

Einfluss der Phosphorylierung durch die Casein Kinase II auf den HSP90-Chaperone-Zyklus in humanen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Patrick Keller
geb. in Landau/Pfalz

Mainz, 2012

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-Dimethylaminogeldanamycin
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CapLC	Kapillar-HPLC
CHIP	carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein
CL	Charged Linker
Clp	Caseinolytische proteasen
DD	Dimerisierungsdomäne
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray Ionisation
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FKS	fetales Kalberserum
FL2	Fluorescence activated cell sorting
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
GA	Geldanamycin
GluFib	Glu1-Fibrinopeptid B
h	Stunde
HCCA	alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)

Ig	Immunglobulin
kDa	kilo Dalton
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MAPK	mitogen-activated protein (kinase)
MD	Mittel Domäne
MEM	Minimum Essential Medium
min.	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
NBD	Nukleotid Bindungsdomäne
NBT	Nitro-blue tetrazolim chloride
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlosung (phosphate buffered saline)
PDB	Protein Data Bank
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quadrupol
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SA	Sinapinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek.	Sekunde
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	time-of-flight
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
WP	Waschpuffer

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung

1	Molekulare Chaperone: die Familie der Hitzeschock-Proteine.....	1
1.1	Die kleinen Hitzeschockproteine sHsps	2
1.2	Die Chaperonine (Hsp60)	3
1.3	Die Hsp70-Chaperone	4
1.4	Die Klasse der HSP90-Chaperone	5
1.5	Die Hsp100-Chaperone	6
2	Struktureller Aufbau der HSP90-Chaperone	7
2.1	Die Nukleotid-Bindungsdomäne der HSP90 Chaperone	8
2.2	Nukleotid abhängige Änderungen in der Tertiärstruktur der HSP90-Chaperone .	8
2.3	Die Mittel-Domäne	10
2.4	Bindungspartner von HSP90	11
2.5	Die Dimerisierungsdomäne.....	12
2.6	Der Charged-Linker (CL)	13
3	Posttranslationale Modifikation (PTM) von HSP90	15
3.1	Die Ubiquitinierung von HSP90.....	15
3.2	Acetylierung von Lysin an HSP90.....	16
3.3	Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen an HSP90.....	18
4	Inhibierung der ATPase-Aktivität von Hsp90 in der Tumor-therapie	20
5	Problemstellung.....	21

II Material und Methoden

1	Material	22
1.1	Geräte und Materialien	22
1.2	Chemikalien und Reagenzien	23
1.3	Antikörper	25
1.3.1	Primärantikörper	25
1.3.2	Sekundärantikörper	25
1.4	Zelllinien und Kultivierungsmedien.....	26
1.4.1	Humane Tumor-Zelllinien.....	26
1.4.2	Humane Primärzelllinien.....	26
1.4.3	Humane Nicht-Tumor-Zelllinien	26

2	Zellbiologische Methoden	27
2.1	Kultivierung der Zelllinien.....	27
2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
2.3	Inkubation der Zellen mit Inhibitoren.....	27
2.4	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	28
3	Proteinbiochemische Methoden	29
3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
3.2	Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele.....	30
3.3	Western-Blot Analyse.....	31
3.3.1	Protein-Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF).....	31
3.3.2	Immunfärbung der Protein-Membran.....	31
3.4	Affinitätsreinigung.....	32
3.5	Herstellung der Zelllysate.....	33
3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay).....	33
3.7	Proteolytischer Verdau nach der SDS-PAGE.....	34
3.8	Kapillar-HPLC.....	35
3.9	In-vitro-Kinase-Reaktion.....	36
3.10	Bindungs-ELISA.....	36
4	Massenspektrometrische Methoden	38
4.1	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI).....	38
4.1.1	Probenvorbereitung Peptide.....	39
4.1.2	Probenvorbereitung Proteine.....	39
4.1.3	Messparameter.....	40
4.2	Elektrospray-Ionisation (ESI).....	42
4.3	Messparameter.....	44

III Ergebnisse

1	Qualitative Bestimmung posttranslationaler Modifikationen an HSP90	46
1.1	Auswahl der Analysemethode.....	46
1.2	Methodenetablierung.....	47
1.2.1	Herstellung von rekombinantem HSP90.....	47
1.2.2	Theoretischer proteolytischer Verdau von HSP90.....	47
1.2.3	Optimierung der proteolytischen Hydrolyse von HSP90 mittels Trypsin.....	48
1.2.4	Trennung der Hydrolysate mittels Kapillar-HPLC (CapLC).....	49
1.3	Beurteilung von endogenem HSP90.....	51
1.3.1	Lokalisation von HSP90-alpha und -beta aus Zelllysaten im SDS-Gel.....	51
1.4	Analyse von endogenem HSP90-alpha und -beta aus der Zelllinie HCT116.....	52
1.4.1	Bestimmung der unmodifizierten Peptide.....	52
1.4.2	Prüfung auf posttranslational modifizierte Peptide.....	54

2	Quantitative Bestimmung der HSP90-Isoformen und deren Phosphorylierungen in der CLR	57
2.1	Qualifizierung des Messsystems CapLC und Synapt.....	57
2.2	Semiquantitative Bestimmung der Phosphopeptide	59
2.2.1	Detektion der Phosphopeptide im Verlauf der CapLC.....	59
2.2.2	Bestimmung der Reproduzierbarkeit (Phosphopeptide).....	60
2.2.3	Lineares Verhalten der Phosphopeptid-Bestimmung	61
2.3	Quantifizierung von HSP90-alpha und -beta	62
2.3.1	Erstellung von Kalibrationsgeraden zur quantitativen Bestimmung beider HSP90-Isoformen	62
2.3.2	Bestimmung der Reproduzierbarkeit (Gehaltsbestimmung HSP90-alpha und -beta).....	63
2.3.3	Qualifizierung des Analyseverfahren zur quantitativen Bestimmung von HSP90 aus Zelllysaten (Wiederfindung)	63
2.3.4	Erstellung von Kalibrationsgeraden aus den nicht-phosphorylierten Peptiden aus der Charged Linker Region	65
2.4	Anwendung der etablierten Methode an Zelllysaten unterschiedlicher Zelllinien	65
2.4.1	Quantifizierung von HSP90-alpha und -beta.....	66
2.4.2	Beurteilung der HSP90-Phosphopeptid-Intensitäten	66
3	Zusammenhang zwischen der HSP90-Phosphorylierung in der CLR und ATPase-Inhibitoren	68
3.1	Affinitätsreinigung von HSP90 aus Zelllysaten mittels ATPase-Inhibitor Geldanamycin.....	68
3.2	Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 in vivo.....	70
3.2.1	Auswirkung auf die Zelllinie HCT116	70
3.2.2	Beurteilung der ATPase Inhibierung von HSP90 in der Zelllinie A2780	73
4	HSP90-CLR-Phosphorylierung durch Arretierung in der G0/G1-Phase des Zellzyklus der Zelllinie HCT116	76
5	Phosphorylierung der CLR von HSP90 durch die Casein-Kinase II..	78
5.1	In-vitro-Kinase-Reaktion von rek. HSP90 und der CK II (Holoenzym).....	78
5.2	Inhibierung der HSP90-CLR-Phosphorylierung in vivo.....	79
5.2.1	Inhibierung der Casein Kinase II Aktivität über spezifische Inhibitoren.....	79
5.2.2	Allgemeine Inhibierung der Kinase-Aktivität durch Staurosporin	80
6	Bindungsverhalten von Co-Chaperonen in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus.....	81
6.1	In-vitro-Phosphorylierung der Co-Chaperone Aha1 und p23.....	81
6.2	Nachweis der Phosphorylierungsstellen an p23 durch MALDI-MS/MS-Analyse.	83
6.3	Bindungs-Assay von p23 und Aha1 an HSP90-alpha und -beta	84

IV Diskussion

1	Qualitative und quantitative PTM-Analyse von endogenem HSP90-alpha und -beta	86
2	Phosphorylierung der CLR von HSP90 durch die CK II	88
3	Phosphorylierung des Co-Chaperone p23 durch die CK II und ihre Auswirkung auf die Bindung zu HSP90	89
4	Einfluss der Casein Kinase II auf den HSP90-Chaperone-Zyklus in humanen Zellen – neue Erkenntnisse.....	91
5	Ausblick.....	93

V Zusammenfassung

VI Literaturverzeichnis

I Einleitung

1 Molekulare Chaperone: die Familie der Hitzeschock-Proteine

Proteine, die spezifisch ungefaltete Peptidketten erkennen, binden und so vor Aggregation schützen, nennt man molekulare Chaperone. Nach der Proteinbiosynthese am Ribosom wird die noch ungefaltete lineare Polypeptidkette ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums freigesetzt, hierbei besteht die Gefahr, dass die frisch synthetisierten Proteine durch intra- und / oder intermolekulare Wechselwirkungen hydrophober Peptidsequenzen aggregieren, bevor sie ihre native Form einnehmen können. Eine weitere Bedeutung der Chaperone liegt im Transport von Proteinen: So können diese nur als lange Polypeptidkette die Zellmembranen passieren und müssen anschließend wieder in ihre native Form zurückgefaltet werden. Das Wort „chaperone“ stammt aus dem französischen und bedeutet ‚Anstandsdame‘. Ron Laskey führte diese Bezeichnung ein, um die Rolle der Nukleoplasmin-ATPase während der strukturellen Bildung des Nukleosoms zu beschreiben (Laskey *et al.*, 1987).

Eine ganz besondere Klasse der Chaperone wurde erstmals in den 1960er Jahren von Ritossa beschrieben. Er konnte durch Vergleich der Gen-Expressionsmuster aus der Speicheldrüse von *Drosophila* nach Hitzeexposition die erhöhte Produktion bestimmter mRNAs feststellen (Ritossa 1962). Die auf diesen mRNAs codierten Proteine wurden aufgrund dieses Merkmals als Hitzeschockproteine bezeichnet.

Diese Familie der durch Stress induzierbaren Proteine lässt sich in fünf Klassen unterteilen. Die Klassifizierung der Hitzeschockproteine erfolgt anhand ihrer molekularen Größe und Sequenzhomologien. In Tabelle 1 sind exemplarisch humane Vertreter aller Klassen mit ihrer Funktion in der Zelle aufgelistet. Eine Ausnahme bildet die Klasse der Hsp100/Clp-Proteine, da diese nur in Eubakterien (Clp), niederen Eukaryoten (Hsp104) und in Pflanzen (Hsp101) vorkommen.

Tabelle 1.1: Klassifizierung der Familie der Hitzeschockproteine

Klasse	Vertreter	Gen-Name	Accession	Funktion*
sHsps (15 – 42 kDa) kleine Hitzeschockproteine	Heat shock protein beta-8	HSPB8 (HSP22)	Q9UJY1	temperaturabhängige Chaperon-Aktivität
	Heat shock protein beta-1	HSPB1 (HSP27)	P04792	Actin Stabilisierung, Schutz vor Stress
Hsp60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1 (HSP60)	P10809	mitochondrialer Proteinimport und Faltung
Hsp70	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSPA1A (HSP71)	P08107	- Faltung neu translatierter Proteine - Erkennung und Stabilisierung nicht-nativer Proteine im Zytosol und in Organellen
	Heat shock 70 kDa protein 1-like	HSPA1L	P34931	
Hsp90	Heat shock protein H'SP 90-alpha	HSPAA1 (HSP90A)	P07900	molekulares Chaperon mit ATPase-Aktivität
	Heat shock protein H'SP 90-beta	HSPAB1 (HSP90B)	P08238	
Hsp100/Clp (E. coli)	Chaperone protein ClpB	clpB	P63284	Regenerierung von Hitze induzierten Schäden

* Bezugsquelle für die Funktion der einzelnen Vertreter: Protein Knowledgebase (UniProtKB)

1.1 Die kleinen Hitzeschockproteine sHsps

Die kleinen Hitzeschockproteine sHsps (**small heatshock proteins**) zeichnen sich durch ihr kleines Molekulargewicht von 15 – 42 kDa aus und liegen in der ungestressten Zelle als Oligomer vor. sHsps kommen in allen Organismen vor und in humanen Zellen sind zurzeit 11 Varianten bekannt. Für HSP26 aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass der unter normalen Bedingungen als 24mer vorliegende Chaperonkomplex durch Induktion von Hitze aktiviert wird und in 12 Dimere zerfällt (Haselbeck *et al.*, 1999). Je ein Dimer bindet ein nicht natives Protein, schützt dieses somit vor Aggregation und reorganisiert sich wieder in seinen Chaperonkomplex nach Freigabe des Proteins. Für diesen Zyklus ist keine Bindung bzw. Hydrolyse von ATP nötig, dadurch unterscheidet sich diese Klasse der Hitzeschockproteine von allen anderen Mitgliedern dieser Familie, da deren Chaperone-Zyklus an die Bindung bzw. Hydrolyse von ATP gekoppelt ist.

