}{K_B})}$$

Mit:

- r** Normalisiertes Bindungssignal;
- n** Stöchiometriefaktor (n=1);

A	Ligand A (immobilisiertes Peptid);
B	Ligand B (kombinatorische Peptidmischung);
K_A	Thermodynamische Assoziationskonstante für Ligand A;
K_B	Thermodynamische Assoziationskonstante für Ligand B;

Unter Verwendung des Programms Kaleidagraph 3.0 wurde obiges Modell an die Datenpunkte angepaßt und die IC₅₀-Werte für die betrachteten Peptide wurden aus der erhaltenen Kurve abgelesen.

Kompetitionsstudien mit kombinatorischen Peptidmischungen

Zum Screening der aus 96 kombinatorischen Peptidmischungen bestehenden Heptapeptidbibliothek Ac-X₄/O-VD-COOH wurden die definierten tridekamer Peptide Ac-C-GSGSGPTIEEVD-COOH und Ac-C-GDDDTSRMEEVD-COOH über ihre Sulfhydrylgruppen auf CM5-Chips immobilisiert (Tabelle 9). Die Signale der Bindungssättigung (R_{max}) lagen für die TPR Domänen von p60 im Bereich mehrerer tausend Bindungseinheiten (RU). Die kombinatorischen Peptidmischungen wurden als 25 mM Stocklösungen in DMSO angesetzt und direkt in die TPR Proteinlösungen hineinverdünnt. Die TPR-Peptidmischungen wurden vor Injektion auf den Chip mindestens 15min bei 8°C vorinkubiert. In allen Konkurrenzexperimenten wurden *sowohl die Proteinkonzentrationen als auch die Konzentrationen der Peptidmischungen konstant* gehalten. Die relativen Konzentrationen von Protein und Peptid wurden so gewählt, dass die maximal randomisierte Mischung Ac-X₅-VD-COOH eine 50% ige Konkurrenz des in Abwesenheit von Peptidinhibitoren erreichten Bindungssignals (100%) bewirkt. Meßreihen, bestehend aus vierzig Bindungs- und Regenerationszyklen, wurden durchgeführt. Die Messdauer eines solchen Experimentes betrug ca. 10h. Die Bestimmung des 100%igen Bindungssignals wurde in jedem vierten Experiment wiederholt. Die Bindungssignale der 100% Werte blieben über den gesamten Meßzeitraum hinweg konstant. Dazwischen erfolgten als Dreifachbestimmungen die Konkurrenzexperimente mit den einzelnen Peptidmischungen.

Sämtliche Konkurrenzexperimente wurden in Puffer G bei 25°C durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug in allen Fällen 20µl/min; das Injektionsvolumen betrug 30µl. 5 min nach Beendigung der Injektion wurde der Chip durch einen zweimaligen einminütigen Puls mit 6M GdnCl pH 3.0 gewaschen. Im Anschluß an jeden Bindungs- und Regenerationszyklus wurden die Waschroutinen EXTRACLEAN und WASH NEADLE durchgeführt.

Die p60 TPRI Domäne wurde im Bibliotheksscreen in einer Konzentration von 1.5µM eingesetzt und die Peptidmischungen in einer Konzentration

von $330\mu\text{M}$. Die DMSO Endkonzentration in den Probenlösungen betrug entsprechend 1.3%. Beim Screening mit der TPRIIA Domäne wurde das Protein in einer Konzentration von $0.9\mu\text{M}$ und die Peptidmischungen in einer Konzentration von $800\mu\text{M}$ eingesetzt. Die DMSO Endkonzentration in den Probenlösungen betrug in diesen Fällen 3.2%.

Zur **Auswertung des Peptidbibliotheksscreens** wurden die in Gegenwart der Peptidmischungen erhaltenen Bindungssignale als Prozent der in Abwesenheit der Peptidmischungen erhaltenen Bindungssignale von TPRI und TPRIIA (100%) ausgedrückt. Von den so normierten Signalstärken wurde das in Gegenwart der Referenzmischung Ac-X₅-VD-COOH erhaltene Signal (50%) abgezogen. Hiernach zeigen negative Werte Peptidmischungen an, die ein größeres Hemmpotential besitzen als Ac-X₅-VD-COOH, und positive Werte Peptidmischungen, die ein kleineres Hemmpotential besitzen als Ac-X₅-VD-COOH.

2.8.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Sämtliche ITC Experimente wurden mit Hilfe von MicroCal Titrationskalorimetern der Typen MCS und VP-ITC bei 25°C durchgeführt [280] [281] [282]. 30-50 Aliquots ($5\text{-}10\mu\text{l}$) Peptid- oder Proteinlösungen wurden schrittweise aus einer rotierenden Spritze ($300\mu\text{l}$) in die Meßkammer (1.36ml) injiziert. Die Injektionsdauer wurde auf 10-20 Sekunden und die Zeit zwischen den einzelnen Injektionen auf vier Minuten festgelegt.

Sämtliche Bindungsstudien mit p60 TPR Domänen wurden in Puffer G durchgeführt, die CDC37-Hsp90 Interaktion wurde in HBS50 Puffer vermessen. Zur Untersuchung der Peptidbindung an TPR Domänen wurden die TPR-Proteine ($450\mu\text{M}$ - 1 mM) in die Meßkammer vorgelegt und mit 10-20fach konzentrierteren Peptidlösungen titriert. Zur Titration von C70 und C90 mit den Hop TPR-Domänen wurden C90 und C70 ($180\text{-}450\mu\text{M}$) in der Meßzellen vorgelegt und mit TPR Lösungen zehnfach erhöhter Konzentrationen titriert. Zur Untersuchung der Wechselwirkung des CDC37-147-270 Fragmentes mit N90 wurde N90 ($50\mu\text{M}$) vorgelegt und mit der CDC37-Domäne ($700\text{-}800\mu\text{M}$) titriert. Die Proteinkonzentrationen in Meßzelle und Spritze wurden, soweit möglich, so eingestellt, dass die Zellkonzentration mindestens der fünffachen K_D -Konzentration der untersuchten Interaktion entsprach. Typischerweise wurden die Injektionen zur Bestimmung der Verdünnungswärmen bis zur Sättigung der Bindung durchgeführt.

Nach Subtraktion der Verdünnungswärmen wurden die kalorimetrischen Daten unter Verwendung des Programms MicroCal Origin 5.0 ausgewertet.

Durch Integration der Rohdaten wurden die pro Injektion freigesetzten Wärmen (Reaktionsenthalpien, ΔH) berechnet und gegen die molaren Verhältnisse der in der Meßzelle befindlichen Bindungspartner aufgetragen. Zur Ermittlung der thermodynamischen Assoziationskonstanten (K_A) sowie der Stöchiometriefaktoren (n) aus den erhaltenen Titrationskurven wurde folgende Beziehung angepaßt [283]:

$$Q = \frac{n*[M]_t*\Delta H_b*V_0}{2} * \left(1 + \frac{[L]_t}{n*[M]_t} + \frac{1}{n*K_A*[M]_t} - \sqrt{1 + \left(\frac{[L]_t}{n*[M]_t} + \frac{1}{n*K_A*[M]_t}\right)^2} - \frac{4*[L]_t}{n*[M]_t}\right)$$

Mit:

Q	Wärmemenge in J
[M]_t	Gesamtkonzentration des vorgelegten Liganden in der Zelle;
[L]_t	Gesamtkonzentration des hinzutitrierten Liganden in der Zelle;
n	Stöchiometriefaktor der Interaktion (n=1);
V₀	Zellvolumen;
ΔH_b	Molare Bindungsenthalpie;
K_A	Thermodynamische Assoziationskonstante.

In allen betrachteten Fällen wurde ein einfaches 1:1 Bindungsmodell zur Auswertung herangezogen. Erhielt man aufgrund zu schwacher Wechselwirkungen keine verlässlich auswertbaren Titrationskurven, wurde für die entsprechende Interaktion die Proteinkonzentration in der Messzelle als kleinstmöglicher K_D -Wert angegeben [284].

2.8.3 Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Differential Scanning Kalorimetrie erfolgte mit einem VP-DSC Gerät von Microcal [280] [281] [282] [285]. Die Messzellen wurden mit Proteinlösungen (200 µg/ml) in Puffer G gefüllt, die Referenzzellen enthielten Puffer G. Die Heizrate betrug 1°C/min über einen Temperaturbereich von 20-90°C mit Äquilibrierungszeiten von 10-15min von Beginn sowie nach Abschluss eines jeden Temperaturscans. Die Schmelzkurven wurden mit Hilfe des Programms MicroCal Origin 5.0 für DSC um die Referenzmessung korrigiert und auf die Proteinkonzentration normalisiert. Nach Abzug der Basislinie

wurden die Daten zur Bestimmung der Schmelztemperaturen T_m an ein Modell für einen einfachen Übergang angepasst. Die T_m -Werte wurden direkt aus den DSC-Schmelzkurven abgelesen (Temperatur am C_p -Maximum). Das Schmelzverhalten aller untersuchten Proteine war irreversibel. Die weitergehende thermodynamische Interpretation der Schmelzkurven wäre unzulässig.

2.8.4 CD-Spektroskopie

Zur Aufnahme von CD-Spektren wurden die zu vermessenden p60 TPR-Domänen mittels NAP5 Säulen in 20mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) überführt und auf eine Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Die CD-Spektren wurden auf einem Jasco J-715 Spektropolarimeter in einer thermostatisierten Quarz-Zelle (Hellma) mit 1 mm optische Weglänge bei 25°C aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 0.1nm, einer Sensitivität von 20mdeg, einer Geschwindigkeit von 20nm/min im Bereich des fernen UV von 190-250nm sowie des nahen UV Bereichs 250-350nm aufgenommen. Jeweils 10-15 Spektren wurden akkumuliert, um die Pufferbeiträge korrigiert und gemittelt.

Die Elliptizitäten wurden im Falle der CD-Spektren des fernen UV-Bereichs als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure (Θ_R) ausgedrückt, während sie im Falle der CD-Spektren des nahen UV-Bereichs auf die Gesamtproteine bezogen wurden (Θ_M). Die Umrechnung erfolgte unter Verwendung folgender Formeln [286]:

$$[\Theta_R] = \frac{\Theta * 100}{C * d * n}$$

und

$$[\Theta_M] = \frac{\Theta * 100}{C * d}$$

Mit:

$[\Theta_R]$	Molare Elliptizität der Aminosäuren in Grad;
$[\Theta_M]$	Molare Elliptizität der Gesamtproteine in Grad;
C	Molare Proteinkonzentration;
d	Schichtdicke der Küvette in cm;
n	Anzahl der Aminosäuren im Protein

Tabelle 11: Hsp82 ATPase Assays

Radicalol	100 % Aktivität		Inhibition durch TPR-Proteine		ATP-Kontrolle
	+	-	+	-	-
Hsp82	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	—
TPR	—	—	2.5-40 μ M	2.5-40 μ M	—
Radicalol	20 μ M	—	20 μ M	—	—
EtOH	2%	2%	2%	2%	2%
ATP*	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM

50 μ l Reaktionsvolumen, 30min, 30°C
Reaktionsstop durch Zugabe von 50mM EDTA

Die thermische Denaturierung der p60 TPR-Domänen (ebenfalls 200 μ g/ml in 20mM Kaliumphosphat pH 7.0) wurde zwischen 25°C und 85°C mit einer Heizrate von 0.5°C/min und bei einer Wellenlänge von 222nm verfolgt. Nach 20 min Inkubation bei 85°C und Aufnahme eines CD Spektrums im fernen UV Spektrums wurde die Probe mit einer Rate von 0.5°C/min wieder auf 10°C abgekühlt, um die Reversibilität der Denaturierung zu überprüfen.

Die Schmelztemperaturen (T_m) wurden über die Wendepunkte der Denaturierungskurven mit Hilfe linearer Basisgleichungen für den nativen und entfalteten Zustand ermittelt. Bestätigt wurden die Werte durch Bestimmung der Steigung an den Messpunkten [287].

2.8.5 ATPase Assays

Sämtliche Hsp82 ATPase Assays wurden als Endpunktbestimmungen nach dem in Tabelle 11 angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von ATP gestartet. 20 μ l der ATP-Stocklösung (0.2M) wurden mit 1 μ l $\alpha^{32}P$ -ATP, entsprechend ca. 1 μ Ci, versetzt. Nach Reaktionsende wurden 1 μ l eines jeden Reaktionsansatzes auf eine 20x20cm PEI-Zellulose F Dünnschichtchromatographiemembran aufgetragen und bis zur Trockenheit gefönt. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der

Adenosinphosphate erfolgte in 0.5M Ameisensäure, 0.5M LiCl. Nach Trocknen der DC-Membranen wurde das im Reaktionsverlauf gebildete ADP durch Phosphoimager-Detektion quantifiziert. Hierzu wurden die DC-Membranen über 5-12h Phosphoimagerdetektorplatten (FuJi-Film, Typ BAS-IP MS2040S) exponiert. Die Detektorplatten wurden mit Hilfe eines FuJiFilm FLA-2000 Phosphoimagers ausgelesen. Zur Bildanalyse und Datenevaluation wurde das FuJiFilm ScienceLab97 Image Gauge Software Packet verwendet.

Zur Bestimmung der spezifischen Hsp82 ATPase-Aktivität wurden alle Reaktionen als Doppelbestimmungen in Gegenwart und Abwesenheit des spezifischen Inhibitors Radicicol (Kapitel 1.2.1) durchgeführt. Die durch Radicicol hemmbare ATPase-Aktivität wurde als spezifische ATPase-Aktivität von Hsp82 betrachtet, sie betrug typischerweise 60-70% des Gesamtsignals. 30-40% der bestimmten ATP Hydrolyse waren nicht durch Radicicol hemmbar und wurden durch kontaminierende ATPasen verursacht. Die spezifische Hsp82 ATPase Aktivität in Abwesenheit inhibitorisch wirksamer TPR Domänen wurde als Referenzwert (100% Aktivität) zur Darstellung der in Gegenwart von TPR Proteinen erhaltenen Werte herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 TPR vermittelte Interaktionen des Adapterproteins p60

Die Domänenarchitektur des humanen *Hsp70-Hsp90-Adapterproteins p60* (Aminosäuren: 1-543) und insbesondere die Anzahl und Organisation seiner TPR-Motive wurden von Clemens Scheufler durch limitierte Proteolyse definiert [253] [254] [261]. Diese Studien führten zur Identifizierung der p60 Domänen TPRI (Aminosäuren: 1-118), TPRIIA (Aminosäuren: 223-352) und TPRIIB (Aminosäuren: 353-477) (Abb. 6 (A)). Auch ein größeres, die Domänen TPRIIA und TPRIIB enthaltendes Fragment erwies sich als relativ proteolyseresistent [261] und wird im folgenden als TPRIIL (Aminosäuren: 190-481) bezeichnet. Eine sorgfältige Sequenzanalyse wies in den Domänen TPRI, TPRIIA und TPRIIB jeweils drei TPR Motive aus. Die Röntgenstrukturanalyse der ligandenfreien p60 Domänen TPRI und TPRIIL ließ sehr große strukturelle Ähnlichkeiten der Subdomänen TPRI, TPRIIA und TPRIIB mit der ebenfalls drei TPR Motive enthaltenden, N-terminalen Domäne des Hsp90 Kofaktors PP5 erkennen [250] [254] [261] (Kapitel 1.3, Abb. 4 (C)). Die einzelnen TPR Motive formen Paare antiparallel verlaufender α -Helices, welche in tandemartiger Anordnung zusammen mit einer C-terminalen, flankierenden Helix den putativen Ligandenbindungsgraben umschließen. Die Natur der TPR-Liganden sowie die Mechanismen der TPR-vermittelten Ligandenerkennung blieben zunächst weiterhin unklar.

3.1.1 Bimolekulare Wechselwirkungen im Hsp70-p60-Hsp90 Komplex

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der neudefinierten p60 TPR Domänen und zur Einordnung ihrer Bedeutung für die Vollängenproteininteraktionen innerhalb des ternären Hsp70-p60-Hsp90 Komplexes wurde ein Oberflächenplasmonresonanz (SPR)³⁷-Bindungsassay etabliert. Die SPR basierte Biosensortechnologie ermöglicht die zuverlässige Analyse bimolekularer Wechselwirkungen in Echtzeit bei ausgesprochen geringem Probenbedarf [288] [289] [290] [291] [292]. Proteininteraktionen innerhalb der Hsp70 und GroEL/ES Maschinerien wurden bereits erfolgreich mittels SPR untersucht [293] [294] [295]³⁸.

³⁷engl. : Surface Plasmon Resonance

³⁸Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden auch SPR basierte Studien von Proteininteraktionen in Hsp90 Multichaperonkomplexen veröffentlicht [296]. Weder die Fragestellung noch das experimentelle Design der Studie [296] überschneiden sich jedoch mit der hier vorgestellten Arbeit.

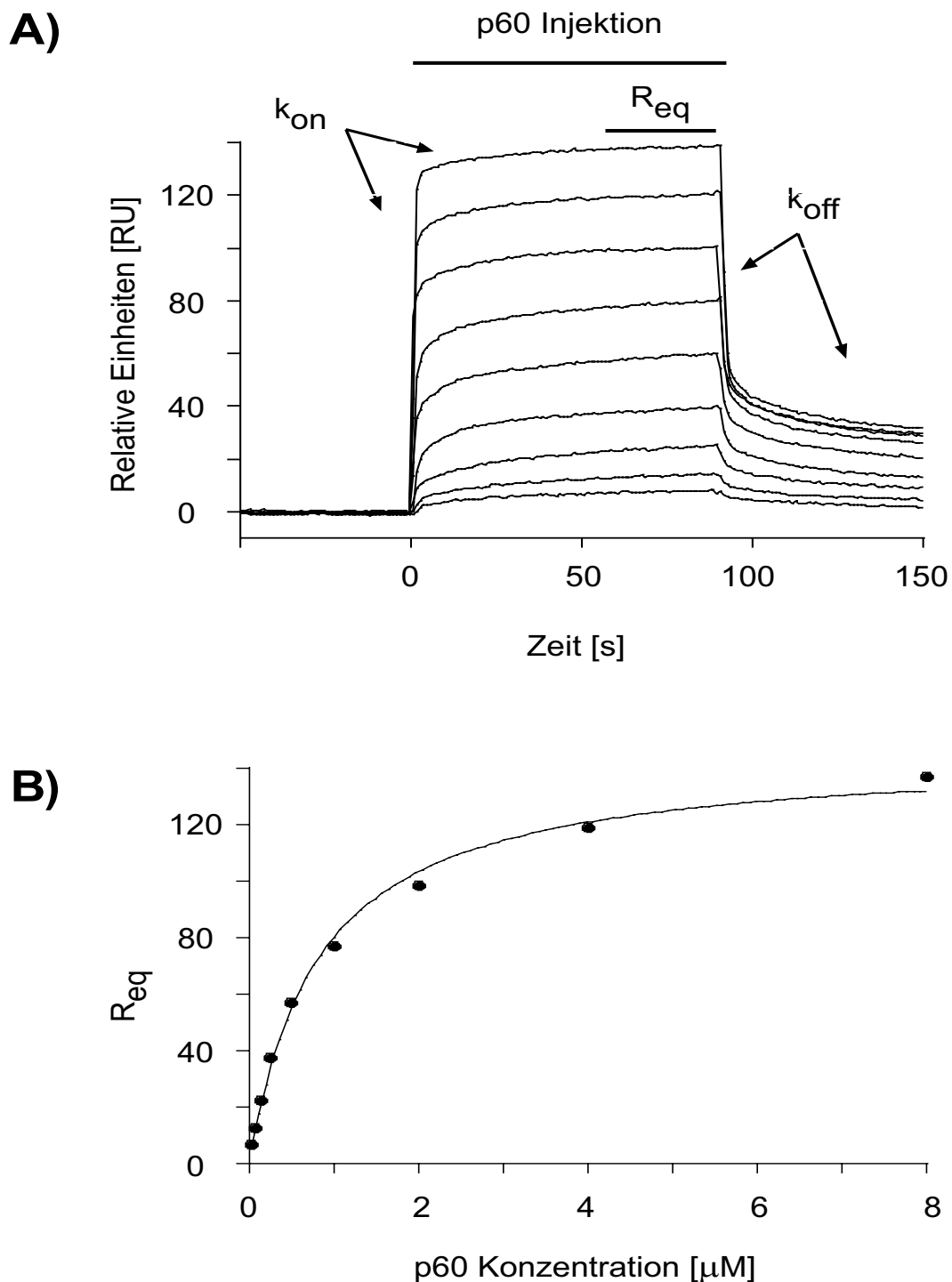


Abbildung 5: Interaktion von p60 mit Hsp90.

(A) Hsp90 (ca. 1200 RU) wurde immobilisiert, p60 zum Zeitpunkt $T=0$ in Konzentrationen zwischen 30nM und $8\mu\text{M}$ darübergelieft und die Bindung von p60 an Hsp90 verfolgt. Nach 90s wurde die p60 Injektion beendet und die Dissoziation des Hsp90-p60-Komplexes beobachtet. (B) Die Signalstärken nahe der Bindungsgleichgewichte (R_{eq} s) wurden gegen die p60 Konzentrationen aufgetragen und die Bindungsstärke der Hsp90-p60 Interaktion ($K_D=1\pm 1\mu\text{M}$) ermittelt (Kapitel 2.8.1).

Im vorliegenden Fall wurden Hsp70 oder Hsp90, bzw. Domänen oder Peptidfragmente dieser Proteine auf Sensorchips immobilisiert und p60, bzw. dessen isolierte TPR Domänen über die derivatisierten Oberflächen geleitet (Kapitel 2.8.1). In dieser Anordnung wurden konzentrationsabhängige Signale³⁹ gemessen, welche die spezifische Bindung der in Lösung befindlichen Proteine an ihre immobilisierten Interaktionspartner widerspiegeln⁴⁰. Mit Hilfe dieses Assays konnten die thermodynamischen Affinitäten bimolekularer Wechselwirkungen im ternären Hsp70-p60-Hsp90 Komplex bestimmt und die Interaktionen der Vollängenproteine weitgehend auf die Interaktionen einzelner Proteindomänen und Proteinfragmente reduziert werden. Zudem konnten die Kinetiken der untersuchten Wechselwirkungen abgeschätzt werden.

Die Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen die SPR-Daten der Interaktionen von p60 mit Hsp90, der Interaktionen von TPRI, TPRIIA und TPRIIB mit Hsp70 (Abbildung 6 (B)), bzw. Hsp90 (Abbildung 6 (C)) sowie der Interaktion von TPRIIA mit dem Peptid Ac-C-GDDDTSRMEEVD-COOH (90C-12). Die Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Affinitäten aller untersuchten bimolekularen Wechselwirkungen im Hsp70-p60-Hsp90 Komplex.

Ein charakteristisches Merkmal TPR-vermittelter Proteininteraktionen sind **die schnellen Kinetiken** der Komplexbildung und der Komplexdissoziation (Abb. 5, 6 und 7, siehe auch Kapitel 16). Die Bildung und Dissoziation des Komplexes aus TPRIIA und Hsp90 (Abb. 6 (C)) oder des Komplexes von TPRIIA mit dem Peptid Ac-GDDDTSRMEEVD-COOH (Abb. 7 (A)) erfolgten während der technischen Schaltvorgänge zu Beginn und Ende einer jeden Injektion und somit innerhalb der instrumentellen Totzeit (3-5 s). Auch die dominierenden Komponenten der Komplexbildung und -dissoziation zwischen p60 und Hsp90 (Abb. 5 A) oder TPRI und Hsp70 (Abb. 6 (B)) konnten zeitlich nicht aufgelöst werden. Assoziations- und Dissoziationskonstanten (k_{ass} , k_{diss}) konnten aus diesem Grund nicht durch nicht-lineare Anpassungsmethoden erhalten werden [297]. Folgende Abschätzung ist jedoch möglich: Unter der Annahme einer einfachen Dissoziationsreaktion von 1:1-Komplexen ohne vorgeschaltete konformationelle Änderungen, z. B. des Hsp90-TPRIIA Komplexes, und einer Halbwertszeit von $t_{\frac{1}{2}} < 5s$ muss die Dissoziationskonstante k_{diss} nach der Beziehung

³⁹gemäß ihrer englischen Bezeichnung als 'Response Units' (RU) benannte, relative Einheiten;

⁴⁰Dagegen konnten weder p60 noch seine isolierten Domänen aktiv auf Sensorchips fixiert werden. Die Störung der Wechselwirkungen mit Hsp70 und Hsp90 nach Lysin-spezifischer Biotinylierung und Immobilisierung von p60 ist möglicherweise auf die Maskierung kritischer Reste der Zweifachen Carboxylatklammer zurückzuführen (siehe Kapitel 3.1.5 und 2.8.1).

$$k_{diss} = \frac{\ln 2}{t_{\frac{1}{2}}}$$

$k_{diss} > 0.14 \text{ s}^{-1}$ sein. Die Assoziationskonstante k_{ass} muß demzufolge bei einer TPRIIA Affinität zu Hsp90 von $K_D = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Tabelle 12) gemäß der Beziehung:

$$K_D = \frac{k_{diss}}{k_{ass}}$$

$k_{ass} > 4.6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ sein. Diese Werte stellen die Minimalgeschwindigkeiten der TPRIIA-Hsp90 Interaktion dar.

In Abhängigkeit von der immobilisierten Komponente und dem in Lösung befindlichen Bindungspartner wurden apparent monophasische und apparent biphasische Assoziations- und Dissoziationsreaktionen beobachtet⁴¹. p60 wies in allen untersuchten Interaktionen mit Hsp70 und Hsp90 sowie mit deren Fragmenten zweiphasige Kinetiken auf. Besonders ausgeprägt ist eine zweite, sehr langsame Komponente der p60 Dissoziation von Hsp70 und Hsp90 (Abb. 5 (A)). Die noch Minuten nach Injektionsende auf der Chipoberfläche befindlichen p60-Hsp70 und p60-Hsp90 Komplexe konnten jedoch mit einer 0.5M NaCl-Lösung unter sehr milden Regenerationsbedingungen vollständig getrennt werden (siehe 2.8.1). Auch in Lösung zerfällt der Hsp70-p60-Hsp90-Komplex unter diesen Bedingungen [213]. Die Interaktionen der TPRIIA Domäne mit Hsp90 und seinen Fragmenten zeigten dagegen ausschließlich apparent monophasische Kinetiken (Abb. 6 (B) und 7 (A)). Insgesamt können diese Beobachtungen als Hinweise auf konformationelle Veränderungen von p60 bei der Hsp90 Bindung gewertet werden. Während die Hsp90 Bindungsstelle der isolierten TPRIIA Domäne direkt zur schnellen Bindung zur Verfügung steht, muss diese Kontaktfläche im Kontext des p60 Vollängenproteins erst bereit gestellt werden. Die hierzu erforderliche Konformationsänderung in p60 wäre nach dieser Vorstellung wesentlich langsamer als die darauffolgende Komplexbildung mit Hsp90 und würde die zweite, langsame Assoziationsphase verursachen (Abb. 5). Eine weitere mögliche Ursache für das Auftreten mehrphasiger Kinetiken ist die zufällige, heterogene Orientierung ungerichtet immobilisierter Proteine nach chemischer Modifikation und die daraus resultierenden Effekte sterischer Hinderung. Ereignisse dieser Art begründen möglicherweise die scheinbare Mehrphasigkeit der Hsp70 Wechselwirkung mit TPRI (Abb. 6 (A)).

⁴¹Aufgrund fehlender zeitlicher Auflösung der schnellen Kinetiken kann die Mehrphasigkeit auch der apparent monophasischen Reaktionen nicht formal ausgeschlossen werden.

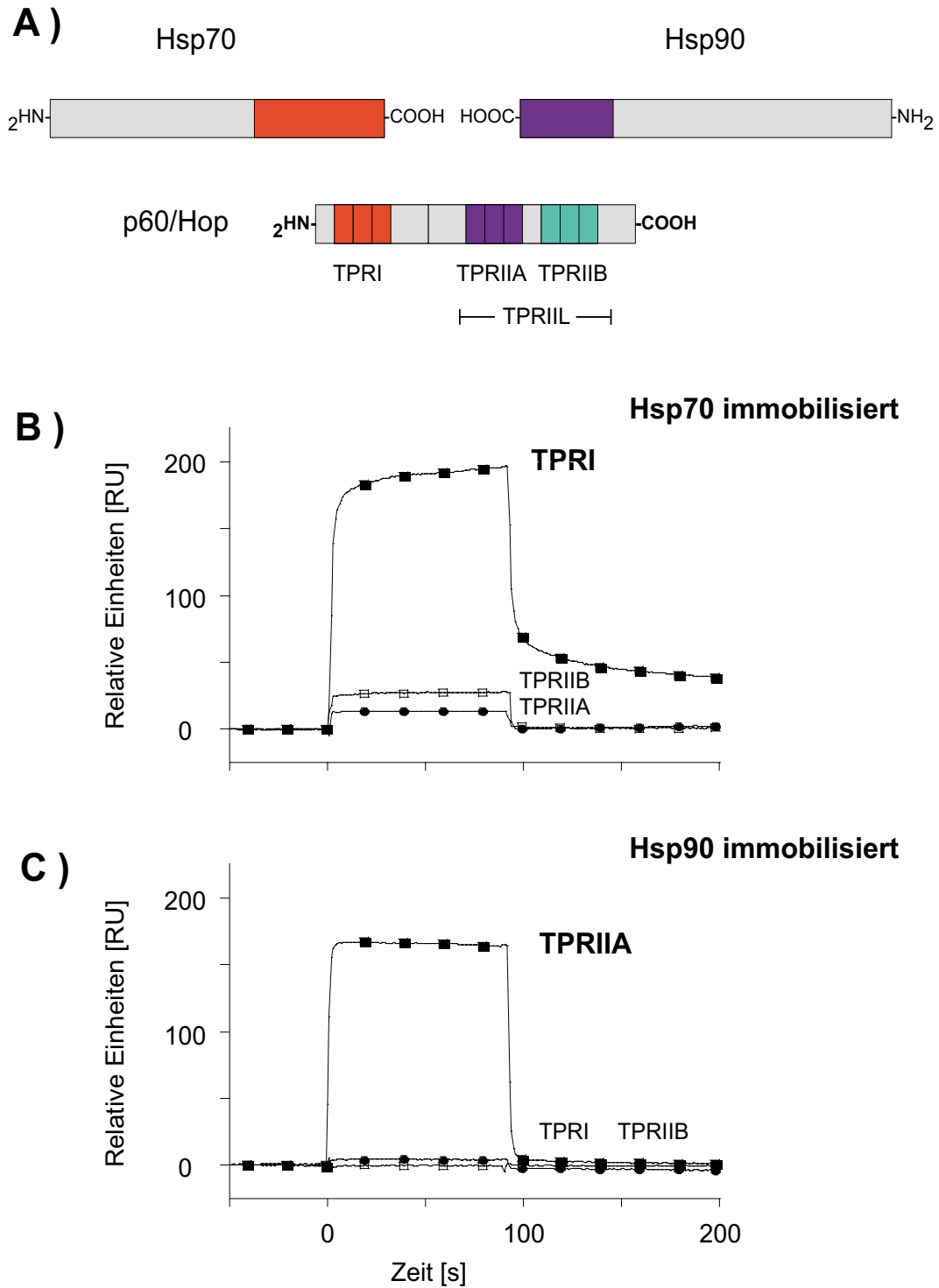


Abbildung 6: Selektive Wechselwirkungen von TPRI und TPRIIA.
 (A) Der Hsp70-p60-Hsp90-Komplex und die Domänenarchitektur von p60. TPRI, TPRIIA und TPRIIB wurden entweder (B) in 20 $\mu\text{molarer}$ Konzentration über Hsp70 (ca. 3000 RU) oder (C) als 10 $\mu\text{molarer}$ Lösungen über Hsp90 (ca. 3000 RU) geleitet.

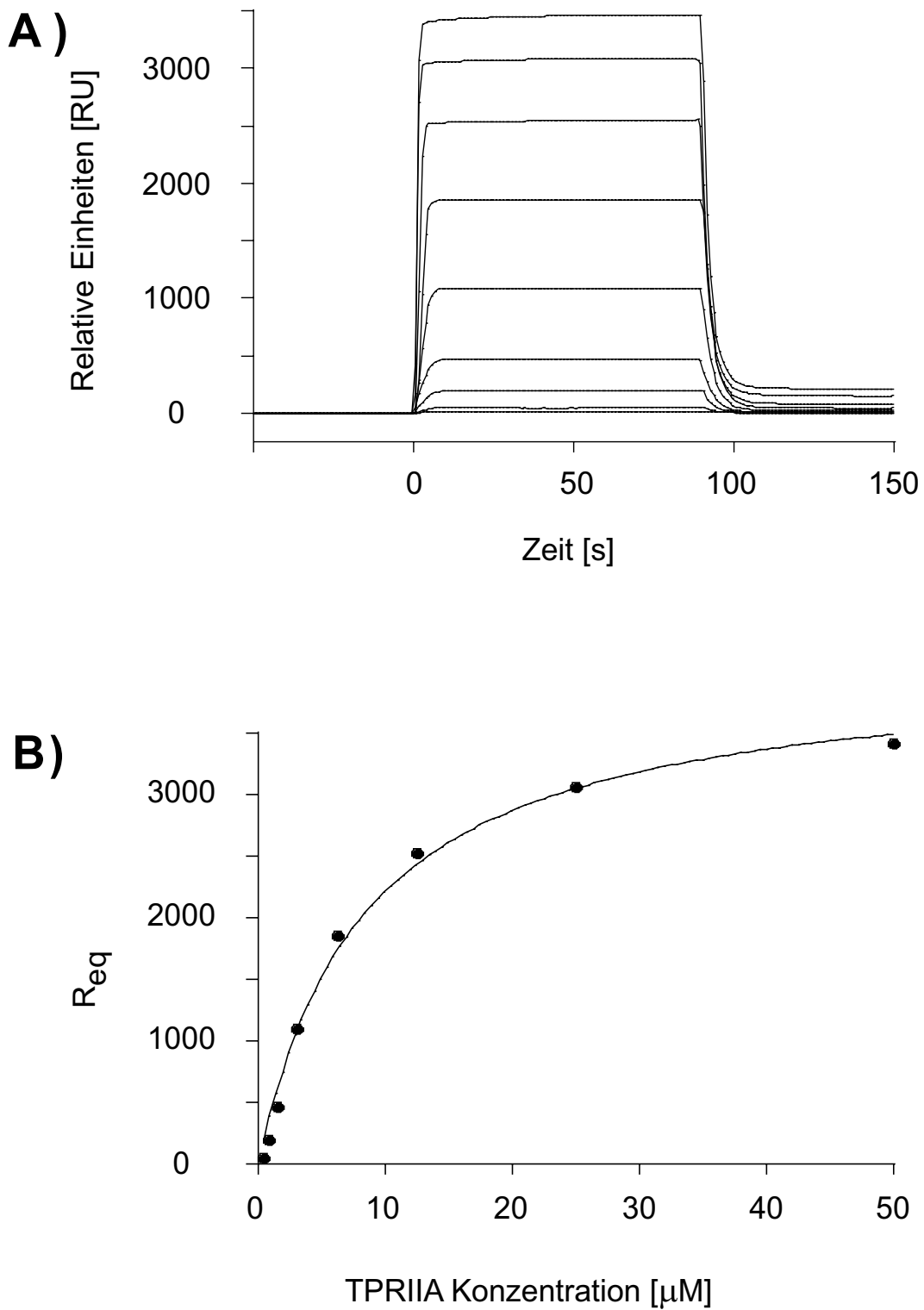


Abbildung 7: Interaktion von TPRIIA mit dem Peptid C90-12. (A) Ac-C-GDDDTSRMEEVD-COOH (C90-12) wurde immobilisiert und TPRIIA (200nM-50 μM) darübergeleitet. (B) Die R_{eq} -Werte wurden gegen die TPRIIA Konzentrationen aufgetragen und die Bindungsstärke der TPRIIA-C90-12-Interaktion ($K_D=7\pm 2\mu\text{M}$) aus der resultierenden Titrationskurve ermittelt.

Tabelle 12: Bimolekulare Interaktionen im Hsp70-p60-Hsp90 Komplex

Sämtliche K_D -Werte wurden durch SPR Titrationsexperimente ermittelt (Kapitel 2.8.1). Alle Titrationsen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt; die Standardabweichungen sind angegeben. Hsp70, Hsp90, p60: Vollängenproteine; C70: C-terminale Domäne von Hsp70 (25kDa); C90: C-terminale Domäne von Hsp90 (12kDa), C70-12: Dodekapeptid mit C-terminalen Hsp70 Sequenzen (GSGSGPTIEEVD-COOH); C90-12: Dodekapeptid mit C-terminalen Hsp90 Sequenzen (GDDDTSRMEEVD-COOH); NSB = Bei einer Proteinkonzentration von 100 μM nicht abgesättigte Bindung.

Immobilisiert	In Lösung				
	p60	TPRI	TPRIIA	TPRIIB	TPRIIL
Hsp70	2±1 μM	18±8 μM	NSB	NSB	NSB
Hsp90	1±1 μM	NSB	3±2 μM	NSB	3±2 μM
C70	2±1 μM	22±2 μM	NSB	NSB	NSB
C90	7±4 μM	NSB	5±1 μM	NSB	6±2 μM
C70-12	8±3 μM	33±2 μM	NSB	NSB	NSB
C90-12	6±2 μM	NSB	7±2 μM	NSB	6±3 μM

Die thermodynamischen Affinitäten (K_D s) bimolekularer Proteininteraktionen im Hsp70-p60-Hsp90-Komplex wurden durch Titrationsexperimente bestimmt (Abb. 5 und 7, Tab. 12, Kapitel 2.8.1)⁴².

TPRI bindet Hsp70, C70 und das den Hsp70 C-Terminus imitierende Dodekapeptid Ac-(C)-GSGSGPTIEEVD-COOH (C70-12) mit vergleichbaren Affinitäten ($K_D = 18 - 33\mu\text{M}$). Hieraus ergibt sich, dass die *zwölf C-terminalen Aminosäuren von Hsp70 den vollständigen TPRI-Liganden enthalten* und die TPRI Domäne keine weiteren Strukturen außerhalb dieser zwölf Aminosäuren ausliest. Die Interaktion zwischen TPRI und C70-12 ist jedoch ungefähr eine Größenordnung schwächer als die Wechselwirkungen von p60 mit Hsp70

⁴²Aus den bei Bindungssättigung erhaltenen spezifischen Signalen (R_{max}) wurden die Aktivitäten von immobilisiertem Hsp70 und C70 zu 50% und die Aktivitäten von immobilisiertem Hsp90 und C90 zu nahezu 80% bestimmt.

oder C70 ($K_D = 2\mu\text{M}$). Letzteres Ergebnis lässt auf die Existenz mindestens einer weiteren Bindungsstelle zwischen p60 und Hsp70 schließen, die einerseits Regionen außerhalb der TPRI Domäne von p60 und andererseits Bereiche in C70 außerhalb von C70-12 involviert. TPRIIA, TPRIIB und TPRIIL wechselwirken nicht spezifisch mit Hsp70, C70 oder C70-12.