1.2 Die Chaperonine (Hsp60)

Die Klasse der Hsp60 oder auch Chaperonine genannt, kann wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden. Die Gruppe I Chaperonine findet man hauptsächlich bei Prokaryoten (GroEL in Bakterien) und in den Mitochondrien, die Gruppe II Chaperonine in Archaeen und im Cytosol von Eukaryoten. Im Gegensatz zu den sHsps wird hier für den Chaperone-Zyklus eine große Menge an ATP benötigt. Dieser Mechanismus wurde am besten für GroEL aus *E. coli* beschrieben (Mayer 2010). Strukturell bildet sich ein Komplex aus zwei Ringen (cis- und trans-Ring), von dem jeder wiederum aus jeweils sieben 57 kDa großen Untereinheiten zusammengesetzt ist. Um Proteine von einer Größe zwischen 30 und 60 kDa in ihre native Form zu überführen, werden jeweils 7 ATP-Moleküle und das Cochaperon GroES benötigt. Dieses aus 10 kDa großen Untereinheiten bestehende Homo-Heptamer setzt sich wie ein Deckel apikal auf den cis-Ring, sobald dieser 7 ATP-Moleküle aufgenommen hat, und schließt das Substratmolekül somit im Inneren des Komplexes ein (s. Abb. 1.1). Durch Hydrolyse der ATPs wird das Substratmolekül in seine native Form überführt und die Freisetzung des Proteins und ADP wird durch die Bindung eines zweiten Substratmoleküls, 7 ATP und GroES (*E. coli*) am trans-Ring ausgelöst.

Die Gruppe II Chaperonine bilden ebenfalls einen Komplex aus zwei Ringen, jedoch setzen sich diese Homo- bzw. Hetero-Oligomere aus jeweils acht oder neun 57 – 61 kDa großen Untereinheiten zusammen. Diese Chaperonine benötigen für den Chaperone-Zyklus kein Cochaperon, durch die Hydrolyse von ATP wird eine Strukturänderung im Komplex ausgelöst, wodurch die apikal liegenden unstrukturierten Bereich eine α -Helix-Loop-Struktur ausbilden und das Substratmolekül im Inneren einschließen (s. Abb.1.1).

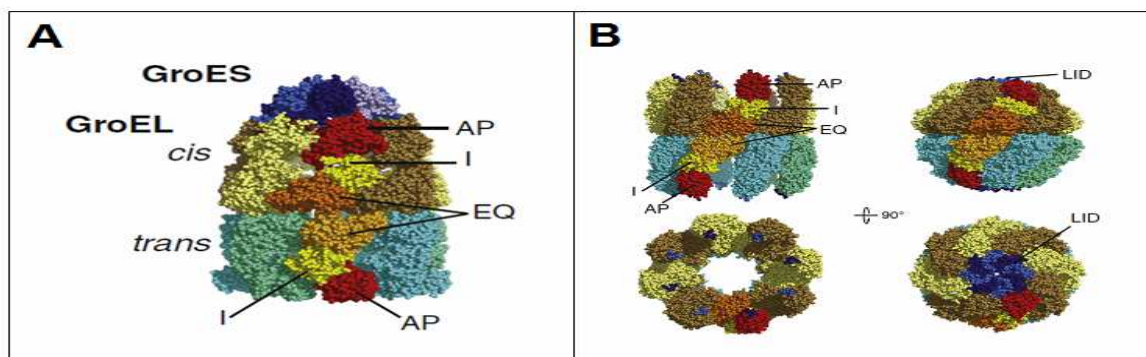


Abbildung 1.1: Struktur der Gruppe I und II Chaperonine

A) Gruppe I Chaperonin GroEL im Komplex mit dem Cochaperon GroES (PDB-Datei 2C7C, Ranson *et al.*, 2006) **B)** Gruppe II Chaperonin Mm-Cpn (*Methanococcus maripaludis*) in der offenen und geschlossenen Form (PDB: 3IYF, Zhang *et al.*, 2010). AP: apikal, I: intermediär, EQ: äquatorial (Mayer 2010)

1.3 Die Hsp70-Chaperone

Die für alle Eukaryoten essentiellen Chaperone der Hsp70-Klasse unterstützen eine Vielzahl von Prozessen, wie z. B. die *de novo* Faltung, Re-Faltung falsch gefalteter Proteine, Solubilisierung von Proteinaggregaten, Transport von Proteinen durch Zellmembranen, Stabilisierung und Aktivierung von nativen Proteinen und natürlich die Reaktion auf Stress-Induktion. Als einzige ihrer Familie liegen sie als Monomere in der Zelle vor. Strukturell setzen sich diese Proteine aus drei Hauptdomänen zusammen, der N-terminal ATPase-Domäne, die für die Bindung von ATP bzw. ADP verantwortlich ist, der Substrat-Bindungs-Domäne mit einer Affinität für hydrophobe Aminosäureseitenketten, und der C-terminalen Domäne, die sich durch einen hohen Anteil an alpha helicalen Strukturen auszeichnet. In der ATP gebundenen Form haben die Mitglieder der HSP70-Familie eine geringe Affinität zu ihren Substratproteinen; die Assoziations- und Dissoziations-Rate ist relativ hoch im Gegensatz zu der ADP gebundenen und der Nucleotid freien Form, hier liegt eine hohe Affinität zwischen beiden Molekülen vor. Die grundlegende ATPase-Rate von HSP70 ist relativ gering, wird jedoch durch Co-Chaperone der Familie der J-Domän-Proteine (JDP, z. B. HSP40) stimuliert. Diese Co-Chaperone binden die Substratmoleküle an HSP70 und durch Stimulation der ATP-Hydrolyse überführen sie so das Chaperon in den Status der hohen Substrataffinität. In Abbildung 1.2 ist dieser Zyklus dargestellt.

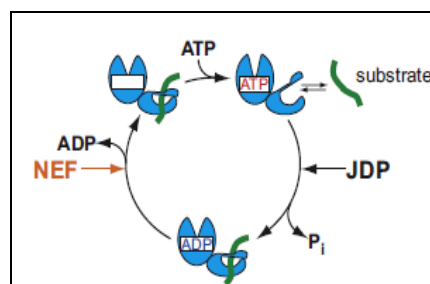


Abbildung 1.2: ATP-Hydrolyse-Zyklus von HSP70

ATPase Zyklus von HSP70 (blau) und Regulation durch JDP (J-Domän-Proteine) und NEF (nucleotid exchange factor) (Mayer 2010)

Durch spezielle NEFs (**n**ucleotid **e**xchange **f**actor) wird ADP von HSP70 freigesetzt, um durch erneute Bindung von ATP schließlich das Substratprotein wieder abzugeben. Die Chaperone der HSP70-Familie sind des Weiteren in vielen Proteinkomplexen eingebunden; im Besonderen wurde dies am HSP90 Chaperone-Pathway für Transkriptions Faktoren (TF) bestimmt. Neben dem TF und HSP70 setzen sich diese Komplexe noch aus HSP90, HSP40, Hop und p23 zusammen (s. Abb. 1.8).

1.4 Die Klasse der HSP90-Chaperone

Wie auch die Klasse der HSP70-Proteine werden die HSP90-Proteine in allen eukaryotischen Zellen exprimiert und zählen mit einem Gehalt von ca. 1 – 2 % im Zytosol ungestresster Zellen zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen, den sog. High-Abundant Proteins (Csermely *et al.*, 1998). Für eukaryotische Zellen sind diese molekularen Chaperone absolut essentiell, wohingegen die HtpG-„knock-out“-Mutante (**high temperature protein G**) in *E. coli* keinerlei Wachstumsdefekte unter normalen Kultivierungsbedingungen zeigt. Diese Mutation führt jedoch zu einem suboptimalen Wachstum, nachdem die Zellen kurzzeitig einem Hitzeschock von 50°C ausgesetzt wurden (Thomas *et al.*, 1998). Involviert sind diese Proteine in eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z. B. Signal Transduktion, Zellzyklus-Kontrolle, Stressmanagement, Faltung, Abbau und Transport von Proteinen.

Die bekannten humanen Varianten der HSP90-Proteine sind die beiden zytosolischen Proteine HSP90-alpha und -beta, Grp94 (**g**lucose **r**egulated **p**rotein 94 kDA) im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und TRAP1 (**T**NF **R**eceptor- **A**ssociated **P**rotein 1) in den Mitochondrien. Das proeukaryotische HSP90 Homolog HtpG findet man in den meisten Spezies der Bakterien, wohingegen *Archaea* keinen Vertreter dieser Chaperone-Klasse besitzen. Dieses HSP90 Homolog HtpG entwickelte sich über zwei Gen-Duplikations-Ereignisse in 3 Abstammungslinien, die Gruppe-A, -B und -C. Keines der in den Organellen lokalisierten Vertreter der HSP90 Proteine wurde durch Endosymbiose aus frühen Eukaryoten gebildet, das mitochondriale TRAP und das im ER lokalisierte HSP90B entwickelten sich separat aus den Vorläufern der HtpG Gruppe-A, *Firmicutes* ähnlicher Organismen in sehr frühen Stadien der Entwicklung eukaryotischer Zellen. TRAP ist monophyletisch und man findet es in allen *Metazoa* und einigen *Protista* Spezies, wohingegen HSP90B paraphyletisch ist und in allen Eukaryoten, mit einigen Ausnahmen der Fungi, die es wahrscheinlich verloren haben, vorhanden ist. Das ausschließlich in Pflanzen vorkommende HSP90C und das zytosolische HSP90A aller Eukaryoten sind monophyletisch und entstanden durch unabhängige Gen-Duplikation aus HSP90B. HSP90C duplizierte sich in höheren Pflanzen in die Isoformen HSP90C1 und HSP90C2 wie auch HSP90A in die Isoformen HSP90AA und HSP90AB in allen Vertebraten (Chen *et al.*, 2006).

1.5 Die Hsp100-Chaperone

Wie zuvor erwähnt, kommt die Klasse der Hsp100/Clp-Chaperone nicht im Menschen vor, sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie denaturierte Proteine aus Aggregaten zurück gewinnen können. In ihrer Struktur ähneln sie den Chaperoninen, jedoch bilden sie nur einfache cyclische Hexamere aus. Die Hsp100-Proteine gehören zu der AAA+(ATPases associated with various cellular activities)-Superfamilie, sie besitzen eine bzw. zwei AAA+-Domänen, die sich durch ein Walker A, Walker B, Sensor 1 und Sensor 2-Sequenz-Motif auszeichnen. Die für die ATP-Hydrolyse verantwortliche Arginin der sog. Arginin-Finger in der Sensor 2 Region lagert sich in diesen oligomeren Strukturen nicht intramolekular, sondern vom benachbarten Molekül aus an. In Abbildung 1.3 ist die Struktur für ClpB mit zwei AAA+-Domänen (NBD nucleotid bindig domains) dargestellt (Wendler 2009, 2010).

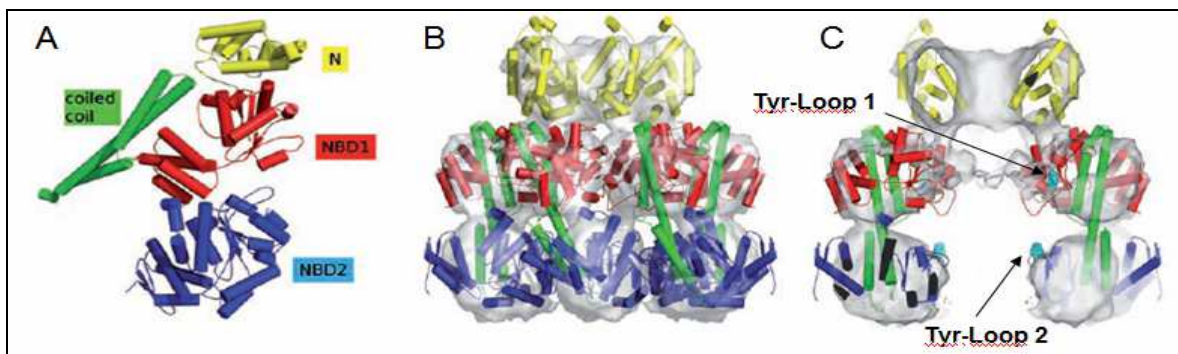


Abbildung 1.3: Monomere-Struktur und Hexameres-Modell von ClpB

A) Kristallstruktur des ClpB-Monomers (PDB: 1QVR_A). N: N-Termini (gelb), NBD1 + 2: nucleotid bindig domains (rot und blau) **B)** Seitenansicht des atomaren Hsp104-Hexamers-Modells in der ATP-gebundenen Form **C)** Querschnitt des atomaren Hsp104-Hexamers-Modells in der ATP-gebundenen Form mit Tyr-Loops (türkis). (Wendler 2010)

Die Nukleotid-abhängige Bewegung in ClpB (Hsp104) wurde von Weibezahn *et al.*, 2004 beschrieben. Sind beide NBDs mit ATP gesättigt, kann das Substratprotein N-Termini am Tyr-Loop1 gebunden werden. Durch Hydrolyse von ATP in der NBD1 wird der Tyr-Loop1 ins Zentrum des Komplexes verlagert und gleichzeitig näher sich der Tyr-Loop2 an die NBD1 an. In diesem Zustand kann Tyr-Loop2 das Substratprotein binden und durch erneute Bindung von ATP in der NBD1 verlagern sich die Loops wieder in ihre Ausgangsposition und das Protein wird Richtung C-Terminus transportiert. Da eine simultane Bewegung beider NBDs durch die Hydrolyse von ATP in der NBD1 stattfindet, trägt die NBD2 entscheidend zum Transport des Substratproteins bei, ohne jedoch selbst eine ATP-Hydrolyse durchzuführen.

2 Struktureller Aufbau der HSP90-Chaperone

Der Vergleich der Kristallstrukturen von Grp94 *Canis lupus familiaris*, Hsp82 *S. cerevisiae* und HtpG aus *E. coli* zeigt, dass die Gesamtstruktur dieser Klasse von Proteinen hoch konserviert ist (Dollins *et al.*, 2007, s. Abb. 1.4). Für die Monomere der *in vivo* vorliegenden Dimere werden für die eukaryotischen als auch für die prokaryotischen Vertreter drei Hauptdomänen beschrieben: die N-Terminale, ca. 25 kDa große Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD), die Mittel-Domäne (MD) und carboxyterminal, die ca. 12 kDa umfassende Dimerisierungsdomäne (DD) (Prodromou *et al.*, 1997, Stebbins *et al.*, 1997, Maruya *et al.*, 1999).

Eine weitere Domäne der sog. „charged linker“ (CL) verbindet die NBD mit der MD. Im Gegensatz zu den drei Hauptdomänen variiert diese Region sehr stark in ihrer Ausprägung zwischen den unterschiedlichen Spezies der HSP90-Proteine (Scheibel *et al.*, 1999).

Ein weiteres hoch konserviertes Motiv (MEEVD), das jedoch ausschließlich bei den eukaryotischen Vertretern dieser Klasse zu finden ist, sitzt am Ende des C-Terminus und bindet Co-Chaperone, die eine sog. TPR-Domäne (Tetratricopeptide-Repeat) besitzen (Scheufler *et al.*, 2000).

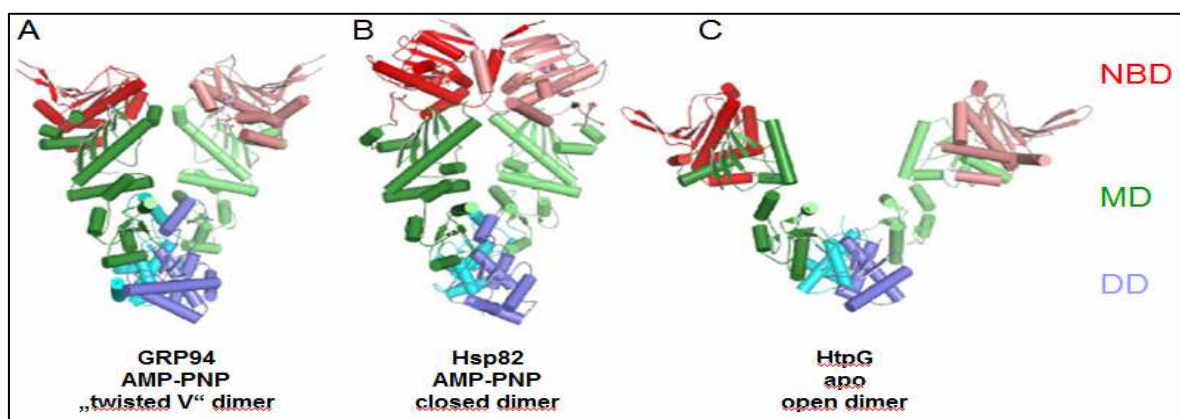


Abbildung 1.4: Vergleich der Hauptdomänen von GRP94, Hsp 82 und HtpG dargestellt als Ribbon-Diagramme

A) GRP94 aus *Canis lupus familiaris* in der AMP-PNP (Adenyl-imidodiphosphonat, nicht hydrolysierbares Analog zu ATP) gebundenen Form, die Charged Linker Region (AS: 287 – 327) wurde entfernt und durch vier Glycin-Reste ersetzt (PDB: 201T, Dollins *et al.*, 2007) B) Hsp82-Sba1-Komplex *Saccharomyces cerevisiae* (HSP90/p23 *Homo sapiens*) in der geschlossenen AMP-PNP gebundenen Form, die Charged Linker Region (AS: 221 – 255) wurde ersetzt durch die Peptid-Sequenz LQHMASVD (PDB: 2CG9, Ali *et al.*, 2006) C) HtpG aus *Escherichia coli* in der vollen Länge, ohne Liganden und offenen Form (PDB: 2IOQ, Shiau *et al.*, 2006)

2.1 Die Nukleotid-Bindungsdomäne der HSP90 Chaperone

Die N-Terminale Bindungsregion für ATP ist die wohl am besten charakterisierte Region der HSP90-Chaperone. 1997 konnten Stebbins und Kollegen zeigen, dass Geldanamycin ein benzochinoides Ansamycin aus *Streptomyces hygroscopicus*, das antiproliferative und antitumor Effekte aufweist, in einer N-Terminale „pocket“ (AS 9 - 232) von HSP90 bindet, und dadurch inhibitorisch auf HSP90 wirkt. Erst später stellte sich heraus, dass in dieser Domäne ATP gebunden und hydrolysiert wird. Diese Tatsache machte Geldanamycin (GA) somit zu einem ATPase-Inhibitor (Prodromou und Pearl 2003).

Die HSP90 Chaperone zeigen eine erstaunlich schwache ATPase-Aktivität, diese ist jedoch *in vitro* als auch *in vivo* essentiell. Für Hsp82 wurde eine Hydrolyserate von 0,4 ATP/min bei 37°C bestimmt und für die humanen Formen eine um den Faktor 10 geringere. (Panaretou *et al.*, 1998, Obermann *et al.*, 1998, McLaughlin *et al.*, 2002).

2.2 Nukleotid abhängige Änderungen in der Tertiärstruktur der HSP90-Chaperone

Zusammen mit der DNA-Gyrase (Topoisomerase II), MutL (DNA-mismatch-repair Enzymen) und den Histidin-Kinasen zählen die HSP90-Chaperone zu der Familie der GHKL ATPasen (Dutta *et al.*, 2000). Alle Vertreter dieser Superfamilie sind Dimere und binden ATP in einer unkonventionellen Art in der sog. Bergerat-Falte. Kristallstruktur-Analysen der HSP90-Proteine in ihrer Apo- (Nukleotid freie Form), ADP- oder ATP-gebundenen Form zeigten deutliche Unterschiede in ihren Tertiärstrukturen (Shiau *et al.*, 2006, Ali *et al.*, 2006). Dies deutete darauf hin, dass die Hydrolyse von ATP eine strukturelle Umorganisation im HSP90-Dimer bewirkt.

So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ATP in der NBD eine Strukturänderung hervorruft, bei der sich die offene V-Form (Apo) in eine geschlossene Konformation umlagert. Die N-Termini nähern sich hierdurch einander an und verändern jeweils ihre Orientierung zur MD.

Cunningham und Kollegen identifizierten hoch konservierte Aminosäuren in der NBD und der MD von Hsc82 aus *S. cerevisiae*, die an diesem Vorgang beteiligt sind, und somit die ATPase-Aktivität modulieren. So spielen die Aminosäuren Thr-22, Val-23 und Tyr-24 in der NBD eine Rolle bei der Hydrolyse von ATP des gegenüberliegenden Monomers, und Leu-372, Leu-374 und Arg-376 in der MD intramolekular (Cunningham *et al.*, 2008). Forscher an der TU München konnten diesen Nukleotid-Abhängigen-Zyklus durch kinetische Messungen mit Fluoreszenz markierten HSP82-Mutanten (Richter *et al.*, 2003) mittels FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) *in vitro* beschreiben (Mickler *et*

al., 2009, Hessling *et al.*, 2009). Das von ihnen beschriebene Modell ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Ausgehend von der offenen Apo-Form bindet ATP in einer schnellen Reaktion (Weikl *et al.*, 2000), gefolgt von einer langsameren Formierung von I_1 , bei der sich die N-Termini immer noch in einer geöffneten Position befinden. Dieser Prozess beinhaltet wahrscheinlich das Schließen des sog. ATP-lid (Richter *et al.*, 2006). Beim Übergang von I_1 nach I_2 dimerisieren die beiden N-Terminale Domänen, woraufhin sich anschließend durch Reorganisation der NBD zur MD die geschlossene Konformation ausbildet. Dieses aktive ATPase Stadium zeichnet sich durch eine langsame Rückreaktion aus. Schließlich erfolgt die Hydrolyse von ATP und die Produkte ADP und P_i lösen sich von HSP90 und die Rückreaktion in die offene Apo-Form erfolgt.

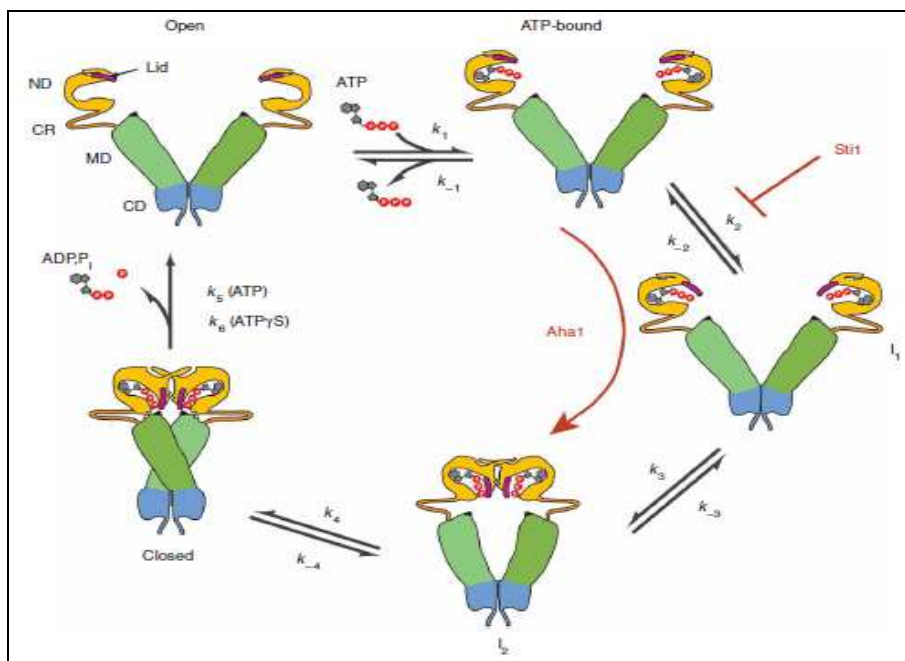


Abbildung 1.5: Modell des HSP90 Zyklus

Open: HSP90 liegt ohne Nucleotid in der offenen C-Terminale dimerisierten Form vor. **ATP-bound:** Die Bindung von ATP erfolgt in einer schnellen Reaktion I_1 : Die Formation von I_1 erfolgt in einer langsameren Reaktion, die N-Termini liegen immer noch in der offenen Form vor. **I_2 :** Dimerisierung der N-Termini **Closed:** Umstrukturierung der NBD und MD in die geschlossene Konformation mit anschließender Hydrolyse von ATP und Dissoziation von ADP und P_i . **Stt1** (hop) blockt die strukturellen Änderungen in einer frühen Phase des Zyklus, **Aha1** induziert strukturelle Änderungen ohne Nucleotid so dass die N-Terminale dimerisierte Form favorisiert wird.

2.3 Die Mittel-Domäne

Die MD ist in erster Linie für die Bindung der Substratproteine verantwortlich. Für die Familie der Protein-Kinasen wurde festgestellt, dass diese gleich zu Beginn der MD im Anschluss an die CL Region der MD binden. In den eukaryotischen HtpG Varianten ist diese CL nicht vorhanden. An die humane HSP90-beta Variante z. B. bindet die Serin/Threonin Kinase Akt/PKB in ihrer phosphorylierten aktiven Form im Bereich der AS 327 – 340. Durch Inhibierung dieser Bindung wird Akt dephosphoryliert und damit inaktiviert (Fontana *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2000). Eine weitere onkogene Tyrosin-Kinase v-*Src* bindet in der gleichen Region wie die zuvor beschriebene Akt/PKB, wohingegen die Bindung des Glucocorticoid Rezeptor (GR), einem Vertreter aus der Familie der Transkriptions Faktoren, durch Mutationen in diesem Bereich nicht beeinflusst wurde. Für die Transkriptions Faktoren konnte eine Bindung in der MD weiter Richtung C-Terminus bestimmt werden. Anhand des GR zeigten Mutationen in Hefe HSP90 der AS 485 und 525 einen fast vollständigen Verlust der GR-Aktivität, jedoch eine gesteigerte Aktivität von v-*Src* im Gegensatz zur Wild-Typ Variante (Hawle *et al.*, 2006).