Die *Interaktion von p60 mit Hsp90* lässt sich weitgehend reduzieren auf die Wechselwirkung von TPRIIA mit den zwölf C-terminalen Resten von Hsp90 (Abb. 7). TPRIIA bindet Hsp90, C90 und das den Hsp90 C-Terminus imitierende Dodekapeptid Ac-(C)-GDDDTSRMEEVD-COOH (C90-12) mit vergleichbaren Affinitäten ($K_D=3-7\mu\text{M}$). Analog zu dem vorigen Fall bedeutet dies, dass die C-terminalen zwölf Aminosäuren von Hsp90 den vollständigen TPRIIA-Liganden enthalten und TPRIIA keine weiteren Strukturen außerhalb dieser zwölf Aminosäuren ausliest. Zudem ist die Stärke der TPRIIA-Bindung an Hsp90 ($K_D=3\mu\text{M}$) im Rahmen der Messgenauigkeit mit der Stärke der p60-Hsp90-Interaktion ($K_D=1\mu\text{M}$) identisch. TPRI bindet dagegen nicht spezifisch an Hsp90 (Abb. 6) oder eines seiner Fragmente.

TPRIIB besitzt im Gegensatz zu TPRI und TPRIIA keine messbaren Affinitäten zu Hsp70 oder Hsp90 und erhöht auch in Kombination mit TPRIIA als Teil der TPRIIL Domäne deren Affinität zu Hsp90 nicht.

Die durch SPR Titrationsexperimente bestimmten Affinitäten von TPRI und TPRIIA zu C70, C90 sowie C70-12 und C90-12 konnten durch Bindungsmessungen in Lösung mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bestätigt werden (Kapitel 3.1.2, Abbildung 12). Störende Einflüsse der Proteinimmobilisation auf die untersuchten Wechselwirkungen können daher ausgeschlossen werden.

Einflüsse von Nukleotiden, Radicol oder Deoxyspergualin (DSG)⁴³ auf die Wechselwirkungen des ternären Komplexes wurden nicht festgestellt.

Zusammenfassend konnten spezifische Interaktionen der TPRI- und TPRIIA-Domänen von p60 mit den C-terminalen Sequenzen von Hsp70, bzw. Hsp90 nachgewiesen werden. Diese Wechselwirkungen stellen zudem die wesentlichen Komponenten der Vollängenproteininteraktionen im Hsp70-p60-Hsp90-Komplex dar. Die Feststellung, dass auch kurze Dodekapeptide mit hohen Affinitäten durch TPRI und TPRIIA gebunden werden, deutete bereits auf die Erkennung ausgestreckter Strukturen hin. Im Gegensatz zum in der Literatur diskutierten TPR-Ligandenbindungsmodell [239] [243] [244] [250] [239] erschien die Auslesung komplexer Proteinoberflächen durch die p60-TPR-Domänen auf Grundlage dieser Ergebnisse als unwahrscheinlich.

⁴³DSG ist eine vermeintlich an die C-terminalen Regionen von Hsc70 und Hsp90 bindende Verbindung mit immunsuppressiver Wirkung [298] [299] [300].

Die Arbeitshypothese, dass p60 TPR Domänen möglicherweise kurze, ausgestreckte Sequenzen von Hsp70 oder Hsp90 auslesen, ergab sich zuerst aus der Beobachtung eines Packungseffektes im Proteinkristall der ligandenfreien TPRI Domäne [254]. Die flexiblen C-terminalen Enden von TPRI interagierten im Proteinkristall wohlgeordnet mit dem putativen Ligandenbindungsgraben des Nachbarmoleküls (vgl. auch Kapitel 3.1.5). Einige an diesem Kristallkontakt beteiligte Aminosäuren des Bindungsgrabens erwiesen sich als hochkonserviert in den TPR-Kofaktoren der Hsp70/Hsp90-Multichaperonmaschinerie (Kapitel 3.1.5, Abb. 19). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass der artifizielle Kristallkontakt eine physiologisch relevante Ligandenbindung nachahmte. Diese Hypothese konnte durch die im folgenden beschriebenen Experimente bestätigt und die Prinzipien der TPR-vermittelten Proteininteraktionen in Hsp70- und Hsp90-Multichaperonkomplexen in detaillierter Form ausgearbeitet werden. Insbesondere konnte die Frage geklärt werden, wie die ausgeprägte Spezifität der Ligandenerkennung durch TPRI und TPRIIA (Tab. 12) mit der Sequenzidentität der letzten vier Aminosäuren im *hochkonservierten EEVD Motiv der Hsp70 und Hsp90 C-Termini* vereinbar ist (Kapitel 3.1.2, 14).

3.1.2 Bindung von EEVD-Peptiden durch p60 TPR-Domänen

Zur Identifizierung der minimalen Peptidliganden von TPRI und TPRIIA⁴⁴ wurde das Tetrapeptid EEVD schrittweise um für Hsp70-, bzw. Hsp90-spezifische Sequenzen verlängert (Kapitel 2.3, Tab. 4) und die Fähigkeit der erweiterten EEVD-Peptide zur Konkurrenz TPR vermittelter Proteininteraktionen getestet. Weiterhin wurden die Affinitäten der Peptidliganden zu den p60 TPR Domänen direkt durch Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt.

Kompetitionsexperimente mit EEVD-Peptiden

Die Konkurrenzexperimente wurden analog zu den zuvor beschriebenen Bindungsstudien (Kapitel 3.1.1) durchgeführt. Hsp70 und Hsp90 wurden auf Sensorchips geladen und p60, TPRI oder TPRIIA in einer konstanten Konzentration in Abwesenheit von Peptiden (100% Bindung) oder in Gegenwart steigender Peptidkonzentrationen über den Chip geleitet (Kapitel

⁴⁴Die **minimalen Liganden** sind die kürzesten Peptide, welche von TPRI, bzw. TPRIIA noch mit der gleichen Affinität und Spezifität wie die Hsp70- und Hsp90-Vollängenproteine gebunden werden.

2.8.1). Die in Gegenwart von Peptidliganden erreichten Bindungssignale wurden normalisiert und gegen die Peptidkonzentrationen aufgetragen (Abb. 8 und 9, Kapitel 2.8.1).

Alle untersuchten Interaktionen konnten durch das Tetrapeptid EEVD vollständig inhibiert werden (Abb. 8 (A) und 9 (A), Abb. 10, Kapitel 3.1.4 und 3.2). Die beobachtete Inhibition war zudem spezifisch, da Peptide mit unverwandter Sequenz, wie TKRRESKL, auch in millimolaren Konzentrationen keinen Einfluss hatten.

Im Falle der Wechselwirkungen von TPRIIA und p60 mit Hsp90 waren zum Erreichen einer halbmaximalen Inhibition 50fache, bzw. 200fache Überschüsse des EEVD Peptids gegenüber TPRIIA, bzw. p60 erforderlich (Abb. 8 (B) und 9 (B)). Die Einführung der für Hsp90 C-Termini spezifischen Aminosäure Methionin führte jedoch zu einer achtfachen Verminderung des IC_{50} -Wertes von MEEVD gegenüber EEVD hinsichtlich der TPRIIA-Hsp90-Interaktion (Abb. 8 (B)) und zu einer sechsfachen Verminderung des IC_{50} -Wertes hinsichtlich der p60-Hsp90-Interaktion (Abb. 9 (B)). IEEVD, das entsprechende Hsp70-Peptid, hatte gegenüber EEVD keine erhöhte Hemmwirkung auf die TPRIIA-Hsp90-Interaktion. Zur Spezifitätskontrolle wurde zudem die zu MEEVD inverse Sequenz DVEEM getestet. DVEEM zeigte bis zu einer Konzentration von 2mM keinen Einfluß auf die Interaktionen von TPRIIA oder von p60 mit Hsp90. Längere EEVD-Peptide mit für Hsp90 spezifischen Resten hatten keine verbesserten Hemmeigenschaften gegenüber dem Pentapeptid MEEVD⁴⁵ (Abb. 10 (B)). Längere EEVD-Peptide mit für Hsp70 spezifischen Sequenzen zeigten, wie IEEVD bezüglich der TPRIIA-Hsp90-Wechselwirkung, lediglich die basalen Hemmeigenschaften der EEVD Sequenz (Abb. 10 (B)).

Ähnliche Ergebnisse wurden im Fall der Interaktionen von TPRI mit Hsp70 erzielt. Die Verlängerung der EEVD-Sequenz um eine einzige, für Hsp70-spezifische Aminosäure bewirkte die Halbierung des IC_{50} Werts von IEEVD gegenüber EEVD (Abb. 10 (A); IC_{50} (EEVD)=221 μ M, IC_{50} (IEEVD)=104 μ M). Die Verlängerung der EEVD-Peptide um zwei weitere Aminosäuren verbesserte die Konkurrenz-eigenschaften zusätzlich (IC_{50} (PTIEEVD)=17 μ M). Okta-Dodekapeptide zeigten gegenüber der Sequenz PTIEEVD keine verbesserten Hemmwirkungen. EEVD-Peptide mit für Hsp90-spezifischen Sequenzen wirkten nur schwach inhibitorisch.

⁴⁵6mer-8mer Peptide mit Hsp90 Sequenzen, wie RMEEVD und TSRMEEVD, die die basische Aminosäure Arg ohne Ladungskompensation durch die N-terminal angrenzenden sauren Aminosäuren in GDDDTSRMEEVD enthalten, besitzen sogar gegenüber MEEVD verschlechterte Hemmwirkungen. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Ala-Scans (Abb. 13) sowie des Peptidbibliotheksscreens (Kapitel 3.1.3).

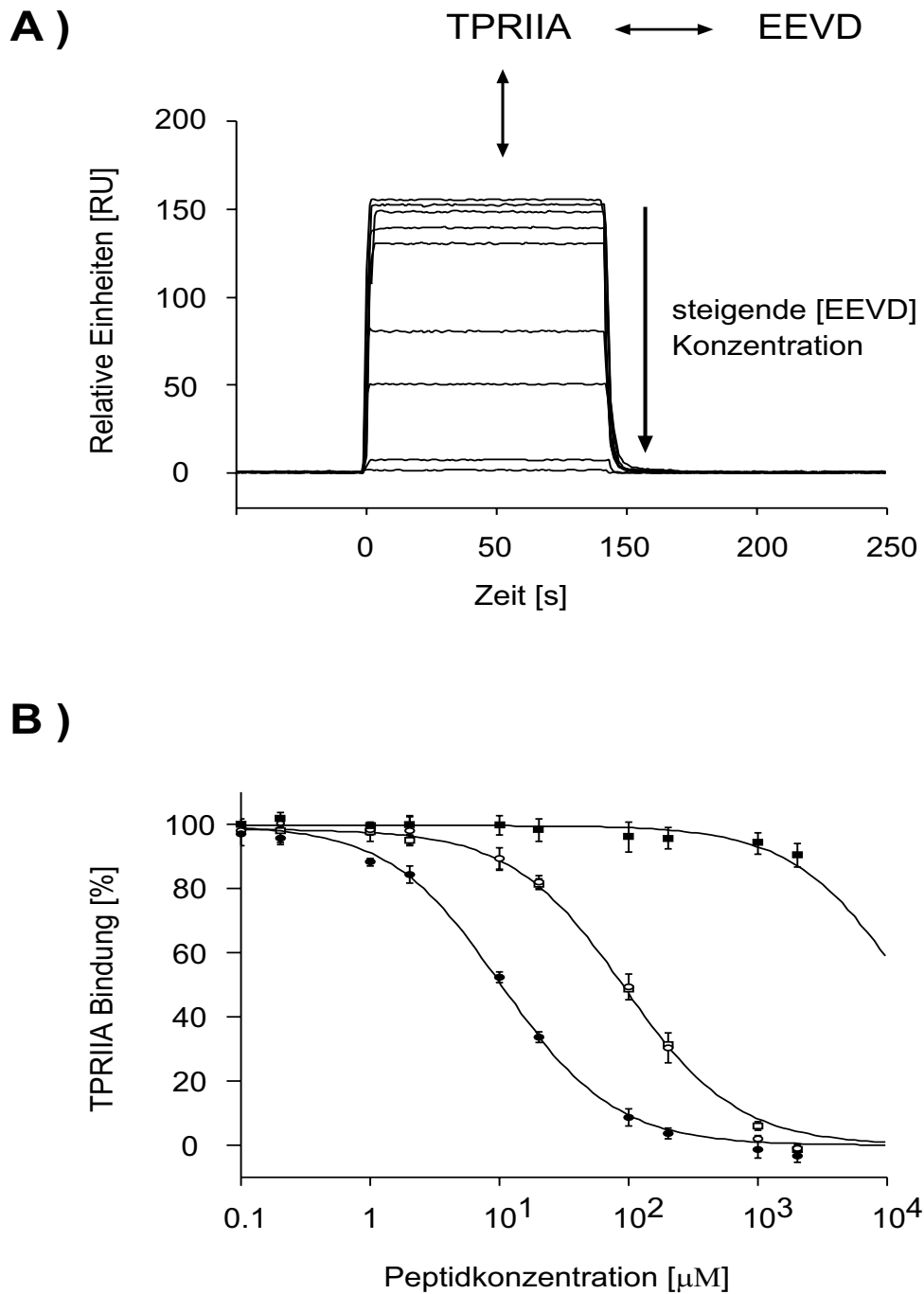


Abbildung 8: Konkurrenz der Hsp90-TPRIIA Interaktion. (A) Hsp90 wurde immobilisiert und TPRIIA ($1.8 \mu\text{M}$) wurde in Abwesenheit und Gegenwart steigender Konzentrationen des Peptids Ac-EEVD-COOH ($1 \mu\text{M}$ - 2mM) über den Sensorchip geleitet. (B) Konkurrenzexperimente wurden wie unter (A) beschrieben für die Peptide Ac-EEVD-COOH (*weiße Quadrate*), Ac-MEEVD-COOH (*schwarze Kreise*), Ac-IEEVD-COOH (*weiße Kreise*) und Ac-DVEEM-COOH (*schwarze Quadrate*) durchgeführt. Die R_{eq} -Werte wurden normalisiert und gegen die Peptidkonzentrationen aufgetragen.

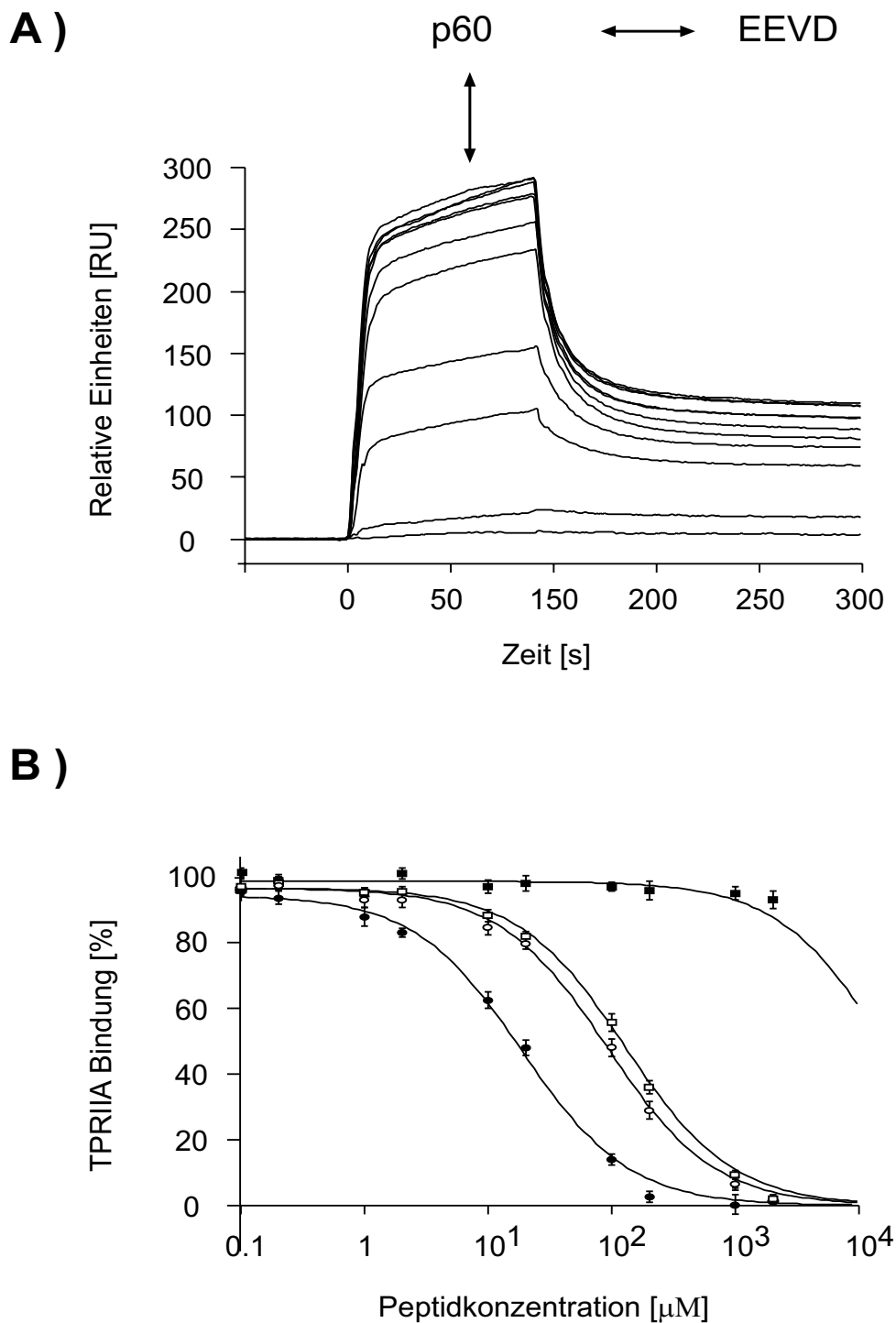


Abbildung 9: Konkurrenz der Hsp90-p60 Interaktion.

(A) Hsp90 wurde immobilisiert und p60 ($0.5 \mu\text{M}$) in Abwesenheit und Gegenwart steigender Konzentrationen des Peptids Ac-EEVD-COOH ($1 \mu\text{M}$ - 2mM) darübergeleitet. (B) Konkurrenzexperimente wurden wie in Abb. 8 beschrieben für die Peptide Ac-EEVD-COOH (weiße Quadrate), Ac-MEEVD-COOH (schwarze Kreise), Ac-IEEVD-COOH (weiße Kreise) und Ac-DVEEM-COOH (schwarze Quadrate) durchgeführt.

Auch hinsichtlich der Interaktion der Vollängenproteine wurden spezifische Hemmeffekte der EEVD-Peptide (Abb. 10) festgestellt. Während aber z. B. das Hsp90 Dodekapeptid GDDDTSRMEEVD die Interaktion von TPRIIA mit Hsp90 ca. 20mal stärker inhibiert als die Interaktion von TPRI mit Hsp70 ($IC_{50}(\text{GDDDTSRMEEVD}, \text{TPRIIA-Hsp90})=8\mu\text{M}$ gegenüber $IC_{50}(\text{GDDDTSRMEEVD}, \text{TPRI-Hsp70})=163\mu\text{M}$), beträgt die apparente Spezifität desselben Peptids bezüglich der Interaktionen von p60 mit Hsp70 oder Hsp90 lediglich einen Faktor von ~ 2 ($IC_{50}(\text{GDDDTSRMEEVD}, \text{p60-Hsp90})=14\mu\text{M}$ gegenüber $IC_{50}(\text{GDDDTSRMEEVD}, \text{p60-Hsp70})=33\mu\text{M}$). Da nicht anzunehmen ist, dass die TPRI und TPRIIA Domänen als Bestandteile von p60 eine andere Peptidbindungsspezifität besitzen als im isolierten Zustand, weist diese Spezifitätsverminderung der EEVD-Peptide auf eine Beteiligung der jeweils niedrigeraffinen TPR Domäne an den untersuchten bimolekularen Interaktionen hin⁴⁶. *In vivo* würden solche unspezifischen Bindungskomponenten, z. B. von TPRI an Hsp90, durch die Präsenz des jeweils höheraffinen Bindungspartners, in diesem Falle durch die Präsenz von Hsp70, unterdrückt.

Bindungsstudien mit EEVD-Peptiden

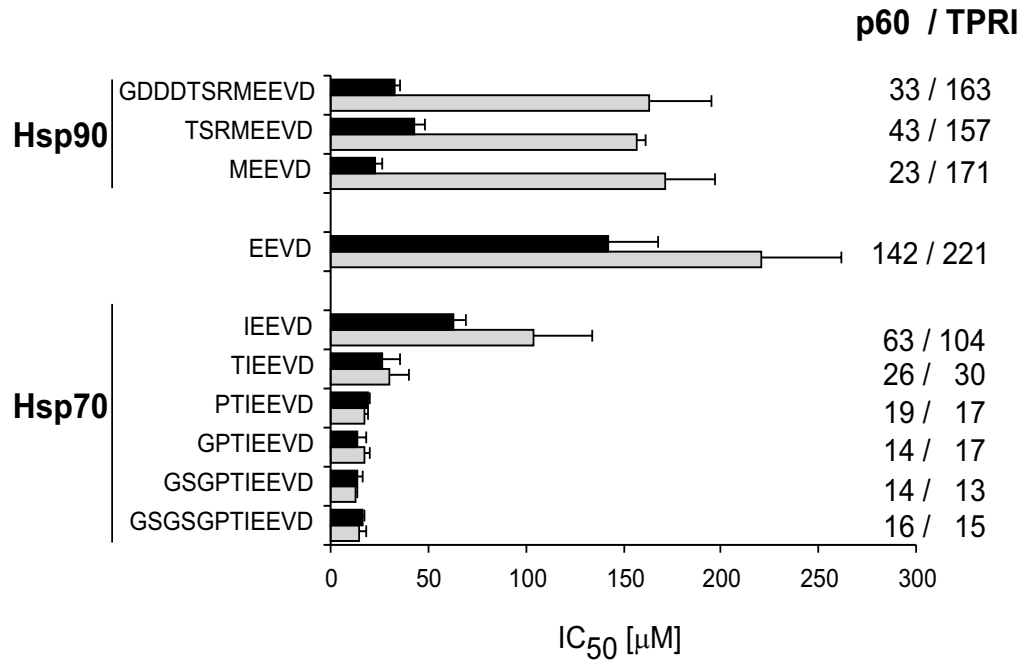
Mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) [280] [281] [282] [283] [284] (Abb. 11) wurden die absoluten thermodynamischen Affinitäten (K_D s) der EEVD-Peptide zu den p60-TPR-Domänen bestimmt (Abb. 12). Kalorimetrische Messungen erlauben es, die Affinitäten unmarkierter Bindungspartner in Lösung zu vermessen. Mögliche Einflüsse von Proteinimmobilisierungen oder hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffen auf die untersuchten Wechselwirkungen sind somit ausgeschlossen. Die erforderlichen Probenmengen zur Durchführung von ITC Messungen sind jedoch insbesondere im Falle niedrig-affiner Wechselwirkungen⁴⁷ wesentlich höher als im Falle von SPR oder Fluoreszenztitrationen, sodass ITC Experimente nur in seltenen Fällen als umfangreiche Studien und als Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden können⁴⁸.

⁴⁶Beteiligung von TPRI an der p60-Hsp90 Interaktion und Beteiligung von TPRIIA an der p60-Hsp70 Wechselwirkung.

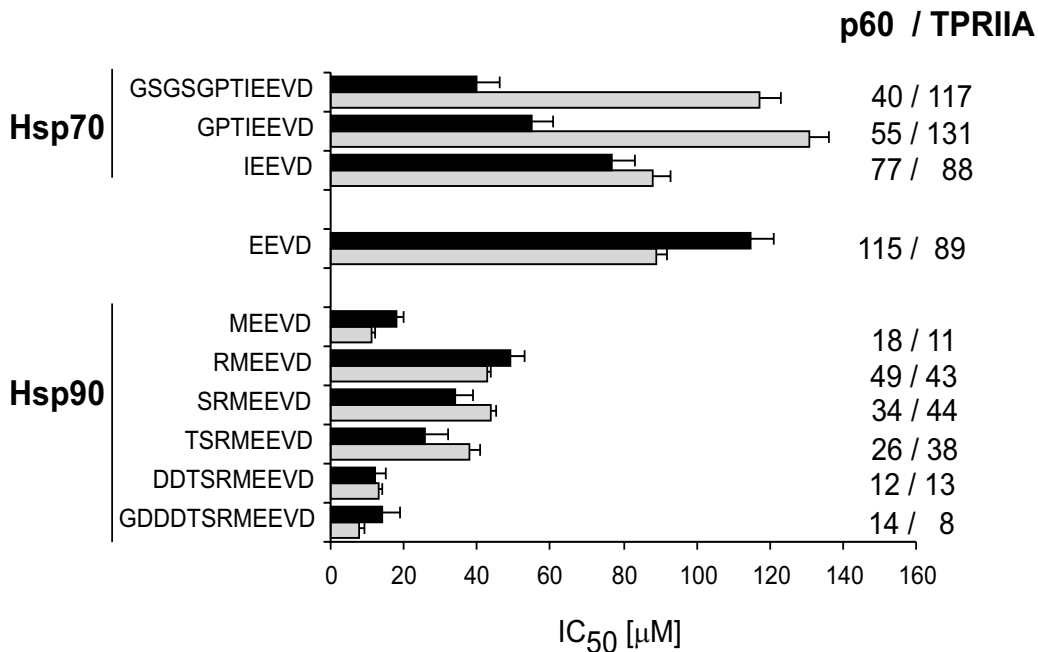
⁴⁷d. h. zwei-dreistellige mikromolare Dissoziationskonstanten (K_D s);

⁴⁸Zum Beladen der VP-ITC Probenkammer sind 2ml Probenlösung erforderlich, ca. 500 μl Probenlösung werden zum blasenfreien Füllen der Spritze aufgewendet. Die Ligandenkonzentrationen sollten idealerweise so gewählt werden, dass die Kammerkonzentrationen mindestens fünffach über dem zu erwartenden K_D -Wert der Interaktion liegen. Die Ligandenkonzentration in der Spritze sollte ca. der 10-20fachen Ligandenkonzentration in der Probenkammer entsprechen. Unter diesen Bedingungen sind die Titrationskurven

A)



B)

Abbildung 10: IC_{50} -Werte für EEVD-Peptide.

Darstellung der IC_{50} -Werte [μ M] für EEVD-Peptide mit Hsp70 oder Hsp90 Sequenzen bezüglich der Interaktionen von p60 und TPRI mit Hsp70 ((A)) oder der Wechselwirkungen von p60 und TPRIIA mit Hsp90 ((B)). *Schwarze Balken* repräsentieren die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente mit p60, *graue Balken* die Ergebnisse der Experimente mit TPRI, bzw. TPRIIA. Sämtliche Titrations wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die mittels ITC durchgeführten Peptidbindungsstudien bestätigten die wesentlichen Befunde der SPR-basierten Konkurrenzexperimente: **TPRI liest die sieben C-terminalen Aminosäuren von Hsp70 aus.** Das Heptapeptid PTIEEVD hat bereits dieselbe Affinität zu TPRI wie C70 (25kDa, $K_D=15-19\mu\text{M}$). Eine weitere Verlängerung des Peptids führt nicht zu einer Verstärkung der Bindung; entsprechende Peptide mit Hsp90-Sequenzen haben 10-30fach niedrigere Affinitäten zu TPRI. **TPRIIA liest die fünf C-terminalen Aminosäuren von Hsp90 aus.** Das Pentapeptid MEEVD bindet TPRIIA mit ähnlicher Affinität wie C90 (12kDa, $K_D=5-11\mu\text{M}$). Entsprechende Peptide und Proteindomänen mit Hsp70 Sequenzen haben eine 8-25 fach niedrigere Affinität zu TPRIIA. Die EEVD Sequenz allein bindet TPRI und TPRIIA nur schwach.

Auch die **p60 TPRIIB Domäne** besitzt eine geringe Affinität zum Peptid EEVD ($K_D(\text{EEVD})=580\mu\text{M}$). Die Oktapeptide TSRMEEVD und GPTIEEVD binden TPRIIB geringfügig besser: $K_D(\text{TPRIIB-GPTIEEVD})=130\mu\text{M}$, $K_D(\text{TPRIIB-TSRMEEVD})=290\mu\text{M}$. Die Interaktionen bleiben jedoch um eine Größenordnung schwächer als die Wechselwirkungen von TPRI und TPRIIA mit ihren minimalen Peptidliganden PTIEEVD, bzw. MEEVD (Abb. 12). Die schwachen Peptidbindungseigenschaften von TPRIIB sind vereinbar mit der zuvor mittels SPR beobachteten, nicht-sättigbaren Interaktion mit Hsp70 und Hsp90 (Abb. 6 (B) und (C)).

Alanin-Scan

Zur Abschätzung der **Bindungsbeiträge einzelner Aminosäureseitenketten** der TPRI, bzw. TPRIIA Peptidliganden Ac-GPTIEEVD-COOH, bzw. Ac-TSRMEEVD-COOH wurden einzelne Reste der Oktapeptide systematisch durch Alanin substituiert und die Affinitäten der Alanin substituierten Peptide zu TPRI, bzw. TPRIIA bestimmt (Abb. 13).

Besonders stark wirkte sich der Austausch von Aspartat und Valin im konservierten EEVD Motif auf die Peptidbindung sowohl an TPRI als auch an TPRIIA aus. Die Affinitäten der Alaninpeptide verringerten sich 6->50 fach gegenüber den Peptiden mit Wildtypsequenzen. Auch ein Austausch der Hauptkettencarboxylatfunktion gegen eine ungeladene Amidfunktion wirkte sich in beiden Fällen deutlich negativ auf die Peptidbindung an die TPR-Domänen aus. Während **Aspartat und Valin eine allgemeine Anker-**

steil und sigmoid und somit einer sicheren Modellanpassung und Auswertung zugänglich [284]. Zur einfachen Bestimmung der relativ hochaffinen TPRIIA-C90 Interaktion (Abb. 11) wurden 5.5 mg C90 und 18 mg TPRIIA eingesetzt.

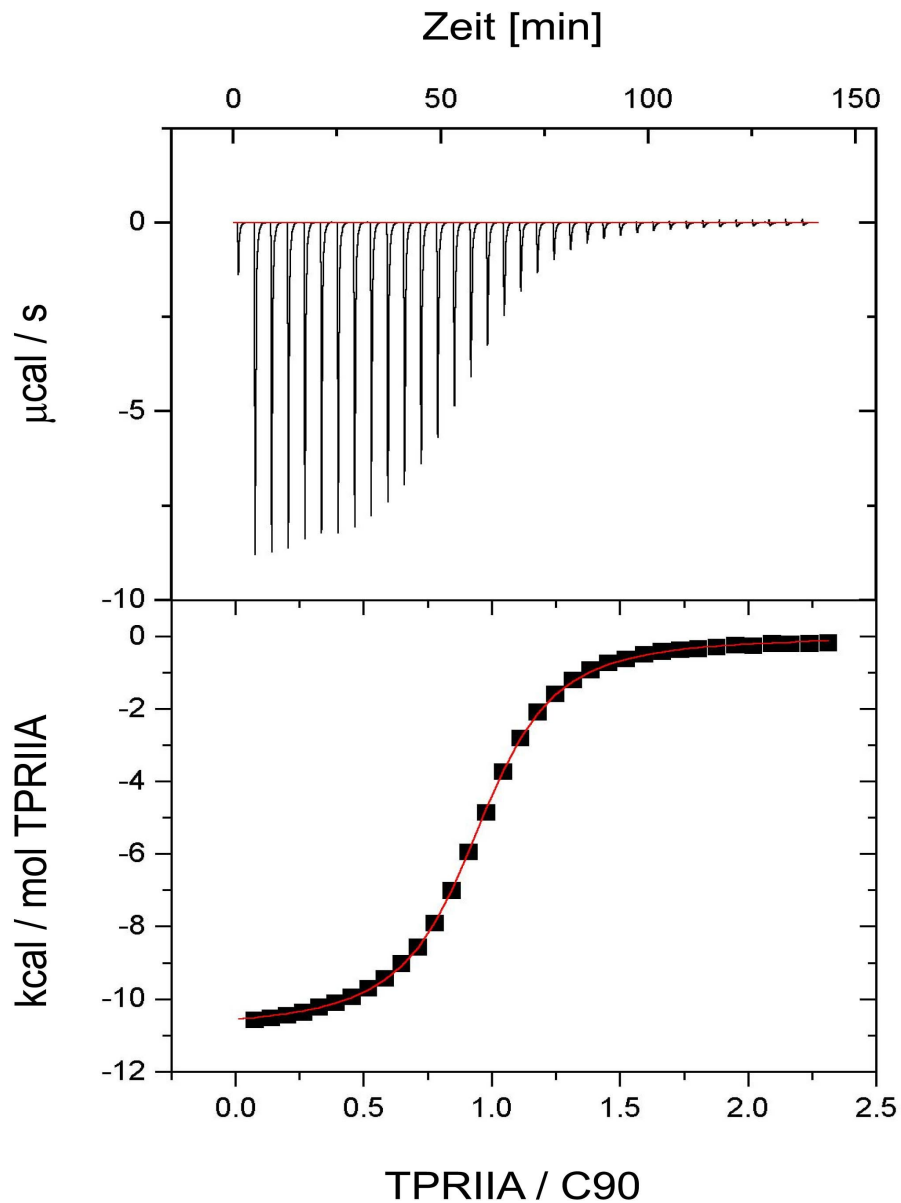


Abbildung 11: Isotherme Titrationskalorimetrie mit C90 und TPRIIA
 C90 ($230 \mu\text{M}$) wurde in die Probenkammer vorgelegt und durch wiederholte Injektionen von $5 \mu\text{l}$ Aliquots einer TPRIIA Lösung (2.5mM) bei 25°C titriert. Durch Integration der Rohdaten (Heizleistungen) wurde die pro Injektion freigesetzte Bindungswärme ermittelt und gegen die molaren Verhältnisse der Bindungspartner in der Probenkammer (TPRIIA:C90) aufgetragen. Durch Anpassen eines 1:1 Bindungsmodells an die erhaltene Titrationskurve wurden die thermodynamischen Parameter der TPRIIA-C90-Interaktion ermittelt. $K_D=5 \mu\text{M}$, Stöchiometrieffaktor $n=0.9$, $\Delta H=8.5 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S=4.6 \text{ cal/mol}$.

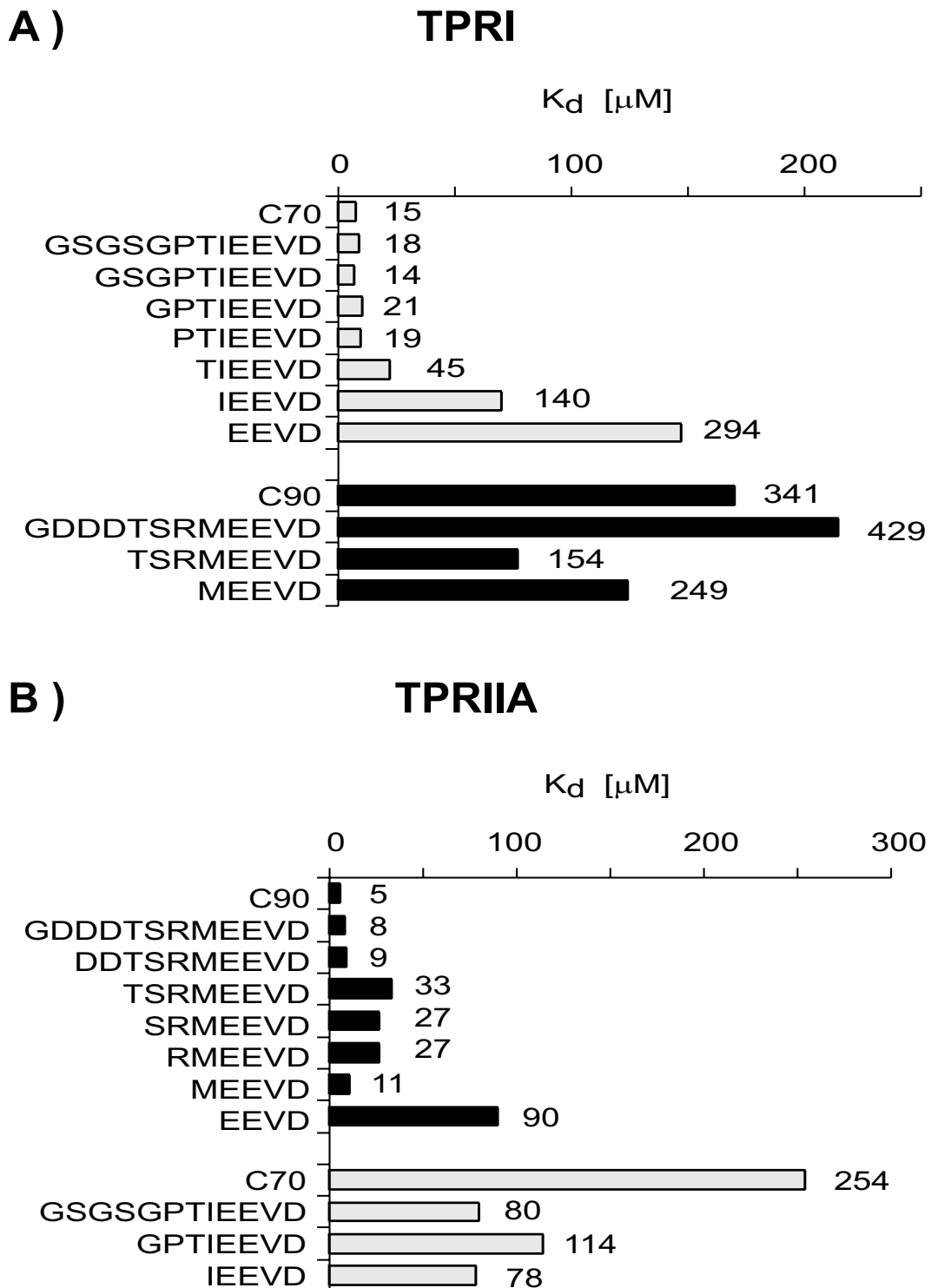


Abbildung 12: Affinitäten (K_{DS}) von TPRI und TPRIIA zu EEVD-Peptiden. Darstellung der Affinitäten (K_{DS} (μM)) von TPRI (Abb. (A)) und TPRIIA (Abb. (B)) zu erweiterten EEVD-Peptiden. Repräsentative Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt; die Standardabweichungen betragen 5-10%. Die experimentellen Stöchiometriefaktoren betragen $n=0.9-1.1$.

funktion für die Peptidliganden zu besitzen scheinen, werden die Glutamatreste des EEVD Motifs in Hsp70 und Hsp90 von TPRI und TPRIIA differentiell ausgelesen. Die Glutamatseitenketten des Hsp70-Peptids leisten offensichtlich keinen Beitrag zur Ligandenbindung an TPRI, und Substitutionen dieser Reste zu Alanin haben keinen Einfluß auf die Affinität der Oktapeptide. Dagegen senkt insbesondere der Austausch von Glutamat in der 5. Position von TSRMEEVD die Affinität zu TPRIIA um eine Größenordnung. Auch der Glutamatrest in Position 6 scheint einen substanziellen Beitrag zur Bindung an TPRIIA zu leisten. **Die wesentlichen affinitätsbestimmenden und für Hsp70-, bzw. Hsp90-spezifischen Seitenketten sind die des Isoleucins, bzw. des Methionins** in GPTIEEVD bzw. TSRMEEVD. Die Substitutionen dieser Aminosäuren gegen Alanin reduzieren die K_D -Werte der EEVD-Peptide um Faktoren von 17, bzw. 7. Ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den zuvor besprochenen Ergebnissen (Abb. 10 und 12) tragen die Seitenketten des Prolins und Threonins in GPTIEEVD ebenfalls geringfügig zur Peptidbindung an TPRI bei, während die Seitenketten des Threonins, Serins und Arginins in TSRMEEVD zur TPRIIA-Bindung nicht beitragen⁴⁹.

Stellt man die Ergebnisse des Alanin Scans (Abb. 13) der Konservierung C-terminaler Aminosäuresequenzen von Hsp70 und Hsp90 (Abb. 14) gegenüber, finden sich augenfällige Parallelen, aber auch deutliche Divergenzen. Die aus dem Alanin Scan abgelesene große Bedeutung der Hsp70- und Hsp90-spezifischen Reste Isoleucin, bzw. Methionin sowie die Bedeutung des Valins und Aspartats im gemeinsamen EEVD-Motiv wird in einer 100%igen Konservierung dieser Reste in allen bekannten eukaryotischen Hsp70- und Hsp90-Sequenzen reflektiert. Weiterhin sind jedoch die Glutamatreste des EEVD-Motivs ebenfalls in 90-100% der Fälle erhalten, während sich deren Substitution nur bezüglich der Ligandenbindung von TPRIIA nachteilig auswirkt. Die Konservierung der Glutamatreste des Hsp70-EEVD-Motivs kann offensichtlich nicht durch ihre Vermittlung der p60-TPRI-Bindung erklärt werden. Weiterhin fallen die starke bis vollständige Konservierung weiterer unmittelbar dem EEVD-Motiv benachbarter Seitenketten wie Glycin und Prolin im Hsp70 Carboxyterminus sowie von Serin im Hsp90 Terminus auf. Substitutionen dieser Reste schienen keine oder nur schwache Einflüsse auf die Ligandenbindung von TPRI und TPRIIA zu besitzen. Zweifellos ist die

⁴⁹Ganz im Gegenteil bewirkt die Substitution des Arginins sogar eine Verbesserung der Affinität des Peptids TSAMEEVD gegenüber TSRMEEVD. TSAMEEVD besitzt gegenüber TPRIIA eine vergleichbare Affinität wie der minimale Ligand MEEVD. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den bereits zuvor beobachteten störenden Einfluß der basischen Aminosäure Arginin auf die Affinität kurzer Peptide zu TPRIIA (Abb. 12 und 10, siehe auch Kapitel 3.1.3).

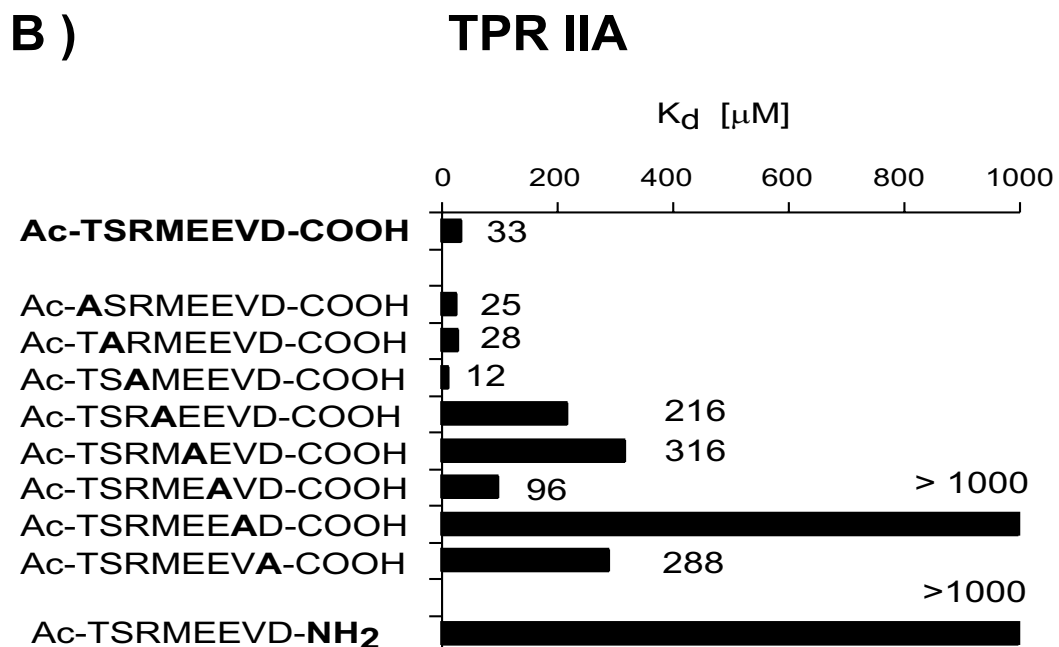
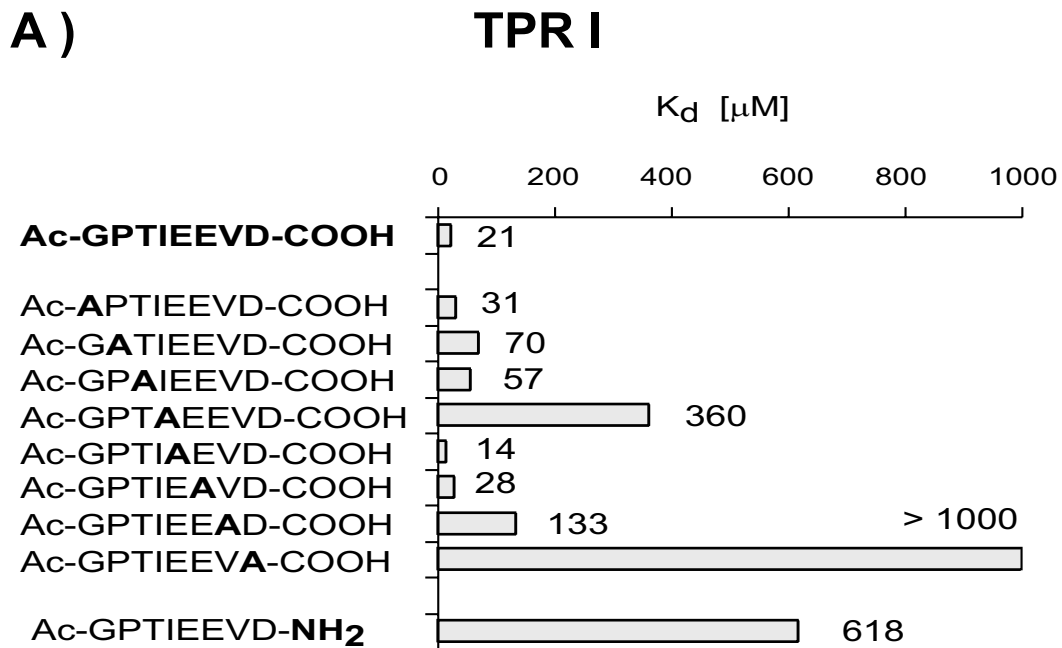


Abbildung 13: Alanin-Scans

Darstellung der Affinitäten (K_D s (μM)) von TPR I (A) und TPR IIA (B) zu den Alanin-substituierten Hsp70- und Hsp90-Oktapeptiden Ac-GPTIEEVD-COOH und Ac-TSRMEEVD-COOH. Die Affinitäten wurden durch ITC bestimmt.

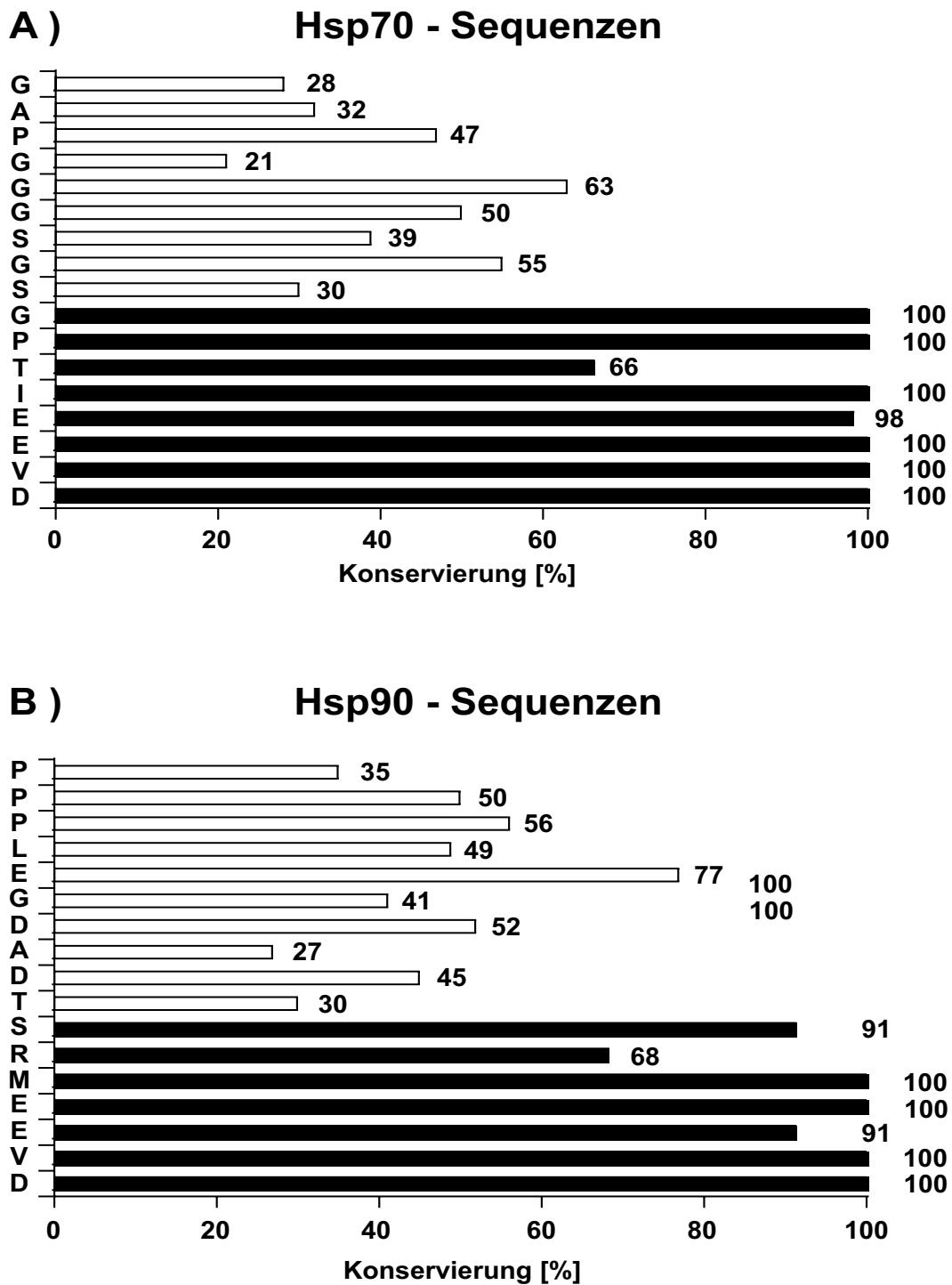


Abbildung 14: Sequenzkonsensus in Hsc/Hsp70- und Hsp90-C-Termini. Für die Analyse wurden die zytosolischen Formen 83 eukaryotischer Hsc/Hsp70-Proteine (A), bzw. die zytosolischen Formen 138 eukaryotischer Hsp90-Proteine (B) verwendet. Die Konservierung der häufigsten Aminosäuren ist jeweils in Prozent angegeben. Die im Rahmen des Alanin-Scans substituierten Seitenketten sind dunkel hervorgehoben.

Konservierung carboxyterminaler Reste von Hsp70 und Hsp90 nicht allein durch die Bindung des TPR-Proteins p60 bedingt. Die Divergenzen zwischen den Ergebnissen des Alanin Scans und der hohen Konservierung des EEVD-Motivs lassen eine differentielle Erkennung der Hsp70- und Hsp90-Carboxytermini durch unterschiedliche TPR-Proteine für möglich erscheinen.

Zur Komplementation der biophysikalischen Beschreibung TPR-vermittelter Ligandenerkennung von p60 wurden TPRI und TPRIIA mit ihren Peptidliganden kokristallisiert und die Röntgenstrukturen der TPR-Peptidkomplexe gelöst (siehe Kapitel 4, Abb. 28) [253] [254]. Die Strukturanalyse untermauerte die wesentlichen Befunde der beschriebenen Peptidbindungsstudien (Kapitel 4).

3.1.3 Screening von Ac-O/X₄-VD-COOH-Peptidmischungen

Um bei der Beschreibung der Ligandenbindungsmotive von TPRI und TPRIIA stärker von den natürlichen Peptidliganden zu abstrahieren, wurden in weitergehenden Studien lösliche, kombinatorische Peptidbibliotheken eingesetzt [270] [271] (Kapitel 2.7). Bibliotheken ähnlicher Art konnten bereits erfolgreich zur Charakterisierung von Protein-Liganden-Wechselwirkungen verwendet werden [269] [301] [302] [303].

Design und Screening der Ac-O/X₄-VD-COOH-Peptidbibliothek

Es wurde eine **verankerte Heptapeptidbibliothek** im Positional Scanning Format **Ac-O/X₄-VD-COOH** entworfen und synthetisiert. Die gesamte Bibliothek setzte sich aus 96 Heptapeptidmischungen zusammen, deren Sequenzen in den beiden C-terminalen Positionen 6 und 7 durch Aspartat und Valin definiert wurden. Diese 96 Mischungen gliederten sich in fünf Untergruppen mit jeweils 19 teildefinierten Mischungen:

Ac-Oxxxx-VD-COOH
 Ac-xOxxx-VD-COOH
 Ac-xxOxx-VD-COOH
 Ac-xxxOx-VD-COOH
 Ac-xxxxO-VD-COOH

mit:

randomisierte Positionen X = A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;
 definierte Positionen O = A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;

sowie die maximal randomisierte Mischung Ac-XXXXX-VD-COOH. In den definierten Positionen 'O' der teildefinierten Mischungen befand sich jeweils eine der 19 proteinogenen Aminosäuren⁵⁰. Dieselben 19 Reste befanden sich in den randomisierten Positionen 'X' in äquimolaren Verhältnissen. Jede einzelne Peptidmischung (z. B. Ac-Axxxx-VD-COOH) enthielt somit theoretisch $19^4=130321$ unterschiedliche Sequenzen⁵¹. Eine Teilbibliothek Ac-OX₄-VD-COOH enthielt theoretisch $19 \cdot 19^4=19 \cdot 130321=ca. 2.5$ Mio. unterschiedliche Sequenzen und deckte, ebenso wie die maximal randomisierte Mischung Ac-X₅-VD-COOH, die gesamte Komplexität der Ac-O/X₄-VD-COOH Bibliothek ab.

In das **Design der Bibliothek** flossen die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Bindungs- und Kompetitionsstudien mit definierten Peptiden ein (Kapitel 3.1.2). Da die p60 TPR Domänen die 5-7 C-terminalen Aminosäuren von Hsp70, bzw. Hsp90 auslesen, waren für Heptapeptidmischungen dieser Längen Interaktionen mit den Proteinoberflächen zu erwarten. Die Ergebnisse der Alanin-Scans legten zudem nahe, dass die C-terminalen Reste Aspartat und Valin entscheidend zur Verankerung der natürlichen Liganden beitragen. Eine solche Verankerung ist insbesondere beim Einsatz komplexer Peptidmischungen notwendig, um die einzelnen Peptide der Mischungen relativ zum Protein einheitlich zu orientieren. In Abwesenheit einer einheitlichen Orientierung können in Peptidmischungen definierte, bindungsfördernde Seitenketten positionsunabhängig wirken und Gleiteffekte entstehen [269].

⁵⁰Cystein wurde aus synthesespezifischen Gründen und wegen der Gefahr spontaner, oxidativer Umwandlung in Sulfonsäure im Verlauf der Synthese und während der Lagerung nicht berücksichtigt.

⁵¹Rein rechnerisch enthielt jedes Wettbewerbsexperiment hinreichend viele Peptide, um diese Anzahl möglicher Sequenzen $3.8 \cdot 10^{11}$ mal abzudecken. (Kapitel 2.7)

Die Affinität einzelner teildefinierter Ac-OX₄-VD-COOH Mischungen zu TPRI und TPRIIA wurde indirekt als Fähigkeit zur Konkurrenz der TPR-Interaktionen mit definierten, auf Sensorchips immobilisierten 70C-12 und 90C-12-Peptiden bestimmt (siehe auch Tabelle 12). Analog zu den bereits beschriebenen **Kompetitionsexperimenten** mit definierten Peptiden wurden die TPR-Domänen in Abwesenheit und Gegenwart kombinatorischer Peptidmischungen über mit 70C-12, bzw. 90C-12 derivatisierte Sensorchips geleitet (Abb. 15 (A)). Die in Abwesenheit von Peptidkonkurrenten erreichten Bindungssignale wurden als 100% Bindung betrachtet. Die relativen Konzentrationen an TPR Domänen und Peptidmischungen wurden so gewählt, dass die maximal randomisierte Mischung Ac-X₅-VD-COOH eine 50%ige Inhibition der TPR Bindung an die immobilisierten 70C-12, bzw. 90C-12 Peptide auf der Chipoberfläche bewirkte. Die Konkurrenzwirkungen der teildefinierten Ac-OX₄-VD-COOH Mischungen wurde relativ zum 50%igen Konkurrenzeffekt der maximal randomisierten Mischung Ac-X₅-VD-COOH ausgedrückt und als Balkendiagramme dargestellt (Abb. 15 (A)). Aminosäuren in definierten Positionen, welche die durchschnittliche Affinität der teildefinierten Peptidmischungen zu den TPR Domänen erhöhen, inhibieren die Bindung der Domänen an den Sensorchip stärker als die maximal randomisierte Mischung Ac-X₅-VD-COOH. Solche Aminosäuren sind in den Balkendiagrammen durch negative Werte gekennzeichnet. Definierte Aminosäuren, welche die durchschnittliche Affinität der Peptidmischungen zu den TPR Domänen erniedrigen, inhibieren die Bindung der TPR-Domänen an den Sensorchip schwächer als die Mischung Ac-X₅-VD-COOH. Solche Aminosäuren sind in den Balkendiagrammen durch positive Werte gekennzeichnet.

Ergebnisse des Screens

In den Abbildungen 15 - 17 sind die Screeningergebnisse dargestellt. Es sind sowohl Bindungspräferenzen der Domänen TPRI und TPRIIA zu erkennen, die für alle Ligandenpositionen zutreffen und unabhängig vom betrachteten Protein sind, als auch positions- und proteinspezifische Bindungspräferenzen.

TPRI hat über alle Ligandenpositionen hinweg eine Tendenz zur bevorzugten Bindung der hydrophoben Seitenketten von Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Valin und Tyrosin. Die relativen und absoluten Bindungspräferenzen für jede einzelne dieser Aminosäuren variieren jedoch deutlich in Abhängigkeit von der Position dieser Reste im Liganden. So verhält sich beispielsweise Isoleucin in Position 4 deutlich bindungsfördernd, in Position 5 aber neutral (Abb. 17 (E)(F)). Leucin dagegen wirkt in den Positionen 2 und 3 neutral, in den Positionen 1 sowie 4 und 5 dagegen deutlich bindungs-

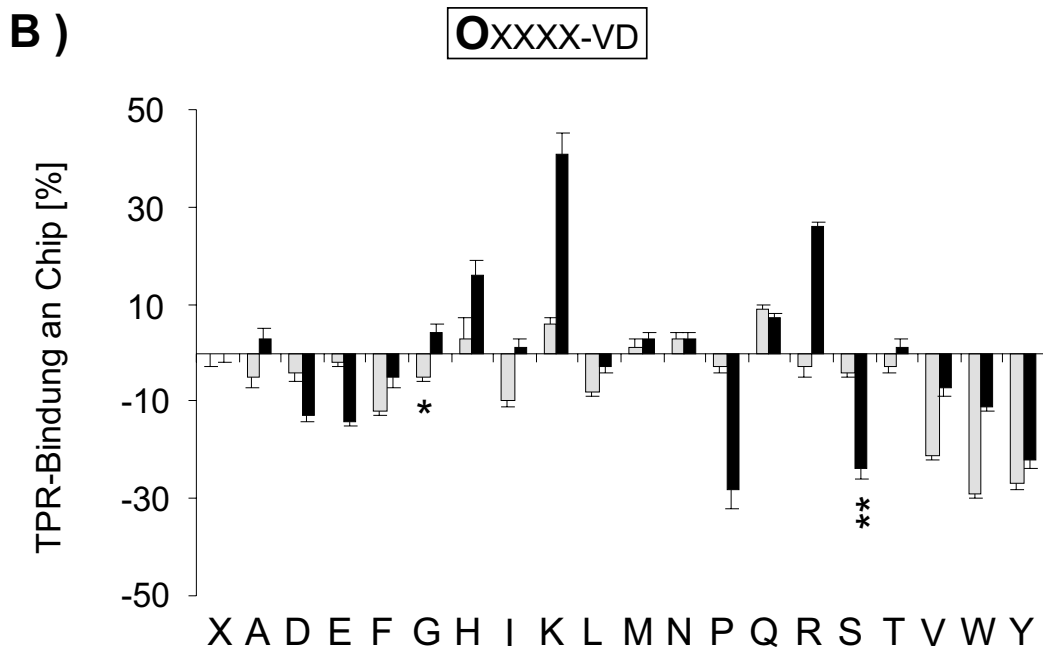
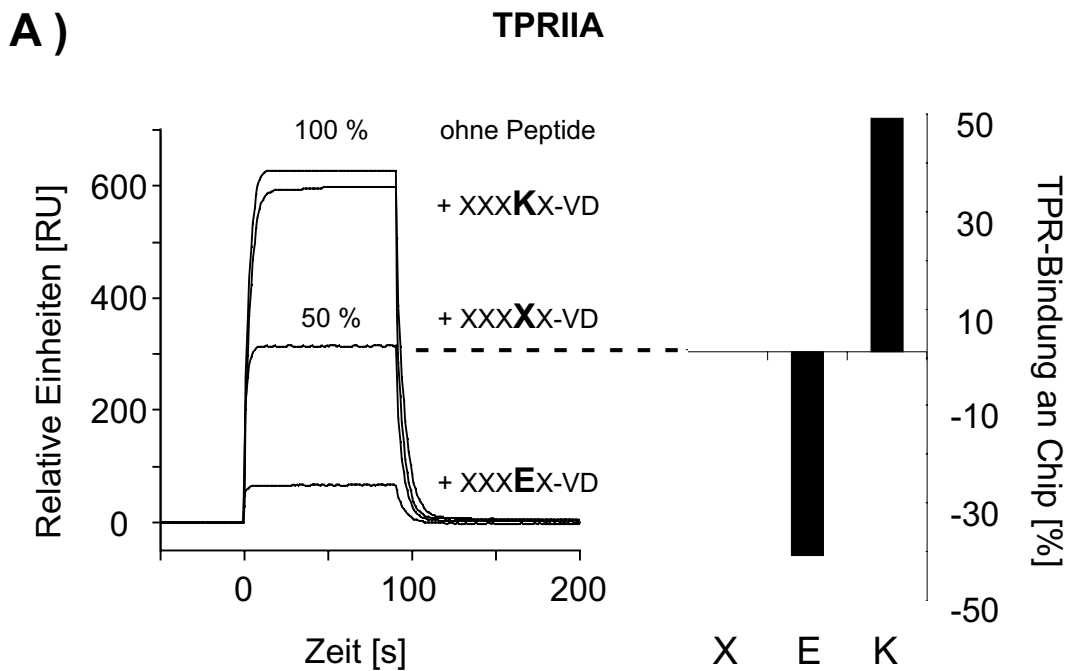


Abbildung 15: Bibliotheksscreen: Durchführung und Ergebnisse für Position 1
(A) TPRIIA ($0.9 \mu\text{M}$) wurde in Abwesenheit (100% Bindung) und Gegenwart von Peptidmischungen ($800 \mu\text{M}$) über C90-12 geleitet. Die TPRIIA Bindung an C90-12 in Gegenwart von OX₄-VD Mischungen wurde relativ zur Bindung in Gegenwart der X₅-VD-Mischung (50% Bindung) ausgedrückt. **(B)** Ergebnisse für die Teilbibliothek Ac-Oxxxx-VD-COOH bezüglich der TPRI Bindung an 70C-12 (*helle Balken*), bzw. der TPRIIA Bindung an 90C-12 (*dunkle Balken*). "*", bzw. "**" kennzeichnen Hsp70, bzw. Hsp90 Sequenzen.

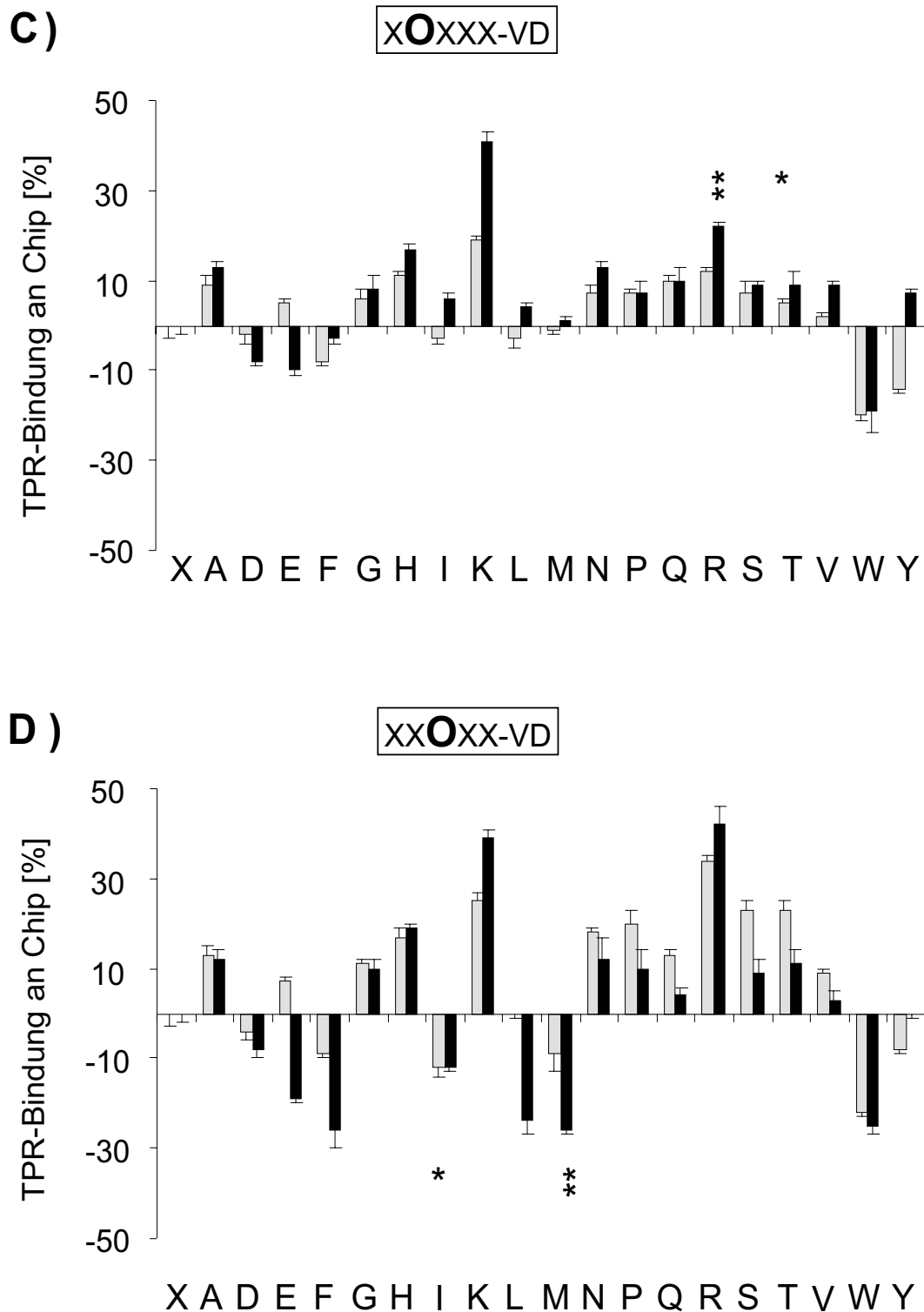


Abbildung 16: Bibliotheksscreen: Ergebnisse für die Positionen 2 und 3. Ergebnisse des Kompetitionscreens mit **(C)** xOxxx-VD, bzw. **(D)** xxOxx-Mischungen bezüglich der Wechselwirkungen von TPRI mit 70C-12 *helle Balken*, bzw. 90C-12 mit TPRIIA *dunkle Balken*. Die Aminosäuren der natürlichen TPRI, bzw. TPRIIA-Liganden sind für die jeweiligen Positionen durch "**", bzw. "***" gekennzeichnet.

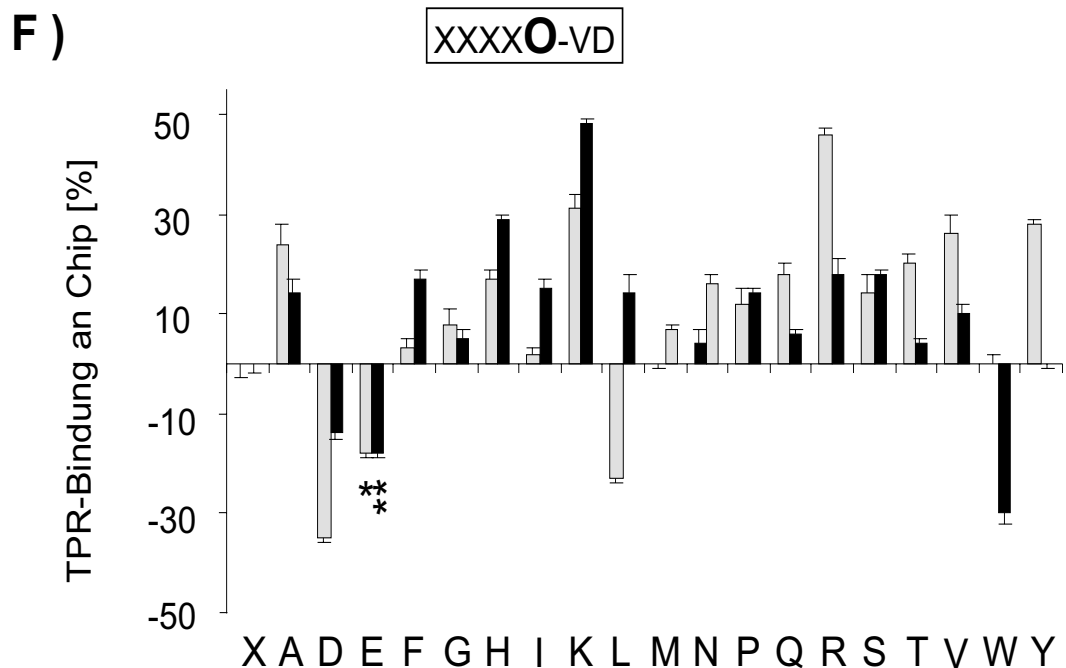
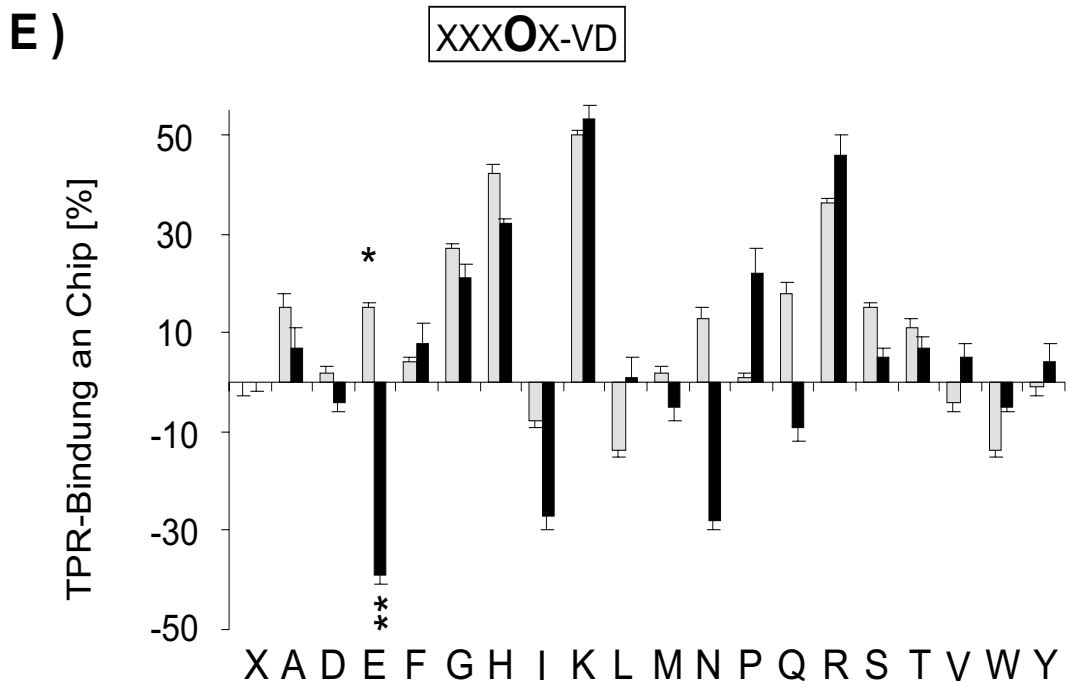


Abbildung 17: Bibliotheksscreen: Ergebnisse für die Positionen 4 und 5. Ergebnisse des Kompetitionscreens mit (E) xxxOx-VD-, bzw. (F) xxxxO-Mischungen bezüglich der Wechselwirkungen von TPRI mit 70C-12 *helle Balken*, bzw. 90C-12 mit TPRIIA *dunkle Balken*. Die Aminosäuren der natürlichen TPRI, bzw. TPRIIA-Liganden sind für die jeweiligen Positionen durch "*", bzw. "***" gekennzeichnet.

fördernd. Während saure Aminosäureseitenketten in Ac-OX₄-VD-COOH-Mischungen keine ausgeprägten Einflüsse auf die TPRI-Bindung haben, wirken sich basische Seitenketten in allen Positionen ausgesprochen störend aus.

Im Gegensatz zu TPRI besitzt **TPRIIA** eine deutliche Tendenz zur Bindung der Aminosäuren Aspartat und Glutamat. Die Präferenz negativ geladener Seitenketten ist nicht allein auf die Positionen 4 und 5 (Abb. 17 (E) und (F)) beschränkt, in denen die natürlichen TPRI- und TPRIIA-Liganden PTIE-EVD und SRMEEVD die konservierten Glutamatreste des EEVD-Motivs aufweisen, sondern sie besteht auch in den Positionen 1-3 (Abb. 15 (B) und Abb. 16 (C) und (D)). Hier geht SRMEEVD hydrophobe Interaktionen ein, vornehmlich vermittelt durch den Rest Methionin (Abb. 13). In **Position 4** besitzt TPRIIA eine sehr starke spezifische Affinität für Glutamat, die stärkste beobachtete Präferenz für eine in Ac-OX₄-VD-COOH Mischungen definierte Seitenkette überhaupt. Wie auch im Fall von TPRI wirken sich die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin in allen Positionen störend auf die Ligandenbindung an TPRIIA aus.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit denen des Alanin-Scans (Abb. 13). Hier wurde ein hinsichtlich der Bindung an TPRI nur geringer Beitrag der konservierten Glutamate im Hsp70-EEVD-Motiv deutlich, während die entsprechenden Reste des Hsp90-EEVD-Motivs bezüglich der Peptidbindung an TPRIIA erhebliche Beiträge liefern. Die ausgeprägte und spezifische Präferenz von TPRIIA für die Bindung von Glutamat in Position 4 ist vermutlich auf die Ausbildung derselben Salzbrücke zwischen TPRIIA und dem definierten Glutamat der Ac-xxxEx-VD-COOH-Mischung zurückzuführen, die TPRIIA auch mit dem Pentapeptid MEEVD ausbildet ([253], Kapitel 4). Dieser spezifische Glutamateffekt ist ein deutlicher Hinweis auf die Einnahme ähnlicher Bindungsmodi sowohl durch die definierten EEVD-Peptide als auch durch die komplexen Ac-OX₄-VD-COOH-Mischungen. Auch die negativen Einflüsse der basischen Aminosäuren auf die Ligandenbindung durch TPRI und TPRIIA befindet sich in gutem Übereinklang mit den beobachteten negativen Effekten des Argininrestes im Carboxyterminus von Hsp90 (TSRMEEVD-COOH) (Abb. 12 (B) und Abb. 13)⁵².

Weitere weitgehend sowohl vom TPR Protein als auch von der Ligandenposition unabhängige Effekte wurden für Tryptophan beobachtet, welches allen

⁵²Die Verlängerung des minimalen TPRIIA Liganden MEEVD zu RMEEVD bewirkt die Verdoppelung des K_D -wertes. Erst nach Kompensation der eingeführten positiven Ladung in DDTSRMEEVD erfolgt die Wiederherstellung der ursprünglichen Affinität (Abb. 12). Der Austausch des störenden basischen Restes in TSRMEEVD durch Alanin in TSA-MEEVD hat eine ähnliche Wirkung (Abb. 13)

getesteten Ac-WX₄-VD-COOH-Mischungen eine starke inhibitionsfördernde Wirkung verleiht (Abb. 15-17). Diese völlig mangelnde Selektivität unterscheidet Tryptophan von Phenylalanin und Tyrosin, die wesentlich differenzierter wirken. An den Positionen 1-3 fördern Phenylalanin und Tyrosin die inhibitorischen Wirkungen der Ac-OX₄-VD-COOH-Mischungen schwach bis mäßig, während sie sich an den Positionen 4 und 5 sowohl hinsichtlich der Peptidbindung an TPRI als auch der Bindung an TPRIIA als neutral bis störend verhalten. Aufgrund der mangelnden Selektivität von Tryptophan wurde diese Aminosäure in der weiteren Diskussion und beim Design definierter Peptide ausgenommen.