Eine Bindung von ATP konnte für die isolierte NTB-Domäne von humanem HSP90 *in vitro* nachgestellt werden, jedoch ist diese Domäne alleine nicht in der Lage, eine Hydrolyse von ATP durchzuführen. Für die restlichen Vertreter der GHKL ATPasen konnte außerhalb der NTB ein Bereich ausgemacht werden (Lys 337 und Gln 335 in GyrB), der das γ -phosphat von ATP bindet und somit entscheidend an der Hydrolyse von ATP beteiligt ist (Dutta *et al.*, 2000). Auch für HSP90 wurde mittlerweile ein eindeutiger Zusammenhang mit der Bindung des γ -phosphat von ATP in einem Sequenz-Loop der MD (AS 370 – 390, *S. cerevisiae*) bestätigt. So wurden durch die Mutationen der AS Arg 380 und Gln 384 in Alanin ein totaler Vitalitätsverlust *in vivo* und nur noch minimale ATP-Hydrolyse *in vitro* erzielt (Meyer *et al.*, 2003). Dies zeigt, dass die MD nicht nur für die Bindung von Substratproteinen und Co-Chaperonen notwendig ist, sondern auch noch essentiell an der ATP-Hydrolyse mitwirkt.

2.4 Bindungspartner von HSP90

Das erste Protein, das als Substratprotein für HSP90 beschrieben wurde, war die Protein-Tyrosin Kinase pp60^{v-src} (Brugge *et al.*, 1981, Oppermann *et al.*, 1981). Seit dieser Veröffentlichung stieg die Zahl der identifizierten Substratproteine kontinuierlich an. Eine große Zahl wurde durch Coimmunpräzipitation aus HSP90-Komplexen nachgewiesen und nachdem Geldanamycin aus der Familie der Ansamycin-Antibiotica als Inhibitor von HSP90 beschrieben wurde, konnten diese gezielt zur Identifikation neuer Substrate eingesetzt werden (Whitesell *et al.*, 1992, 1994). Nicht nur Substratproteine konnten über diese Methoden identifiziert werden, sondern auch Proteine, die als Co-Chaperone fungieren. In Tabelle 1.2 sind einige wichtige Vertreter der mittlerweile weit über 200 Substratproteine aus der Familie der Protein-Kinasen, Transkriptions Faktoren und der Chaperone/Co-Chaperone aufgelistet. Die Liste der Proteine, die mit HSP90 eine Interaktion eingehen, erweitert sich ständig und umfasst nicht nur Proteine der oben genannten Protein-Familien.

Tabelle 1.2: HSP90-Bindungspartner aus der Familie der Protein-Kinasen, Transkriptions Faktoren und der Chaperone/Co-Chaperone

Substratprotein	Nachweis	Referenz
Protein-Kinasen		
Akt/PKB (Serin/Threonin Protein Kinase)	Co-Immunpräzipitation	Sato <i>et al.</i> , 2000
PDPK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1)	Co-Immunpräzipitation	Fujita <i>et al.</i> , 2002
c-Raf (Serin/Threonin Protein Kinase)	Inhibierung mit GA	Stancato <i>et al.</i> , 1997
pp60^{src} (Tyrosin Kinase)	Inhibierung mit GA	Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Wee1 (Serin/Threonin Protein Kinase im Zellkern)	Co-Immunpräzipitation	Aligue <i>et al.</i> , 1994
Transkriptions Faktoren		
GR Glucocorticoid Rezeptor	Co-Immunpräzipitation	Sanchez <i>et al.</i> , 1985
PR Progesterone Rezeptor	Co-Sedimentation	Catelli <i>et al.</i> , 1985
AhR Aryl hydrocarbon Rezeptor	Co-Immunpräzipitation	Perdew 1988
MR Mineralocorticoid Rezeptor	Co-Sedimentation	Rafestin-Oblin <i>et al.</i> , 1989
ER Estrogen Rezeptor	Co-Sedimentation	Joab <i>et al.</i> , 1984
Chaperone/Co-Chaperone		
HSP70 Hitzeschockprotein 70	Co-Immunpräzipitation	Murphy <i>et al.</i> , 2001
Aha1 Aktivator von HSP90	Co-Immunpräzipitation	Lotz <i>et al.</i> , 2003
p23 Prostaglandin E-Synthetase	Co-Immunpräzipitation	Hutchison <i>et al.</i> , 1995
cdc37 HSP90 Chaperon	Co-Immunpräzipitation	Whitelaw <i>et al.</i> , 1991
Hop HSP70-Hsp90 Organisations Protein	Co-Immunpräzipitation	Smith <i>et al.</i> , 1993

Unter www.picard.ch/downloads/hsp90interactors.pdf sind die aktuell bekannten Substrat-proteine aufgelistet und werden durch Identifikation neuer Proteine ständig ergänzt.

2.5 Die Dimerisierungsdomäne

1991 konnte von Minami gezeigt werden, dass der größte Teil der beiden zytosolischen HSP90 Varianten aus Mouse lymphoma L5178Y-Zellen als Homodimere vorliegen. Nur ein geringer Anteil der monomeren bzw. höhere oligomere Formen beider Isoformen wurde beobachtet (vgl. Minami *et al.*, 1991). Zur Bestimmung der für die Dimerisierung von HSP90 verantwortlichen Domäne konnte später *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass die C-Terminale-Region von HSP90 für die Dimerisierung verantwortlich ist. Dies gelang *in vitro* durch proteolytische Abspaltung eines ca. 15-kDa großen Segmentes vom C-Terminus mittels m-Calpain, wodurch eine Dissoziation des Dimeres stattfand. Durch Expression einer C-Terminus und einer N-Terminus verkürzten Form als auch der nativen Form von HSP90-alpha in Retikulozyten Lysat konnten die N-Terminus verkürzte und die native Form weiterhin als Dimere nachgewiesen werden. Da die C-Terminus verkürzte Form nur noch als monomere vorlag, gelang somit der Nachweis, dass nur der C-Terminus und nicht der N-Terminus für die Dimerisierung notwendig ist. Eine doppelte Mutation der beiden HSP90-Gene (*hsp82* und *hsc82*) in *S. cerevisiae* hat eine letale Wirkung zur Folge, die durch Expression der humanen HSP90-alpha Variante aufgehoben werden konnte; durch die C-Terminus verkürzte Variante, die auch hier keine Dimerisierung zeigte, jedoch nicht. Dies bekräftigte die Vermutung, dass die dimere Form für die Funktion von HSP90 in der Zelle erforderlich ist (Minami *et al.*, 1994). Wie unter I 2 schon erwähnt, befindet sich bei den eukaryotischen Vertretern der HSP90 C-Terminus ein hoch konserviertes Motiv (MEEVD), das spezielle Co-Chaperone bindet, die ein sog. TPR-Motiv enthalten (Chen *et al.*, 1996). Zu diesen Proteinen zählen die Immunophiline, wie z. B. FKBP51 und FKBP52 (Pratt *et al.*, 2003, 2004), die Serin/Thr-Protein Phosphatase PP5 (Silverstein *et al.*, 1997) und das wohl am besten charakterisierte Adapterprotein Hop (p60), das HSP90 mit HSP70 verbindet (Travers und Fares 2007). HSP70 besitzt ebenso wie HSP90 am Ende des C-Terminus das Motiv MEEVD, worüber es die TPR1 N-Terminus, und HSP90, die TPR2A im mittleren Bereich von Hop bindet. Über diesen HSP90-Hop-Hsp70-Komplex werden ungefaltete Proteine in ihre native Form überführt. Zuerst assoziiert das Substratprotein an HSP70, wo es eine partielle Faltung erfährt, und wird anschließend zu HSP90 weitergeleitet, wo die Faltung vervollständigt wird. Dieser Faltungsprozess ist an die ATPase-Aktivität beider Proteine gekoppelt, die dadurch ihre Konformation ändern (Kosano *et al.*, 1998).

2.6 Der Charged-Linker (CL)

Die Kristallisation der HSP90-Proteine zur Strukturaufklärung mittels X-Ray-Analysen (s. Abb. 1.4) gelang nur durch starke Mutationen in der CL-Region, somit konnte eine definierte Struktur für diesen Bereich bislang nicht aufgeklärt werden. Am wahrscheinlichsten wird eine „coiled-coil“-Struktur gehalten, die durch Computer gestützte Berechnungen der Sekundärstruktur vorhergesagt wurde. Diese Linker Region zeichnet sich besonders durch ihren hohen Gehalt an geladenen Aminosäuren aus. So wiederholt sich das Motiv (D/E)(D/E)(D/E)KK fünf Mal in der CL-Region von Hsp82 *S. cerevisiae* (Farrelly *et al.*, 1984, Hainzl *et al.*, 2009). Durch Deletion unterschiedlich langer Fragmente der CL-Region in Hsp82 konnte gezeigt werden dass die vollständige Abwesenheit und sehr kurze CL eine letale Wirkung auf Hefe haben. Die Struktur der ATP-Bindungstasche und somit die Bindung von ATP blieb zwar vollständig in diesen letalen Mutanten erhalten, aber die Hydrolyse von ATP konnte deutlich herabgesetzt werden. Interessanter Weise konnte durch Einfügen artifizierlicher CL diese letale Wirkung rückgängig gemacht werden. Dies zeigte, dass eine gewisse Freiheit zwischen der NBD und der MD nötig ist, um eine effektive ATP-Hydrolyse durchzuführen. Weitere Versuche wurden mit dem Co-Chaperon Aha1 einem ATPase-Aktivator durchgeführt, dieser bindet im Bereich der MD und des CL an HSP90 und stabilisiert die Bindung von Arg380 und der γ -Phosphat-Bindung von ATP (Meyer *et al.*, 2003, 2004, Lotz *et al.*, 2003). Die letalen Varianten waren zwar noch in der Lage, Aha1 zu binden, aber eine Erhöhung der ATPase-Aktivität konnte im Gegensatz zu den Varianten mit einer ausreichend langen CL auch hier nicht gemessen werden. Bindungsversuche mittels Biacore wurden für ein weiteres Co-Chaperon, p23 (Sba1 in Hefe) an den HSP90-Mutanten durchgeführt. Der ATPase Inhibitor p23 bindet an der NBD von HSP90, jedoch nur in der ATP gebundenen Konformation (Chadli *et al.*, 2000, Fang *et al.* 1998, McLaughlin *et al.* 2006, Obermann *et al.* 1998). Auch hier konnte keine Bindung der letalen Mutanten an p23 beobachtet werden, was darauf hin deutet, dass diese Mutanten nicht mehr in der Lage sind, diese für die ATP-Hydrolyse wichtige geschlossene Konformation auszubilden.

Bei der Untersuchung von hydrophoben Wechselwirkungen in der NBD zwischen dem β -Strand 8 und der α -Helix 9 zeigten Alanin-Mutationen des IxL-Motivs (I205A/L207A in *S. cerevisiae*) (s. Abb. 1.6) im β -Strand 8 eine deutlich größere Flexibilität der NBD, wodurch die offene Konformation die Apo-Form begünstigt wurde. Die hieraus resultierende letale Wirkung konnte bei diesen Mutationen durch die Entfernung eines Großteils der CL-Region wieder rückgängig gemacht werden. Durch partiellen tryptischen Verdau zeigten die Alanin-Mutanten einen deutlich stärkeren Abbau, der diese offenere Konformation bestätigte. Bei näherer Betrachtung der CL zeigte sich in diesen Mutanten, dass vor allem

die CL in einer anderen Struktur vorliegen muss. Über Sandwich-ELISA-Experimente konnte diese Hypothese unterstützt werden: Antikörper, die gegen die CL gerichtet sind, binden diese Alanin-Mutanten deutlich besser als die natürlichen Varianten (Tsutsumi *et al.*, 2009). All diese Versuche deuten darauf hin, dass die CL-Region einen entscheidenden regulatorischen Einfluss auf die Funktion von HSP90 hat. Betrachtet man die unterschiedliche Ausprägung der CL-Region in verschiedenen Spezies, so ist in höheren Lebewesen ein deutlich komplexere Ausprägung dieser Region zu erkennen. In Abbildung 1.6 ist ein Clustal X Alignment der CL-Regionen aus HSP90 unterschiedlicher Spezies dargestellt. Angefangen bei *E. coli* über *S. cerevisiae* bis hin zu den humanen Vertretern von HSP90 wächst die CL-Region deutlich an und mit ihr auch die Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren. Diese schon sehr hohe Dichte an negativer Partialladung kann in höheren Eukaryoten noch durch Phosphorylierung von einem bzw. zwei Serin-Resten erhöht werden. Diese Phosphorylierung ist die am häufigsten beschriebene PTM an HSP90 in der Literatur (s. I 3.3).