TPRI und TPRIIA weisen zudem ausgeprägte positionsspezifische Bindungspräferenzen für hydrophobe Seitenketten in den **Positionen 1 und 3** der Peptidmischungen auf (Abb. 15 - 17, Tabelle 13). In *Position 1* wirken Tyrosin, Valin, Phenylalanin und Isoleucin deutlich vorteilhaft auf die Bindung an TPRI. Die Seitenketten dieser Aminosäuren teilen ihre hydrophoben Eigenschaften mit dem im Hsp70-Carboxyterminus (PTIEEVD-COOH) an entsprechender Stelle auftretenden Prolinrest. Prolin als definierte Aminosäure in Ac-Pxxxx-VD-COOH fördert die Bindung gegenüber Ac-X₅-VD-COOH nur schwach (Abb. 15 (B)). Hinsichtlich der Wechselwirkung mit TPRIIA wirken sich in Position 1 dagegen, neben den sauren Seitenketten, gerade Prolin, aber auch Serin und Tyrosin deutlich vorteilhaft aus. Der im Falle von Serin beobachtete starke Effekt überrascht vor dem Hintergrund der Ergebnisse des Alanin-Scans (Abb. 13). Hier wirkte sich ein Austausch von Serin in TSRMEEVD zu Alanin neutral aus, sodass keine bedeutenden Beiträge des Serins zur TPRIIA Ligandenbindung erwartet wurden. Sowohl der starke bindungsfördernde Effekt von Prolin als auch der von Serin ist positionsspezifisch und wiederholt sich in den Positionen 2-5 weder im TPRI- noch im TPRIIA-Screen. In **Position 3** begünstigt Isoleucin die Ligandenbindung an TPRI am stärksten, während Methionin die Bindung der Ac-O/X₄-VD-COOH-Mischungen an TPRIIA am meisten fördert (Abb. 16 (D), Tab. 13). Damit haben TPRI und TPRIIA in Position 3 jeweils die entsprechende Seitenkette der natürlichen Liganden PTIEEVD und SRMEEVD unter den 19 angebotenen Aminosäuren als jeweils besten Interaktionspartner herausgefunden. Schwächer positiv wirken jeweils die Reste Methionin, Phenylalanin und Tyrosin auf die Bindung an TPRI, bzw. Phenylalanin, Leucin, Glutamat und Isoleucin auf die Bindung an TPRIIA.

In **Positionen 2** ragen nur wenige bindungsfördernde Aminosäuren heraus. Tyrosin und Phenylalanin wirken schwach positiv auf die Peptidbindung an TPRI, während Aspartat und Glutamat sich schwach positiv auf die Bindung an TPRIIA auswirken. In **Position 4** bestehen etwas ausgeprägte

re Interaktionen zwischen Leucin, bzw. Isoleucin und TPRI. TPRIIA weist neben dem bereits besprochen Glutamateffekt eine ausgesprochen positions-spezifische Interaktion mit Asparagin aus. In **Position 5** wirken sich insbesondere die sauren Seitenketten förderlich auf die Ligandenbindung sowohl an TPRI als auch an TPRIIA aus. Position 5 ist hinsichtlich der Bindung an TPRI die Position mit den deutlichsten positiven Einflüssen saurer Seitenketten im Peptidliganden. Weiterhin wurde für TPRI eine starke Interaktion mit Leucin gefunden. Auf die Bindung an TPRIIA wirken sich in Position 5 der Peptidliganden ausschließlich die Aminosäuren Aspartat und Glutamt günstig aus.

Zusammenfassend sind in Tabelle 13 die besonders bindungsfördernden Aminosäuren für TPRI und TPRIIA dargestellt. Als besonders bindungsfördernd wurden definierte Aminosäuren solcher Peptidmischungen betrachtet, die die Kompetitionswirkung der jeweiligen Ac-OX₄-VD-COOH-Mischung gegenüber Ac-X₅-VD-COOH um weitere 10% erhöhten, bzw. im beschriebenen Kompetitionsassay die Bindung von TPRI und TPRIIA an die 70C-12- und 90C-12-Peptide auf einen Wert unter 40% reduzierten. Diese Aminosäuren wurden in Tabelle 13 für jede Position nach abnehmender Wirkung aufgelistet. Die positionsübergreifenden Tendenzen von TPRI zur Bindung hydrophober Seitenketten, bzw. die deutliche Präferenz von TPRIIA zur Interaktion mit sauren Seitenketten wird erneut widerspiegelt. Sowohl **TPRI als auch TPRIIA stellen zudem für die Ligandenpositionen 1 und 3 der Heptapeptide hydrophobe Kontaktstellen bereit**. Im Fall von TPRI verpassen in Position 3 weitere, in Tabelle 13 nicht aufgeführte bindungsfördernde hydrophobe Seitenketten die Auswahlgrenze nur knapp (Tabelle 13, Abb. 16 (D)).

Unter den für jede Sequenzposition als optimal befundenen Aminosäuren ist im Fall von TPRI (YYILD-VD, Tabelle 13) lediglich Isoleucin in Position 3 auch im natürlichen Liganden vorhanden. An den weiteren Positionen zeichnet sich YYILD-VD gegenüber der C-terminalen Hsp70-Sequenz PTIEEVD durch eine höhere Hydrophobizität aus. Dagegen enthält der vermeintlich optimale TPRIIA-Peptidligand PEMEE-VD die vollständige Sequenz des minimalen natürlichen TPRIIA-Liganden MEEVD. PEMEE-VD zeichnet sich gegenüber der C-terminalen Hsp90-Sequenz SRMEEVD vor allem durch seine zweifach erhöhte negative Nettoladung aus (vgl. hierzu auch Abb. 12 und 13 und 16 (C)).

Tabelle 13: Bindungsfördernde Aminosäuren für TPRI und TPRIIA.

Für jede Ligandenposition wurden die definierten Aminosäuren 'O' solcher Ac-OX₄-VD-COOH Mischungen aufgelistet, welche im Kompetitionsassay die Wechselwirkungen von TPRI und TPRIIA mit 70C-12 und 90C-12 Peptiden um weitere 10% gegenüber Ac-X₅-VD-COOH (50%ige Kompetition) verminderten. In der ersten Zeile sind zum Vergleich die C-terminalen Sequenzen von Hsp70 und Hsp90 angegeben. Die im Screen wiedergefundenen Hsp70, bzw. Hsp90-Reste sind fett markiert.

TPRI-Screen						
	OxxxxVD	xOxxxVD	xxOxxVD	xxxOxVD	xxxxOVD	
Hsp70:	P	T	I	E	E	VD
	Y	Y	I	L	D	
	V				L	
	F				E	
	I					
TPRIIA-Screen						
	OxxxxxVD	xOxxxVD	xxOxxVD	xxxOxVD	xxxxOVD	
Hsp90:	S	R	M	E	E	VD
	P	E	M	E	E	
	S		F	N	D	
	Y		L	I		
	D		E			
	E		I			

3.1.4 Modifizierte Peptidliganden

Um die Ergebnisse des Peptidbibliotheksscreens zur Affinitätsoptimierung der EEVD-Liganden zu nutzen, wurden auf Grundlage von Tabelle 13 modifizierte TPR-Liganden entworfen und hinsichtlich ihrer Affinitäten zu TPRI, bzw. TPRIIA getestet.

Das als **optimaler TPRI-Ligand** vorausgesagte Heptapeptid Ac-YYILDVD-COOH besitzt eine doppelt so hohe Affinität zu TPRI wie das den Hsp70-Carboxyterminus nachahmende Peptid Ac-PTIEEVD-COOH ($K_D(\text{YYILDVD}) = 9\mu\text{M}$ gegenüber $K_D(\text{PTIEEVD}) = 19\mu\text{M}$, Tab. 14). Diese Affinität läßt sich weiter steigern, indem in dem optimierten Liganden an den Positionen 1 und 2 die Hsp70-spezifischen Aminosäuren Prolin und Threonin eingeführt werden. Das resultierende Peptid Ac-PTILDVD-COOH ($K_D(\text{PTILDVD}) = 5\mu\text{M}$) besitzt gegenüber der reinen Hsp70-Sequenz PTIEEVD-COOH eine vierfach höhere Affinität zu TPRI und gegenüber C70 (25kD) ($K_D(\text{C70}) = 15\mu\text{M}$, Abb. 12) eine dreifach höhere Affinität⁵³. Das als **optimaler TPRIIA-Ligand** vorausgesagte Heptapeptid Ac-PEMEEVD-COOH zeichnet sich durch eine gegenüber der entsprechenden Hsp90 Sequenz zweifach erhöhte Affinität zu TPRIIA aus ($K_D(\text{PEMEEVD}) = 11\mu\text{M}$ gegenüber $K_D(\text{SRMEEVD}) = 27\mu\text{M}$). Dieser Effekt ist jedoch ausschließlich auf den Austausch des hinderlichen Argininrestes in SRMEEVD zurückzuführen (vgl. auch Abb. 12 (B) und Abb. 13). Die Peptide Ac-PEMEEVD-COOH, Ac-SEMEEVD-COOH und Ac-MEEVD-COOH binden TPRIIA gleich stark. TPRIIA liest lediglich die Sequenz -MEEVD-COOH der Heptapeptide aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die C-terminalen Sequenzen von Hsp70 und Hsp90 bereits weitgehend zur Interaktion mit TPRI und TPRIIA optimiert sind. Weitere Optimierungsmöglichkeiten bestehen voraussichtlich für die Heptapeptidliganden von TPRI durch Addressierung weiterer hydrophober Kontaktstellen der TPRI-Proteinoberfläche über die 5. Ligandenposition.

Neben der Fähigkeit zur Bindung von TPRI, bzw. TPRIIA wurde die Hemmwirkung der modifizierten Peptidliganden VYIEEVD, VYILDVD, SEMEEVD und PEMEEVD auf die Wechselwirkung der Ubiquitinligase CHIP mit Hsp70 und Hsp90 untersucht (Abb. 18). CHIP bindet C-terminale Sequenzen von Hsp70 und Hsp90 mit ähnlicher Affinität und mittels derselben TPR-Domäne (Tabelle 16). Aus diesem Grunde wirken kurze Heptapeptide mit entsprechenden Hsp70-, bzw. Hsp90-Sequenzen als effektive Inhibitoren sowohl der

⁵³Der Meßfehler bei ITC-Experimenten liegt unter den gewählten Versuchsbedingungen bei 5-10%.

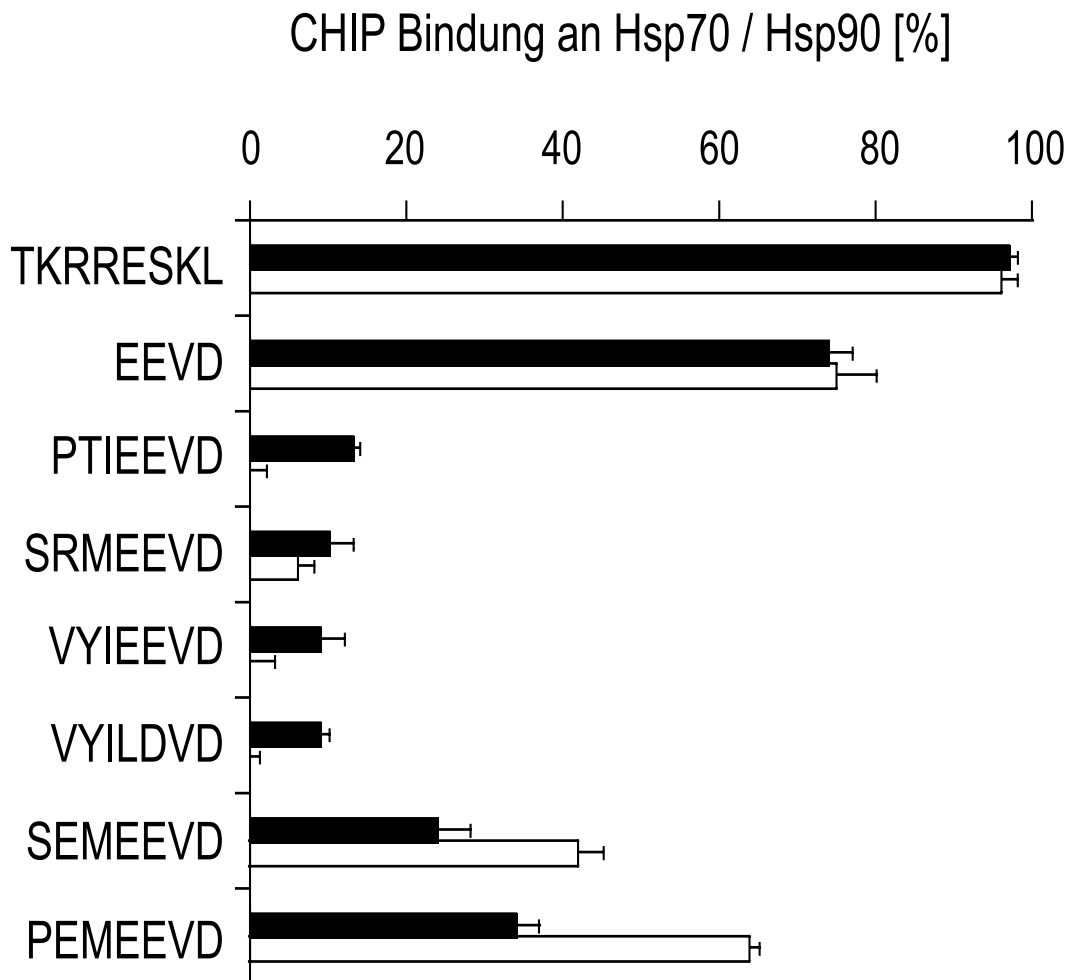


Abbildung 18: Konkurrenz der CHIP Bindung an Hsp70 und Hsp90. CHIP ($2 \mu\text{M}$) wurde in Abwesenheit und Gegenwart kurzer Peptide ($100 \mu\text{M}$) über einen mit Hsp70, bzw. Hsp90 beladenen Sensorchip geleitet. Die in Abwesenheit von Peptidkonkurrenten erreichten Bindungssignale wurden als 100% Bindung betrachtet und die in Gegenwart der Konkurrenten erreichten Signalstärken auf diesen Wert bezogen. Die CHIP Interaktion mit 70C-12 ist durch *weiße Balken* dargestellt, die CHIP Interaktion mit 90C-12 durch *schwarze Balken*.

CHIP Bindung an Hsp70 als auch an Hsp90. EEVD alleine ist kein wirksamer Kompetitor (Abb. 18).

Modifizierte Liganden von TPRI und TPRIIA besitzen gegenüber den Peptiden PTIEEVD und SRMEEVD eine **veränderte Spezifität** der Bindung an TPRI, TPRIIA und CHIP. Während VYIEEVD eine gegenüber PTIEEVD niedrigere Affinität zu TPRI aufweist, ist es als Kompetitor der CHIP-Interaktionen mit Hsp70 und Hsp90 gleichermaßen aktiv. VYILDVD inhibiert die CHIP-Wechselwirkung mit Hsp90 und folglich auch dessen Wechselwirkung mit Hsp70 nicht stärker als das Peptid VYIEEVD, wohingegen die Affinität von VYILDVD zu TPRI deutlich höher ist als die Affinität von VYIEEVD zu TPRI. Sowohl SEMEEVD als auch PEMEEVD haben im Vergleich zum Wildtyppeptid SRMEEVD eine deutlich verringerte Wirksamkeit bei der Inhibition der CHIP-Interaktionen mit Hsp70 und Hsp90 (Abb. 18), wohingegen beide Peptide eine höhere Affinität zu TPRIIA aufweisen als das Wildtyppeptid SRMEEVD. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle des hochkonservierten Argininrests im Hsp90-Carboxyterminus (Abb. 14) als Spezifitätsfaktor bei der CHIP-Bindung an Hsp90 hin. Das Peptid VYIEEVD wurde somit als ein Ligand mit einer relativ zur Hsp70-Sequenz PTIEEVD höheren Selektivität der Bindung an CHIP versus TPRI identifiziert. SEMEEVD und PEMEEVD zeigen eine gegenüber der Hsp90-Sequenz SRMEEVD höhere Affinität und Selektivität bei der Bindung an TPRIIA versus CHIP.

Die beschriebenen Bindungsstudien unter Verwendung definierter Peptide (Abb. 12 und Abb. 13) und kombinatorischer Peptidmischungen (Abb. 16 (D)) wies auf die große Bedeutung der Reste Isoleucin, bzw. Methionin für die Affinität und Selektivität der Ligandenerkennung durch TPRI, bzw. TPRIIA hin. Um den Beitrag dieser Reste relativ zur Bedeutung der benachbarten für Hsp70-, bzw. Hsp90-spezifischen Sequenzen abzuschätzen, wurden die **chimären Peptide GPTMEEVD und TSRIEEVD** hinsichtlich ihrer Affinitäten zu TPRI und TPRIIA untersucht (Tabelle 14). Hieraus wurde ersichtlich, dass Isoleucin im Hsp70 Carboxyterminus eine wichtige, jedoch nicht die alleinige Determinante spezifischer TPRI Bindung darstellt. Methionin im Hsp90 Carboxyterminus ist dagegen sowohl notwendig als auch hinreichend für die spezifische TPRIIA-Bindung. Das Peptid GPTMEEVD enthält mehr Hsp70- als Hsp90-spezifische Sequenzen. Die mit Hsp70 interagierende p60 Domäne TPRI jedoch bindet GPTMEEVD lediglich mit schwacher Affinität, wohingegen TPRIIA zu dem Oktapeptid GPTMEEVD eine vergleichbare Affinität aufweist wie zu dem Pentapeptid MEEVD. Im Gegensatz hierzu ist das Peptid TSRIEEVD in seiner Bindungsstärke sowohl gegenüber TPRI als auch TPRIIA substantiell geschwächt. Diese Ergebnisse

Tabelle 14: Modifizierte TPRI und TPRIIA Liganden

TPRI	
Sequenzen	K_D (μM)
<i>Ac-PTIEEVD-COOH</i>	19
<i>Ac-YYILDVD-COOH</i>	9
<i>Ac-VYILDVD-COOH</i>	20
<i>Ac-VYIEEVD-COOH</i>	54
<i>Ac-PTILDVD-COOH</i>	5
<i>Ac-GPTIEEVD-COOH</i>	21
<i>Ac-TSRMEEVD-COOH</i>	154
<i>Ac-GPTMEEVD-COOH</i>	166
<i>Ac-TSRIEEVD-COOH</i>	91
TPRIIA	
Sequenzen	K_D (μM)
<i>Ac-SRMEEVD-COOH</i>	27
<i>Ac-MEEVD-COOH</i>	11
<i>Ac-SEMEEVD-COOH</i>	12
<i>Ac-PEMEEVD-COOH</i>	11
<i>Ac-GPTIEEVD-COOH</i>	114
<i>Ac-TSRMEEVD-COOH</i>	27
<i>Ac-GPTMEEVD-COOH</i>	14
<i>Ac-TSRIEEVD-COOH</i>	498

befinden sich in guter Übereinstimmung mit der früheren Beobachtung, dass das Pentapeptid IEEVD nicht die maximale Affinität zu TPRI aufweist, sondern Threonin und Prolin im minimalen TPRI Liganden PTIEEVD ebenfalls einen Beitrag leisten (Abb. 12 (A)).

3.1.5 Bedeutung der Zweifachen Carboxylatklammer

Ein zentrales strukturelles Motiv Hsp70 und Hsp90 bindender TPR Proteine ist die sog. Zweifache Carboxylatklammer [253] [254] ⁵⁴. Die Klammer besteht aus fünf Lysin, Arginin und Asparaginresten, die jeweils in den Helices 1A, 2A und 3A der TPR Strukturen konserviert sind (Abb. 19). Diese Seitenketten sind kein Bestandteil der TPR-Motive selbst. TPR Proteine, die bekanntermaßen anderen zellulären Kontexten angehören, z. B. TPR-Proteine des Anaphase Promovierenden Komplexes oder peroxisomale Proteinimportrezeptoren wie PEX5, besitzen die Zweifache Carboxylatklammer nicht. Die Seitenketten der Klammerreste bilden mit den beiden Carboxylatfunktionen des Aspartats im EEVD-COOH-Motiv ein hochgeordnetes Netzwerk aus Salz- und Wasserstoffbrücken aus und dienen dadurch der Verankerung von EEVD-Liganden an TPR-Domänen (Abb. 20 (A)) [253] [254]. Die Zweifache Carboxylatklammer der TPRI-Domäne trägt wesentlich zur Ausbildung des bereits erwähnten Packungseffekts im Kristall der ligandenfreien Domäne bei. Dieser Kristallkontakt lieferte den initialen Hinweis auf die generelle Natur TPR-vermittelter Proteininteraktionen in Hsp90-Multichaperonkomplexen (Kapitel 3.1.1).

Um die Bedeutung der Zweifachen Carboxylatklammer für die Bindung von EEVD-Liganden zu beurteilen, wurden exemplarisch die Reste Lys229, Asn264, Lys301 und Arg305 der p60-TPRIIA-Domäne⁵⁵ einzeln gegen Alanin ausgetauscht und die TPRIIA-Klammermutanten mit dem TPRIIA Wildtypprotein (TPRIIA(WT)) bezüglich ihrer Ligandenbindungsfähigkeit verglichen. Während TPRIIA(WT) Hsp90 vergleichbar stark bindet wie p60 (Abb. 12), interagieren die untersuchten TPRIIA-Punktmutanten nicht oder nur sehr schwach mit Hsp90 (Abb. 21 (A)). Zudem sank die mittels ITC bestimmte Affinität von TPRIIA zum MEEVD-Peptid nach Substitution nur einer der

⁵⁴Mit Ausnahme des Hsp70-Kofaktors Hip besitzen die TPR-Domänen aller bekannten TPR-Kofaktoren von Hsp70 und Hsp90 diese Zweifache Carboxylatklammer. Die TPR-Domäne von Hip interagiert nicht mit dem carboxyterminalen EEVD-Motiv von Hsp70, sondern erkennt interne Sequenzen der N-terminalen ATPase Domäne des Chaperons [109] [257].

⁵⁵Die Bezeichnung der genannten Seitenketten folgt der Nummerierung des humanen p60.

genannten Klammerreste um mindestens zwei Größenordnungen. Während das Wildtypprotein MEEVD mit einer Affinität von $K_D=11\mu\text{M}$ bindet (Abb. 12), liegen die Affinitäten der Mutanten TPRIIA K229A, TPRIIA N264A, TPRIIA K301A und TPRIIA R305A zu MEEVD im millimolaren Bereich ($K_D\leq 1\text{mM}$).

Um destabilisierende, bzw. strukturverändernde Einflüsse der Punktmutationen auszuschließen, wurden TPRIIA(WT) und seine Mutanten CD-spektroskopisch analysiert (Abb. 21 (B) sowie Abb. 22 (A) und (B)). Vergleiche der CD-Spektren im fernen und nahen UV-Bereich ließen keine Veränderungen der Sekundär- oder Tertiärstrukturen der Klammermutanten gegenüber TPRIIA(WT) erkennen (Abb. 22 (A) und (B)). Die entsprechenden CD-Spektren sind im Rahmen der Genauigkeit der Proteinkonzentrationsbestimmung identisch. Der dominierende α -helikale Charakter aller untersuchten TPR-Domänen ist anhand der ausgeprägten Doppelbande im Bereich des fernen UV bei 210 nm, bzw. 220-225 nm klar zu erkennen [279] [304] (Abb. 3.1.6 (A)). Die bei 220 nm gemessenen Schmelzkurven weisen zudem nicht auf eine Destabilisierung der mutierten Proteine hin (Abb. 21 (B)). Die Schmelzpunkte von TPRIIA(WT) und seiner Mutanten liegen zwischen 57°C und 61°C, wobei für die Mutanten tendentiell höhere Schmelztemperaturen ermittelt wurden. Die aromatischen Aminosäuren der TPRIIA-Domäne⁵⁶ deuten als Sensoren der Tertiärstruktur von Proteinen keine mutationsbedingten strukturellen Veränderungen an.

Zusammenfassend erscheint die vollständige strukturelle Integrität der Zweifachen Carboxylatklammer als absolut notwendige Voraussetzung für die Funktion der Ligandenbindung durch TPRIIA. Für die Stabilität der TPRIIA-Domäne sind die Seitenketten der Zweifachen Carboxylatklammer entbehrlich (siehe auch Kapitel 3.1.6).

3.1.6 TPRIIB und die Hsp82 ATPase

Das zu p60 homologe Protein der Hefe, Sti1, inhibiert die ATPase-Aktivität des zu Hsp90 homologen Hefeproteins Hsp82. Diese inhibitorische Aktivität von Sti1 konnte auf dessen mittlere und C-terminale Regionen eingegrenzt werden [190]. Auch humanes p60 ist in der Lage, die spezifische Hsp82-ATPase-Aktivität zu inhibieren⁵⁷ (Abb. 23 (B), Kapitel 2.8.5). Wie auch im

⁵⁶TPRIIA enthält keine Tryptophane, jedoch zehn Tyrosinreste und vier Phenylalanine.

⁵⁷Hsp82 besitzt *in vitro* im Gegensatz zu humanem Hsp90 nach heterologer Expression in *E. coli* und Präparation eine spezifische, d. h. durch Geldanamycin, bzw. Radicol [79] inhibierbare ATPase-Aktivität auf.

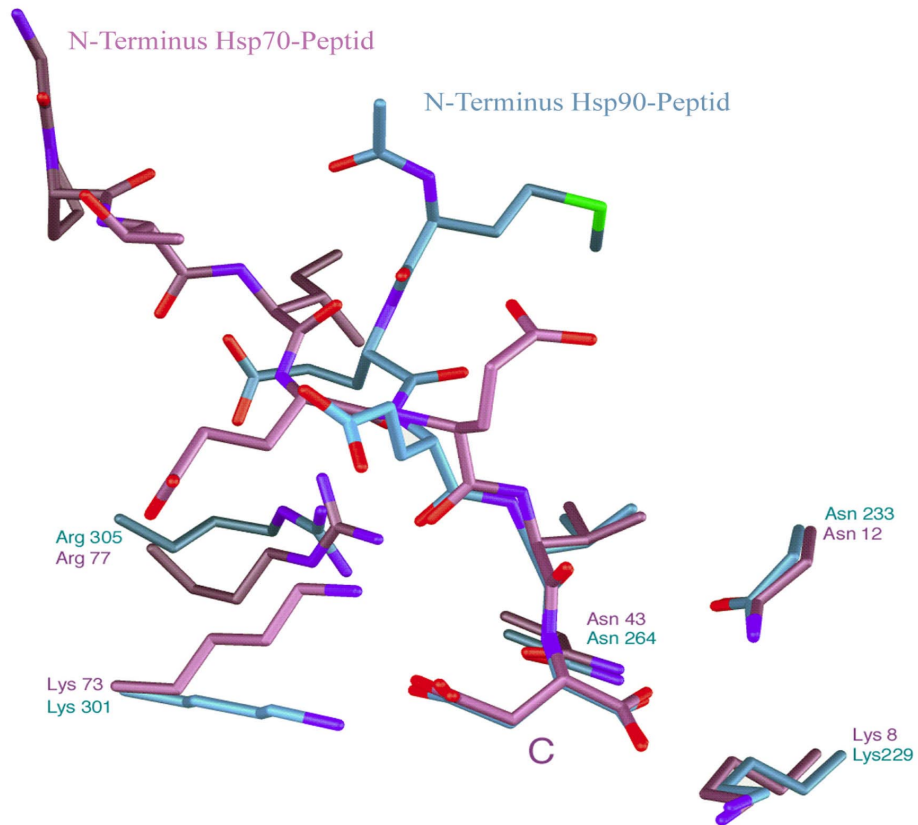
	HELIX 1A	HELIX 1B	HELIX 2A	HELIX 2B
Tpr1	4 VNEL KEKGN KALSVGNIDDA ALQCY FAIKLDPHN-----			HVLY SN SAAYAKKGDYQ KAYEDGCKT VDL---KPDW----
CHIP	26 AQEL KEQGN RLVGRKYPE AAAC YGRVITRNPLV-----			AVYY TNR ALCYLKMQQHEQ ALADCRRA LEL---DGQS----
Tpr2A	225 ALKE KELGN DAYKKDFD TA LKH YDK AKELDPTN-----			MTYIT NQ AAVYFEKGDY NKCRELCE KAIEVGRE NRE DYRQI
PP5	28 AEEL KTQ ANDYFKAKDYEN A IK FYSQ AIELNPSN-----			AIYY GNR SLAYLRTECY GYALGD ATRA LEL ---DKKY----
FKBP51	268 AAIV KEKGT VYFKGK YMQ AVIQY YK IVSWLEMEYGLSEKE--SKASES FLLA AF NL AMCYLKLREY TKAVE CC DKA LGL---DSAN----			
FKBP52	270 STIV KE RGTVYFKGK YQ ALL QY KKIVSWLEYESSFSNEE-AQKAQALRLASH LN LAM CH LKLOAF SAA TES CNK ALEL---DSNN----			
Cyp40	223 TEDL KNI GN TF FKSQNWEM A IK Y AEVLR YV SSKAVIETADRAKLQ PI AL SC VL NI G ACK LKMSNW Q AI DS CLE ALE L---DPSN----			
TOM34	193 ARVL KEE GNELV KKGN H KA IE KY SE S LLCSNLE-----			SATY SN RALCYLV LK QY TE AV KD CTE A LKL---DGKN----
TOM70	136 AAKL KE GN K AYGSKDF NA IDL YSK AIICKPDP-----			VVY SN RAACHNALAQ WE Q V AD TTA A L LKL---DPHY----
CNS1_sc	83 AEN F K Q GN L YKAKRF DA REL YSK GLAVECEDK S IN-----			ESLY AN RA CE LELKNY RR CT ED CS K AL TI ---NPKN----
Tpr2B	360 ALEE KN GN EC FQKGDY PQ AM KHY TEAIKRNPKD-----			AKLY SN RA AC Y T KLLE FQ L L K D CE EC I Q L---EPTF----
TTC1	116 STPL KEE GN Q FKGDY TE A ESS YS R ALEMCP S CFQKER-----			SIL F SN RA AR RM QDK EM A IN DC S K A I Q L---NPSY----
TTC2	246 LKAK ED GN K AFKEGN YK L AV ELY TE ALGIDP NI KTN-----			AKLY CNR GT V NSKLRL DD A IE DC TN AV L KL---DDTY----
TTC3	231 GELM K GN E FSKERFD IA I Y Y TR AIEYRPEN-----			YLLY GNR AL CF LR TG FR N AL GD K R A TI L---KN T W----
TTC4	79 AKTY KDE GN Y FKEKDY K AVI SY TE GL KKCADPDLN-----			AVLY TNR AA Q Y L GN F RS AL ND V TA R LKL---K P CH----
IRSP	225 FKAL KE GN Q C V NDK NY K D AL SK Y SE CLK IN KE-----			CAI YTNR ALCYL LK L Q FEE AK Q CD Q A L Q L---ADGN----
SGT	89 AERL KTE GN Q M K VENFE AV H F Y G K A IELNPAN-----			AVY FCNR AA Y SK L GN Y AG AV Q C ER A I C I---DPAY----
KIAA0719	114 AQA AK NG K Y F KAGKY QA I Q CY TE AISLC P TEKNVDL-----			STFY QNR AA F EQ L Q K W KE V A Q D CT K A V EL---NPKY---K

	HELIX 3A	HELIX 3B	HELIX C
TprI	72 G K Y S R K A A A LE F LN R FE E A K R T Y E E G L K HE AN NP Q L E GL Q N M E A R L A E R K F M		125
CHIP	94 V K A H F L G Q C Q L E M E S Y D E A I A N L Q R A Y S L A K E Q R L N F G D D I P S A L R I A K K R W		147
TprIIA	300 A K A Y A R I G N S Y F K E E K Y K D A I H F Y N K S L A E H R T P D V L K K C Q A E K I L K E Q E R L A		353
PP5	96 I K G Y R R A S N M A L G K F R A L R D Y E T V V K V K P H D K A K M Y Q E C N K I V K Q A F E		149
FKBP51	351 E K G L Y R R G E A Q L M N E F S A K G D F E K V L E V N P Q N K A R L Q I S M C Q K A K E H N E R		404
FKBP52	353 E K G L F R R G E A H L A V N D F E L A R A D F Q K V L Q L Y P N N K A A K T Q L A V C Q R I R R Q L A R		406
Cyp40	347 T K A L Y R R A Q G W Q L K E Y D A L A D L K K A Q G I A P E D K A I Q A E L L K V K Q I K A Q K D K		400
TOM34	261 V K A F Y R R A Q A H K A L K D Y K S F A D I S N L L Q I E P R N G P A Q K L R Q E V K Q N L H		309
TOM70	203 V K A L N R R A N A Y D Q L S R Y R H A L L D F T A S C I I D G F R N E Q S A Q A V E R L L K F A E N K A		256
CNS1_sc	155 V K C Y R I S K A F F Q L N K L E E A K S A A T F A N Q R I D P E N K S I L N M L S V I D R K E Q E L K A		208
TprIIB	428 I K G Y T R K A A A L E A M K D Y T K A M D V Y Q K A L D L D S S C K E A A D G Y Q R C M M A Q Y N R H D S		481
TTC1	189 I R A I L R R A E L Y E K T D K L D E A L E D Y K S I L E K D P S I H Q A E R A C M R L P K Q I E E R N E R		242
TTC2	318 I K A Y L R R A Q C Y M D T E Q Y E E A V R D Y E K V Y Q T E K T K E H Q L L K N A Q L E L K S K R D		371
TTC3	299 P K G H Y R C D A L S M L G E Y D W A L Q A N I K A Q K L C K N D P E G I K D L I Q H V K L Q K I E D		352
TTC4	151 L K A I R G A L C H E L I H F A E A V N W C D E G L Q I D A K E K L L E M R A K A D K L R I E Q R D		204
IRSP	293 V K A F Y R R A L A H K L K N Y Q K S L I D L N K V I L L D P S I I E A K M E L E E V T R L L N L K D K T		346
SGT	159 S K A Y G R M G L A L S S L N K H V E A V A Y Y K K A L E L D P D N E T Y K S N L K I A E L K L R E A P S		212
KIAA0719	187 V K A L F R R A K A H E K L D N K K E C L E D V T A V C I L E G F Q N Q S M L L A D K V L K L L G K E R A		240

Abbildung 19: Sequenzvergleich von TPR-Domänen.

Sequenzvergleich von TPR Domänen, die als Kofaktoren von Hsc/Hsp70 oder Hsp90 bekannt sind oder potentielle Bindungspartner aufgrund ihrer konservierten Carboxylatklammern darstellen. Die Reste der konservierten Carboxylatklammern sind rot hervorgehoben. Fett gedruckte Positionen gehören zum TPR-Konsensus. Bis auf TOM70 and CNS1 sind alle Sequenzen humanen Ursprungs. TOM70 ist aus *N. crassa*, CNS1 aus *S. cerevisiae*.

A)



B)

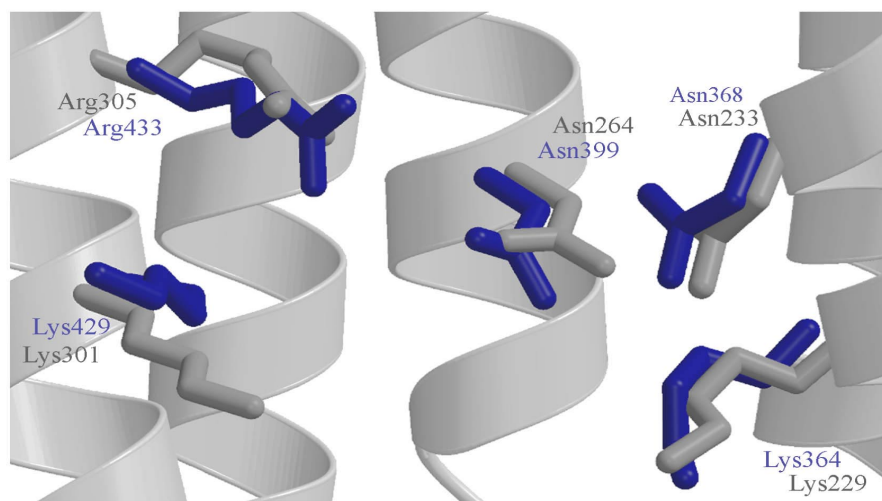


Abbildung 20: Die Zweifache Carboxylatklammer.