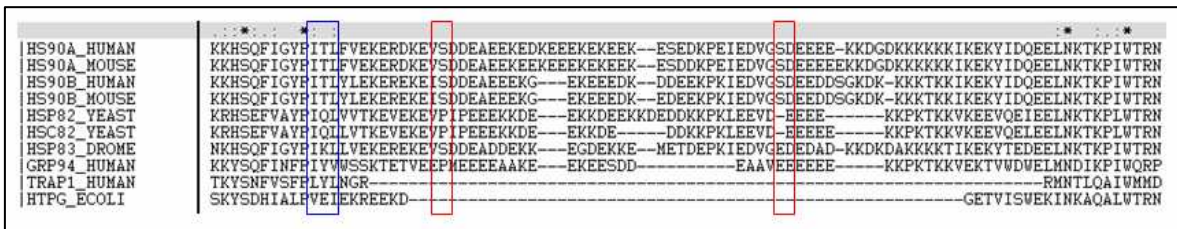


Abbildung 1.6: Clustal X Alignment der CL von HSP90 unterschiedlicher Spezies

Sequenzvergleich der Charged Linger Region aus HSP90 von den zytosolischen Varianten alpha und beta (HS90A und HS90B aus *Homo sapiens* und *Mus musculus*), den humanen Varianten aus dem Endoplasmatischen Retikulum (GRP94) und den Mitochondrien (TRAP1) aus *S. cerevisiae* (HSP82 und HSC82), aus *Dosophila melanogaster* (HSP83) und aus *E. coli* (HTPG). Das IxL-Motiv ist blau und die beiden Serin-Reste die durch die Casein-Kinase II phosphoryliert werden rot markiert. Für das humane HSP90-alpha ist die Sequenz von AS 208 – 300 (IxL-Motiv AS 218 – 220 und die Serin-Reste S₂₃₁ und S₂₆₃) und für HSP82 (AS 195 - 280) dargestellt.

3 Posttranslationale Modifikation (PTM) von HSP90

Die Entwicklung von Hochdurchsatz-Proteomics Techniken im Besonderen mittels massenspektrometrischer Methoden ermöglichte es, eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen an Proteinen eindeutig zu identifizieren. Zu den wohl wichtigsten reversiblen PTM, die an HSP90 identifiziert wurden, zählen die Phosphorylierung, Acetylierung und die Ubiquitinierung. Die meisten Hinweise, die in diesem Zusammenhang zu finden sind, beziehen sich jedoch auf die Phosphorylierung unterschiedlicher Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste.

3.1 Die Ubiquitinierung von HSP90

Ubiquitin ist eine Polypeptidkette, die aus 76 Aminosäuren besteht. Durch eine sog. Isopeptid-Bindung wird Ubiquitin durch die E3-Ligase an den ϵ -Aminorest von Lysin gebunden. Mono- und Multi-Ubiquitinierungen beeinflussen die zelluläre Verteilung und das Bindevverhalten zu anderen Proteinen, wohingegen Oligo- und Poly-Ubiquitinierungen einen Einfluss auf die Stabilität der Zielproteine haben. Von Poly-Ubiquitinierung spricht man, wenn mehr als 5 Ubiquitin-Reste miteinander verbunden sind, diese können wiederum über unterschiedliche Lysin Reste in der Ubiquitinkette miteinander verbunden sein. So ist die Verknüpfung über Lysin 48 ausschlaggebend für den proteasomalen-, und über Lysin 63 für den lysosomalen-Abbau (Hershko and Ciechanover 1992, Barriere *et al.*, 2007). Das Ubiquitin-Proteasom-System spielt eine wichtige Rolle beim Abbau irreparabel gefalteter Proteine. So wurde ein Multikomplex aus Protein, Chaperon und E3-Ligase beobachtet, der eine Poly-Ubiquitinierung falsch gefalteter Proteine erzeugt, wodurch der Abbau durch das Proteasom ermöglicht wird. Für HSP90 ist ein solcher Komplex mit der Ubiquitin Ligase CHIP bekannt, diese bindet über ihre N-Terminale TPR-Domäne an den C-Terminus von HSP90 und ubiquitiniert dessen Substraproteine (Connell *et al.*, 2001). Durch *in vitro* Versuche mit CHIP und HSP90-beta wurden auch dreizehn Lysin-Reste (K107, K204, K219, K275, K284, K347, K399, K477, K481, K538, K550, K607 und K623) eindeutig und zwei weitere in der CL-Region von HSP90-beta über Tandem-Massenspektrometrie identifiziert (Kundrat and Regan 2010).

Durch die Behandlung von Tumorzellen mit Hypericin, das eine inhibitorische Wirkung auf die Chaperon-Aktivität von HSP90 zeigt, konnte eine Ubiquitinierung an HSP90 auch *in vivo* induziert werden. Dieser Nachweis gelang durch Westernblot-Analysen der behandelten Proben, die parallel zum Abbau der Substratproteine Raf-1, p53 und Cdk4 einen deutlichen Anstieg von Ubiquitiniertem HSP90 zeigten (Blank *et al.*, 2003).

3.2 Acetylierung von Lysin an HSP90

Die Acetylierung von Proteinen an Lysin-Resten ist eine dynamische posttranslationale Modifikation und spielt eine sehr wichtige Rolle in der Regulation der Transkription und DNA-abhängiger Zellkern-Prozesse. Ursprünglich wurde diese Modifikation an Histonen schon vor über 40 Jahren entdeckt (Vidali *et al.*, 1968), es dauerte jedoch weitere 30 Jahre, bis auch die ersten nicht Histon-Proteine entdeckt wurden, die auch durch Acetylierung modifiziert werden. Der Transfer einer Acetyl-Gruppe vom Acetyl-Coenzym A auf den ϵ -Aminorest von Lysin erfolgt durch die N-alpha-Acetyltransferasen (NATs), einer Sub-Familie der GNAT Superfamilie von Acetyltransferasen, zu der auch die Histon-Acetyl-Transferasen gehören (HAT). Die Deacetylierung wird durch die Histon-Deacetylasen (HDAC) katalysiert, die in drei Hauptgruppen unterteilt werden können. Die Klasse I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) und Klasse II (Klasse IIA HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 und Klasse IIB HDAC6, HDAC10) der Histondeacetylasen binden Zink in ihrem katalytischen Zentrum und zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Aktivität durch Trichostatin A (TSA) und Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibiert werden kann. Die Klasse I HDACs findet man ausschließlich im Nukleus, wohingegen ein aktiver Transport der Klasse IIA zwischen Nukleus und Zytoplasma stattfindet. Die Klasse III der HDACs benötigen kein Zink im Aktiv-Zentrum, sind jedoch absolut auf NAD⁺ angewiesen und ebenfalls im Nukleus und im Zytoplasma lokalisiert. Die Klasse IIB, die fast ausschließlich im Zytoplasma vorkommt, unterscheidet sich noch in einem weiteren Detail, da diese Vertreter im Gegensatz zu allen anderen zwei katalytische Zentren besitzen (Dokmanovic *et al.*, 2007).

Durch Inhibierungsversuche mit den zuvor beschriebenen Inhibitoren für die Klasse I und II HDACs konnte eine Hyperacetylierung von HSP90 und einem daraus resultierenden Abbau von einigen Substratproteinen gezeigt werden (vgl. Bali *et al.*, 2005). Ein Zusammenhang der reversiblen Acetylierung an HSP90 und der Aktivierung von Transkriptions Faktoren wurde von Kovacs *et al.*, 2005 anhand des Glucocorticoid Rezeptors beschrieben (s. Abb. 1.7). Sie identifizierten die HDAC6 als physiologische Deacetylase von HSP90 durch Co-Immünpräzipitationen aus unterschiedlichen Zelllinien. Durch siRNA-„knock-down“ der HDAC6 erfolgte eine Hyperacetylierung von HSP90 und eine daraus resultierende destabilisierende Wirkung auf die Bindung zum GR. Eine Acetylierung von HSP90 scheint jedoch nicht ausschließlich von der HDAC6 katalysiert zu werden, so konnte eine Hyperacetylierung auch durch Inhibierung mit dem Klasse I HDAC-Inhibitor FK228 (FR901228 / Depsipeptide) beobachtet werden (Yu *et al.*, 2002, Furumai *et al.* 2002). Durch Markierung mit [¹⁴C]Acetat konnte eine Acetylierung in den humanen Varianten HSP90alpha- und -beta an einem hoch konservierten Lysin-Rest im

Übergangsbereich der CL in die MD entdeckt werden (K294 α /287 β). Mutationsversuche dieses Restes durch Glutamin (Q) bzw. Alanin (A), die die acetylierte Form imitieren, zeigte sich eine deutliche verminderte Bindung zu Substratproteinen (p53 und Androgen Receptor) sowie zu Co-Chaperonen (p23 und cdc37). Im Gegensatz dazu konnte durch eine Arginin(R)-Mutante, die eine nicht acetylierbare Form darstellt, die gleiche Bindung zu den Partnerproteinen wie zu der wild Typ Variante festgestellt werden (Scroggins *et al.*, 2007).

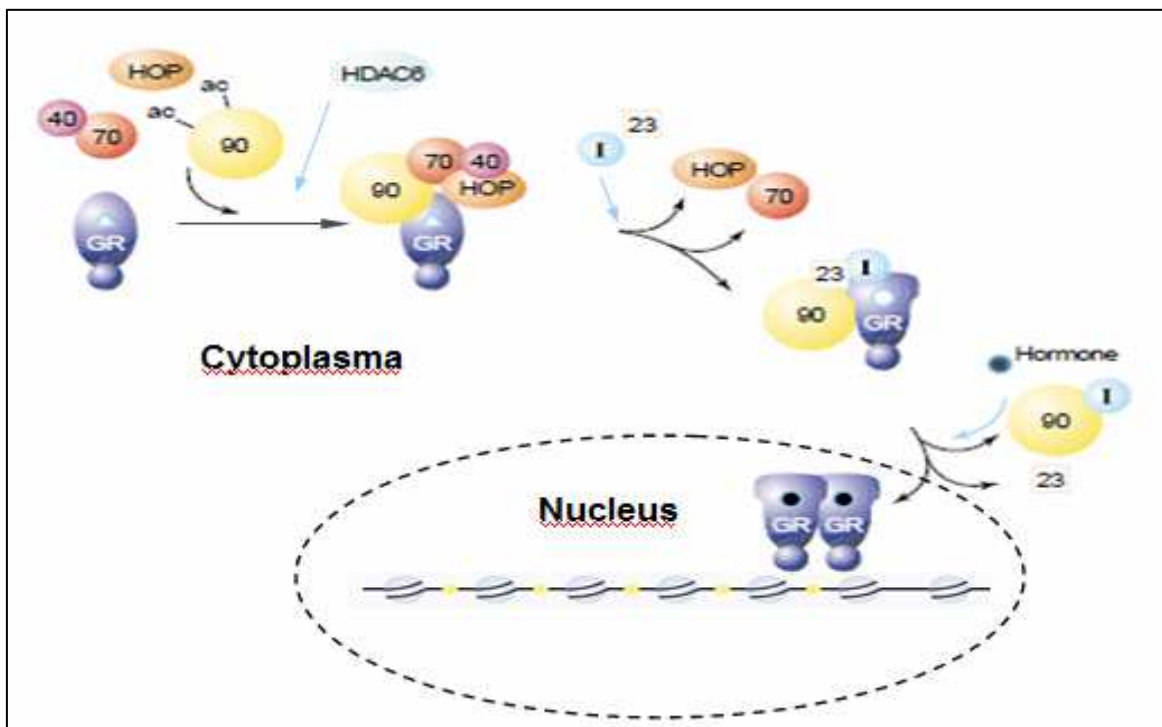


Abbildung 1.7: Acetylierung von HSP90 im Verlauf der Glucocorticoid Rezeptor Reifung

HSP90 liegt in seiner acetylierten Form unkomplexiert vor. Die Deacetylierung durch die HDAC6 erlaubt die Ausbildung des HSP90-Hop-HSP70-HSP40-Komplex (s. I 2.5), der für die Bindung des unreifen Glucocorticoid Rezeptor nötig ist. Die anschließende Dissoziation von Hop und p23 erlaubt die Reifung des Glucocorticoid Rezeptor. Durch Bindung des Hormons dissoziiert der Glucocorticoid Rezeptor vom HSP90-Komplex, dimerisiert, wandert in den Nucleus und bindet an das Hormon Response Element im Promotor und induziert die Transkription (modifizierte Abbildung von Aoyagi und Archer 2005).

Bei einer Analyse über hoch auflösende Massenspektrometrie konnten 3600 Acetyl-Lysine in 1750 Proteinen detektiert werden. Sieben modifizierte Lysinreste konnten für HSP90-alpha (AS-Position: 224, 410, 443, 458, 489, 576, 585) und acht für HSP90-beta (AS-Position: 275, 284, 354, 399, 402, 435, 481, 585) identifiziert werden (Choudhary *et al.*, 2009). Bei einem weiteren Versuch, bei dem die Acetylierung und extrazelluläre Lokalisation von HSP90-alpha untersucht wurde, konnten sieben weitere Lysin-Reste (AS-Position: 69, 100, 292, 327, 478, 546, 558) über massenspektrometrische Methoden bestimmt werden (Yang *et al.*, 2008). All diese möglichen Acetylierungsstellen in HSP90, die durch Inhibierungsversuch der Histondeacetylasen gefunden wurden, weisen darauf

hin, dass eine reversible Acetylierung über HATs und HDACs ein wichtiger Faktor für die Regulation von HSP90 darstellt.