(A) Superposition der zweifachen Carboxylatklammern von TPRI (lila) und TPRIIA (hellblau). Die Reste der Carboxylatklammern und die N- bzw. C-Termini der Peptide sind markiert. (B) Superposition der zweifachen Carboxylatklammer der Komplexstruktur von TPRIIA/MEEVD mit den entsprechenden Seitenketten von TPRIIB. [253] [254]

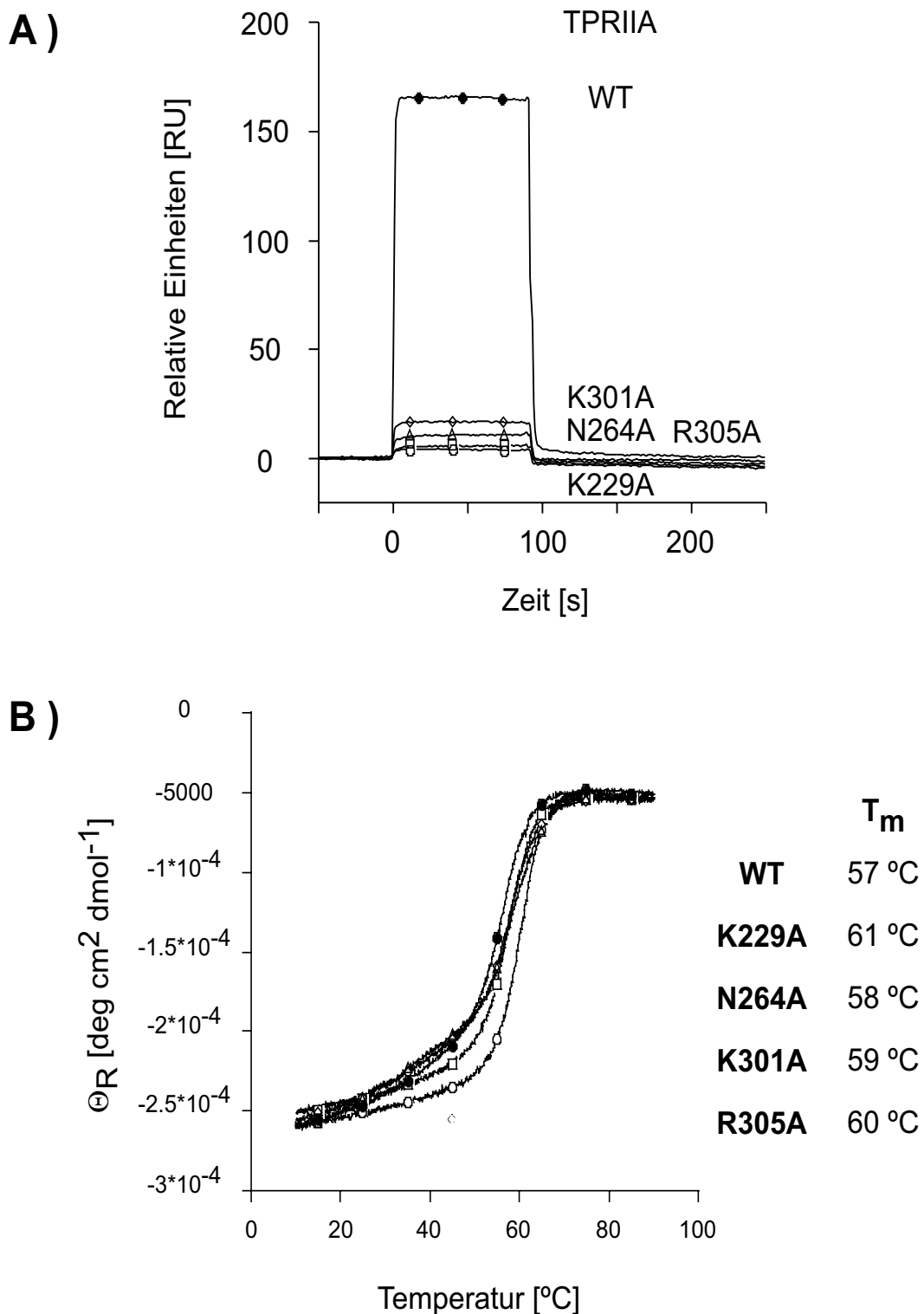


Abbildung 21: Bedeutung der Zweifachen Carboxylatklammer von TPRIIA. (A) Die Bindung des TPRIIA Wildtyp Proteins (TPRIIA WT) und seiner Klammerrmutanten (10 μ M) an Hsp90 (1800 RU). (B) CD-spektroskopisch vermessene Schmelzkurven und Schmelztemperaturen (T_m) von TPRIIA WT sowie der Klammerrmutanten. TPRIIA WT: *schwarze Kreise*, K229A: *weiße Kreise*, N264A: *weiße Dreiecke*, K305A: *weiße Quadrate*, R305A: *weiße Karos*.

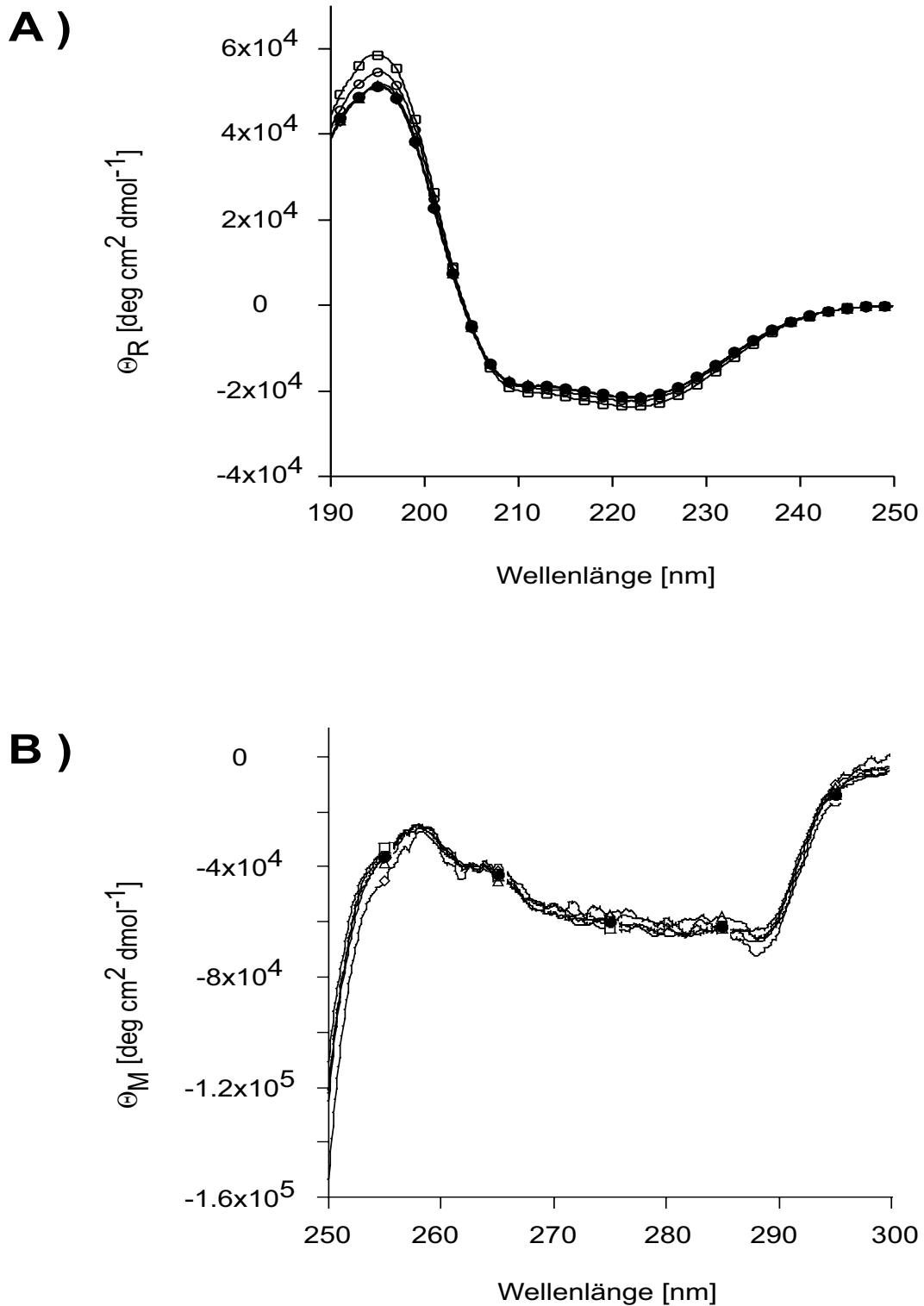


Abbildung 22: CD-Spektroskopische Analyse von TPRIIA. Vergleich der CD-Spektren des TPRIIA Wildtyps und der Klammermutanten K229A, N264A, K301A und R305A (A) im fernen sowie (B) im nahen UV-Bereich. TPRIIA WT: schwarze Kreise, K229A: weiße Kreise, N264A: weiße Dreiecke, K305A: weiße Quadrate, R305A: weiße Karos.

Fall von Sti1 kann die inhibitorische Aktivität von p60 auf dessen mittlere und C-terminale Regionen eingegrenzt werden: die p60 TPRIIL Domäne (Abb. 24 (A)) hemmt die Hsp82-ATPase-Funktion mit gleicher Effizienz wie das p60 Volllängenprotein. Die weitere Eingrenzung der inhibitorischen Aktivität auf eine der isolierten p60-TPR-Domänen TPRI, TPRIIA oder TPRIIB gelang nicht. TPRI und TPRIIB binden Hsp90 (Kapitel 3.1.1) und Hsp82 (nicht gezeigt) nicht mit physiologisch relevanten Affinitäten und inhibieren die Hsp82-ATPase entsprechend nicht. TPRIIA dagegen interagiert mit Hsp90 und Hsp82 ebenso stark wie das Konstrukt TPRIIL (p60-Reste: 190-481), welches die beiden Domänen TPRIIA (p60-Reste: 223-352) und TPRIIB (p60-Reste: 353-477) enthält⁵⁸ (Abb. 23 (A)). Überraschenderweise inhibiert die isolierte TPRIIA-Domäne die Hsp82-Aktivität ebenfalls nicht, obwohl die Hsp90-p60-Interaktion im wesentlichen durch TPRIIA bestimmt wird (Kapitel 3.1.1). Auch in Kombination wirken die isolierten TPRIIA- und TPRIIB-Domänen nicht inhibitorisch auf Hsp82, während nach Fusion dieser Domänen zum TPRIIL Konstrukt eine sehr effiziente inhibitorische Aktivität beobachtet wird (Abb. 23 (B) und Abb. 24 (A)).

Diese Ergebnisse ließen ein **Modell der Hsp90-ATPase-Inhibition** vermuten, nach dem TPRIIL gleichzeitig mittels einer hochaffinen Interaktion über TPRIIA sowie einer niedrigaffinen Interaktion über TPRIIB die benachbarten carboxyterminalen EEVD-Sequenzen des Hsp90-Schwanz-Schwanz-Dimers [216] binden würde. TPRIIL könnte durch diese doppelte Wechselwirkung als Spange wirken und die konformationellen Umlagerungen in Hsp90 blockieren, welche zur Zusammenlagerung dessen N-terminaler Domänen und zur darauffolgenden ATP-Hydrolyse notwendig sind [78]. Die strukturellen Voraussetzungen für eine solche Spangenfunktion von TPRIIL sind erfüllt, da die Reste der Zweifachen Carboxylatklammer sowohl in TPRIIA als auch TPRIIB konserviert sind (Kapitel 3.1.5, Abb. 19 sowie Kapitel 3.1.6, Abb. 23 (A)) und TPRIIB zumindest eine basale Affinität zu EEVD-Sequenzen aufweist (Kapitel 3.1.2). Die Röntgenstruktur des gegenüber TPRIIL geringfügig verkürzten Konstruktes TPRIIS (p60-Reste: 224-481) zeigt zudem TPRIIA und TPRIIB als unabhängige Subdomänen [254] [261]. Sie werden durch eine verlängerte α -Helix miteinander verbunden. TPRIIA besitzt als Bestandteil von TPRIIL dieselbe Struktur wie in Isolation und TPRIIB bildet als Bestandteil von TPRIIL ebenfalls das typische Faltungsmuster eines dreifachen TPR-Motivs und formt somit eine ähnliche Struktur wie TPRI und TPRIIA. Die Betrachtung der TPRIIS-Struktur läßt es als durchaus wahrscheinlich erscheinen, dass TPRIIA und TPRIIB als un-

⁵⁸Sowohl humanes Hsp90 als auch das Hefeprotein Hsp82 enthalten den minimalen TPRIIA-Liganden MEEVD (Kapitel 3.1.2 am Carboxyterminus).

abhängige Module zur Bindung verschiedener EEVD-Sequenzen dienen.

Zur Untersuchung der Beteiligung von TPRIIA und TPRIIB bei der Bindung von TPRIIL an Hsp90 sowie zur Analyse der Hsp90-ATPase-Inhibition durch TPRIIL wurden die Zweifachen Carboxylatklammern entweder der TPRIIA- oder der TPRIIB-Subdomänen im TPRIIL-Konstrukt mutiert und die TPRIIL Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Hsp90 und zur Inhibition seiner ATPase-Aktivität untersucht. Die erzeugten Klammermutanten von TPRIIL sind in Abb. 23 (A) dargestellt.

Keine der eingeführten Klammermutationen bewirkte eine offensichtliche Destabilisierung der TPRIIL-Strukturen. Alle Proteindomänen zeigten kooperatives Schmelzverhalten⁵⁹ und die mittels Differentieller Scanning Kalorimetrie (DSC) [281] [282] [284] [285] ermittelten Schmelzpunkte von TPRIIL(WT) und seiner Mutanten lagen zwischen 58.8°C und 61.3°C (Tabelle 15 und Abb. 24 (B)). Mutationen der Zweifachen Carboxylatklammer innerhalb der TPRIIA-Subdomäne von TPRIIL bewirkten den völligen Verlust der Affinität von TPRIIL Δ A zu Hsp90, bzw. Hsp82 und demzufolge zum Verlust des inhibitorischen Einflusses auf die Hsp82-ATPase-Aktivität (Tabelle 15 und Abb. 24 (A)). Dieses Ergebnis unterstreicht die dominierende Bedeutung der TPRIIA-Domäne für die Wechselwirkung von p60 mit Hsp90 (Kapitel 3.1.1) sowie die absolute Notwendigkeit der Zweifachen Carboxylatklammer für die TPR-vermittelte Bindung von EEVD-Sequenzen (Kapitel 3.1.5, Abb. 21). Im Gegensatz hierzu bewirkte der Austausch von bis zu vier Seitenketten der Zweifachen Carboxylatklammer innerhalb der TPRIIB-Subdomäne weder eine verminderten Affinität der TPRIIL Δ B Mutanten zu Hsp90 oder Hsp82 noch zu einer Beeinträchtigung ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Hsp82-ATPase (Tabelle 15 und Abb. 24 (A)). Wie auch TPRIIL(WT) inhibieren die TPRIIL Δ B Mutanten die Hsp82-ATPase in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 24 (A)).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse einen regulatorischen Einfluss der p60 TPRIIB-Domäne auf die Hsp82-ATPase-Aktivität an. Diese Wirkung der TPRIIB-Domäne ist abhängig von ihrer Verankerung an Hsp82 über die TPRIIL-Subdomäne TPRIIA. Die Bindung von EEVD-Sequenzen durch TPRIIB ist für seine regulatorische Rolle nicht notwendig.

⁵⁹Weder das Schmelzverhalten der TPRIIA noch der TPRIIL Domänen ist reversibel. Dies betrifft sowohl die Wildtypproteine als auch die Mutanten. Die Bestimmung von Schmelzenthalpien und Wärmekapazitäten war aus diesem Grund nicht durchführbar.

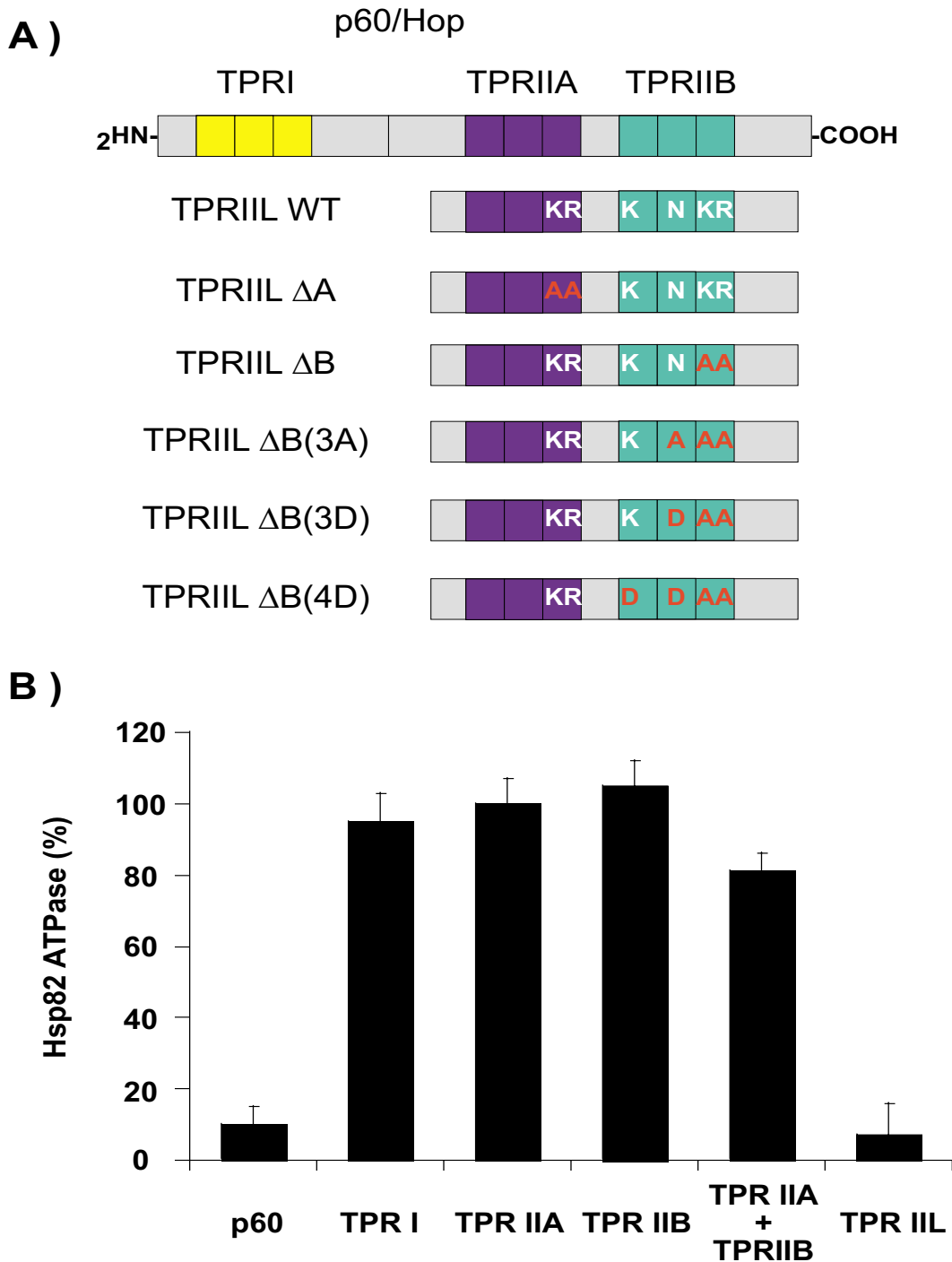


Abbildung 23: Inhibition der Hsp82 ATPase durch p60 und seine Domänen (A) Domänenarchitektur von p60 und Darstellung der TPRIL Klammermutanten. In der TPRIIA Subdomäne wurden wie angegeben die Reste K301 sowie R305 mutiert und in der TPRIIB Subdomäne die Reste K364, N339, K429 und R433. (B) Die durch Radicolol inhibierbare ATPase Aktivität von Hsp82 (10 μ M) wurde in Abwesenheit (100% Aktivität) und in Gegenwart von p60, bzw. seiner TPR Domänen (20 μ M) bestimmt (Kapitel 2.8.5).

Tabelle 15: Biophysikalische Eigenschaften von TPRIIL WT und Mutanten

Die Affinitäten von p60 TPRIIL und seinen Klammermutanten zu Hsp90 (Mensch), bzw. Hsp82 (*S. cerevisiae*) wurden wie in Kapitel 3.1.1, Tab. 12 angegeben ermittelt. Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte durch Differentielle Scannig Kalorimetrie (DSC). Die His₆-Tags der TPR-Proteine wurden in dieser Versuchsreihe nicht entfernt. Die Nomenklatur der Klammermutanten ist in Abb. 23 dargestellt. KB: Keine beobachtbare Bindung bis zu einer Konzentration von 100 μ M.

	Affinitäten		Schmelz- temperatur
	zu Hsp90 K_D	zu Hsp82 K_D	
TPRIIL WT	3 μ M	4 μ M	59.5°C
TPRIIL ΔA	KB	KB	61.3°C
TPRIIL ΔB	4 μ M	5 μ M	60.0°C
TPRIIL ΔB(3A)	5 μ M	8 μ M	58.8°C
TPRIIL ΔB(D3)	3 μ M	5 μ M	59.2°C
TPRIIL ΔB(D4)	4 μ M	6 μ M	60.8°C

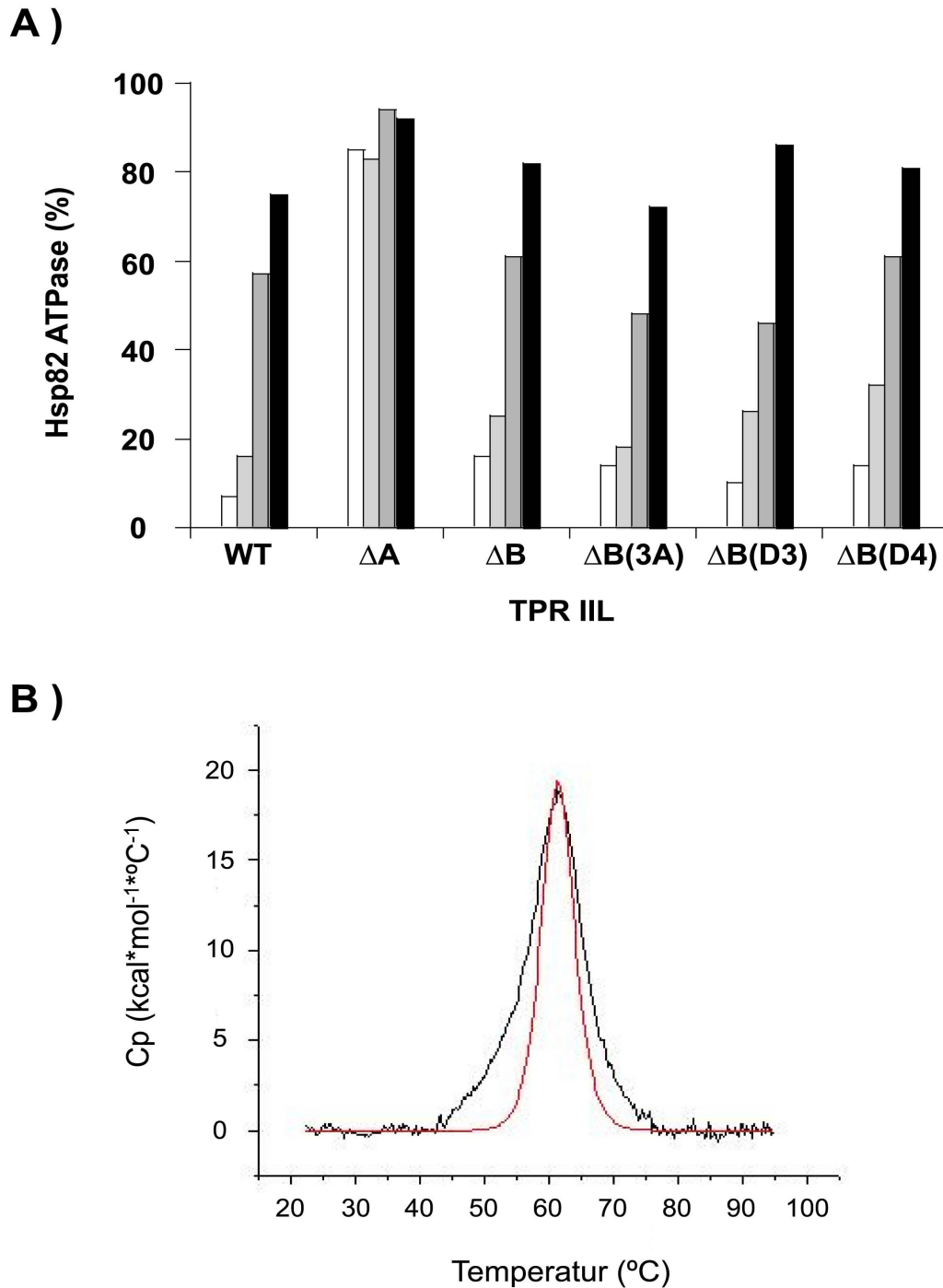


Abbildung 24: Eigenschaften der TPR IIL Klammermutanten

(A) Titration der Hsp82 ATPase Inhibition durch TPR IIL und seine Klammermutanten. Die ATPase Aktivität von Hsp82 (10 μM) wurde in Abwesenheit von TPR IIL sowie in Gegenwart variierender Konzentrationen von TPR IIL Proteinen (20 μM (weiße Balken), 10 μM (hellgraue Balken), 5 μM (dunkelgraue Balken) und 2.5 μM (schwarze Balken) bestimmt. (B) Schmelzkurve der TPR IIL ΔB (3A) Mutante und Modell eines einfachen Übergangs, ermittelt durch DSC. C_p molare Wärmekapazität.

3.2 TPR vermittelte Interaktionen weiterer Kofaktoren

Neben den TPR-Domänen von p60 wurde eine Reihe weiterer TPR-Proteine, bzw. deren isolierte TPR-Domänen auf ihre Fähigkeit zur Bindung von erweiterten EEVD-Motiven und hinsichtlich ihrer Präferenz zur Bindung von Hsp70 oder Hsp90 getestet. Unter diesen TPR Proteinen befanden sich die 'klassischen' Hsp90 Kofaktoren PP5 [203] sowie Cyp40 [45], der bekanntermaßen mit Hsp70 interagierende mitochondriale Importrezeptor TOM70 [69], die erst kürzlich als Hsp70-, bzw. Hsp90-Kofaktoren identifizierten Proteine TOM34 [237] und CHIP [150] [151] [152] [227] sowie die neu identifizierten Kofaktoren Hcp/TPR2 (entspricht 'TTC2' in Abb. 19) [234] und Unc45 [264] [305] [306].

PP5, Cyp40, CHIP sowie Unc45 enthalten jeweils ein definiertes TPR-Modul, welches drei TPR-Motive enthält, die durch eine Zweifache Carboxylatklammer ausgezeichnet sind. TOM70 besitzt lediglich eine Carboxylatklammer, es werden jedoch durch BLAST 7 TPR-Motive vorausgesagt. TOM34 und Hcp/TPR2 dagegen besitzen zwei Carboxylatklammern in verschiedenen, bislang nicht eindeutig abgegrenzten TPR-Modulen (Abb. 19 und [234] [234]).

Die Fähigkeit dieser Proteine zur Bindung von EEVD-Motiven wurde entweder *direkt* durch die Bestimmung ihrer Affinitäten zu C70-12, bzw. C90-12 Peptiden mittels ITC oder SPR Titrationsexperimenten nachgewiesen oder *indirekt* durch Konkurrenzexperimente untersucht (Abb. 16). Die Proteinphosphatase PP5 zeigte in SPR-Titrationsexperimenten die erwartete Spezifität der Bindung an Hsp90. Die PP5-Hsp90-Interaktion konnte zudem durch C90-12 wesentlich effizienter kompetitiert werden als durch das Dodecamer C70-12 oder das EEVD-Peptid allein (nicht gezeigt). Das Cyp40-Volllängenprotein interagiert in SPR-Bindungsexperimenten sehr spezifisch mit immobilisiertem Hsp90. Dementsprechend zeigt die isolierte TPR-Domäne von Cyp40 (Cyp40(TPR)) die erwartete Spezifität der Bindung von C90-12 ($K_D = 15 \mu\text{M}$) versus C70-12 ($K_D = 211 \mu\text{M}$). Das Tetramer EEVD interagiert nur sehr schwach mit Cyp40(TPR) ($K_D = 894 \mu\text{M}$). Ähnliche Ergebnisse wurden mit der TPRII-Domäne von TOM34 erhalten (Tabelle 16).

Die isolierte TPR-Domäne des Unc45-Proteins aus *C. elegans* hat nur eine schwache Affinität zu immobilisiertem *C. elegans* Hsp90 ($K_D = 50\text{-}100 \mu\text{M}$) bzw. zum MEEVD-Peptid in freier Lösung ($K_D = 54 \mu\text{M}$) (Tabelle 16). Diese niedrigaffine Interaktion konnte jedoch konzentrationsabhängig und peptidspezifisch kompetitiert werden (Abb. 25 (B)). Hierbei wirkten das Pentapeptid MEEVD sowie das den erweiterten C-Terminus des *C. elegans* Hsp90-Proteins imitierende Dodecapeptid AEEDASRMEEVD als die stärksten Inhibitoren. Auch für die Unc45-TPR-Domäne stellt somit die

MEEVD-Sequenz den minimalen Liganden dar. Die inhibitorische Wirkung des Tetrapeptids EEVD ist unter gleichen Bedingungen zu vernachlässigen. Das zu MEEVD inverse Peptid DVEEM bewirkte bis zu einer Konzentration von $1200\mu\text{M}$ ebenfalls keine erhebliche Inhibition. Die Peptide VEEVD und NYPQGPTVEEVD, welche den Carboxyterminus des Hsp70-Proteins aus *C. elegans* imitieren, sind deutlich schwächere Inhibitoren als die entsprechenden Hsp90-Peptide. Die Selektivität der Kompetitionswirkung von Hsp70-Peptiden steigt mit zunehmender Peptidlänge. Insgesamt stellt sich die TPR-Domäne (18.5kDa) des Unc45-Proteins (110kDa) als schwacher EEVD-Binder mit einer Präferenz zur Wechselwirkung mit Hsp90 dar [264]. Die Interaktion der Vollängenproteine Unc45 und Hsp90 konnte mittels SPR nicht quantifiziert werden, da der Unc45-Hsp90-Komplex unter milden, nicht-denaturierenden Regenerationsbedingungen nicht dissoziierbar war. Die beobachtete langsame und unvollständige Dissoziation des Komplexes läßt eine gegenüber der TPR-Domäneninteraktion mit Hsp90 deutlich stärkere Affinität der Vollängenproteine zueinander als möglich erscheinen.

Die Ubiquitinligase *CHIP* wechselwirkt im Gegensatz zu allen bisher besprochenen TPR-Proteinen vergleichbar stark mit Hsp70 und Hsp90, wobei eine schwache Präferenz für die Bindung an Hsp90 besteht (Tabelle 16). Da CHIP lediglich ein einziges TPR-Modul aus drei TPR-Motiven und einer einzigen Carboxylatklammer besitzt, müssen die Wechselwirkungen von CHIP sowohl mit Hsp70 als auch mit Hsp90 durch diese TPR Domäne vermittelt werden. Die mangelnde Selektivität der CHIP-TPR-Domäne beim Auslesen der ausgedehnten EEVD-Motive von Hsp70 und Hsp90 unterscheidet sie somit deutlich von den hochspezifisch bindenden TPR-Domänen von p60, PP5 und Cyp40. Daß die geringe Bindungsspezifität des Vollängenproteins CHIP tatsächlich durch unselektive Erkennung der ausgedehnten EEVD-Motive von Hsp70, bzw. Hsp90 und nicht durch zusätzliche sekundäre Kontaktstellen bedingt wird, legten Konkurrenzexperimente mit kurzen Peptiden nahe (Abb. 18). Heptamere EEVD-Peptide mit carboxyterminalen Hsp70- oder Hsp90-Sequenzen (PTIEEVD, SRMEEVD) wirkten als vergleichbar potente Konkurrenten sowohl der CHIP-Interaktion mit Hsp70 als auch der Wechselwirkung mit Hsp90 (Abb. 18). Eine ähnlich wirksame Inhibition beider Wechselwirkungen konnte durch das EEVD-Peptid nicht erreicht werden. Diese Versuche zeigen, dass auch durch CHIP dem EEVD-Motiv benachbarte Sequenzen in Hsp70, bzw. Hsp90 ausgelesen werden und die verminderte Selektivität der CHIP-TPR-Domäne nicht aus einer auf das EEVD-Motiv reduzierten Interaktion resultiert.

Ähnlich wie CHIP bindet TOM70 Hsp70 und Hsp90 mit vergleichbaren Affinitäten und weist dabei ebenfalls eine leichte Präferenz zur Bindung an

Tabelle 16: Bindungsspezifitäten weiterer TPR-Kofaktoren.

Bindungspräferenzen weiterer TPR Kofaktoren für C-terminale Sequenzen von Hsp70 und Hsp90 wurden bestimmt durch SPR Titrationsexperimente mit immobilisierten Hsp70, bzw. Hsp90 Vollängenproteinen (♠) oder immobilisierten C70-12, bzw. C90-12 Peptiden (♣), durch SPR Kompetitonsexperimente mit EEVD-Peptiden (◇) oder durch ITC Messungen mit C70-12 und C90-12 (♡), bzw. MEEVD (†). NSB = Bei einer Proteinkonzentration von 100 μM nicht abgesättigte Bindung; +: schwacher Effekt; +++: starker Effekt.

Kofaktor		K_D [μM]			
		Hsp70		Hsp90	
PP5	Volle Länge	NSB	♡	7 μM	♡
Cyp40	Volle Länge	NSB	♡	+++	♡
	TPR-Domäne	15 μM	♡	211 μM	♡
TOM34	TPRII-Domäne	4 μM	♡	>100 μM	♡
Unc45	TPR-Domäne	+	◇	+++	◇
				54 μM	†
				50-100 μM	♠
TOM70	TOM70 Δ	7 μM	♠	1 μM	♠
Hcp	Volle Länge	3 μM	♣	6 μM	♣
CHIP	Volle Länge	6 μM	♠	3 μM	♠

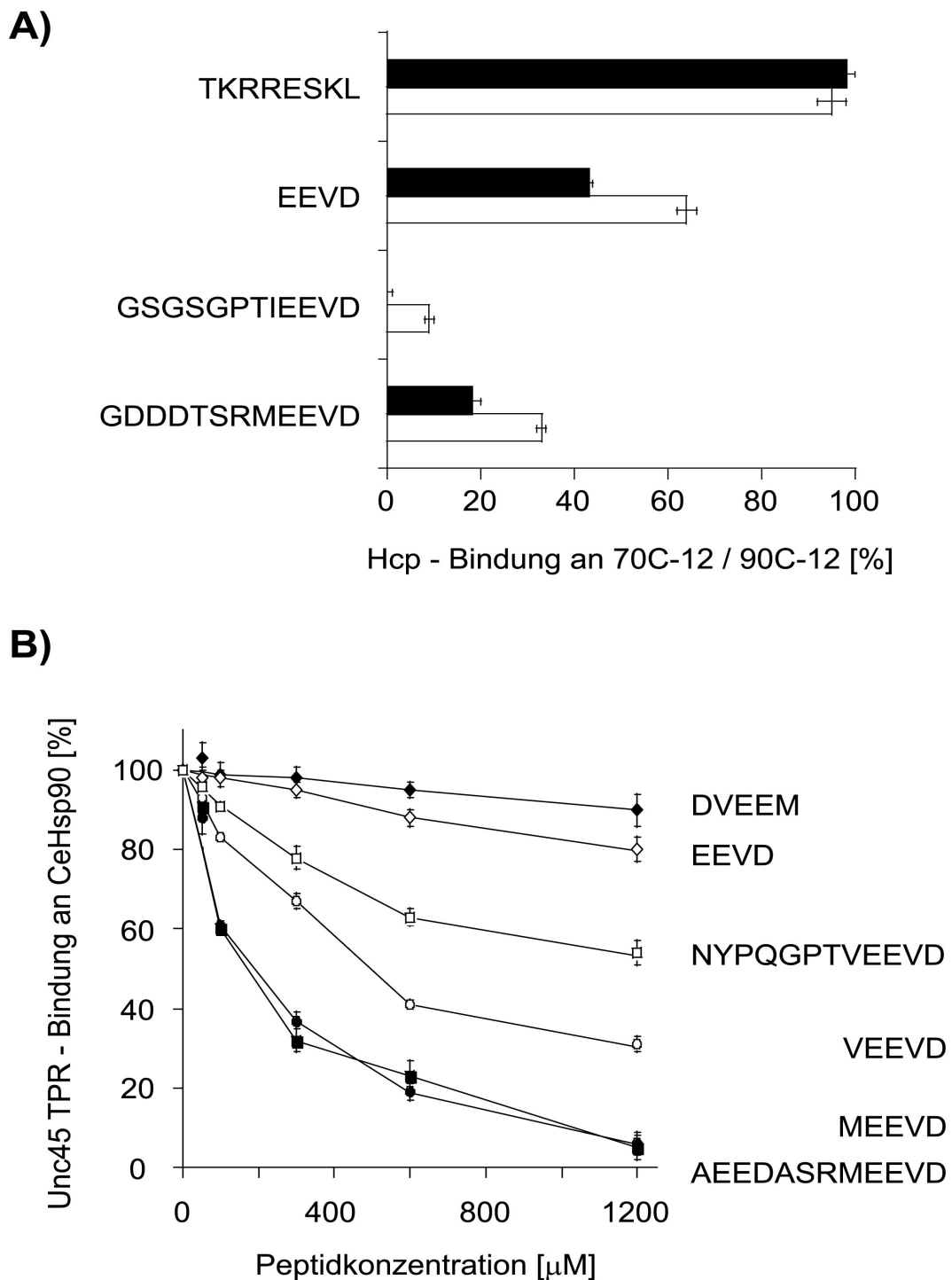


Abbildung 25: Bindungspräferenzen von Hcp/TPR2 und Unc45(TPR).
(A) Hcp ($2\mu\text{M}$) wurde in Abwesenheit und Gegenwart von EEVD-Peptiden (1mM) über C70-12 (weiße Balken) und C90-12 (schwarze Balken) geleitet. **(B)** Die Unc45 TPR-Domäne ($50\mu\text{M}$) wurde in Gegenwart und Abwesenheit von EEVD-Peptiden ($50\text{--}1200\mu\text{M}$) über Hsp90 (*C. elegans*) geleitet. Die in Gegenwart der EEVD-Peptide erhaltenen Bindungssignale wurden relativ zu den in Abwesenheit der Kompetitoren erhaltenen Signalen (100%) ausgedrückt.

Hsp90 auf.

Das erst kürzlich als Hsp70- und Hsp90-Kofaktor identifizierte *J-Domänenprotein Hcp/TPR2* (TTC2 in Abb. 19) [228] besitzt zwei Carboxylatklammern und somit zwei potentielle Bindungsstellen für Hsp70 und Hsp90 [234]. Hcp wies in SPR-Titrationsexperimenten vergleichbare Affinitäten zu C70-12- und C90-12-Peptiden auf, wobei eine leichte Präferenz zur Bindung an C70-12 festgestellt wurde (Tabelle 16). Experimente, in denen die Hcp-Bindung an immobilisierte C70-12- und C90-12-Peptide durch dieselben Peptide in Lösung kompetiert wurde, deuten an, daß entweder beide Bindungsstellen in Hcp sehr unselektiv mit EEVD-Peptiden interagieren oder überhaupt nur eine geringfügig selektive Bindungsstelle aktiv ist (Abb. 25 (A)). Sowohl C70-12 als auch C90-12 sind effektive Inhibitoren sowohl der Hcp-Interaktion mit C70-12 als auch mit C90-12. Entsprechend der geringfügig höheren Affinität von Hcp gegenüber C70-12 ist dieses Peptid in Lösung in beiden Fällen der etwas potentere Kompetitor. Die Interaktion von Hcp mit C90-12 wird durch beide Peptide stärker gehemmt als die etwas höher affine Interaktion von Hcp mit C70-12. Existierten zwei Bindungsstellen in Hcp, die sich durch deutliche Bindungsspezifitäten entweder für Hsp70 oder Hsp90 auszeichneten, wäre zu erwarten gewesen, dass das Dodekapeptid C90-12 in Lösung die Hcp-Interaktion mit immobilisiertem C90-12 stärker hemmt als das Dodekapeptid C70-12, während C70-12 seinerseits die Interaktion von Hcp mit immobilisiertem C70-12 stärker inhibieren sollte als der Kompetitor C90-12. Die erhaltenen Ergebnisse sind dagegen gut vereinbar mit der Existenz lediglich eines Typs von Bindungsstellen mit nur einer schwachen Präferenz zur Bindung von Hsp70-EEVD-Peptiden.

3.3 Die Hsp90-CDC37-Interaktion

Als Beispiel einer nicht durch TPR-Module vermittelten Proteininteraktion wurde die Hsp90-CDC37-Wechselwirkung untersucht. Das Volllängenprotein Hsp90, N- oder C-terminal verkürzte Fragmente, bzw. die N-terminale, mittlere oder C-terminale Domäne von Hsp90 (N90, M90, C90) wurden auf einen Sensorchip geladen und CDC37, bzw. die Fragmente CDC37/39-119, CDC37/147-270, CDC37/147-349 und CDC37/273-349 darübergeleitet (Kapitel 2.8.1).

Spezifische Bindungssignale wurden in genau den Experimenten gefunden, in denen das immobilisierte Hsp90-Konstrukt die N-terminale Domäne enthielt und CDC37 das Fragment CDC37/147-270 (Tabelle 17). Das um die N-terminale Domäne verkürzte Konstrukt Hsp90 Δ N sowie auch die isolierte

mittlere und C-terminale Domäne von Hsp90 interagiert weder mit CDC37 noch mit seinen Fragmenten. Hsp90 sowie auch Hsp90 Δ C und die N90 Domäne allein interagierten dagegen mit CDC37 sowie mit den Fragmenten CDC37/147-270 und CDC37/147-349, nicht jedoch mit CDC37/39-119 und CDC37/273-349⁶⁰. Die durch SPR-Titrationsexperimente bestimmte Affinität von N90 zu CDC37/147-270 ist gut vergleichbar mit der Affinität der Vollängenproteine Hsp90 und CDC37 ($K_D = 2.5 \mu\text{M}$, bzw. $K_D = 5.1 \mu\text{M}$) (Abb. 26 (A) und (B), Tab. 18). Ein ITC-Bindungsexperiment bestätigte die durch SPR-Titration erhaltene Affinität der N90-CDC37/147-270 Interaktion (Abb. 18 (C)). Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich die Wechselwirkung von CDC37 mit Hsp90 auf die Wechselwirkungen der N90-Domäne mit CDC37/147-270 reduzieren. Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage für die erfolgreiche Kristallisation und Strukturlösung des N90-CDC37/147-270-Komplexes (Kapitel 4).

Wie schon für die TPR vermittelten Proteininteraktionen mit Hsp90 beschrieben, werden sehr schnelle Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten auch für die N90-Wechselwirkung mit CDC37/147-270 (Abb. 26) sowie für die Interaktion der Vollängenproteine beobachtet. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Kontaktstellen von Hsp90 und CDC37 freiliegen und zumindest keine langsamen konformationellen Änderungen auftreten müssen, um die Proteininteraktion zu ermöglichen. Die strukturelle Konserviertheit der N90-Domäne begründet die ähnlichen Affinitäten des menschlichen CDC37 zu den Hsp90-Proteinen des Menschen, des Nematoden *C. elegans* und der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Tabelle 18). Das bakterielle Hsp90-Homologe Htpg dagegen bindet CDC37 nicht⁶¹.

Nukleotide beeinflussen die Wechselwirkungen von N90 mit CDC37/147-270, bzw. von Hsp90 mit CDC37 nur geringfügig (Tabelle 18). Die Affinitäten der Proteininteraktionen sanken in Gegenwart von ATP maximal um einen Faktor von ~ 2 . Eine stärkere Erhöhung der K_D -Werte wurde in Gegenwart von ADP beobachtet. Diese Tendenzen waren im Fall der Vollängenproteininteraktion stärker ausgeprägt als im Fall der Interaktion von Proteindomänen. Die Gegenwart von Radicol hatte weder auf die Hsp90-CDC37 noch auf die N90-CDC37/147-270-Wechselwirkung einen meßbaren Einfluss.

⁶⁰Die hier beschriebenen Interaktionen wurden im wesentlichen auch nach Immobilisation von CDC37, bzw. der CDC37/147-270-Domäne gefunden. Die Aktivitäten der CDC37 Proteine waren jedoch mit nur ca. 10% wesentlich niedriger als die Aktivitäten der immobilisierten Hsp90-Fragmente (30-50%). Zudem war eine zeitlich schnell fortschreitende Inaktivierung von CDC37 zu beobachten.

⁶¹Dieses Ergebnis ist vor dem Hintergrund der Abwesenheit von CDC37 in *E. coli* aus biologischer Perspektive nicht überraschend.

Tabelle 17: Identifizierung interagierender Hsp90 und CDC37 Domänen

Das Vollängenprotein Hsp90, die um die N- oder C-terminalen Domänen verkürzten Konstrukte Hsp90 Δ N, bzw. Hsp90 Δ C und die N-terminale, mittlere oder C-terminale Hsp90 Domäne (N90, M90, C90) wurden auf Sensorchips geladen (1500-2500 RU) und CDC37, bzw. die CDC37 Konstrukte CDC37/39-119, CDC37/147-270, CDC37/147-349 oder CDC37/273-349 wurden in einer Konzentration von 5 μ M darübergelitet. Bindungssignale >20 RU wurden als Hinweise auf spezifische Interaktionen gewertet und im folgenden mit '+' gekennzeichnet. Typischerweise ergaben die mit '+' gekennzeichneten Interaktionen unter den bezeichneten Bedingungen Signale > 50RU.

	CDC37				
	CDC37	39-119	147-270	147-349	273-349
Hsp90	+	-	+	+	-
90ΔN	-	-	-	-	-
90ΔC	+	-	+	+	-
N90	+	-	+	+	-
M90	-		-	-	
C90	-		-	-	

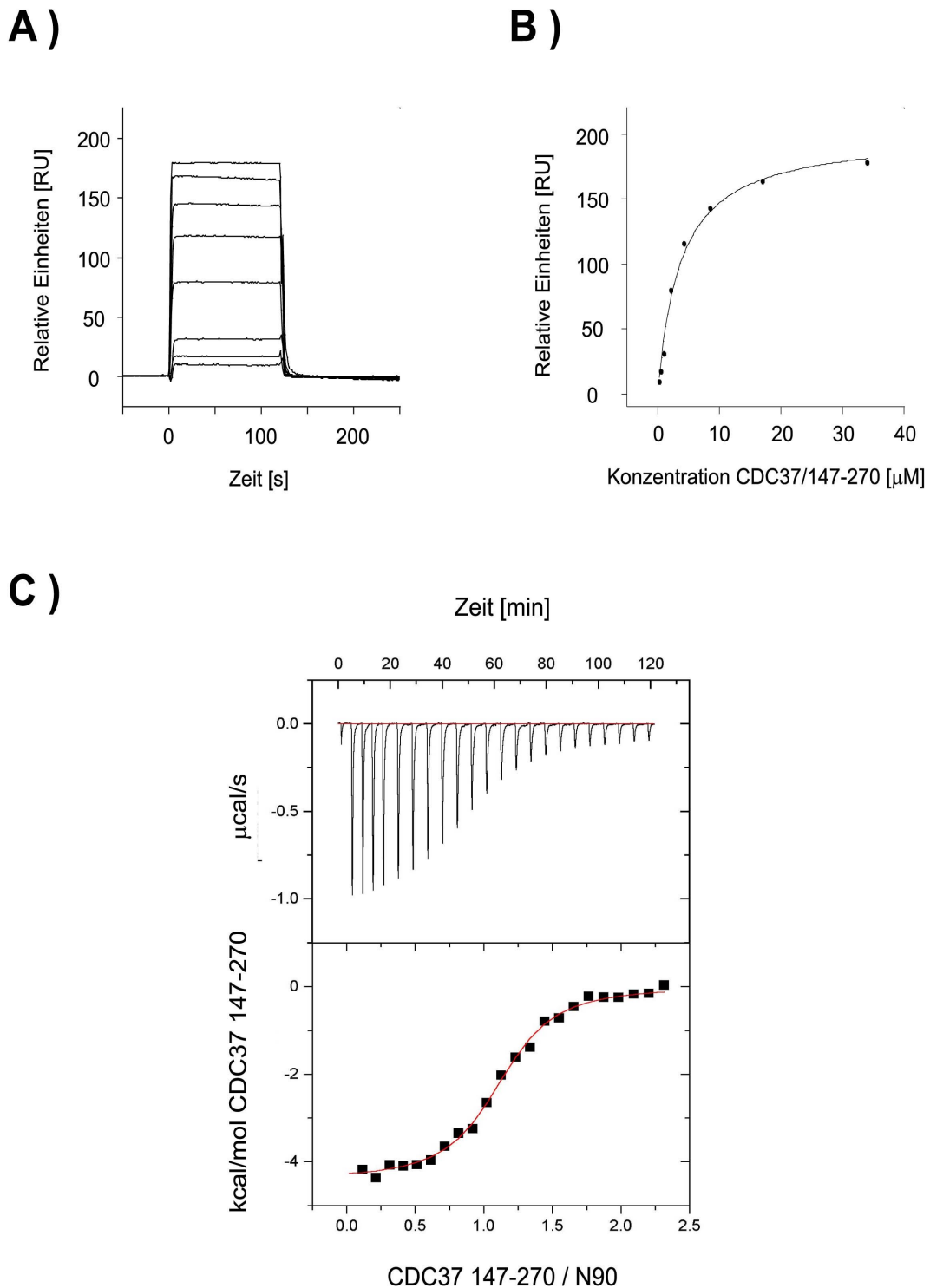


Abbildung 26: Interaktionen zwischen Hsp90 und CDC37.

(A) CDC37/147-270 wurde in steigenden Konzentrationen (270nM-35 μM) über N90 (1200 RU) geleitet. (B) Die Gleichgewichtsbindungssignale (R_{eq}) wurden gegen die CDC37 Konzentrationen aufgetragen und die thermodynamische Dissoziationskonstante ($K_D=2.5\mu\text{M}$) ermittelt. (C) Das ITC-Experiment wurde durchgeführt mit N90 (50 μM) in der Kammer und CDC37/147-270 (700 μM) in der Spritze. $K_D=2.1\mu\text{M}$, $n=1.1$.

Tabelle 18: Bindungsstärken (K_{Ds}) von Hsp90-CDC37 Wechselwirkungen

Die N-terminale Domäne von Hsp90, bzw. die Vollängen Hsp90-Proteine des Menschen, des Fadenwurms *C. elegans*, der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sowie das bakterielle *E. coli* Homologe Htpg wurden auf Sensochips geladen (1500-2500 RU) und mit CDC37, bzw. der Domäne CDC37/147-270 (200 nM-100 μ M) in Abwesenheit, bzw. in Gegenwart der Nukleotide ATP oder ADP (2 mM) oder von Radicol (10 μ M) titriert. Soweit nicht anders angegeben wurden Proteine menschlichen Ursprungs verwendet.

Immobilisiert:	N90	Hsp90	
In Lösung:	CDC37/147-270	CDC37	
Ohne Nukleotid	2.5±0.5 μ M	<i>Mensch</i> (Hsp90):	5.1±1 μ M
	ITC: 2.1 μ M	<i>C. elegans</i> (Hsp90):	3.2 μ M
		<i>S. cerevisiae</i> (Hsp82):	3.6 μ M
		<i>E. coli</i> (HtpG):	Keine Interaktion
+ATP (2 mM)	3.8 μ M ITC: 6.9 μ M	10 μ M	
+ADP (2 mM)	6.5 μ M	30 μ M	
+Radicol (10 μM)	2.6 μ M	3 μ M	

4 Diskussion

4.1 TPR vermittelte Proteininteraktionen

... in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen

Seit der Entdeckung der Aminosäuresequenzmotive vom Typ der Tetratricopeptiderepeats (TPR Motive) vor ca. 10 Jahren [243] [244] wurde ihre bedeutende Rolle bei der Vermittlung spezifischer Protein-Proteinwechselwirkungen in einer Reihe intrazellulärer Multiproteinkomplexe und in verschiedenen funktionellen Kontexten nachgewiesen. Hierzu gehören die Proteintranslokation, die Proteinfaltung und die Zellzyklusregulation [238] [239] [240]. Strukturell bilden TPR Motive in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Vorhersagen Ensembles aneinandergereihter α -Helices aus, die einen zentralen Ligandenbindungsgraben umschließen [250] (Abb. 4 in Kapitel 1.3). Dementsprechend erfolgte die Klassifizierung der TPR Strukturen in eine Gruppe α -helikaler und aus kurzen Sequenzmotiven aufgebauter Proteindomänen unterschiedlicher Topologie [251]. Neben den TPR Motiven gehören dieser Gruppe die sog. HEAT-Motive [307], die Ankyrin-Motive [308], die Armadillo-Sequenzen [309] [310] sowie die Leucin-reichen Varianten-Motive [311] an.

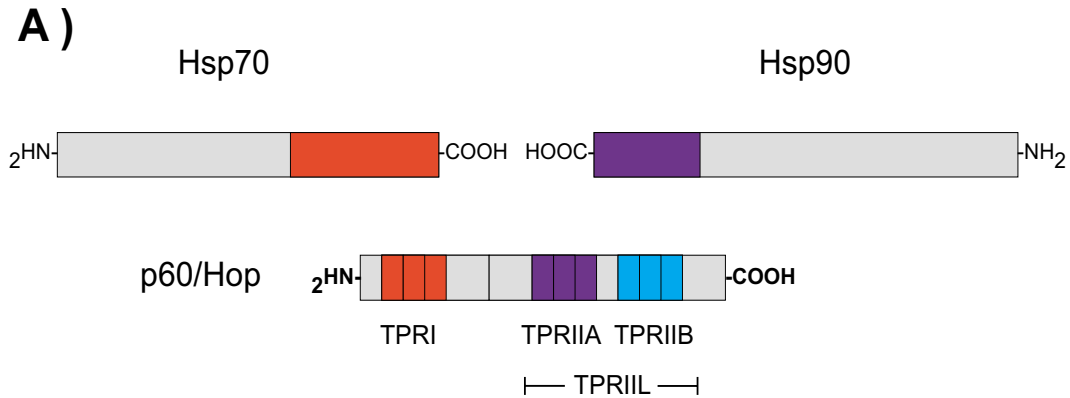
Im Gegensatz zur gut charakterisierten Struktur von TPR-Domänen blieb die Natur der TPR Liganden sowie der Mechanismus der spezifischen Ligandenerkennung lange unbekannt. Den zunächst vorherrschenden Modellen zur Folge sollten TPR Domänen entweder Sekundärstrukturelemente, wie etwa exponierte α -Helices, erkennen, mit denen sie Coiled-Coiled-Strukturen ausbilden könnten, oder alternativ dreidimensionale Proteinoberflächen abtasten [239] [251]. Erst die Beobachtung der Kristallpackung einer kurzen, C-terminalen Sequenz der p60 TPRI Domäne in den vermeintlichen Ligandenbindungsgraben des Nachbarmoleküls begründete die Arbeitshypothese, dass die TPR Kofaktoren in Hsp70/Hsp90 Multichaperonkomplexen kurze Sequenzen der Carboxytermini von Hsp70 und Hsp90 in ausgestreckter Konformation auslesen [254] (Kapitel 3.1).

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die TPR vermittelten **Proteininteraktionen im ternären Hsp70-p60-Hsp90 Komplex** analysiert (Abb. 27 (A)). Die bimolekularen Wechselwirkungen zwischen p60 und Hsp70 konnten im wesentlichen auf die Interaktionen der p60 Domäne TPRI mit der C-terminalen Heptamersequenz von Hsp70 PTIEEVD-COOH reduziert werden. Analog hierzu

stellt die Wechselwirkung zwischen der p60 Domäne TPRIIA und der C-terminalen Pentamersequenz von Hsp90 *MEEVD-COOH* das Kernstück der p60-Hsp90 Vollängenproteininteraktion dar (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Kurze 5-7mer Peptide, welche die genannten Sequenzen enthielten, konnten zur vollständigen Kompetition der Wechselwirkungen zwischen p60 und Hsp70, bzw. zwischen p60 und Hsp90 eingesetzt werden (Kapitel 3.1.2). Diese Ergebnisse demonstrierten zum ersten Mal, dass natürliche **TPR Liganden durch Peptide repräsentiert** werden können, welche zu kurz sind, um stabile Sekundär- oder Tertiärstrukturen auszubilden.

Das **EEVD-COOH Motiv** der Hsp70 und Hsp90 C-Termini dient als **generelle Ankersequenz** zur Anlagerung von Hsp70 und Hsp90 TPR-Kofaktoren. Die Sequenz EEVD-COOH ist in allen eukaryotischen Vertretern der **Hsp70 und Hsp90** Familien hochkonserviert (Abb. 14) und sie ist für diese zwei Familien molekularer Chaperone charakteristisch. Die TPR Domänen der Hsp70 und Hsp90 Kofaktoren besitzen mit der sog. **Zweifachen Carboxylatklammer** die zum EEVD-COOH Motiv ihrer Liganden komplementäre Struktur (Kapitel 3.1.5, Abb. 19 und Abb. 20 sowie Kapitel 3.1.6). Wie das EEVD Motiv ist auch die Zweifache Carboxylatklammer hochkonserviert und für TPR-Proteine aus Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen kennzeichnend. Wie eine **Steckdose** fixiert die Zweifache Carboxylatklammer der TPR-Domänen das **EEVD-'Stecker'-Motiv** ihrer Liganden in zwei Punkten. Beide Carboxylatfunktionen des Aspartatrestes im EEVD-Motiv sind in ein dichtes Netzwerk von Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäureseitenketten der Zweifachen Carboxylatklammer eingebettet, auch bestehen hydrophobe Kontakte zum angrenzenden Valin [253] [254].

Zwar ist die vollständige Integrität der Wechselwirkungen zwischen dem EEVD-Motiv und der Zweifachen Carboxylatklammer absolut notwendig für die effiziente Kofaktorbindung an Hsp70 und Hsp90 (Kapitel 3.1.2, Abb. 13, Kapitel 3.1.5 und 3.1.6), doch sind die Interaktionen allein dieser konservierten Strukturen nicht hinreichend zur Sicherstellung einer physiologisch relevanten Ligandenbindungsstärke (Kapitel 3.1.2, Abb. 10 und 12 sowie Kapitel 3.2). Insbesondere die an die EEVD-COOH Sequenz angrenzenden 1-3 hydrophoben und für Hsp70, bzw. Hsp90 spezifischen Aminosäuren vermitteln die hohe Affinität und vor allem die Selektivität TPR-vermittelter Proteininteraktionen in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen. So wirken im Hsp70-p60-Hsp90 Komplex das **Isoleucin im Hsp70 C-Terminus** (PTIEEVD-COOH) und das **Methionin im Hsp90 C-Terminus** (MEEVD-COOH) als **'primäre Spezifitätsanker'** (Abb. 27 (B), Kapitel 3.1.2, Abb. 10, 12 und Abb. 13). Das Prolin der Hsp70 Sequenz (PTIEEVD) geht weitere hydrophobe Interaktionen mit der p60 TPRI Domäne ein und stellt den **'se-**



B)

TPRI: Hph-Hph-Ile-Hph-Hph-Val-Asp-COOH

TPRIIA: Hph-Neg-Met-Glu-Neg-Val-Asp-COOH

C)

TPR-Proteine mit Zweifacher Carboxylatklammer

Bekannte Hsp70 oder Hsp90 Kofaktoren

Neue Kandidaten

p60 / Hop
FKBP52, FKBP54, Cyp40
PP5
Cns1
TOM34
TOM70
CHIP

TTC1
TTC2 / TPR2
TTC3
TTC4
IRSP
SGT
IAA0719
Unc45

Abbildung 27: TPRs in Hsp70-Hsp90-Multichaperonkomplexen. (A) Der Hsp70-p60-Hsp90-Komplex. (B) Ligandenbindungsmotive der p60 Domänen TPRI und TPRIIA. *Hyp*: hydrophobe Seitenketten. Durch TPRI und TPRIIA erkannte Seitenketten sind grün dargestellt, die spezifisch erkannten Reste in rot (TPRI) oder blau (TPRIIA). Die Größe der Buchstaben repräsentiert die relative Bedeutung der Seitenketten. (C) Die Zweifache Carboxylatklammer als Kriterium zur Voraussage neuer Interaktionspartner von Hsp70 und Hsp90.

kundären' Spezifitätsanker dar (Kapitel 3.1.2, Abb. 13).

Die **substantiellen Bindungsbeiträge hydrophober Wechselwirkungen** sowohl für die zwischen Hsp70 und Hsp90 nicht differenzierende, EEVD-vermittelte Verankerung der TPR-Liganden als auch insbesondere der stark ausgeprägte spezifitätsdeterminierende Einfluß hydrophober Interaktionen (Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.1.3) waren vor dem Hintergrund der bestehenden Modellvorstellungen unerwartet [183] [214] [215] [252]. Als treibende Kraft TPR vermittelter Proteininteraktionen in Hsp90 Multichaperonkomplexen wurden elektrostatische Wechselwirkungen angesehen. Die Notwendigkeit des EEVD-Motifs für die Bindung von TPR-Kofaktoren war zwar durch Deletionsmutagenese illustriert worden *tpri3* [312], jedoch wurde eine strukturgebende Funktion dieser Sequenz vermutet ('Minidomäne'). Zudem blieb der Mechanismus einer zwischen Hsp70 und Hsp90 diskriminierenden Ligandenerkennung ungeklärt. Durch den Einsatz einer kombinatorischen Peptidbibliothek (Ac-O/X₄-VD-COOH) wurden im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der p60 TPRI Domäne deutliche Bindungspräferenzen für hydrophobe Seitenketten in allen fünf gestesteten Positionen, insbesondere jedoch in den Positionen 1 und 3 der Heptapeptidliganden, aufgedeckt (Kapitel 3.1.3 und Kapitel 3.1.4). Tatsächlich leisten auch im natürlichen TPRI Liganden die konservierten Glutamatseitenketten des Hsp70 C-Terminus keinen Beitrag zur Bindung von TPRI. Die p60 Domäne TPRIIA hat zwar eine generell stärkere Tendenz zur Wechselwirkung mit negativ geladenen Seitenketten als TPRI, in den Positionen 1 und 3 der heptameren Peptidkolektionen Ac-O/X₄-VD-COOH bevorzugt TPRIIA jedoch ebenfalls hydrophobe Reste (Abb. 27 (B), Kapitel 3.1.3).

Die **Röntgenstrukturanalyse** der p60 Domänen TPRI und TPRIIA im Komplex mit ihren jeweiligen Peptidliganden bestätigte die Befunde der Peptidbindungsstudien (Abb. 28, [253] [254] [261]) und bewies eindeutig die ausgestreckte Konformation der gebundenen Peptidliganden. Wie zu erwarten, interagieren lediglich die C-terminalen 7-8 Aminosäuren des kokristallisierten Hsc70 Dodekapeptids Ac-GASSGPTIEEVD-COOH mit der TPRI Domäne. Die angrenzenden vier Seitenketten sind flexibel und ungeordnet und somit in der Kristallstruktur nicht sichtbar. Während die große Bedeutung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem EEVD-COOH Motiv und der Zweifachen Carboxylatklammern aus den Kristallstrukturen abgeschätzt werden konnte, waren insbesondere die wesentlichen Bindungsbeiträge hydrophober Protein-Peptidkontakte durch Strukturbetrachtungen nicht ersichtlich und bedurften der experimentellen Bestimmung. Die Strukturen der p60 TPR-Domänen sind rigide und erfahren durch Ligandenbindung keine konformationellen Änderungen [261]. Diese Ergebnisse sind gut

vereinbar mit den schnellen Bindungs- und Dissoziationskinetiken der Hsp70 und Hsp90 Komplexe mit TPRI, bzw. TPRIIA (Kapitel 3.1.1) sowie mit der sehr dynamischen Natur von Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexe [118] [133].

Da die Zweifache Carboxylatklammer kennzeichnend ist für die TPR Kofaktoren der Hsp70/Hsp90-Multichaperonmaschinerie, konnten die konservierten Seitenketten der Klammer zur Datenbankrecherche und damit zur **Identifizierung von Kandidaten** neuer Hsp70 und Hsp90 Kofaktoren herangezogen werden (Abb. 27 (C)). Die meisten dieser Kandidaten sind bisher funktionell nicht oder nur sehr unvollständig charakterisiert: TTC1 und TTC2⁶² sind bekannt als Interaktionspartner von Neurofibromin [313]; TTC3 liegt in einer chromosomalen Region, die in der Pathologie des Down-Syndroms impliziert wurde [314]; TTC4 liegt in einer bei Brustkrebs häufig deletierten chromosomalen Region [315]; IRSP⁶³ ist ein mit Unfruchtbarkeit assoziiertes Spermien Protein [316]; SGT⁶⁴ wird als Interaktionspartner des Parvovirus NS1 Proteins diskutiert [317]; KIAA0719 ist ein humanes Protein mit unbekannter Funktion und Unc45 (*C. elegans*) ist in die Myosinbiogenese involviert [305] [306].

Experimentell wurden diese Vorhersagen bislang an den Beispielen von TTC2-/TPR2/**Hcp** und **Unc45** [228] [234] [264] bestätigt. Das J-Domänenprotein Hcp wurde als ein gemeinsamer TPR Kofaktor von Hsp70 und Hsp90 klassifiziert (Kapitel 3.2, Abb. 16). Es enthält mindestens zwei TPR-Module mit Carboxylatklammerstrukturen. Die Bindungspräferenzen der einzelnen TPR Domänen von Hcp bleiben weiter zu analysieren. Seine funktionelle Bedeutung für das Zusammenspiel von Hsp70 und Hsp90 sind ebenfalls ein Gegenstand der aktiven Forschung. Die Implikation von Hcp bei der Suppression eines neurodegenerativen Phänotyps im *Drosophila melanogaster* Modell [318] machen dieses Protein zu einem auch aus medizinischer Sicht hochinteressanten Untersuchungsobjekt. Die Rolle von Hcp als Kofaktor zweier prominenter Familien molekularer Chaperone ist ein weiterer Hinweis auf deren Potential zur Modulation von Proteinaggregationsereignissen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen [98] [99]. Das *C. elegans* Protein **Unc45 wurde als spezifischer Hsp90 Kofaktor klassifiziert** (Kapitel 3.2, Abb. 16). Es enthält TPR Domäne mit drei TPR Motiven, welche die Bindungspräferenz für Hsp90 vermittelt. Genetische Studien sprechen für eine Beteiligung von Unc45 bei der Myosinbiogenese [305] [306]. Kürzlich konnte die direkte Assoziation von Unc45 mit Myosin *in vitro* nachgewiesen

⁶²TTC; *engl.*: Tetratricopeptide Repeat Containing Protein;

⁶³IRSP; *engl.*: Infertility Related Sperm Protein;

⁶⁴SGT; *engl.*: Small Glutamine-rich Tetratricopeptide;

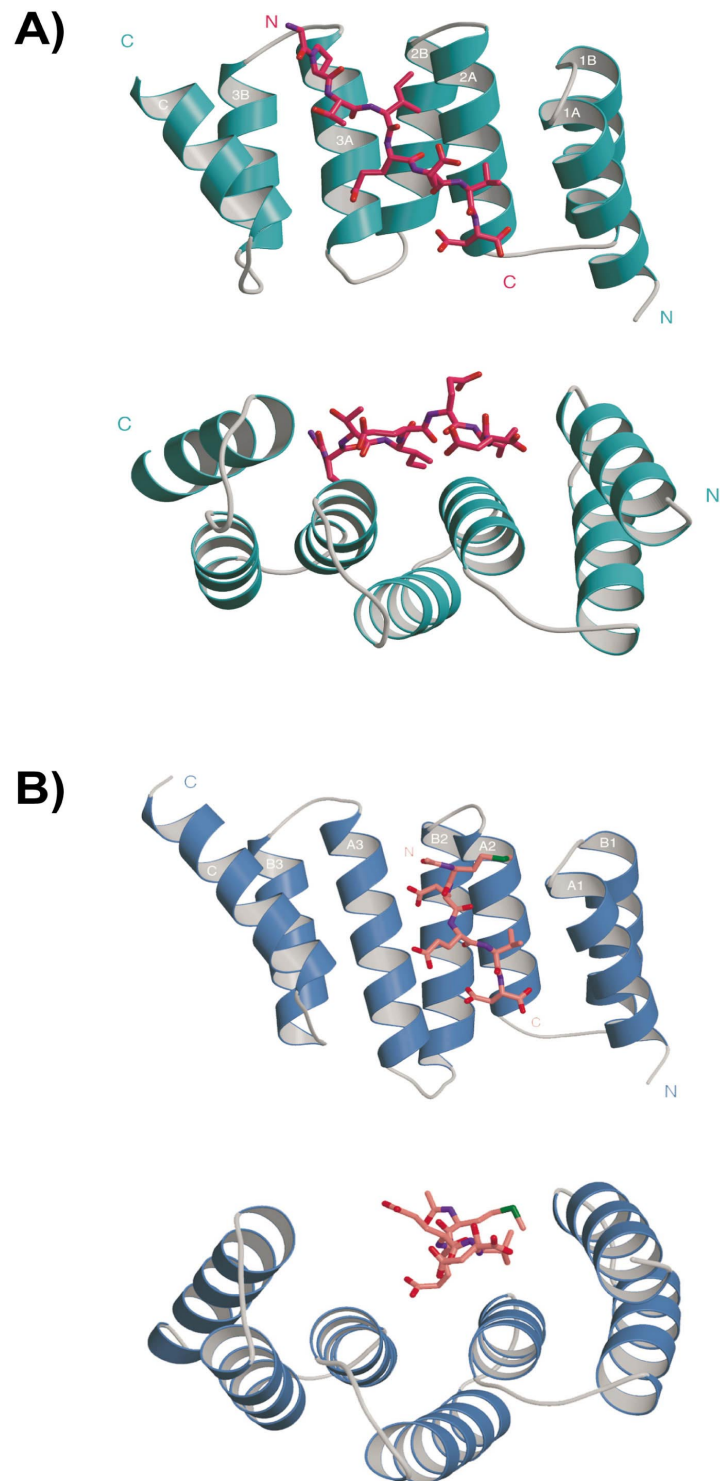


Abbildung 28: Strukturen der TPR-Peptidkomplexe.

(A) Struktur von TPRI im Komplex mit dem Hsc70 Dodekapeptid Ac-GASSGPTIEEVD-COOH und (B) Struktur von TPRIIA im Komplex mit dem Hsp90 Pentapeptid Ac-MEEVD-COOH. Die TPR Strukturen sind als Ribbondiagramme dargestellt. Die N- und C-Termini der Proteine und Peptide sind gekennzeichnet. [253] [254]

werden und eine ATP unabhängige, generelle Chaperonaktivität von Unc45 wurde festgestellt [264]. Diese Ergebnisse lassen eine mit CDC37 vergleichbare Funktion von Unc45 als substratspezifischer Rekrutierungsfaktor von Hsp90 vermuten. Während CDC37 Hsp90 im Rahmen der Reifung von Proteinkinasen rekrutiert (Kapitel 1.2.4), könnte Unc45 diese Funktion bei der Biogenese von Myosin erfüllen. Eine Beteiligung von Hsp90 bei der Reifung und Assemblierung eines so häufigen Proteins wie Myosin würde zudem auch den Bedarf für die sehr hohen zellulären Hsp90 Konzentrationen unter normalen Wachstumsbedingungen erklären (Kapitel 1.2.1).

Trotz der zutreffenden Voraussage von zwei neuen Hsp70, bzw. Hsp90 Kofaktoren sei betont, dass die Identifizierung einer Zweifachen Carboxylatklammer durch strukturelle Sequenzanalysen allein **keine physiologisch relevante Affinität** der neu identifizierten TPR Proteine zu den Carboxytermini von Hsp70 oder Hsp90 **garantiert**. Die Seitenketten der Zweifachen Carboxylatklammer wechselwirken nur mit den letzten beiden Aminosäuren des EEVD-Motivs. Das Tetrapeptid EEVD besitzt aber lediglich eine sehr basale Affinität zu allen bislang getesteten TPR Strukturen von p60, Cyp40 und hTOM34 (Kapitel 3.1.2 und 3.2). Weitere Proteininteraktionen müssen die Wechselwirkungen der Zweifachen Carboxylatklammer ergänzen, um eine physiologisch relevante Ligandenbindung zu erreichen. Die p60 TPRIIB Domäne kann als Beispiel einer klassischen TPR Domäne mit Zweifacher Carboxylatklammer aber ohne offensichtlichen Interaktionspartner genannt werden (Kapitel 3.1.2 und 3.1.5 Abb. 19, [261]). TPRIIB bindet das EEVD-Tetrapeptid mit sehr schwacher Affinität, assoziiert jedoch nicht meßbar mit den Vollängenproteinen Hsp70 oder Hsp90 (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Das Beispiel der Ubiquitinligase CHIP⁶⁵ zeigt zudem, dass die Bindungsspezifitäten von TPR Kofaktoren auch im Fall der Beobachtung physiologisch relevanter Interaktionen mit entweder Hsp70 oder Hsp90 weiter experimentell überprüft werden müssen, da eine einzige TPR Domäne die Carboxytermini von Hsp70 und Hsp90 durchaus unselektiv mit vergleichbarer Stärke zu binden vermag (Kapitel 3.2, [151] [152] [227]). Abschließend sei auf Hip als einen weiteren TPR Kofaktor in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen hingewiesen, der keine Carboxylatklammer enthält und mit der ATPase-Domäne von Hsc70 assoziiert [109] [256] [257].

Kurz vor der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurde die **Struktur des Cyp40 Vollängenproteins** in Abwesenheit von Liganden publiziert [319]. Cyp40, ein Vertreter der Familie grosser Immunophiline, trat in einer monoklinen und einer tetragonalen Kristallform auf. Die Struktur der Immunophilindomäne des Zweidomänenproteins Cyp40 entsprach erwartungsgemäss

⁶⁵ engl.: Carboxyterminus *Hsc70 Interacting Protein*

in beiden Kristallformen der Struktur der 'kleinen Immunophilinen' [320]. Die Cyp40-TPR-Domäne ähnelt in der monoklinen Kristallform den Strukturen der p60-TPR-Domänen [253] [254], bzw. der PP5-TPR-Domäne [250]. In der tetragonalen Kristallform des Cyp40 Volllängenproteins dagegen erscheint die Cyp40-TPR-Domäne in einer 'aufgeklappten', partiell 'entfalteten' Konformation. Die beiden α -Helices des ersten TPR-Motivs besitzen anstelle der antiparallelen Anordnung eine ausgestreckte Konformation und bilden eine einzige ausgestreckte Helix aus. Die ausgestreckten Helices zweier Cyp40 Moleküle gehen im Proteinkristall *intermolekulare* Kontakte ein, wie sie ansonsten als *intramolekulare* Wechselwirkungen in TPR-Strukturen auftreten und wie sie ursprünglich durch das '*knob-and-hole*'-Modell als ein möglicher Mechanismus für Proteininteraktionen zwischen zwei TPR-Proteinen vorgeschlagen wurden [238] [239]. Die Autoren der Cyp40-Struktur interpretieren die ausgestreckte Konformation der TPR-Domäne in der tetragonalen Kristallform als Proteinfaltungsintermediat [319].

TPRs in anderen zellulären Kontexten

Seit der Veröffentlichung des Mechanismus TPR vermittelter Proteininteraktionen in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen [253] wurden TPR-Domänen-Ligandeninteraktionen in zwei weiteren funktionellen Kontexten, dem peroxisomalen Proteinimport [245] [246] und im Multienzymkomplex der NADPH Oxidase [249] [321], aufgeklärt. Die TPR Domäne des humanen Rezeptors peroxisomaler Importsignale vom Typ PTS1 **hPEX5** enthält zwei Cluster mit jeweils drei TPR Motiven, die durch eine Scharnierstruktur miteinander verknüpft sind und die in dieser Anordnung der p60 TPRIIL Domäne ähneln ([246], Abb. 27 (A)). Während in der Struktur der p60 TPRIIL Domäne die zwei Subdomänen TPRIIA und TPRIIB unabhängige Bindestellen für zwei EEVD-Peptide bereitstellen [261] [254], formen die zwei TPR Cluster der Domäne von hPEX5 eine gemeinsame Bindestelle für ihren Liganden. Dieser wird von den zwei Subdomänen TPR1-3 und TPR5-7 beidseitig umringt und vollständig umschlossen. Die Struktur der hPEX5 TPR1-3 und TPR5-7 Cluster ist vergleichbar mit der Struktur der p60 TPRI und TPRIIA Domänen (Abb. 28). Gemeinsam formen die TPR1-3 und TPR5-7 Subdomänen von hPEX5 jedoch einen Ligandenbindungstunnel im Gegensatz zu den einseitig geöffneten Ligandenbindungsgräben von TPRI und TPRIIA. Analog zu der Situation in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen liest hPEX5 die C-terminalen Zielsteuerungssequenzen für Peroxisomen (SKL-COOH Motive) in ausgestreckter Konformation aus.

Eine anders geartete Interaktion geht die ebenfalls drei Motive enthaltende

TPR Domäne der NADPH Oxidase Untereinheit $p67^{phox}$ mit dem kleinen G-Protein Rac(GTP) ein [249]. Während die Struktur der $p67^{phox}$ TPR-Domäne wiederum der Struktur der p60 TPR Domänen gleicht [322] (Abb. 28), ist ihr Ligandenbindungsgraben bei der Bindung von Rac(GTP) nicht direkt beteiligt. Hier erfolgt die **Wechselwirkung über eine β -Haarnadelstruktur** als Insertion zwischen zwei TPR-Sequenzen der $p67^{phox}$ Domäne. Diese Haarnadelschleife formt eine β -Faltblatt-Interaktion mit einer Schleifenstruktur in Rac(GTP) aus. Sequenzinsertionen dieser Art werden auch in den Primärstrukturen von TPR-Domänen der Hsp70/Hsp90-Multichaperonmaschinerie beobachtet. Insbesondere die Immunophiline weisen ausgeprägte Sequenzeinschübe zwischen dem ersten und zweiten TPR Motiv ihrer drei Motive enthaltenden TPR Domänen auf (Kapitel 3.1.5, Abb. 19). Durch limitierte Proteolyse der Cyp40 TPR Domäne und massenspektrometrische Identifizierung ihrer Verdauungsprodukte wurde festgestellt, dass diese Sequenzeinschübe ebenfalls flexible und für Proteasen zugängliche Schleifenstrukturen ausbilden (Achim Brinker, Daten nicht gezeigt). Insertionen dieser Art stellen somit möglicherweise ganz allgemein alternative oder sogar zusätzliche Oberflächen für spezifische, TPR vermittelte Proteininteraktionen zur Verfügung. Für die TPR Domänen der großen Immunophiline scheinen daher Möglichkeiten zur Interaktion nicht nur mit dem Hsp90 EEVD-Motiv, sondern zudem zur Interaktion mit weiteren Bindungspartnern nach Art der $p67^{phox}$ -Rac(GTP)-Wechselwirkung zu bestehen. Analog zur Situation der ligandenfrei kristallisierten p60 TPRI Domäne ist auch der putative Ligandenbindungsgraben der $p67^{phox}$ TPR Domäne im Komplex mit Rac(GTP) nicht leer, sondern der C-terminale Schwanz des TPR-Konstruktes bindet in den Graben *desselben* Moleküls zurück und nimmt hier eine ausgestreckte Konformation ein. Dies deutet im Umkehrschluß zu dem Fall der großen Immunophiline in Hsp90 Komplexen auf die mögliche Existenz weiterer Interaktionen der $p67^{phox}$ TPR Domäne im NADPH Oxidase Multienzymkomplex nach Art der TPR vermittelten EEVD-Ligandenbindung hin. Der generelle Importrezeptor mitochondrialer Proteine **Tom20** enthält ein einziges TPR Sequenzmotiv (Aminosäuren: 69-103), welches ebenfalls ein Paar antiparalleler α -Helices ausbildet [323]. Die Struktur des isolierten TPR Motivs kann zwanglos mit der des ersten Motivs der p60 TPRI Domäne überlagert werden [254]. Das Tom20 TPR Motiv ist wesentlich an der Bindung von Signalsequenzen mitochondrialer Importsubstrate beteiligt [323]. Gemeinsam mit zwei weiteren, direkt an das TPR Motiv angrenzenden α -Helices des Rezeptors bindet Tom20 die amphiphilen, ebenfalls α -helikalen Signalsequenzen über hydrophobe Wechselwirkungen. Dieses Beispiel illustriert sehr deutlich, dass auch isolierte TPR Motive produktiv zu Proteininteraktionen beitragen können. Die Wechselwirkung zwischen dem Tom20

TPR Motiv und der α -helikalen Importsequenz für Mitochondrien repräsentiert den Typus molekularer Erkennung, wie er bis vor kurzem als genereller Mechanismus TPR vermittelter Proteininteraktionen angenommen wurde.