3.3 Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen an HSP90

Die reversible Phosphorylierung an Hydroxylgruppen von Aminosäureresten gilt als eine der wichtigsten Regulationen von intrazellulären Signalkaskaden. Hierbei wird das γ -Phosphat von einem Phosphatgruppendonor, zumeist ATP, auf ein Substratprotein übertragen. Dieser Transfer wird von Proteinkinasen katalysiert, die einen festen Komplex mit ihrem Substratprotein eingehen.

In der Literatur wird für HSP90 die Casein Kinase II (CK II) als physiologische Kinase der Serinreste in der CL-Region höherer Eukaryoten beschrieben. Durch Isolierung der Casein Kinase II aus Rattenleber gelang es J.J. Dougherty schon 1987, HSP90 durch Co-Präzipitation als Bindungspartner der CK II zu identifizieren. Chromatographisch gereinigtes HSP90 aus HeLa-Zellkulturen, denen [32 P]-Orthophosphat ins Zellkulturmedium zugesetzt wurde, zeigten ein Verhältnis von 2 Mol 32 P pro Mol HSP90. Diese beiden Phosphorylierungsstellen konnten über tryptischen Verdau und Analyse der Peptide den Serinresten in der CL von HSP90-alpha (Serin 231 und 236) und -beta (Serin 226 und 255) zugewiesen werden. Alle vier Serin-Reste enthalten das typische Erkennungsmotif (S-X-X-E/D), das die Substratspezifität der CK II ausmacht (s. Abb. 1.6) (Meggio *et al.*, 1994). Der Nachweis zur Identifizierung der CK II als physiologische Kinase gelang durch Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase der isolierten HSP90-Varianten und anschließender *in vitro* Phosphorylierung mit gereinigter CK II (Lees-Miller und Anderson 1988).

Bei Untersuchungen des Phospho-Proteoms an Tumorzellen werden immer wieder diese beiden Phosphorylierungen an HSP90 beschrieben, so z. B. aus LNCaP-Zellen (Prostata-Tumor-Zelllinie, Giorgianni *et al.*, 2007), aus HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zelllinie, Beausoleil *et al.*, 2006), einer Kernfraktion aus HeLa (Beausoleil *et al.*, 2004), humane Jurkat-Zellen (T-Zell-Leukämie-Zelllinie, Mayya *et al.*, 2009) und vielen weiteren. Trotz der frühzeitigen Identifikation dieser Phosphorylierungsstellen der beiden HSP90-Formen und dem häufigen Nachweis bei Phospho-Proteom-Analysen ist in der Literatur nur sehr wenig über die Funktionalität dieser PTM in der CL-Region von HSP90 zu finden. Anhand des Reovirus Attachment Protein sigma1 konnte gezeigt werden dass dieses nur an die unphosphorylierte HSP90-Form bindet und durch die HSP90 Phosphorylierung freigesetzt wird (Zhao *et al.*, 2001). Einige wenige Versuche wurden mit Mutationen der Serin-Reste in der CL-Region und deren Auswirkung auf Partnerproteine durchgeführt.

Um die phosphorylierte Form von HSP90 nachzustellen, wurden die beiden Serin-Reste durch Glutaminsäure (E) und für eine nichtphosphorylierbare Form gegen Alanin (A) ausgetauscht. Diese Versuche mit den Mutanten von HSP90-beta und dem Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) zeigten eine schlechtere Bindung zwischen dem Rezeptor und der Glutaminsäure-Mutation als zu der Wild-typ Variante. Durch die Alanin-Mutante konnte jedoch ein deutlicher Anstieg der Bindung zu dem Rezeptor erzielt werden, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung der CL-Region eine Dissoziation des Chaperon-Komplexes hervorruft (Ogiso *et al.*, 2004). Mit den gleichen Mutationen an HSP90-beta zeigte sich, dass eine Hypophosphorylierung eine starke Inhibierung der Formation des Apoptosom darstellt, das durch die Bindung von Apaf-1 (apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1) und Caspase 9 gebildet wird (Kurokawa *et al.*, 2008). Durch Versuche mit hTERT (Substratprotein von HSP90), einer katalytischen Untereinheit der Telomerase, gelang einer anderen Gruppe von Forschern durch Einschleusung dieser Mutationen in HeLa Zellen der Nachweis, dass die Alanin-Mutation die Telomerase-Aktivität im Gegensatz zur Glutaminsäure-Mutante nicht verstärkt. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Bindung von p23 einen entscheidenden Einfluss auf die Phosphorylierung von HSP90 hat. Die alpha-Untereinheit der für die Phosphorylierung verantwortliche Casein Kinase II bindet nur in Anwesenheit von p23 an HSP90 (Woo *et al.*, 2009). Eine Tyrosin-Phosphorylierung in der NBD (Y24/Y38 Hefe/Human) von HSP90 trat in letzter Zeit in den Fokus. Diese tritt während der S-Phase des Zell-Zyklus auf und wird durch die Tyrosin-Kinase Wee1 katalysiert. Versuche mit einer nicht phosphorylierbaren Mutante (Y38F) von HSP90 hatten einen deutlichen Verlust der Interaktionen mit den Onkogenen v-Src, ErbB2 und Raf-1, jedoch nicht zu den Transkriptionsfaktoren GR und AR zur Folge. Dies demonstrierte zum ersten Mal, dass eine Phosphorylierung von HSP90 einen differentiellen Einfluss auf seine Substratproteine hat. Interessanterweise konnte auch eine deutlich höhere Affinität der Phenylalanin-Mutante zu dem HSP90-Inhibitor GA demonstriert werden, ein Unterschied zu der Bindung von ATP zeigte sich jedoch nicht (Mollapour *et al.*, 2010, Mayer 2010).

4 Inhibierung der ATPase-Aktivität von Hsp90 in der Tumortherapie

Die Identifizierung von HSP90 als Drug Target begann durch die Entdeckung des benzochinoiden Ansamycin Geldanamycin (GA) (De Boer *et al.*, 1970). Zuerst dachte man, dass diese Klasse von natürlichen Substanzen eine inhibitorische Wirkung auf die src Familie der Tyrosin-Kinasen hat und dadurch zytotoxisch auf humane Tumorzelllinien wirkt. Dies wurde widerlegt, als sich herausstellte, dass diese heterozyklischen Substanzen mit einer hohen Affinität an die ATP-Bindungsstellen von HSP90 in der NBD binden und somit die ATPase-Aktivität blockieren (Scheibel *et al.*, 1998). GA weist eine um rund 500-fach höhere Bindungsaffinität als ATP zu HSP90 auf. Das sich strukturell von GA unterscheidende Radicol, das von *Streptomyces* gebildet wird, bindet noch einmal 100fach stärker als GA. Im Laufe der Zeit wurden viele Substratproteine identifiziert, die durch die Inhibierung von HSP90 über Ubiquitinierung der proteosomalen Degradation zugeführt werden. Bei vielen dieser Substratproteine handelt es sich um Proteine, die in onkologische Prozesse involviert sind, wie Akt, Met, Telomerase und viele mehr (Neckers 2007). Diese Tatsache machte HSP90 zu einem potentiellen Drug Target für die Anti-Tumor Behandlung. In präklinischen und klinischen Studien stellte sich heraus, dass HSP90-Inhibitoren *in vivo* in solchen Dosen verabreicht werden konnten, bei denen das Tumorwachstum signifikant beeinflusst wurde, aber eine Toxizität auf normales Gewebe nicht beobachtet wurde (Xu *et al.*, 2003, Vilenchik *et al.*, 2004, Banerji *et al.*, 2005). Zurzeit befinden sich über 10 HSP90-Inhibitoren auf der Basis chemischer Moleküle in der klinischen Entwicklung. Der am weitesten entwickelte Inhibitor ist 17AAG in der klinischen Phase III. Dieses 17-Allylamino-Derivat von Geldanamycin wurde entwickelt, da GA hepatotoxische Eigenschaften aufwies. In Abb. 1.8 ist die chemische Struktur von GA, Radicol und deren Derivaten dargestellt.

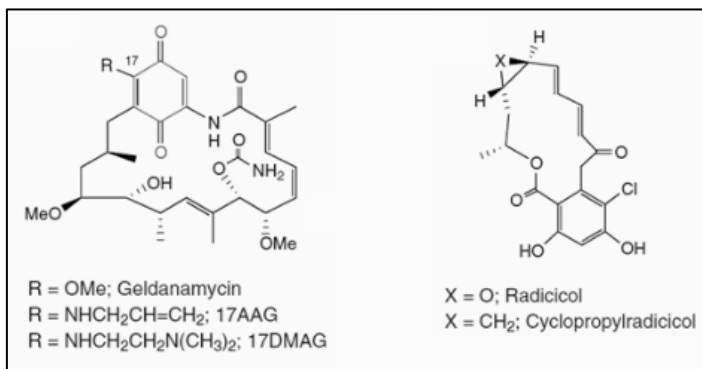


Abbildung 1.8: Natürliche Inhibitoren der ATPase-Aktivität von HSP90
 Modifizierte Abbildung von Chiosis *et al.*, 2004

5 Problemstellung

Die Fragestellung für diese Arbeit ergab sich aus zwei paradoxen Beobachtungen in Bezug auf die selektive Inhibierung der HSP90-ATPase-Aktivität in Tumor-Zelllinien und Maus-Xenograft-Modellen. Zum einen bindet rekombinantes HSP90 *in vitro* mit einer mikromolaren Affinität an 17AAG, wohingegen nanomolare Konzentrationen für eine Inhibierung der Tumor-Zelllinien *in vivo* ausreichen. Die höhere Bindeaffinität von HSP90 zu 17AAG aus Tumor-Zelllinien im Vergleich zu normalen Zelllinien wurde durch kompetitive Binde-Assays mit bioGA von Kamal *et al.*, 2003, nachgewiesen. Sie konnten auch zeigen, dass HSP90 aus Tumorzellen fast ausschließlich in Multi-Protein-Komplexen vorliegt, die eine deutliche Aktivierung der ATPase-Aktivität aufweisen. Diese fast ausschließlich in Tumorzellen vorliegende Bindung zu HSP90 wurde im besonderen für das Co-Chaperon p23, die Prostaglandin E synthase 3 durch Coimmunpräzipitationen nachgewiesen.

Die zweite Beobachtung beruht auf der Tatsache, dass sich HSP90-Inhibitoren in den humanen Tumoren in Maus-Xenograft-Modellen selektiv anreichern, obwohl HSP90 in fast allen Zellen *abundant* vorliegt (Eiseman *et al.*, 2004, Vilenchik *et al.*, 2004).

In Bezug auf diese Beobachtungen wird ein Zusammenhang zwischen der posttranslationalen Modifikation an HSP90 und deren Auswirkung auf die Aktivierung der ATPase Aktivität diskutiert. Bislang konnte keiner der derzeit bekannten PTM an HSP90 eine eindeutige Aktivierung bzw. Deaktivierung der Chaperonfunktion des Proteins zugeordnet werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, herauszufinden ob posttranslationale Modifikationen an der Ausbildung der von Kamal und Kollegen beschriebenen Multi-Chaperon-Komplexen zur Aktivierung der ATP-Hydrolyse von HSP90 beteiligt sind. Hierzu sollte eine geeignete analytische Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, endogenes HSP90 in humanen Zellen zu bestimmen und dessen posttranslationale Modifikationen zu detektieren. Eine quantitative Beurteilung dieser Modifikation(en) sollte in einem zweiten Schritt an stimulierten und nicht stimulierten Zelllinien gezeigt werden. Des Weiteren sollten diese Methoden in der Lage sein, die beiden in humanen Zellen vorkommenden Isoformen, HSP90-alpha und -beta, getrennt voneinander zu beurteilen.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte und Materialien

Analysenwaage	Mettler Toledo	AX205
Brutschrank	Thermo Scientific	Heracell 150
Elektrophorese-System	Novex	X-Cell Sure Lock™ Mini Cell
ESI-Q-TOF	Waters	Synapt G1 HDMS
FACScan-Gerät	BectonDickinson	
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Premium
Gefrierschrank -80°C	GFL	
Inkubator	Eppendorf	Thermomixer comfort
Kühlschrank	Liebherr	Profiline
Kultivierungsflaschen	Nunc	EasyFlasks™
Magnetrührer	IKA	RCT basic
MALDI-TOF/TOF	Bruker Daltonics	Ultraflex III
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 25
Mikrotiterplatte	NUNC	F96 Cert. Maxisorp
Multipipette	Eppendorf	Multipipette plus
Spectrophotometer (Nanodrop)	Peqlab Biotech	ND-1000
pH-Meter	Metrohm	780 pH-Meter
Pipetten	Eppendorf	10, 100 und 1000 µl
Power supply	BioRad	Power-Pac 1000
Protein LoBind® tubes	Eppendorf	
Sterilwerkbank	Thermo Scientific	HeraSafe Typ KSP12 1/PE AC
Ultraschallbad	Bandelin	
Vakuumkonzentrator	Thermo Savant	SpeedVac Plus SC210A
Vortex Mixer	VWR International	ECN-444-1372
Waage	Mettler Toledo	
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore	Milli-Q Gradient A10
Wasserbad	Julabo	SW22
Zentrifuge	Eppendorf	5415 D
Zentrifuge (Microfuge®)	Beckmann Coulter	