Zusammenfassend stellen sich TPR Motive als eine sehr vielseitige Klasse von Proteininteraktionsmodulen dar. Das durch die nur locker konservierten 34er Sequenzen ausgebildete Paar antiparalleler α -Helices kann als weitgehend unabhängige Faltungseinheit [323] mit sich selbst oder mit Strukturen angrenzender Proteinregionen kombiniert und durch Sequenzeinschübe in TPR Clustern ergänzt werden. Hierdurch entstehen variable Kontaktflächen zur Wechselwirkung mit kurzen, ausgestreckten Proteinstrukturen über Ligandenbindungsgräben [253] und -tunnel [246] oder zur Wechselwirkung mit β -Faltblattstrukturen [249] und α -Helices [322]

Weitere peptidbindende Proteininteraktionsdomänen

Die **PDZ-Domänen** repräsentieren eine weitere Klasse peptidbindender Proteininteraktionsdomänen [324]. PDZ Domänen bestehen aus $\alpha\beta$ -Sandwich-Strukturen und sind den PTB-(Phosphotyrosin-Bindung) und PH-(Pleckstrin-Homologie) Domänen verwandt [325]. Sie besitzen jedoch keinerlei Sequenzähnlichkeiten oder Ähnlichkeiten der Struktur mit den TPR Domänen. Wie diese erkennen PDZ-Domänen kurze C-terminale Sequenzen ihrer Liganden mit dem Konsensus X-Thr/Ser-X-Val-COOH. Der Bindungsmodus der Peptidliganden von PDZ-Domänen unterscheidet sich wesentlich vom Bindungsmodus der EEVD-Peptide an TPR Domänen. Die PDZ-Peptidliganden lagern sich an die Proteindomänen an, indem sie eine vorgebildete β -Faltblattstruktur um einen weiteren Strang erweitern.

Eine entfernte Strukturähnlichkeit besteht dagegen zwischen TPR-Domänen und **14-3-3 Domänen** [250] [253] [326]. 14-3-3 Domänen bilden Homodimere, die jeweils aus neun α -Helices bestehen. Die Überlagerung ligandenbeladener TPR und 14-3-3 Strukturen deutet auf eine ähnliche räumliche Anordnung der Carboxylatklammerreste, bzw. der entsprechenden kritischen Seitenketten der 14-3-3-Peptidinteraktion hin [253].

4.2 Kooperation von Hsp90 mit CDC37

Die Wechselwirkung von Hsp90 mit seinem Kofaktor CDC37 wird nicht durch TPR Domänen vermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Vollängenproteininteraktion auf die Wechselwirkung der N-terminalen Domäne von Hsp90 mit der mittleren Domäne von CDC37 (CDC37/147-270)

reduziert werden (Kapitel 3.3). Diese Studien stellten die Grundlage für die erfolgreiche Kristallisation und Strukturlösung des N90-CDC37/147-270 Komplexes dar (Abb. 4.2, [327]). Das CDC37 Fragment packt auf die Klapfenstruktur der N90 Domäne, welche die ATP-Bindungstasche im Anschluß an die Nukleotidbindung schließt, und stabilisiert die geöffnete Konformation der N90 Klappe (Kapitel 1.2.2 Abb. 3). Substantielle konformationelle Änderungen der Komplexstruktur wurden in Gegenwart von Nukleotiden nicht beobachtet. Diese Beobachtung befindet sich in guter Übereinstimmung mit der weitgehenden Insensitivität der Komplexstabilität gegenüber Nukleotiden und Radicol (3.3 Tabelle 18). Auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 wirken sowohl das CDC37 Vollängenprotein als auch das CDC37-147-270 Fragment inhibierend (Jason Young, persönliche Mitteilung und [327]), obwohl die Zugänglichkeit der ATP Bindungsstelle in N90 zumindest durch das Fragment CDC37/147-270 sterisch nicht behindert wird.

Dem **'molekularen Klammermodell'** zum Wirkmechanismus von Hsp90 zufolge kontaktieren sich die N90 Domänen des Hsp90 Dimers im Laufe des ATPase Zyklus nach Bindung von ATP (Kapitel 1.2.2 Abb. 3 and [78] [190]). Diese Zusammenlagerung der N-terminalen Domänen würde dann die Hydrolyse des gebundenen ATP auslösen. Nach Betrachtung des N90-CDC37/147-270 Komplexes erscheint es als möglich, daß CDC37 durch die Bindung der N90-Domänen deren Dimerisierung unterbindet und auf diesem Wege die ATP-Hydrolyse inhibiert.

Ein weiteres Beispiel für die negative Regulation der Hsp90 ATPase-Aktivität ist die Hemmung dieser Aktivität durch das Adapterprotein p60/Hop/Sti1 [190]. Laurence Pearl und Mitarbeiter konnten die Hemmwirkung von p60/Hop/Sti1 auf eine der TPRIIL Domäne entsprechende Region eingrenzen [190]. Diesen Studien zur Folge induziert die Bindungen von p60/Hop/Sti1 an die C-terminalen Domänen von Hsp90 bedeutende konformationelle Umlagerungen in dem Chaperon. Gebundenes Nukleotid wird verdrängt und ein nukleotidfreier Zustand induziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der p60 TPRIIB Domäne für diesen Effekt von essentieller Bedeutung ist, obwohl die Bindung von TPRIIL an Hsp90 durch die Interaktion der TPRIIA Subdomäne mit dem carboxyterminalen EEVD-Motif eines Hsp90 Monomers dominiert wird (Kapitel 3.1.1 und 3.1.6). Die Zweifache Carboxylatklammer der TPRIIB-Domäne ist für diesen Effekt unbedeutend (Kapitel 3.1.6).

Die **Mechanismen der Hsp90 ATPase Inhibition** durch CDC37, bzw. p60/Hop/Sti1 sind offensichtlich verschieden, da die beiden Kofaktoren an unterschiedlichen Regionen von Hsp90 angreifen. Die Hemmwirkungen haben zudem möglicherweise eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung. p60-

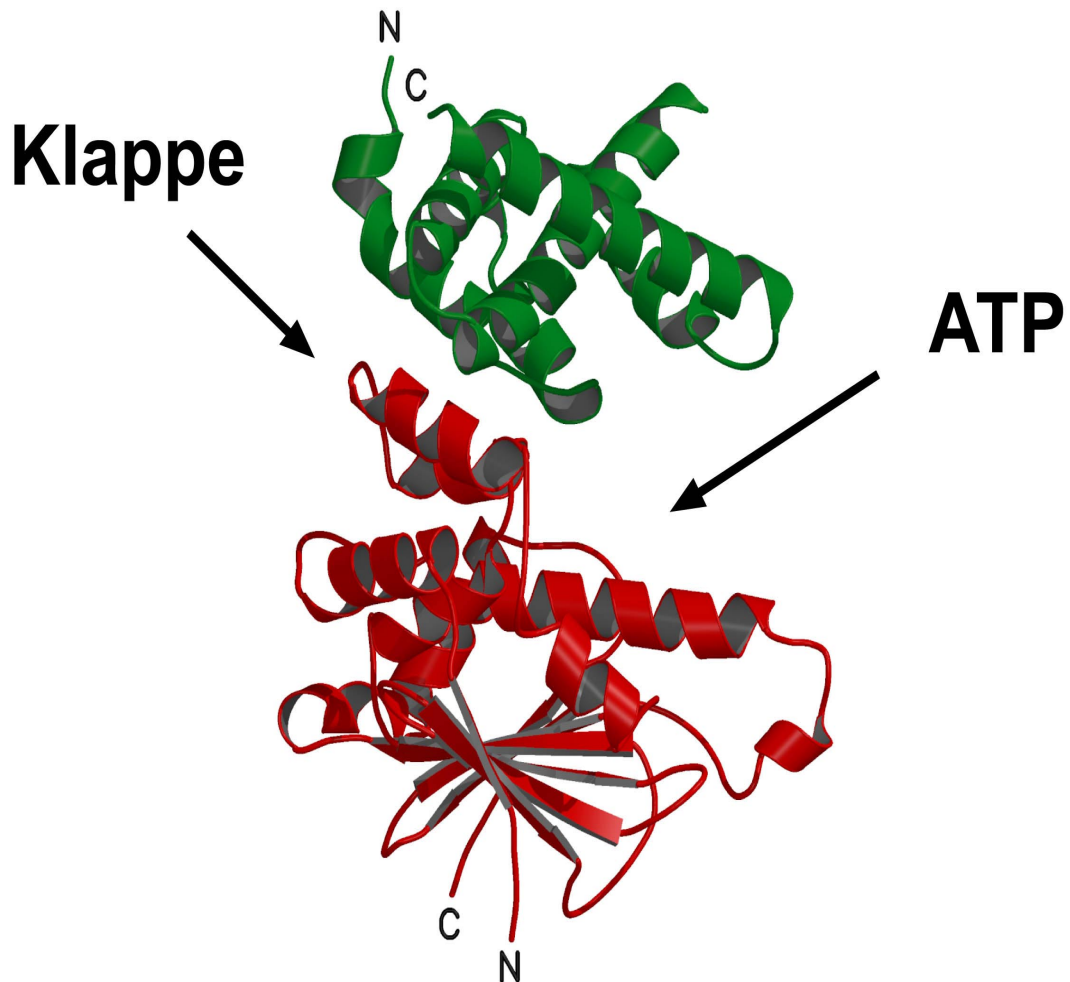


Abbildung 29: Struktur des Komplexes aus N90 und CDC37/147-270. Die N-terminale Domäne von Hsp90 ist in rot dargestellt und die CDC37-147-270 Domäne in grün. Gut zu erkennen ist die Packung der CDC37-Domäne auf den flexiblen Deckel von N90. Die ATP-Bindungsstelle von N90 wird durch das CDC37 Fragment nicht sterisch blockiert. [327]

/Hop/Sti1 induziert einen nukleotidfreien Zustand, der nach dem gegenwärtigen Modell des Hsp90 Reaktionszyklus die Beladung von Hsp90 mit Substrat ermöglicht [78] [198] [201]. p60/Hop/Sti1 würde nach dieser Vorstellung durch die Rekrutierung von Hsp70-Substratkomplexen in den intermediären Hsp70-p60-Hsp90 Komplex und durch die Bereitstellung einer für die Substratbindung empfänglichen Konformation in Hsp90 in doppeltem Sinne als Hsp90-Substratladungsfaktor wirken. Die Bindung des Kinasen-spezifischen Kofaktors CDC37 an Hsp90 ist dagegen voraussichtlich mit der Bindung von ATP an Hsp90 vereinbar. CDC37 ist im Gegensatz zu p60/Hop/Sti1 ein Bestandteil reifer Hsp90-Komplexe. Da die ATP-Hydrolyse durch Hsp90 die Substratfreisetzung aus diesen reifen Komplexen bewirkt [201], hat die inhibitorische Wirkung von CDC37 möglicherweise eine Qualitätskontrollfunktion und bewirkt die Erhaltung des reifen Hsp90-Substratkomplexes bis zur vollständigen Faltung der Kinasen, bzw. bis zu ihrer Aktivierung und Stabilisierung durch Phosphorylierung im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen [80].

4.3 Biologische Implikationen und Ausblick

Der molekulare Wirkmechanismus von Hsp90 bei der assistierten Reifung und Aktivierung zellulärer Signalmoleküle ist weitgehend unverstanden. Insbesondere die Funktionen und die Beiträge vieler Hsp90 Kofaktoren sind unklar. Die Mechanismen der regulierten Assemblierung von Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen und der Kooperation zwischen Hsp70 und Hsp90 sind nur unzureichend charakterisiert. **Spezifische Inhibitoren** definierter Proteininteraktionen würden es ermöglichen, zielgesteuert nur einzelne Wechselwirkungen in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen zu unterbinden. Der Beitrag des herausgelösten Kofaktors zum beobachteten Gesamtprozeß könnte auf diesem Wege *in vitro* und idealerweise auch *in vivo* untersucht werden. Nach spezifischer Kompetition, z. B. der Interaktion von Hsp90 mit der Ubiquitinligase CHIP [150] [151] [152] könnte die Beteiligung von Hsp90 bei der Qualitätskontrolle von Proteinkonformationen untersucht werden, ohne die Aktivierbarkeit von Signalmolekülen, wie z. B. p53, zu tangieren. Andererseits könnte durch die gezielte Disruption der Hsp90-CDC37 Wechselwirkung [174] [260] die Aktivierung zellulärer Proteinkinasen selektiv unterbunden werden, ohne z. B. die Reifung von Steroidhormonrezeptoren zu stören.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durch die Aufklärung wesentlicher Prinzipien TPR-vermittelter Proteininteraktionen in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen sowie durch die Identifizierung interagierender Kernstrukturen in Hsp90-CDC37-Komplexen wichtige Voraussetzungen für die

Entwicklung solcher Inhibitoren geschaffen. Niedermolekulare Verbindungen (z. B. Ac-MEEVD-COOH: 663 Da) sind in der Lage, die Wechselwirkungen von Hsp90 mit den Kofaktoren p60, CHIP und PP5 (Kapitel 3.1.2 Abb. 9, bzw. Kapitel 3.1.4 Abb. 18) effizient und vollständig zu inhibieren. Einzelne p60 TPR-Domänen lesen das konservierte EEVD-Motiv in Hsp70 und Hsp90 zudem differentiell aus und interagieren selektiv mit den angrenzenden hydrophoben Sequenzen (Kapitel 3.1.2 Abb. 13 und Kapitel 3.1.3 Tabelle 13). Es sollte daher prinzipiell möglich sein, spezifische Inhibitoren definierter TPR vermittelter Wechselwirkungen zu entwickeln. Ein Testsystem zum Durchforsten von Verbindungsbibliotheken mit mittlerem Durchsatz (ca. 100 Verbindungen/Tag) wurde etabliert. Einem rationalen, strukturbasierten Ansatz folgend, könnten auf der Grundlage bestehender und in Zukunft zu lösender Proteinstrukturen zunächst umfangreiche Substanzdatenbanken *in silico* durchforstet und durch Kompetitionsexperimente hunderte vielversprechende Leitstrukturkandidaten in kurzer Zeit validiert werden. Auch an die rein experimentelle Durchforstung komplexer nichtpeptidischer Substanzkollektionen mit mehreren tausend definierten Verbindungen ist zu denken. Auf diesem Wege sollten potente Werkzeuge zur weiteren Analyse des Wirkmechanismus von Hsp90 *in vitro* sowie *in vivo* aufgefunden werden.

In Zukunft könnten niedermolekulare Substanzen, welche die spezifische Chaperonaktivität von Hsp90 durch Modulation von Kofaktorwechselwirkungen zu beeinflussen vermögen, selektivere und daher vielversprechendere pharmazeutische Wirkstoffkandidaten darstellen als die gegenwärtig als Antikrebswirkstoffe diskutierten Ansamycinantibiotika [141] [142] [144]. Letztere blockieren Hsp90 durch Inhibition seiner ATPase Aktivität völlig unspezifisch bezüglich aller zellulärer Funktionen [79].

5 Zusammenfassung

Proteindomänen mit sog. *Tetratricopeptiderepeat* (TPR) Motiven vermitteln Protein-Proteinwechselwirkungen in einer Reihe zellulärer Kontexte. In Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen sind TPR Domänen kritische Elemente der Komplexassemblierung und fördern das Zusammenspiel der Hsp70 und Hsp90 Chaperone bei der Faltung und Aktivierung zahlreicher Signaleproteine und Zellzyklusregulatoren. Während TPR Domänen strukturell gut charakterisiert sind, blieben die Natur ihrer Liganden und die Mechanismen TPR vermittelter Proteininteraktionen lange unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die zentralen TPR-Liganden in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen zu identifizieren und die wesentlichen Determinanten der Affinität und der Spezifität TPR vermittelter Proteininteraktionen herauszuarbeiten.

Zunächst wurden biophysikalische Methoden zur Quantifizierung bimolekularer Proteininteraktionen im ternären Hsp70-p60-Hsp90 Komplex etabliert. Das Adapterprotein p60/Hop verbrückt Hsp70 und Hsp90 mittels seiner TPR Domänen und optimiert so den Substrattransfer zwischen den molekularen Chaperonen. Die Interaktionen des p60 Vollängenproteins mit Hsp70, bzw. Hsp90 konnten im wesentlichen auf die Wechselwirkungen der p60 TPRI Domäne mit der C-terminalen Hsp70-Sequenz *PTIEEVD-COOH*, bzw. die Wechselwirkung der p60 TPRIIA Domäne mit der Hsp90-Sequenz *MEEVD-COOH* reduziert werden. Peptide, die zu kurz sind, um stabile Sekundär- oder Tertiärstrukturen ausbilden zu können, sind effiziente Mimetika natürlicher TPR Liganden. Das in den Hsp70 und Hsp90 Familien hochkonservierte **EEVD-COOH-Motiv** stellt die generelle Ankersequenz zur Anlagerung von TPR Kofaktoren an **Hsp70 und Hsp90** dar. Die TPR Domänen dieser Faktoren enthalten mit der sog. **Zweifachen Carboxylatklammer** eine ebenfalls hochkonservierte Struktur zur Verankerung des EEVD-Motivs. Mutagenesestudien belegten die essentielle Funktion der Zweifachen Carboxylatklammer bei der Bindung von EEVD-Liganden. Als dominierende **Spezifitätsanker** dienen die direkt an die EEVD-Sequenz angrenzenden hydrophoben und für Hsp70, bzw. Hsp90 spezifischen Seitenketten (*PTIEEVD-COOH*, bzw. *MEEVD-COOH*). Durch eine selektive Wechselwirkung mit diesen Seitenketten vermögen es die p60 TPR Domänen zwischen Hsp70 und Hsp90 zu unterscheiden. Zur allgemeineren Beschreibung der molekularen Ligandenerkennung durch TPR-Strukturen wurde eine kombinatorische Peptidbibliothek (**Ac-O/X₄-VD-COOH**) synthetisiert und die positionsabhängigen Bindungspräferenzen der p60 TPRI und TPRIIA Domänen wurden analysiert.

Durch Datenbankrecherchen wurden weitere TPR Proteine identifiziert, die aufgrund ihrer konservierten Zweifachen Carboxylatklammern als Kandidaten für **neue Hsp70 oder Hsp90 Kofaktoren** gelten können. Die getroffenen Vorhersagen wurden für die Proteine **Hcp und Unc45** bestätigt.

Als Beispiel einer nicht durch TPR Module vermittelten Kofaktorbindung wurde die **Interaktion von Hsp90 mit CDC37** analysiert. CDC37 assistiert der Hsp90 abhängigen Reifung von Proteinkinasen. Die Vollängenproteininteraktion konnte auf die Wechselwirkung der CDC37/147-270 Domäne mit der N-terminalen Domäne von Hsp90 reduziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Ausgangspunkt für die Entwicklung selektiver Hemmstoffe, insbesondere TPR vermittelter Proteininteraktionen in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen, dienen. Solche Verbindungen stellen potentiell sehr wertvolle Werkzeuge zur Analyse des nur unvollständig verstandenen Reaktionszyklus von Hsp90 *in vitro* sowie *in vivo* dar. Die gezielte Modulation der spezifischen Chaperonaktivität von Hsp90 als etabliertem Anti-Tumortarget hätte zudem ein pharmakologisches Potential.

6 Literatur

Literatur

- [1] M. Sela, F. H. White Jr., and C. B. Anfinsen. Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease. *Science*, 125:691–692, 1957.
- [2] F. H. White Jr. and C. B. Anfinsen. Some relationships of structure to function in ribonuclease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 81:515–523, 1959.
- [3] C. B. Anfinsen. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181:223–230, 1973.
- [4] A. N. Schechter, R. F. Chen, and C. B. Anfinsen. Kinetics of folding of staphylococcal nuclease. *Science*, 167:886–887, 1970.
- [5] R. L. Baldwin. The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view. *NMR*, 5:103–109, 1995.
- [6] R. L. Baldwin. On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding & Design*, 1:R1–8, 1996.
- [7] S. E. Radford, C. M. Dobson, and P. A. Evans. The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature*, 358:302–307, 1992.
- [8] D. Barrick and R. L. Baldwin. Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry*, 32:3790–3796, 1993.
- [9] V. Agashe, M. C. Shastry, and J. B. Udgaonkar. Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature*, 377:754–757, 1995.
- [10] C. P. Schultz. Illuminating folding intermediates. *Nat. Struc. Biol.*, 7:7–10, 2000.
- [11] J. N. Onuchic. Theory of protein folding. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 48:545–600, 1997.
- [12] V. S. Pande, A. Y. Grosberg, T. Tanaka, and D. S. Rokhsar. Pathways for protein folding: Is a new view needed? *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 8:68–79, 1998.

-
- [13] C. M. Dobson and M. Karplus. The fundamentals of protein folding: Bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:92–101, 1999.
- [14] A. R. Dinner, A. Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson, and M. Karplus. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.*, 25:331–339, 2000.
- [15] M. B. Elowitz, M. G. Surette, P. E. Wolf, J. B. Stock, and S. Leibler. Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181:197–203, 1999.
- [16] Zimmermann S. B. and Trach S. O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 222:599–620, 1991.
- [17] Minton A. P. The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: Some biological consequences. *Mol. Cell. Biochem.*, 55:119–140, 1983.
- [18] Zimmermann S. B. and Minton A. P. Macromolecular crowding: Biochemical, biophysical and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22:27–65, 1993.
- [19] C. M. Dobson, A. Sali, and M. Karplus. Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angewandte Chemie*, 110:908–935, 1998.
- [20] J. Ellis. Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328:378–379, 1987.
- [21] F. U. Hartl. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381:571–579, 1996.
- [22] W. J. Netzer and F. U. Hartl. Protein folding in the cytosol: Chaperonin-dependent and - independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.*, 23:68–73, 1998.
- [23] R. J. Ellis and F. U. Hartl. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:102–110, 1999.
- [24] Agashe V. R. and F. U. Hartl. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Sem. Cell. Dev. Biol.*, 11:15–25, 2000.
- [25] D. E. Feldman and J. Frydman. Protein folding in vivo: The importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:26–33, 2000.

-
- [26] M. Shtilerman, G. H. Lorimer, and S. W. Englander. Chaperonin function: Folding by forced unfolding. *Science*, 284:822–825, 1999.
- [27] J. Martin and F. U. Hartl. The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:1107–1112, 1997.
- [28] B. van den Berg, R. J. Ellis, and C. M. Dobson. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.*, 18:6927–6933, 1999.
- [29] B. van den Berg, R. Wein, C. M. Dobson, and R. J. Ellis. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: Implications for folding inside the cell. *EMBO J.*, 19:3870–3875, 2000.
- [30] J. Frydman. Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:603–647, 2001.
- [31] B. Bukau, E. Deuerling, C. Pfund, and E. A. Craig. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101:119–122, 2000.
- [32] C. Pfund, N. Lopez-Hoyo, T. Ziegelhoffer, B. A. Schilke, P. Lopez-Buesa, W. Walter, M. Wiedmann, and E. A. Craig. The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J.*, 17:3981–3989, 1998.
- [33] S. A. Teter, W. A. Houry, D. Ang, T. Tradler, D. Rockabrand, G. Fischer, P. Blum, C. Georgopoulos, and F. U. Hartl. Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell*, 97:755–765, 1999.
- [34] E. Deuerling, A. Schulze-Specking, T. Tomoyasu, A. Mogk, and B. Bukau. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature*, 400:693–696, 1999.
- [35] S. Wang, H. Sakai, and M. Wiedmann. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J. Cell. Biol.*, 130:519–528, 1995.
- [36] G. C. Flynn, T. G. Chappell, and J. E. Rothman. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*, 245:385–390, 1989.

-
- [37] S. Blond-Elguindi, S. E. Cwirla, W. J. Dower, R. J. Lipshutz, S. R. Sprang, J. F. Sambrook, and M. J. Gething. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 75:717–728, 1993.
- [38] S. Rüdiger, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, and B. Bukau. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose bound peptide libraries. *EMBO J.*, 16:1501–1507, 1997.
- [39] S. Rüdiger, A. Buchberger, and B. Bukau. Interaction of Hsp70 chaperone with substrates. *Nat. Struct. Biol.*, 4:342–349, 1997.
- [40] J. Martin, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich, and F. U. Hartl. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of GroEL through a molten-globule like intermediate. *Nature*, 352:36–42, 1991.
- [41] W. A. Houry, D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and F. U. Hartl. Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, 402:147–154, 1999.
- [42] T. Langer, C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, Hayer M. K., and F. U. Hartl. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, 356:683–689, 1992.
- [43] A. Mogk, T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Roder, H. Langen, and B. Bukau. Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: Prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.*, 18:6934–6949, 1999.
- [44] P. Bohley. The Fates of proteins in cells. *Naturwissenschaften*, 82:425–435, 1995.
- [45] W. B. Pratt. The hsp90-based chaperone system: Involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217:420–34, 1998.
- [46] W. J. Netzer and Hartl F. U. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature*, 388:343–349, 1997.
- [47] M. R. Leroux and F. U. Hartl. Protein folding: Versatility of the cytosolic chaperonin TRiC/CCT. *Curr. Biol.*, 10:R260–264, 2000.

-
- [48] L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, K. O. Stetter, H. Huber, R. Huber, and S. Steinbacher. Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, 93:125–138, 1998.
- [49] O. Llorca, E. A. McCormack, G. Hynes, J. Grantham, J. Cordell, J. L. Carrascosa, K. R. Willison, J. J. Fernandez, and J.M. Valpuesta. Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. *Nature*, 402:693–696, 1999.
- [50] R. Siegert, M.R. Leroux, C. Scheufler, F.U. Hartl, and I. Moarefi. Structure of the molecular chaperone prefoldin: Unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell*, 103:621–632, 2000.
- [51] I. E. Vainberg, S. A. Lewis, H. Rommelaere, C. Ampe, J. Vandekerckove, H. L. Klein, and N. J. Cowan. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell*, 93:863–873, 1998.
- [52] K. Siegers, T. Waldmann, M. R. Leroux, K. Grein, A. Shevchenko, E. Schiebel, and F. U. Hartl. Compartmentation of protein folding in vivo: Sequestration of non- native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J.*, 18:75–84, 1998.
- [53] M. J. Gething, editor. *Molecular chaperones and protein folding catalysts*. Guidebook Series. Sambrook and Tooze, Oxford University Press, Oxford-New York, 1997.
- [54] J. I. Clark and P. J. Muchowski. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:52–59, 2000.
- [55] M. Haslbeck, S. Walke, T. Stromer, M Ehrnsperger, H. E. White, S. Chen, H. Saibil, and J. Buchner. Hsp26: A temperature-regulated chaperone. *EMBO J.*, 18:6744–6751, 1999.
- [56] U. Jakob, W. Muse, M. Eser, and J. C. Bardwell. Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, 96:341–352, 1999.
- [57] J. Vijayalakshmi, M. K. Mukherjee, J. Graumann, U. Jakob, and M. Saper. The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: A heat shock protein with redox-regulated chaperone activity. *Structure*, 9:367–375, 2001.
- [58] Z. Xu, A. L Horwich, and P. B. Sigler. The crystal structure of the asymmetrical GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, 388:741–749, 1997.

- [59] J. Martin, M. Mayhew, T. Langer, and F. U. Hartl. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin assisted protein folding. *Nature*, 366:228–233, 1993.
- [60] M. Mayhew, A. C. R. da Silva, J. Martin, H. Erjument-Bromage, P. Tempst, and F. U. Hartl. Protein folding in the central cavity of the GroEL/GroES chaperonin complex. *Nature*, 379:420–426, 1996.
- [61] J. S. Weissman, C. M. Hohl, O. Kovalenko, Y. Kashi, S. Chen, K. Braig, H. Saibil, W. A. Fenton, and A. L. Horwich. Mechanism of GroEL action: Productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell*, 83:577–587, 1995.
- [62] P. Goloubinoff, J. T. Christeller, A. A. Gatenby, and G. H. Lorimer. Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and mg-ATP. *Nature*, 342:884–889, 1989.
- [63] Y. Dubaquié, R. Looser, R. Fünfschilling, P. Jenö, and S. Rospert. Identification of in vivo substrates of the yeast mitochondrial chaperonins reveals overlapping but non-identical requirement for Hsp60 and Hsp10. *EMBO J.*, 17:5868–5876, 1998.
- [64] X. Zhu, X. Zhao, W. F. Burkholder, A. Gragerov, C. M. Ogata, M. E. Gottesman, and W. A. Hendrickson. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272:1606–1614, 1996.
- [65] S. Rüdiger, J. Schneider-Mergener, and B. Bukau. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.*, 20:1042–1050, 2001.
- [66] C. J. Harrison, M. Hayer-Hartl, M. Di Liberto, F. U. Hartl, and J. Kuriyan. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, 276:431–435, 1997.
- [67] A. Mally and S. N. Witt. GrpE accelerates peptide binding and release from the high affinity state of DnaK. *Nat. Struc. Biol.*, 8:254–257, 2001.
- [68] K. A. Morano, P. C. C. Liu, and D. J. Thiele. Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1:197–203, 1997.

- [69] W. Neupert. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 66:863–917, 1997.
- [70] Haas I. G. and M. Wabl. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 306:387–389, 1983.
- [71] K. E. S. Matlack, W. Mothes, and T. A. Rapoport. Protein translocation: Tunnel vision. *Cell*, 92:381–390, 1998.
- [72] M. Pilon and R. Schekman. Protein translocation: How Hsp70 pulls it off. *Cell*, 97:679–682, 1999.
- [73] Y. Minami, J. Höhfeld, K. Ohtsuka, and F. U. Hartl. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J. Biol. Chem.*, 271:19617–19624, 1996.
- [74] K. M. Flaherty, C. DeLuca-Flaherty, and D. B. McKay. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70kDa heat-shock cognate protein. *Nature*, 346:623–628, 1990.
- [75] L. H. Pearl and C. Prodromou. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:46–51, 2000.
- [76] S. M. Roe, C. Prodromou, R. O’Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, and L. H. Pearl. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.*, 42:260–266, 1999.
- [77] C. Prodromou, Roe S. M., R. O’Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, and L. H. Pearl. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90:65–75, 1997.
- [78] C. Prodromou, B. Panaretou, S. Chohan, G. Siligardi, R. O’Brien, J. E. Ladbury, S. M. Roe, P. W. Piper, and L. H. Pearl. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular clamp via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.*, 19:4383–4392, 2000.
- [79] C. E. Stebbins, A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl, and N. P. Pavletich. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 89:239–250, 1997.
- [80] M. P. Mayer and B. Bukau. Molecular chaperones: The busy life of Hsp90. *Curr. Biol.*, 9:R322–R325, 1999.

- [81] P. Csermely, T. Schnaider, C. Söti, Z. Prohászka, and G. Nardai. The 90-kda molecular chaperone family: Structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 79:129–168, 1998.
- [82] H. Udono and P. K. Srivastava. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90 and hsp70. *J. Immunol.*, 152:5398–5403, 1994.
- [83] R. J. Binder, D. K. Han, and P. K. Srivastava. CD91: A receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol.*, 1:151–155, 2000.
- [84] H. Singh-Jasuja, R. E. M. Toes, P. Spee, C. Münz, N. Hilf, S. P. Schoenberger, P. Ricciardi-Castagnoli, J. Neefjes, H. G. Rammensee, D. Arnold-Schild, and H. Schild. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.*, 191:1965–1974, 2000.
- [85] M. C. Sousa, C. B. Trame, H. Tsuruta, S. M. Wilbanks, V. S. Reddy, and D. B. McKay. Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell*, 103:633–643, 2000.
- [86] M. Bochtler, C. Hartmann, H. K. Song, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, and R. Huber. The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature*, 403:800–805, 2000.
- [87] E. U. Weber-Ban, B. G. Reid, A. Miranker, and A. L. Horwich. Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature*, 401:90–92, 1999.
- [88] A. Mogk, T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Röder, H. Langen, and B. Bukau. Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: Prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.*, 18:6934–6949, 1999.
- [89] J. R. Glover and S. Lindquist. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 94:73–82, 1998.
- [90] Y. O. Chernoff, S. L. Lindquist, B. I. Ono, S. G. Inge-Vechtomov, and S. W. Liebman. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. *Science*, 268:880–883, 1995.

- [91] R. I. Morimoto. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes. Dev.*, 12:3788–3796, 1998.
- [92] N. Pfanner, E. A. Craig, and A. Hönliger. Mitochondrial preprotein translocase. *Annu. Rev. Cell Div. Biol.*, 13:25–51, 1997.
- [93] Y. Tamura, P. Peng, K. Liu, M. Daou, and P. K. Srivastava. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 278:117–120, 1997.
- [94] N. E. Blachere, Z. Li, R. Y. Chandawarkar, R. Suto, N. S. Jaikaria, S. Basu, H. Udono, and P. K. Srivastava. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.*, 186:1315–1322, 1997.
- [95] S. B. Prusiner, M. R. Scott, and F. E. DeArmond, S. J. Cohen. Prion protein biology. *Cell*, 93:337–348, 1998.
- [96] A. L. Horwich and J. S. Weissman. Deadly conformations - protein misfolding in prion disease. *Cell*, 89:499–510, 1997.
- [97] C. M. Dobson. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.*, 24:329–332, 1999.
- [98] P. J. Muchowski, G. Schaffar, A. Sittler, E. Wanker, M. K. Hayer-Hartl, and F. U. Hartl. Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:7841–7846, 2000.
- [99] S. Krobitsch and S. Lindquist. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1589–1594, 2000.
- [100] S. Wickner, M. R. Maurizi, and S. Gottesman. Posttranslational quality control: Folding, refolding and degrading proteins. *Science*, 286:1888–1893, 1999.
- [101] C. Spiess, A. Beil, and M. Ehrmann. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97:339–347, 1999.
- [102] P. Bohley. Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. *Biol. Chem.*, 377:425–435, 1996.

- [103] J. Ellis. Molecular chaperones: Pathways and networks. *Curr. Biol.*, 9:R137–R139, 1999.
- [104] B. Bukau and A. L. Horwich. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92:351–366, 1998.
- [105] D. Brehmer, S. Rüdiger, C. S. Gässler, D. Klostermeier, L. Packschies, J. Reinstein, Mayer. M. P., and B. Bukau. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struc. Biol.*, 8:427–432, 2001.
- [106] S. Rüdiger, M. P. Mayer, J. Schneider-Mergener, and B. Bukau. Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch. *J. Mol. Biol.*, 304:245–251, 2000.
- [107] M. P. Mayer, H. Schöder, S. Rüdiger, K. Paal, T. Laufen, and B. Bukau. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat. Struc. Biol.*, 7:586–593, 2000.
- [108] W. L. Kelley. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.*, 23:222–227, 1998.
- [109] J. Höhfeld, J. Minami, and F. U. Hartl. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell*, 83:589–598, 1995.
- [110] J. Frydman and J. Höhfeld. Chaperones get in touch: The Hip-Hop connection. *Trends Biochem. Sci.*, 22:87–92, 1997.
- [111] H. Sondermann, C. Scheufler, C. Schneider, J. Höfeld, F. U. Hartl, and I. Moarefi. Structure of a Bag/Hsc70 complex: Convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 291:1553–1557, 2001.
- [112] J. Höhfeld and S. Jentsch. GrpE-like regulation of the Hsc70 cochaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.*, 16:6209–6216, 1997.
- [113] S. Takayama, D. N. Bimston, S. Matsuzawa, B. C. Freeman, C. Aime-Sempe, Z. Xie, and R. I. Morimoto. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.*, 16:4887–4896, 1997.
- [114] J. Lüders, J. Demand, O. Papp, and J. Höhfeld. Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. *J. Biol. Chem.*, 275:14817–14823, 2000.

-
- [115] C. Petersen, C. Hahn, and U. Gehring. Dissection of the ATP-binding domain of the chaperone Hsc70 for interaction with the cofactor Hap46. *J. Biol. Chem.*, 276:10178–10184, 2001.
- [116] T. Langer, G. Pfeiffer, J. Martin, W. Baumeister, and F. U. Hartl. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accomodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J.*, 11:4757–4765, 1992.
- [117] J. L. Johnson and C. A. Craig. Protein folding in vivo: Unraveling complex pathways. *Cell*, 90:201–204, 1997.
- [118] A. J. Caplan. Hsp90's secrets unfold: New insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol.*, 9:262–268, 1999.
- [119] J. Buchner. Hsp90 and co. - A holding for a folding. *Trends Biochem. Sci.*, 24:136–141, 1999.
- [120] R. I. Freeman, B. C. amd Morimoto. The human cytosolic molecular chaperones Hsp90, Hsp70 (Hsc70) and Hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.*, 15:2969, 1996.
- [121] R. J. Schumacher, W. J. Hansen, B. C. Freeman, E. Alnemri, G. Litwack, and D. O. Toft. Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry*, 35:14889–14898, 1996.
- [122] H. Wiech, J. Buchner, R. Zimmermann, and U. Jakob. Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature*, 358:169–170, 1992.
- [123] C. J. Young, C. Schneider, and F. U. Hartl. In vitro evidence that Hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Let.*, 418:139–143, 1997.
- [124] T. Scheibel, T. Weikl, and J. Buchner. Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1495–1499, 1998.
- [125] T. Scheibel, H. I. Siegmund, R. Jaenicke, P. Ganz, H. Lilie, and J. Buchner. The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 396:336–342, 1998.
- [126] D. F. Nathan, M. H. Vos, and S. Lindquist. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12949–12956, 1997.

- [127] Y. Kozutsumi, M. Segal, K. Normington, M. J. Gething, and J. Sambrook. The presence of malfolded proteins in the endoplasmatic reticulum signals the induction of glucose regulated proteins. *Nature*, 332:462–464, 1988.
- [128] J. Melnick, J. L. Dul, and Y. Argon. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 370:373–375, 1994.
- [129] K. A. Borkovich, F. W. Farelly, D. B. Finkelstein, J. Taulien, and S. Lindquist. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.*, 9:3919–3930, 1989.
- [130] B. Panaretou, C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, and L. H. Pearl. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. *EMBO J.*, 17:4829–4836, 1998.
- [131] W. M. J. Obermann, H. Sondermann, A. Russo, N. P. Pavletich, and F. U. Hartl. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and hydrolysis. *J. Cell. Biol.*, 143:1–10, 1998.
- [132] U. Jakob, T. Scheibel, S. Bose, J. Reinstein, and J. Buchner. Assessment of the ATP binding properties of Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 271:10035–10041, 1996.
- [133] W. B. Pratt and D. O. Toft. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18:306–360, 1997.
- [134] S. Uma, S. Hartson, J.-J. Chen, and R. L. Matts. Hsp90 is obligatory for the heme-regulated kinase eif-2 α kinase to aquire and maintain an activatable conformation. *J. Biol. Chem.*, 272:11648–11656, 1997.
- [135] S. D. Hartson, E. A. Ottinger, W. Huang, G. Barany, and P. Burn. Modular folding and evidence for phosphorylation-induced stabilization of an Hsp90-dependent kinase. *J. Biol. Chem.*, 273:8475–8482, 1998.
- [136] C. De Boer, P. A. Meulman, R. J. Wnuk, and D. H. Peterson. Geldanamycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.*, 23:442–450, 1970.
- [137] K. Sasaki, K. L. Jr. Rinehart, G. Slomp, M. F. Grostic, and E. C. Olson. Geldanamycin. I. Structural Assignment. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:7591–7598, 1970.

- [138] T. W. Schulte, S. Akinaga, T. Murakata, T. Agatsuma, S. Sugimoto, H. Nakano, Y. S. Lee, B. B. Simen, Y. Argon, S. Felts, D. O. Toft, L.M. Neckers, and S.V. Sharma. Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Mol. Endocrinol.*, 13:1435–1448, 1999.
- [139] P. Cook and L. Whitesell. Stable and specific binding of heat shock protein 90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cells. *Mol. Endocrinol.*, 10:705–713, 1996.
- [140] L. Whitesell, B. Mimnaugh, E. G. De Costa, C. E. Myers, and L. M. Neckers. 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.*, 91:8324–8328, 1994.
- [141] M Srethapakdi, F. Liu, R. Tavorath, and N. Rosen. Inhibition of Hsp90 function by ansamycins cause retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest. *Cancer Res.*, 60:3940–3946, 2000.
- [142] F. F. Zheng, S. D. Kuduk, G. Chiosis, P. N. Münster, L. Sepp-Lorenzino, S. J. Danishefsky, and N. Rosen. Identification of a geldanamycin dimer that induces the selective degradation of HER-family tyrosine kinases. *Cancer Res.*, 60:2090–2094, 2000.
- [143] G. Chiosis, M. N. Timaul, B. Lucas, P. N. Munster, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, and N. Rosen. A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Trends Biochem. Sci.*, 25:331–339, 2000.
- [144] J. G. Supko, R. L. Hickman, M. R. Grever, and L. Malspeis. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36:305–315, 1995.
- [145] V. Thulasiraman and R. L. Matts. Effect of geldanamycin on the kinetics of chaperone mediated renaturation of firefly luciferase in rabbit reticulocyte lysate. *Biochemistry*, 35:13443–13450, 1996.
- [146] D. F. Smith, L. Whitesell, S. C. Nair, S. Chen, V. Prapapanich, and D. A. Rimerman. Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an Hsp90 binding agent. *Mol. Cell. Biol.*, 15:6804–6812, 1995.

- [147] L. Whitesell, P. D. Sutphin, E. J. Pulcini, J. D. Martinez, and P. H. Cook. 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, 1998.
- [148] L. F. Stancato, A. M. Silverstein, J. K. Owens-Grillo, Y.-H. Chow, R. Jove, and W. B. Pratt. The Hsp90 binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signalling without disrupting formation of signalling complexes and reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J. Biol. Chem.*, 272:4013–4020, 1997.
- [149] C. Schneider, L. Sepp-Lorenzino, E. Nimmegern, O. Ouerfelli, D. Danishefsky, N. Rosen, and F. U. Hartl. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:14536–14541, 1996.
- [150] A. J. McClellan and J. Frydman. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat. Cell Biol.*, 3:E1–3, 2001.
- [151] P. Connell, C. A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L. J. Thompson, J. Höhfeld, and C. Patterson. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat shock proteins. *Nat. Cell Biol.*, 3:93–96, 2001.
- [152] G. C. Meacham, C. Patterson, W. Zhang, J. M. Younger, and D. M. Cyr. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.*, 3:100–105, 2001.
- [153] B. M. H. Lange, A. Bachi, M. Wilm, and González. Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in drosophila and vertebrates. *EMBO J.*, 19:1252–1262, 2000.
- [154] G. de Carcer, M. do Carmo Avides, M. J. Lallena, D. M. Glover, and C. Gonzales. Requirement of hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability. *EMBO J.*, 20:2878–2884, 2001.
- [155] P. Pandey, A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S. M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E. S. Alnemri, D. Kufe, and S. Kharbanda. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock proteins 90. *EMBO J.*, 19:4310–4322, 2000.

- [156] A. Saleh, S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins, and E. S. Alnemri. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell. Biol.*, 2:476–483, 1999.
- [157] S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam, and P. K. Srivastava. CD91 is a common receptor for heat shock proteins Gp96, Hsp90, Hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14:303–313, 2001.
- [158] S. L. Rutherford and S. Lindquist. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396:336–342, 1998.
- [159] M. N. Arbeitman and D. S. Hogness. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, 101:67–77, 2000.
- [160] E. R. Sanchez, D. O. Toft, M. J. Schlesinger, and W. B. Pratt. Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat-shock protein. *J. Biol. Chem.*, 260:12398–12401, 1985.
- [161] M. G. Catelli, N. Binart, I. Jung-Testas, J. M. Renoir, E. E. Baulieu, J. R. Feramisco, and W. J. Welch. The common 90-kDa protein component of nontransformed ‘8S’ steroid receptors is a heat shock protein. *EMBO J.*, 4:3131–3135, 1985.
- [162] I. Joab, C. Radanyi, M. Renoir, T. Buchou, M. G. Catelli, N. Binart, J. Mester, and E. E. Baulieu. Common nonhormone binding component in nontransformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature*, 308:850–853, 1984.
- [163] M. E. Rafestin-Oblin, B. Couette, C. Radanyi, M. Lombes, and E. E. Baulieu. Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine. Oligomeric structure and transformation. *J. Biol. Chem.*, 264:9304–9309, 1989.
- [164] B. Sepehrnia, I. B. Paz, G. Dasgupta, and J. Momand. 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, 1996.
- [165] J. Zou, Y. Guo, T. Guettouch, D. F. Smith, and R. Voellmy. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by Hsp90 (Hsp90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94:471–480, 1998.

- [166] Y. Xu and S. Lindquist. Heat shock protein Hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:7074–7078, 1993.
- [167] Y. Xu, M. Singer, and S. Lindquist. Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:109–114, 1999.
- [168] J. S. Brugge, E. Erikson, and R. L. Erikson. The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein pp60v-src with two cellular proteins. *Cell*, 25:363–372, 1981.
- [169] S. D. Hartson, D. J. Barrett, P. Burn, and R. L. Matts. Hsp90 mediated folding of the lymphoid cell kinase p56-lck. *Biochemistry*, 35:13451–13459, 1996.
- [170] A. Aligue, H. Akhavan-Niak, and P. Russell. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J.*, 13:6099–6106, 1994.
- [171] T. Cutforth and G. M. Rubin. Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell*, 77:1027–1036, 1994.
- [172] A. van der Straten, C. Rommel, B. Dickson, and E. Hafen. The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in *Drosophila*. *EMBO J.*, 16:1961–1969, 1997.
- [173] D. L. Fisher, E. Mandart, and M. Dorée. Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, 19:1516–1524, 2000.
- [174] T. Hunter and R. Y. C. Poon. Cdc37: A protein kinase chaperone ? *Trends Cell. Biol.*, 7:157–161, 1997.
- [175] K. Dai, R. Kobayashi, and D. Beach. Physical interaction of mammalian CDC37 with CDK4. *J. Biol. Chem.*, 271:22030–22034, 1996.
- [176] C. F. Chen, Y. Chen, K. Dai, P. L. Chen, D. J. Riley, and W. H. Lee. A new member of the Hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol. Cell. Biol.*, 16:4691–4699, 1996.
- [177] S. E. Holt, D. L. Aisner, J. Baur, V. M. Tesmer, M. Dy, M. Ouellette, J. B. Trager, G. B. Morin, D. O. Toft, J. W. Shay, W. E. Wright, and

- White M. A. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.*, 13:817–826, 1999.
- [178] G. García-Cardena, R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papatropoulos, and W. Sessa. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 392:821–24, 1998.
- [179] M. A. Loo, T. J. Jensen, L. Cui, Y. Hou, X.-B. Chang, and J. R. Rordan. Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.*, 17:6879–6887, 1998.
- [180] P. D. Yorgin, S. D. Hartson, Fellah A. M., Scroggins B. T., W. Huang, E. Katsanis, J. M. Couchman, Matts R. L., and Whitesell L. Effects of geldanamycin, a heat-shock protein 90-binding agent, on T cell function and T cell nonreceptor protein tyrosine kinases. *J. Immunol.*, 164:2915–2923, 2000.
- [181] D. F. Smith. Dynamics of heat-shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol. Endocrinol.*, 7:1418–1428, 1993.
- [182] J. P. Grenert, B. D. Johnson, and D. O. Toft. The importance of ATP binding and hydrolysis by Hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J. Biol. Chem.*, 274:17525–17533, 1999.
- [183] S. Chen, V. Prapapanich, R. A. Rimerman, B. Honoré, and D. F. Smith. Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins Hsp90 and Hsp70. *Mol. Endocrinol.*, 10:682–693, 1996.
- [184] S. Chen and D. F. Smith. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, 273:35194–35200, 1998.
- [185] B. D. Johnson, R. J. Schumacher, E. D. Ross, and D. O. Toft. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.*, 273:3679–3686, 1998.
- [186] Y. Morishima, K. C. Kanelakis, A. M. Silverstein, K. D. Dittmar, L. Estrada, and W. B. Pratt. The Hsp organizer protein Hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90 based chaperone system. *J. Biol. Chem.*, 275:6894–6900, 2000.

- [187] H. C. J. Chang, D. Nathan, and S. Lindquist. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol. Cell. Biol.*, 17:318–325, 1997.
- [188] K. D. Dittmar and W. B. Pratt. Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90 based chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, 272:13047–13054, 1997.
- [189] T. Rajapandi, L. E. Greene, and E. Eisenberg. The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 275:22597–22604, 2000.
- [190] C. Prodromou, G. Siligardi, R. O'Brien, D. N. Woolfson, L. Regan, B. Panaretou, J. E. Ladbury, P. W. Piper, and L. Pearl. Regulation of Hsp90 atpase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.*, 18:754–762, 1999.
- [191] M. Gebauer, M. Zeiner, and U. Gehring. Interference between proteins Hsp46 and Hop/p60, which bind to different domains of the molecular chaperone Hsp70/Hsc70. *Mol. Cell. Biol.*, 18:6238–6244, 1998.
- [192] A. J. Weaver, W. P. Sullivan, S. J. Felts, B. A. L. Owens, and D. O. Toft. Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. *J. Biol. Chem.*, 275:23045–23052, 2000.
- [193] A. A. Duina, H. C. J. Chang, J. A. Marsh, S. Lindquist, and R. F. Garber. A cyclophilin function in Hsp90 dependent signal transduction. *Science*, 274:1713–1715, 1996.
- [194] S. Bose, T. Weikl, and J. Bügl, Buchner. Chaperone function of Hsp90-assisted proteins. *Science*, 274:1715–1717, 1996.
- [195] B. C. Freeman, D. O. Toft, and R. I. Morimoto. Molecular chaperone machines: Chaperone activities of the cyclophilin Cyp40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science*, 274:1718–1720, 1996.
- [196] C. Mayr, K. Richter, H. Lilie, and J. Buchner. Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae* differ in their functional properties. *J. Biol. Chem.*, 275:34140–34146, 2000.
- [197] F. Pirkl and Buchner J. Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J. Mol. Biol.*, 308:795–806, 2001.

- [198] W. Sullivan, B. Stensgard, G. Caucutt, B. Bartha, N. McMahon, E. S. Alnemri, G. Litwack, and D. Toft. Nucleotides and two functional states of Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 272:8007–8012, 1997.
- [199] J. P. Grenert, W. P. Sullivan, P. Fadden, T. A. J. Haystead, J. Clark, E. Mimnaugh, H. Krutzsch, H. J. Ochel, T. W. Schulte, E. Sausville, L. M. Neckers, and D. O. Toft. 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, 1997.
- [200] A. Chadli, I. Bouhouche, W. Sullivan, B. Stensgard, N. McMahon, and M. G. Catelli. Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:12524–12529, 2000.
- [201] J. C. Young and F. U. Hartl. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.*, 19:5930–5940, 2000.
- [202] J. Rao, P. Lee, S. Benzeno, C. Cardozo, J. Albertus, D. M. Robins, and A. J. Caplan. Functional interaction of human p50cdc37 with the androgen receptor but not with the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 276:5814–5820, 2001.
- [203] A. M. Silverstein, M. D. Caligniana, M. S. Chen, J. K. Owens-Grillo, M. Chinkers, and W. B. Pratt. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor-Hsp90 complexes with properties of an FK506 binding immunophilin. *J. Biol. Chem.*, 272:16224–16230, 1997.
- [204] T. Nemoto, N. Sato, H. Iwanari, H. Yamashita, and T. Takagi. Domain structures and immunogenic regions of 90-kDa heat shock protein (Hsp90). *J. Biol. Chem.*, 272:26179–26187, 1997.
- [205] C. Prodromou, S. M. Roe, P. W. Piper, and L. H. Pearl. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat. Struc. Biol.*, 4:477–482, 1997.
- [206] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay. Distantly related sequences in the α -subunits and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, 1:945–951, 1982.

- [207] D. B. Wigley, G. J. Davies, E. J. Dodson, A. Maxwell, and G. Dodson. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature*, 351:624–629, 1991.
- [208] C. Ban, M. Junop, and W. Yang. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: A switch in DNA mismatch repair. *Cell*, 97:85–97, 1999.
- [209] A. M. Bilwes, L. A. Alex, B. R. Crane, and M. I. Simon. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell*, 96:131–141, 1999.
- [210] T. Nemoto, Y. Ohara-Nemoto, M. OTA, T. Takagi, and K. Yokoyama. Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.*, 233:1–8, 1995.
- [211] P. A. Wearsch and C. W. Nicchitta. Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain. *Biochemistry*, 35:16760, 1996.
- [212] M. Lässle, G. L. Blatch, V. Kundra, T. Takatori, and B. R. Zetter. Stress-inducible, murine protein mSTI1. *J. Biol. Chem.*, 272:1876–1884, 1997.
- [213] J. C. Young, W. M. J. Obermann, and F. U. Hartl. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 273:18007–18010, 1998.
- [214] A. Carrello, E. Ingley, R. F. Minchin, S. Tsai, and T. Ratajczak. The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and Hop is located in the dimerization domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 274:2682–2689, 1999.
- [215] A. J. Ramsey, L. C. Russell, S. R. Whitt, and M. Chinkers. Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.*, 275:17857–17862, 2000.
- [216] M. Maruya, M. Sameshima, T. Nemoto, and I. Yahara. Monomer arrangement in Hsp90 dimer as determined by decoration with N- and C-terminal region specific antibodies. *J. Mol. Biol.*, 285:903–907, 1999.
- [217] T. Weikl, P. Muschler, K. Richter, T. Veit, J. Reinstein, and J. Buchner. C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J. Mol. Biol.*, 303:583–592, 2000.

- [218] S. C. Kampranis, A. D. Bates, and A. Maxwell. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:8414–8419, 1999.
- [219] A. M. Silverstein, N. Grammatikakis, B. H. Cochram, M. Chinkers, and W. B. Pratt. p50cdc37 binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on Hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J. Biol. Chem.*, 273:20090–20095, 1998.
- [220] S. D. Hartson, A. D. Irwin, J. Shao, B. T. Scroggins, L. Volk, W. Huang, and R. L. Matts. p50cdc37 is a nonexclusive Hsp90 cohort which participates intimately in Hsp90-mediated folding of immature kinase molecules. *Biochemistry*, 39:7631–7644, 2000.
- [221] N. Grammatikakis, J. H. Lin, A. Grammatikakis, P. N. Tsihchlis, and B. H. Cochran. p50cdc37 acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol. Cell. Biol.*, 19:1661–1672, 1999.
- [222] J. S. Shao, N. Grammatikakis, B. T. Scroggins, S. Uma, W. Huang, J. J. Chen, S. D. Hartson, and R. L. Matts. Hsp90 regulates p50cdc37 function during the biogenesis of the active conformation of the heme-regulated eif2 α kinase. *J. Biol. Chem.*, 276:206–214, 2001.
- [223] L. Stepanova, X. Leng, S. B. Parker, and J. W. Harper. Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.*, 10:1491–1502, 1996.
- [224] L. Stepanova, G. Yang, F. DeMayo, T. M. Wheeler, M. Finegold, T. C. Thompson, and J. W. Harper. Induction of human Cdc37 in prostrate cancer correlates with the ability to targeted Cdc37 expression to promote prostatic hyperplasia. *Oncogene*, 19:2186–2193, 2000.
- [225] L. Stepanova, M. Finegold, F. DeMayo, E. V. Schmidt, and J. W. Harper. The oncoprotein kinase chaperone CDC37 functions as an oncogene in mice and collaborates with both c-myc and cyclin D1 in transformation of multiple tissues. *Mol. Cell. Biol.*, 20:4462–4473, 2000.
- [226] G. Scholz, S. D. Hartson, K. Cartledge, N. Hall, J. Shao, A. R. Dunn, and R. L. Matts. p50(Cdc37) can buffer the temperature-sensitive properties of a mutant of Hck. *Mol. Cell. Biol.*, 20:6984–6995, 2000.
- [227] C. A. Ballinger, P. Connell, Y. Wu, Z. Hu, L. J. Thompson, L. Y. Yin, and C. Patterson. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide

- repeat containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.*, 19:4535–4545, 1999.
- [228] F.-H. Liu, S.-J. Wu, S.-M. Hu, C.-D. Hsiao, and C. Wang. Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.*, 274:34425–34432, 1999.
- [229] K. J. Dolinski, M. E. Cardenas, and J. Heitman. Cns1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell. Biol.*, 18:7344–7352, 1998.
- [230] J. A. Marsh, H. M. Kalton, and R. F. Gaber. Cns1 is an essential protein associated with the Hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin40 dependent functions in *cpr7 δ* cells. *Mol. Cell. Biol.*, 18:7353–7359, 1998.
- [231] D. F. Nathan, M. H. Vos, and S. Lindquist. Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:1409–1414, 1999.
- [232] M. Chinkers. Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 12:28–32, 2001.
- [233] C. Sinclair, C. Borchers, C. Parker, K. Tomer, H. Charbonneau, and S. Rossie. The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of Ser/Thr protein phosphatase 5. *J. Biol. Chem.*, 274:23666–23672, 1999.
- [234] A. Brychzy, F. U. Hartl, and W. M. J. Obermann. Manuskript in Vorbereitung.
- [235] L. Aravind and E.V. Koonin. The U-Box is a modified RING-finger - a common motif in ubiquitination. *Curr. Biol.*, 10:R132–R134, 2000.
- [236] M. Koegl, T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96:635–644, 1999.
- [237] J. C. Young, W. M. J. Obermann, and F. U. Hartl. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the 12-kDa C-terminal domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 273:1807–1810, 1998.

- [238] M. Goebel and M. Yanagida. The TPR snap helix: A novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem. Sci.*, 16:173–177, 1991.
- [239] J. R. Lamb, S. Tugendreich, and P. Hieter. Tetratricopeptide repeat interactions: To TPR or not to TPR ? *Trends Biochem. Sci.*, 20:257–259, 1995.
- [240] G. L. Blatch and M. Lässle. The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. *Bio Essays*, 21:932–939, 1999.
- [241] A. M. Page. The anaphase-promoting complex: New subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:583–609, 1999.
- [242] C. Gieffers, P. Dube, J. R. Harris, H. Stark, and J. M. Peters. Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell.*, 7:907–913, 2001.
- [243] R. S. Sikorski, M. S. Boguski, M. Goebel, and P. Hieter. 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, 1990.
- [244] T. Hirano, N. Kinoshita, K. Morikawa, and M. Yanagida. Snap helix with knob and hole: Essential repeats in *S. pombe* nuclear protein *nuc2⁺*. *Cell*, 60:319–328, 1990.
- [245] G. Lametschwandtner, C. Brocard, M. Fransen, P. Van Veldhoven, J. Berger, and A. Hartig. The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J. Biol. Chem.*, 273:33635–33643, 1998.
- [246] G. J. Gatto Jr., B. V. Geisbrecht, S. J. Gould, and J. M. Berg. Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human Pex5. *Nat. Struct. Biol.*, 7:1091–1095, 2000.
- [247] S. Subramani, A. Koller, and W. B. Snyder. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 69:399–418, 2000.
- [248] N. Pfanner and A. Geissler. Versatility of the mitochondrial import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:339–349, 2001.

- [249] K. Lapouge, S. J. M. Smith, P. A. Walker, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and K. Rittinger. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac*GTP. *Mol. Cell.*, 6:899–907, 2000.
- [250] A. K. Das, P. T. W. Cohen, and D. Barford. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: Implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.*, 17:1192–1199, 1998.
- [251] M. P. Groves and D. Barford. Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:383–389, 1999.
- [252] L. C. Russell, S. R. Whitt, M. S. Chen, and M. Chinkers. Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.*, 274:20060–20063, 1999.
- [253] C. Scheufler, A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl, and I. Moarefi. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, 101:199–210, 2000.
- [254] C. Scheufler. *Struktur-Funktions-Analyse von Hop: TPR-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2000.
- [255] S. Chen, W. P. Sullivan, D. O. Toft, and D. F. Smith. Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaperones*, 3:118–129, 1998.
- [256] J. Demand, J. Lüders, and J. Höhfeld. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell. Biol.*, 18:2023–2028, 1998.
- [257] H. Irmer and J. Höhfeld. Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip. *J. Biol. Chem.*, 272:2230–2235, 1997.
- [258] J. Van der Spuy, B. D. Kana, H. W. Dirr, and G. L. Blatch. Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. *Biochem. J.*, 345:645–651, 2000.

- [259] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods of Enzymology*, 185:60–89, 1990.
- [260] R. Albrecht, C. Scheufler, A. Brinker, J. Young, and I. Moarefi. Structural basis for the interaction of Hsp90 with the kinase chaperone Cdc37. *Manuskript in Vorbereitung*.
- [261] C. Scheufler, A. Brinker, F. U. Hartl, and I. Moarefi. Crystal structures of the peptide free TPR1 and TPR2 domains of Hop at 0.88 Å and 2.4 Å resolution. *Manuskript in Vorbereitung*.
- [262] T. D. Parks, K. K. Leuther, E. D. Howard, S. A. Johnston, and W. G. Dougherty. Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal. Biochem.*, 216:413–417, 1994.
- [263] L. J. Lucast, R. T. Batey, and J. A. Doudna. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. *BioTechniques*, 30:544–554, 2001.
- [264] J. M. Barral, A. Hutagalung, A. Brinker, F. U. Hartl, and H. Epstein. The myosin assembly protein Unc-45 is a molecular chaperone that interacts with Hsp90 and myosin. *Zur Publikation eingereicht.*, 2001.
- [265] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, editors. *Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [266] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557–580, 1983.
- [267] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [268] A. Brinker. *Inhibitoren von humanem Cathepsin L aus kombinatorischen Pentapeptidbibliotheken*. Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1998.
- [269] A. Brinker, E. Weber, Stoll D., J. Voigt, A. Müller, N. Sewald, G. Jung, K.-H. Wiesmüller, and P. Bohley. Highly potent inhibitors of human cathepsin L identified by screening combinatorial pentapeptide amide collections. *Eur. J. Biochem.*, 267:5085–5092, 2000.

- [270] A. Beck-Sickinger and G. Jung. *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*. Verlag Chemie, Weinheim, 1996.
- [271] C. Pinilla, J. Appel, S. Blondelle, C. Dooley, B. Dörner, J. Eichler, J. Ostresh, and R. A. Houghten. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 37:221–240, 1995.
- [272] F. S. Tjoeng, D. S. Towery, J. W. Bullock, D. E. Whipple, K. F. Fock, H. Williams, M. E. Zupec, and S. P. Adams. Multiple peptide synthesis using a single support. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 35:141–146, 1990.
- [273] E Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, and P. J. Cook. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, 34:595–598, 1970.
- [274] J. W. Metzger, K. H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brünjes, and Jung G. Ion-spray mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry of synthetic peptide libraries. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32:884–896, 1993.
- [275] S. Stevanović and G. Jung. Multiple sequence analysis: Pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal. Biochem.*, 212:212–220, 1993.
- [276] B. Johnsson and S. Löfås. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran modified gold surface for biospecific interaction analysis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 121:1526–1528, 1990.
- [277] D. J. O’Shannessy, M. Brigham-Burke, and K. Peck. Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Anal. Biochem.*, 205:132–136, 1992.
- [278] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. VCH, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, 1987.
- [279] H. Bisswanger. *Enzymkinetik*. VCH, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, 1994.
- [280] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L.-N. Lin. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.*, 179:131–137, 1989.
- [281] A. Cooper. Thermodynamic analysis of bimolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:557–563, 1999.

- [282] I. Jelesarov and H. R. Bosshard. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of bimolecular recognition. *J. Mol. Recognit.*, 12:3–18, 1999.
- [283] M. M. Pierce, C. S. Raman, and B. T. Nall. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, 19:213–221, 1999.
- [284] J. E. Ladbury and Chowdry B. Z., editors. *Biocalorimetry*. Wiley, Chichester-New York-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto, 1994.
- [285] V. V. Plotnikov, J. M. Brandts, L. N. Lin, and J. F. Brandts. A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal. Biochem.*, 250:237–244, 1997.
- [286] D. Freifelder. *Physical Biochemistry*. Freeman, New York, 1982.
- [287] T. E. Craighton. *Protein structure a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1989.
- [288] U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, I. Rönnberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Ståhlberg, C. Urbaniczky, H. Östlin, and M. Malmquist. Realtime biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques*, 11:620–627, 1991.
- [289] D. G. Myszka. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:50–57, 1997.
- [290] P. Schuck. Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:498–502, 1997.
- [291] G. Canziani, W. Zhang, D. Cines, A. Rux, S. Willis, G. Cohen, R. Eisenberg, and I. Chaiken. Exploring biomolecular recognition using optical biosensors. *Methods*, 19:253–269, 1999.
- [292] K. R. Rogers and A. Mulchandani, editors. *Affinity Biosensors*. Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
- [293] M. K. Hayer-Hartl, J. Martin, and F. U. Hartl. Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding. *Science*, 269:836–841, 1995.

- [294] B. Misselwitz, O. Staek, and T. A. Rapoport. J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Molecular Cell*, 2:593–603, 1998.
- [295] M. P. Mayer, T. Laufen, K. Paal, J. S. McCarty, and B. Bukau. Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 289:1131–1144, 1999.
- [296] K. Graumann and A. Jungbauer. Quantitative assessment of complex formation of nuclear-receptor accessory proteins. *Biochem. J.*, 345:627–636, 2000.
- [297] D. J. O’Shannassey, M. Brigham-Burke, K. K. Soneson, P. Hensley, and I. Brooks. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: Use of nonlinear least square analysis methods. *Anal. Biochem.*, 212:457–468, 1993.
- [298] K. Nadeau, S. G. Nadler, M. Saulnier, M. A. Tepper, and C. T. Walsh. Quantitation of the interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin and analogs with Hsc70 and Hsp90. *Biochemistry*, 33:2561–2567, 1994.
- [299] S. G. Nadler, D. D. Dischino, A. R. Malacko, J. S. Cleaveland, S. M. Fujihara, and H. Marquardt. Identification of a binding site on Hsc70 for the immunosuppressant 15-deoxyspergualin. *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 253:176–180, 1998.
- [300] R. J. Binder, N. Blachere, and P. K. Srivastava. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by MHCi molecules. *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [301] G. C. Flynn, J. Pohl, M. T. Flocco, and J. E. Rothman. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 353:726–730, 1991.
- [302] N. A. Thornberry, T. A. Rano, Peterson E. P., D. M. Raspe, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Hautzager, P. A. Nordstrom, S. Ray, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman, and D. W. Nicolson. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272:17907–17911, 1997.

-
- [303] K. H. Wiesmüller, B. Fleckenstein, and G. Jung. Peptide vaccines and peptide libraries. *Biol. Chem.*, 382:571–579, 2001.
- [304] N. J. Greenfield and G. D. Fasman. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8:4108–4116, 1969.
- [305] J. M. Barral, C. C. Bauer, I. Ortiz, and H. F. Epstein. Unc-45 mutations in *Caenorhabditis elegans* implicate a CRO/She4p- like domain in myosin assembly. *J. Cell Biol.*, 143:1215–1225, 1998.
- [306] J. M. Barral and H. F. Epstein. Protein machines and self assembly in muscle organization. *BioEssays*, 21:813–823, 1999.
- [307] M. R. Groves, N. Hanlon, P. Turowski, B. A. Hemmings, and D. Barford. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly arranged HEAT motifs. *Cell*, 96:99–110, 1998.
- [308] S. G. Sedgwick and S. J. Smerdon. The ankyrin repeat: A diversity of interactions on a common structural framework. *Trends. Biochem. Sci.*, 24:311–316, 1999.
- [309] M. Pfeifer, S. Berg, and A. B. Reynolds. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, 76:789–791, 1994.
- [310] A. H. Huber, J. W. Nelson, and W. I. Weis. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell*, 90:871–882, 1997.
- [311] J. W. Peters, M. H. B. Stowell, and D. C. Rees. A leucine-rich repeat variant with a novel repetitive protein structural motif. *Nat. Struct. Biol.*, 3:991–994, 1996.
- [312] S. Chen, W. P. Sullivan, D. O. Toft, and D. F. Smith. Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaperones*, 3:118–129, 1998.
- [313] A. E. Murthy, A. Bernards, D. Church, J. Wasmuth, and J. F. Gusella. Identification and characterization of two novel tetratricopeptide repeat-containing genes. *DNA Cell Biol.*, 15:727–775, 1996.
- [314] F. Tsukahara, M. Hattori, T. Muraki, and Y. Sakaki. Identification and cloning of a novel cDNA belonging to tetratricopeptide repeat

- gene family from down-syndrome critical region. *J. Biochem. (Tokyo)*, 120:820–827, 1996.
- [315] G. Su, T. Roberts, and J. K. Cowell. TTC4, a novel human gene containing the the tetratricopeptide repeat and mapping to the region of chromosome 1p31 that is frequently deleted in sporadic breast cancer. *Genomics*, 55:157–163, 1999.
- [316] M. L. Zhang, L. F. Wang, S. Y. Miao, and S. S. Koide. Isolation and sequencing of the cDNA encoding the 75-kDa human sperm protein related to infertility. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 105:998–1003, 1992.
- [317] E. Kordes, L. Savelyeva, M. Schwab, J. Rommelaere, J. C. Jauniaux, and C. Cziepulch. Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, 52:90–94, 1998.
- [318] P. Kazemi-Esfarjani and S. Benzer. Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science*, 287:1837–1840, 2000.
- [319] P. Taylor, J. Dornan, A. Carrello, T. Minchin, R. F. and Ratajczak, and M. D.. Walkinshaw. Two structures of cyclophilin40: Folding and fidelity in the TPR domains. *Structure*, 9:431–438, 2001.
- [320] W. Braun, J. Kallen, V. Mikol, M. D. Walkinshaw, and K. Wüthrich. Three dimensional structure and actions of immunosuppressants and their immunophilins. *FASEB J.*, 9:63–72, 1995.
- [321] H. Koga, H. Terasawa, H. Nunoi, K. Takeshige, F. Inagaki, and H. Sumimoto. Tetratricopeptide repeat (TPR) motif of p67phox participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 274:25051–25060, 1999.
- [322] S. Grizot, F. Fieschi, M. C. Dagher, and E. Pebay-Peyroula. The active N-terminal region of p67phox: Structure at 1.81 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [323] Y. Abe, T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo, and D. Kohda. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, 100:551–560, 1996.

-
- [324] D. A. Doyle, A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng, and R. McKinnon. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: Molecular basis of peptide recognition. *Cell*, 85:1067–1076, 1996.
- [325] S. C. Harrison. Peptide-surface association: The case of PDZ and PTB domains. *Cell*, 86:341–343, 1996.
- [326] M. B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and L. C. Cantley. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91:961–971, 1997.
- [327] R. Albrecht, C. Scheufler, A. Brinker, J. Young, and I. Moarefi. Structural basis for the interaction of Hsp90 with the kinase chaperone Cdc37. *Manuskript in Vorbereitung*.

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen, Vortrag, Preis, Patent

Artikel

bereits erschienen:

- C. Scheufler♣, **A. Brinker**♣, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl and I. Moarefi. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210;

♣ *Diese Autoren trugen gleichberechtigt zur Arbeit bei.*

zur Publikation eingereicht und in Vorbereitung:

- J. M. Barral, A. Hutagalung, **A. Brinker**, F. U. Hartl and H. Epstein. The myosin assembly protein Unc-45 is a molecular chaperone that interacts with Hsp90 and myosin. *Zur Publikation eingereicht bei Science.*
- R. Albrecht, C. Scheufler, **A. Brinker**, J. Young and I. Moarefi. Structural basis for the interaction of Hsp90 with the kinase chaperone Cdc37. *In Vorbereitung.*
- **A. Brinker**, B. Fleckenstein, F. von der Mülbe, C. Scheufler, G. Jung, I. Moarefi and F. U. Hartl. Elucidation of general ligand recognition motives of the Hop TPRI and TPRIIA domains. *In Vorbereitung*
- C. Scheufler♣, **A. Brinker**♣, F. U. Hartl and I. Moarefi. Crystal structures of the peptide free TPRI and TPRII domains of Hop at 0.88 Å and 2.4 Å resolution. *In Vorbereitung.*

♣ *Diese Autoren trugen gleichberechtigt zur Arbeit bei.*

Posterbeiträge

- **A. Brinker**, C. Scheufler, I. Moarefi and F. U. Hartl. TPR domains of Hsp70-Hsp90 adaptor protein p60/Hop recognize short peptides including the EEVD motif with high specificity and affinity. *Cold Spring Harbor Meeting Molecular Chaperones & Heat Shock Response*: May 3-7, 2000.
- C. Scheufler, **A. Brinker**, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl and I. Moarefi. Structural basis of TPR mediated protein-protein interactions: TPR domains as critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Fall Meeting of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Munich: Oktober 10-13, 2000.*

Vortrag

- **A. Brinker**, B. Fleckenstein, F. von der Mülbe, C. Scheufler, L. Moroder, G. Jung, I. Moarefi and F. U. Hartl. Analysis of TPR mediated protein recognition using short defined peptides and combinatorial peptide collections. *5th German Peptide Symposium, Bielefeld: March 11-14, 2001.*

Preis

C. Scheufler und **A. Brinker** wurde für die Arbeit:

C. Scheufler[♣], **A. Brinker**[♣], G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl and I. Moarefi. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell 101, 199-210*

[♣] Diese Autoren trugen gleichberechtigt zur Arbeit bei.

der **Young Investigator Research Award 2001** des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried verliehen.

Patentanmeldung

am Deutschen und Europäischen Patentamt:

Titel: Raumform von TPR-Strukturmotiv enthaltenden Polypeptiden mit Chaperon-Bindungsfunktion, deren Kristalle und Verbindungen zur Inhibierung derartiger Polypeptide. (*Amtliches Kennzeichen:* PCT/EP01/03617 basierend auf DE 100 15 748)

wurden als Erfindung gemeldet von **A. Brinker**, F. U. Hartl, I. Moarefi und C. Scheufler sowie zur Patentierung eingereicht.

7.2 Liste akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

in Tübingen:

Bisswanger, Bock, Bohley, Breyer-Pfaff, Dringen, Eisele, Fröhlich, Gauglitz, Gebhardt, Günzel, Häfelinger, Hagenmeier, Hamprecht, Hanack, Hoffmann, Jung, Kaiser, Kalbacher, Lindner, Mayer, Mecke, Nagel, Nakel, Oberhammer, Oelkrug, Pfaff, Pfeiffer, Probst, Rammensee, Reutter, Ritter, Schild, Schott, Schöffel, Stegmann, Strähle, Schwarz, Voelter, Voigt, Weber, Wegmann, Werringloer, Weser, Wiesinger, Wiesmüller, Wohlleben;

in München:

Hartl, Moarefi, Moroder

in Dortmund:

Herrmann

7.3 Lebenslauf

- 06.10.1971 geboren in Dortmund, Nordrhein-Westfalen
Vater: Eckhard Brinker
Mutter: Beatrix Brinker, geb. Schlüsener
- 1978-1982 Besuch der Städtischen Grundschule, Waltrop
(Lutherschule)
- 1982-1991 Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums, Waltrop
mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife
- 1991-1992 Zivildienst im Sozialdienst
des Städtischen Krankenhauses Waltrop
- 1992-1998 Studium der Biochemie
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 10/1993 1. Teil der Diplomvorprüfung
in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 04/1995 2. Teil der Diplomvorprüfung
in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 08/1997-01/1998 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Peter Bohley
*Inhibitoren von humanem Cathepsin L
aus Kombinatorischen Pentapeptidkollektionen*
am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen,
Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Bohley;
am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut
an der Universität Tübingen in Reutlingen, Abteilung Biochemie,
Arbeitskreis Dr. Karl-Heinz Wiesmüller;
am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen,
Arbeitskreis Prof. Dr. Günther Jung;
- 01/1998 Diplom in Physiologischer Chemie und Biochemie.
- 1998-2001 Dissertation bei Herrn Prof. Dr. F. Ulrich Hartl
*Proteininteraktionsdomänen
in Hsp70/Hsp90-Multichaperonkomplexen*
am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.