HPLC (CapLC)

Binary Pump	Agilent	1100 Series
Wellplate Autosampler	Agilent	1100 Series
Online Degasser	Agilent	1100 Series
Column Thermostat	Agilent	1100 Series
Automatic Fraction Collector	Agilent	1100 Series
Diode Array Detector	Agilent	1100 Series
Capillary Pump	Agilent	1100 Series
Micro Wellplate Autosampler	Agilent	1100 Series
Micro Fraction Collector	Agilent	1100 Series
HPLC Säule	Agilent	Zorbax SB C18

1.2 Chemikalien und Reagenzien

Albumin Standard 2 mg/ml	Thermo Scientific
1,4 Dithiothreitol, für biochemische. Zwecke	Merck KGaA
17AAG	Calbiochem
2-Mercaptoethanol, > 99%	Merck KGaA
2-5 Dihydroxybenzoesäure ≥ 99%	Merck KGaA
Aceton, ≥ 99,8%	Merck KGaA
Acetonitril, ≥ 99,9%	Merck KGaA
Aha1 (rek. Protein)	
Ameisensäure, 98-100%	Merck KGaA
Ammoniaklösung, 25%	Sigma-Aldrich
Ammoniumdihydrogenphosphat z. A.	Merck KGaA
Biotin-Geldanamycin	InvivoGen
BSA Fraktion V, für bioch. Zwecke	Merck KGaA
Calciumchlorid, ≥ 98%	Merck KGaA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat z. A.	Merck KGaA
DMAT (Casein Kinase II, Inhibitor II)	Calbiochem
DMSO z. A.	Merck KGaA
EDTA (Titrplex III), > 99%	Merck KGaA
Essigsäure wasserfrei, 100%	Merck KGaA
Ethanol absolut, ≥ 99,9%	Merck KGaA
[Glu ¹]-Fibrinopeptide B human	Sigma-Aldrich
HEPES	Merck KGaA

HCCA (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure)	Sigma-Aldrich
IQA (Casein Kinase II, Inhibitor IV)	Calbiochem
Kaliumchlorid z. A.	Merck KGaA
Methanol, $\geq 99,8\%$	Merck KGaA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat z. A.	Merck KGaA
Natriumchlorid z. A.	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat, $> 99\%$	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat wasserfrei, $> 99\%$	Merck KGaA
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, 98-100%	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat z. A.	Merck KGaA
Natronlauge, 1 M	Merck KGaA
Nonidet P-40, 10%	Pierce, Perbio Science GmbH
Ortho-Phosphorsäure, 85%	Merck KGaA
p23 (rek. Protein)	Stressgen
Phosphatase Inhibitor Cocktail (Set I)	Calbiochem
Phosphatase Inhibitor Cocktail (Set II)	Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail (Set III)	Calbiochem
Protein kinase CK2, holo enzyme (rek. Protein)	Biaffin GmbH & Co KG
PBS (10 x Puffer pH 7.4)	Ambion
Quinalizarin (Casein Kinase II, Inhibitor V)	Calbiochem
Salzsäure rauchend, 37%	Merck KGaA
Schwefelsäure, 20%	Merck KGaA
Sinapinsäure 98 %	Sigma Aldrich
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare
TBCA (Casein Kinase II, Inhibitor III)	Calbiochem
TMB Tabletten	Sigma Alrich
Trifluoressigsäure (TFA), $\geq 99,8\%$	Merck KGaA
Tris (Trizma, für bioch. Zwecke)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Promega
Trypsin-EDTA, phenol rot (0.05 %)	Invitrogen
Tween ^(R) 20 Molecular Biology Grade	Calbiochem
Wasser (LC-MS grade)	J.T. Baker
Wasserstoffperoxid (30 %) z. A.	Merck KGaA
Zitronensäure-Monohydrat z. A.	Merck KGaA

1.3 Antikörper

1.3.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Subtyp	Verdünnung	Herkunft	Bestell-Nr.
Westernblot					
HSP90 mAK	Maus	IgG1	1 : 1250	BD Bioscience	610419
HSP90-beta mAK	Maus	IgG2b	1 : 3000	Calbiochem	CA1024
HSP90-alpha mAK	Maus	IgG2a	1 : 8000	Acris Antibodies GmbH	AM03143PU-N
HSP90-beta mAK	Maus	IgG2a	1 : 8000	Acris Antibodies GmbH	AM03142PU-N
c-Raf mAK	Maus	IgG1	1 : 1000	BD Bioscience	610151
Akt/PKB mAK	Maus	IgG	1 : 2000	Millipore	05-591
HSP70 mAK	Maus	IgG1	1 : 5000	Stressgen	SPA-810
Acetylated-Lysine pAK	Kaninchen	-	1 : 2000	Cell Signaling	9441
HSP90 pAK	Kaninchen	-	1:500	Cell Signaling	4874
HSP90-beta (pSer226) pAK	Kaninchen	-	1 : 400	abcam	ab63562
HSP90-beta (pSer254) pAK	Kaninchen	-	keine Bindung	Acris Antibodies GmbH	AP02466PU-N
Bindungs-ELISA					
HSP90 mAK	Maus	IgG1	1 : 250	BD Bioscience	610419
p23 pAK	Kaninchen	-	Verdünnung sreihe ab 1,5 µg/ml	EPITOMIC	2731-1

1.3.2 Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Konjugiert mit	Verdünnung	Herkunft	Bestell-Nr.
Westernblot					
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Alkalischer Phosphatase	1 : 2500	Jackson ImmunoResearch	111-055-003
Maus IgG (H+L)	Ziege	Alkalischer Phosphatase	1 : 2500	Jackson ImmunoResearch	115-055-062
Bindungs-ELISA					
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Peroxidase	1 : 5000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003

1.4 Zelllinien und Kultivierungsmedien

1.4.1 Humane Tumor-Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Medium*
A2780	Ovarialkarzinom	European Collection for Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wilshire, England) Nr. 93112519	RPMI 1640 + 10% FKS + 2 mM L-Glutamin
A431	Epidermoidkarzinom Haut	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) Nr. CRL-1555	DMEM + 10% FKS + 2 mM L-Glutamin
HCT116	Kolonkarzinom	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) Nr. CCL247	MEM Eagle + 10% FKS + 2 mM L-Glutamin
SK-BR-3	Adenokarzinom Brust	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) Nr. HTB-30	McCoy's 5A + 10% FKS + 2 mM L-Glutamin

* Alle Komponenten der Medien von Fa. Invitrogen

1.4.2 Humane Primärzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Medium*
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany) C-12200	500 ml Endothel cell 1 Supplement F 25 ml FCS-25 2 ml ECGS/H-2 5 ml hEGF-5 HC-500
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts	PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany) C-12300	500 ml Fibroblast Growth Medium 1 Supplement Pack 10 ml FCS-10 0.5 ml hbFGF-β.5 2.5 ml Insulin-2.5

* Alle Komponenten der Medien von Fa. Promocell

1.4.3 Humane Nicht-Tumor-Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Medium*
HFFF2	Human Caucasian foetal foreskin fibroblast	European Collection fo Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wilshire, England) Nr. 86031405	DMEM + 10% FKS
HS68	Human Caucasian foreskin	European Collection fo Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wilshire, England) Nr. 89051701	DMEM + 10% FKS

* Alle Komponenten der Medien von Fa. Invitrogen

2 Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die unter II 1.4 aufgeführten Zellen wurden in den entsprechenden Medien in einer mit Wasserdampf gesättigten, auf 37 °C temperierten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid in einem Brutschrank kultiviert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht hatten, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 5 min. mit 0.05 % Trypsin-EDTA trypsinisiert. Die Trypsinaktivität wurde mit FKS-haltigem Medium gestoppt und die Zellen bei 500 UpM für 10 min. zentrifugiert. $1,0 \times 10^6$ der im Medium resuspendierten Zellen wurden in T75-Flaschen in 15 ml Medium ausgesät. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das eingesetzte FKS wurde vor Verwendung für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfriermedium: Kulturmedium mit 8 % DMSO

Zur längeren Konservierung der Zellen wurde von frühen Passagen Kryokulturen angelegt. Ca. $1,0 \times 10^6$ Zellen in 1.0 ml Einfriermedium wurden an einem Einfriergerät auf – 80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für das Anzüchten kryokonservierter Zellen wurden diese schnell bei 37°C aufgetaut und in 10 ml Medium überführt. Die Zellen wurden bei 500 UpM für 10 min. zentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 15 ml Medium resuspendiert und in T75-Flaschen ausgesät.

2.3 Inkubation der Zellen mit Inhibitoren

Für die Inhibierungsversuche wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen in 15 ml Medium in T75-Flaschen ausgesät und 48 h im Brutschrank kultiviert. Wurden die Versuche in kleineren bzw. größeren Kultivierungsflaschen durchgeführt, wurden entsprechend der Aussaatfläche mehr oder weniger Zellen ausgesät. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und anschließend in 37°C vorgewärmtem Medium verdünnt. Das Medium wurde nach 48 h abgesaugt und durch die Inhibitor/Medium-Lösung ersetzt. Die so präparierten Zellkulturen wurden für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert.

2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie wird angewandt, um Fluoreszenz markierte Zellen auf Einzelzell-Niveau zu analysieren bzw. zu quantifizieren. Zellzyklusphasen einer Zellkultur können durch Inkubation der Zellen mit Propidiumiodid bestimmt werden. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der stöchiometrisch mit DNA interkaliert. Zellen in der G1/G0-Phase besitzen einen diploiden Chromosomensatz, während Zellen der G2- und M-Phase einen doppelt diploiden Chromosomensatz enthalten. Die Bestimmung des DNA-Gehalts wurde mit einem FACScan-Gerät (BectonDickinson/USA), mit dem die Fluoreszenzintensität (Kanal FL2: 585 nm) auf Einzelzellniveau ermittelt wird, durchgeführt.

- DNA Reagent Kit CycleTEST™ PLUS, Fa. Becton Dickinson

Der Überstand (enthält apoptotische Zellen) der Zellkultur wurde abgenommen. Mit diesem Überstand wurden die trypsinisierten Zellen wie unter II 2.1 beschrieben in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g durch 5-minütige Zentrifugation in der Megafuge (Heraeus) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und ca. $1,0 \times 10^6$ Zellen wurden 2 x mit 1,0 ml PBS gewaschen.

Probenvorbereitung mit dem DNA Reagent Kit:

1. 500 µl Buffer Solution; Zellen waschen, Zentrifugation bei 300 g
2. 100 µl Lösung A; Inkubation: 10 min. RT; Verdau der Zellmembranen und des Zytoskelets (Trypsin)
3. 80 µl Lösung B; Inkubation: 10 min. RT; Inaktivierung von Trypsin und RNA-Verdau
4. 80 µl Lösung C; Inkubation: 10 min. dunkel auf Eis; 125 µg/ml Propidiumiodid

Die Messung sowie die Auswertung erfolgte mit dem Programm Facs-Scan 2.1. Pro Messung wurden jeweils 10 000 Ereignisse aufgenommen.

Geräteparameter:

Kanal	Datenmodus	Detektor	Verstärker	Schwellenwert
FSC	linear	E00	1.34	90
SSC	Linear	410	1.00	50
FL2	linear	320*	1.00	20

* FL2 wurde so eingestellt, dass sich der M1-Peak (G1-Phase) auf der x-Achse bei 200 einstellt

Um G1-Dupletten von der G2/M-Analyse auszuschließen, wurde bei der Auswertung ein sog. Gate gesetzt (s. Dotplot Abb. 2.1).

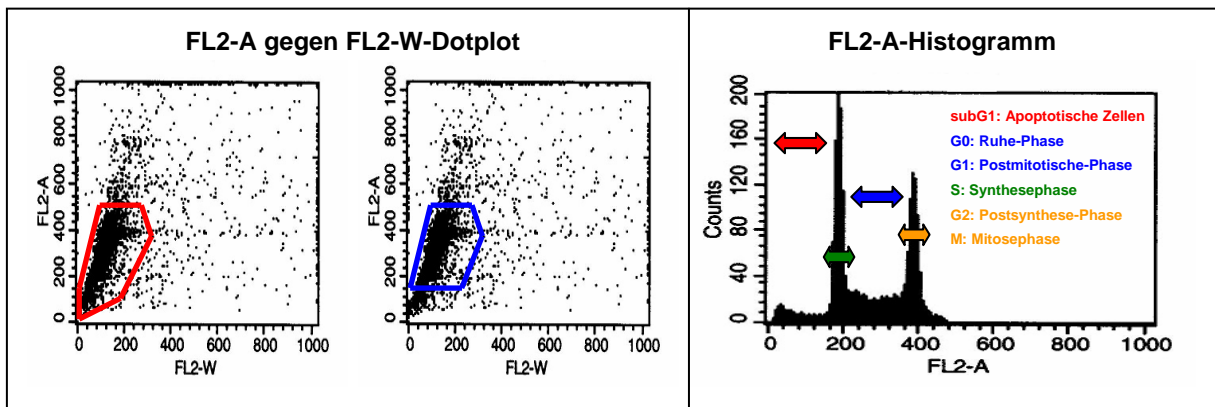


Abb. 2.1: Auswertung am FACScan-Gerät

Schematische Darstellung des FL2-A gegen FL2-W-Dotplots (die rote Markierung zeigt den Messbereich einer FACS-Analyse, die blaue Markierung zeigt den Messbereich, bei dem die apoptotischen Zellen herausgenommen wurden) und das dazugehörige FL2-A-Histogramm einer Zellzyklusanalyse.

3 Proteinbiochemische Methoden

3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse erfolgt durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970). Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem Detergenz, das sehr fest an Proteine bindet und dabei seine negative Ladung auf die Proteine überträgt, wird die eigentliche Ladung der Proteine maskiert, so dass SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladung-Masse-Verhältnisse aufweisen. Demzufolge bewegen sich die negativ geladenen Moleküle im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

In dieser Arbeit wurde das NuPAGE-System der Firma Invitrogen verwendet. Durch ein neutrales Millieu der vorgefertigten Gele sorgt dieses System für maximale Stabilität der Gelmatrix und minimiert unerwünschte Proteinmodifikationen.

- Polyacrylamidgel: NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 10 well, Fa. Invitrogen
- 20 x Elektrodenpuffer: NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer, Fa. Invitrogen
- 4 x Probenpuffer: NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), Fa. Invitrogen
- 10 x Reduzierpuffer: NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) , Fa. Invitrogen

Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit den entsprechenden Volumina Proben- und Reduzierpuffer versetzt und 10 min. bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Gele erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA pro beladene Gelspur für ca. 2 h.

Parallel zu den Proben wurde ein Proteinstandardmarker aufgetragen, um das relative Molekulargewicht detektierter Proteinbanden genauer zu bestimmen.

- Proteinmarker: See Blu ® Plus Pre-Stained Standard, Fa. Invitrogen

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
Myosin	250	210	188	191	210
Phosphorylase	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12% Gel

©1999-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved. IM-1008F 072602

Abb. 2.2: See Blu®Plus Pre-Stained Standard

3.2 Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele

- Färbelösung: SimplyBlue™ Safe Stain, Fa. Invitrogen
- Entfärbelösung: Milli-Q-Wasser

Zur Visualisierung der getrennten Proteine nach der SDS-PAGE wurden die Gele je 3 x für 5 min. mit Milli-Q-Wasser gespült und anschließend für 1 h mit der Färbelösung inkubiert. Um die maximale Sensitivität der Färbung zu erzielen, wurde so lange mit Milli-Q-Wasser entfärbt, bis der Hintergrund wieder klar wurde. Mit dieser Färbung kann eine Nachweisgrenze von 7 ng Protein erreicht werden.

3.3 Western-Blot Analyse

3.3.1 Protein-Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF)

- PVDF-Membran: Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwiches, Fa. Invitrogen
- 20 x Transferpuffer: NuPAGE® Transfer Buffer (20x) Fa. Invitrogen

Der Protein-Transfer von der SDS-PAGE auf die PVDF-Membran erfolgt nach dem Prinzip des Semi-Dry-Blot-Verfahren nach KHYSE-ANDERSON (1984). Über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluieren die Proteine aus der Gel-Matrix auf die PVDF-Membran und werden dort immobilisiert.

Aufgrund ihrer starken Hydrophobizität wird die PVDF-Membran zunächst in Methanol aktiviert und anschließend für 10 min. in Transferpuffer equilibriert. Zu Beginn wurde auf die Anodenseite der Semi-Dry-Blot-Apparatur ein in Transferpuffer getränktes Blotpapier gelegt. Auf dem Papier wurde die equilibrierte Membran aufgelegt und anschließend das Gel luftblasenfrei auf der Membran platziert. Zum Abschluss wurde das Gel mit einem weiteren Blotpapier bedeckt und überschüssiger Transferpuffer durch Rollen mit einer Glaspipette entfernt. Nach dem Auflegen des Deckels (Kathode) wurde pro Sandwich eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt.

3.3.2 Immunfärbung der Protein-Membran

Nach dem Transfer der Proteine aus der Gel-Matrix auf die PVDF-Membran wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit der Blockierlösung abgesättigt. Dies erfolgte für 30 min. bei Raumtemperatur. Nach kurzem Spülen mit Milli-Q-H₂O wurden die Membranen für 1 h bei RT und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in der Primär-Antikörper-Lösung (Verdünnung s. II 1.3.1) inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde 2 x für je 5 min. mit der Waschlösung gespült und anschließend wurde der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundär-Antikörper in der unter II 1.3.2 beschriebenen Verdünnung für 30 min. bei Raumtemperatur aufgegeben. Nach einem weiteren Wasch-Zyklus von 2 x 5 min. mit der Waschlösung wurden wieder unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Zum Abschluss wurden die Membranen für 2 min. mit Milli-Q-H₂O behandelt und durch Aufgabe des Nachweissubstrats NBT/BCIP für 5 – 30 min. wurden die Membranen entwickelt. Mit Ausnahme der Nachweissubstrats (10 ml) wurde von allen Lösungen je 20 ml hergestellt und auf die Membranen gegeben.

WesternBreeze® Blocker/Diluent (part A and B), Fa. Invitrogen
NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets Fa. Roche

- Blockierlösung: 10 ml Milli-Q-H₂O / 4 ml Part A / 6 ml Part B
- Antikörperlösung: 14 ml Milli-Q-H₂O / 4 ml Part A / 2 ml Part B
- Waschlösung: WesternBreeze® Wash Solution (16X) 10 ml / 150 ml Milli-Q-H₂O
- Nachweislösung: 1 Tablette NBT/BCIP in 10 ml Milli-Q-H₂O

3.4 Affinitätsreinigung

Zur Isolierung von „aktivem“ HSP90 aus Zellkulturproben wurde ein biotinyliertes Derivat des HSP90-Inhibitors Geldanamycin and Streptavidin-Sepharose-Beads gebunden und mit den Zelllysaten inkubiert.

- HEPES-Puffer: 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 5mM MgCl₂ + 1 mM EDTA, pH 7,3
- Blockierlösung: 5 mg/ml BSA in HEPES-Puffer
- Streptavidin-Beads: 250 µl in 20 % Ethanol
- bioGA-Lösung: 0,11 mg/ml in HEPES-Puffer

Durchführung:

- 250 µl Streptavidin-Beads 3 x waschen mit je 1000 µl HEPES-Puffer
- Blockieren mit 1,0 ml Blockierlösung (30 Min., RT)
- 1 x waschen mit 500 µl HEPES-Puffer
- Inkubation mit 500 µl bioGA-Lösung (1 h, RT)
- 3 x waschen mit je 1000 µl HEPES-Puffer
- Inkubation mit 1000 µl Zelllysate (3 h, 4°C)
- 3 x waschen mit je 500 µl HEPES-Puffer

Nach den Wasch- bzw. Inkubationsschritten wurde jeweils 5 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Die Beads wurden nach dem letzten Waschschrift direkt mit Proben- und Reduzierpuffer versetzt und die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese (s. II 3.1) getrennt.

3.5 Herstellung der Zelllysate

TBS-Puffer:	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0
Lysepuffer:	1 % NP40, 1:1000 Protease Inhibitor Cocktail PIC III, 1:100 Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIC I + II) in TBS

Bei allen in dieser Arbeit benutzten Zelllinien handelt es sich um adhären wachsende Zellen – die wie unter II 2.1 beschrieben – vor der Zelllyse mit 0,05 %iger Trypsinlösung von der Kultivierungsflasche gelöst wurden. Die Zellen wurden 2 x mit 5 - 10 ml kaltem TBS gewaschen und bei 4 000 g für 5 Min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1.0 ml Lysepuffer versetzt, 15 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei - 20°C gelagert.

3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay)

Das Prinzip des BCA-Assays beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine im alkalischen Medium Cu^{2+} in Cu^{1+} reduzieren. Verantwortlich für diese Reaktion sind in der makromolekularen Struktur des Proteins die vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin sowie die Peptidbindungen. Das BCA-Reagenz (Bicinchoninic Acid) bildet mit Cu^{1+} einen lilafarbenen Komplex, in dem zwei Moleküle BCA und ein Cu^{1+} -Ion komplexieren. Dieser Komplex weist ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm auf und ermöglicht somit eine kolorimetrische Messung.

BCA™ Protein Assay Kit, Fa. Pierce

- BCA™ Reagent A (Bicinchoninic Acid)
- BCA™ Reagent B (4 % Kupfersulfat)
- Albumin Standard 2 mg/ml
- Arbeitslösung: Reagent A/Reagent B (8:1)

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurden 25 µl Probe bzw. BSA-Standard-Lösung in eine 96 Well MTP pipettiert. Durch Zugabe von 200 µl Arbeitslösung wurde die Reaktion gestartet. Die MTP wurde 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend wurde am MTP-Reader bei 562 nm gemessen.

Durch Aufstellen einer Kalibrationsgeraden der BSA-Standardlösungen konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

3.7 Proteolytischer Verdau nach der SDS-PAGE

Trypsin:

Trypsin ist eine Endoproteinase, die spezifisch die Peptidbindung C-terminal von Arginin (R) und Lysin (K) spaltet und als Cofaktor Calciumionen benötigt (Heiland *et al.*, 1976).

Chymotrypsin:

Bei Chymotrypsin handelt es sich um eine Endoproteinase, die vorwiegend die Peptidbindung C-terminal von Tyrosin (Y), Phenylalanin (F), Tryptophan (W), und Leucin (L) spaltet. Eine sekundäre Hydrolyse kann außerdem C-terminal von Methionin (M), Isoleucin (I), Serin (S), Threonin (T), Valin (V), Histidin (H), Glycin (G) und Alanin auftreten.

Die tryptische Hydrolyse der Proteine aus der Gelmatrix wurde unter Zuhilfenahme des ProteoExtract® All-in-One Trypsin Digestion Kit der Fa. Calbiochem® durchgeführt. Folgende Lösungen wurden aus dem Kit verwendet, für die chymotryptische Proteolyse wurde die Trypsin-Lösung durch Chymotrypsin (1 µg/µl) ersetzt:

- Wash buffer
- Reducing agent
- Blocking agent
- Trypsin (1 µg/µl)

Nach der SDS-PAGE (siehe II 3.1) und Färbung des Pacrylamid-Gels mit SimplyBlue™ SafeStain, Fa. Invitrogen (MS-Kompatibel) wurden die Gelstücke zunächst 3 x 5 min. bei 37°C unter Schütteln mit je 100 µl Wash buffer gewaschen. Die Waschlösungen wurden abgenommen und verworfen. Die Gelstücke wurden an der Vakuumzentrifuge für 15 min. getrocknet und anschließend in 100 µl Milli-Q-H₂O aufgenommen.

Evtl. vorhandene Cystin-Brücken wurden durch Zugabe von 20 µl Reducing agent für 10 min. bei 37 °C reduziert. Um eine erneute Bildung von Cystinbrücken zu vermeiden, wurden die Gelstücke für weitere 10 min. bei Raumtemperatur mit 20 µl Blocking agent inkubiert. Der tryptische Verdau wurde für 4 h bei 37 °C mit 5 µl Trypsin (5 µg) durchgeführt.

Im Anschluss an den Verdau wurden die Gelstücke für 10 min bei 14 000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um verbliebene Peptide aus den Gelstücken zu extrahieren, wurden diese mit 100 µl ACN / 5% Ameisensäure (2/1) für 15 min. bei 37 °C inkubiert und erneut für 10 min bei 14 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen und mit den ersten Überstand vereinigt. Diese Lösung wurde vollständig an der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Dieser Rückstand wurde entsprechend der weiteren Verwendung in den entsprechenden Lösungsmitteln aufgenommen.

3.8 Kapillar-HPLC

Die chromatographische Trennung der unter II 3.7 generierten Peptidgemische erfolgte an der Kapillar-HPLC (CapLC) der Fa. Agilent bei einem Fluss von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Je 8 μl Probelösung wurde über eine SORBAX SB-C18 Säule (5 μm ; 150 x 0,5 mm) bei 45 °C aufgetrennt. Es wurden zwei unterschiedliche Fließmittelzusammensetzungen verwendet. Für eine anschließende Auswertung der getrennten Peptide über MALDI-TOF-TOF

Fließmittel A: 0,1 % TFA in 5 % Acetonitril

Fließmittel B: 0,085 % TFA in 95 % Acetonitril

und über ESI-Q-TOF:

Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure in 5 % Acetonitril

Fließmittel B: 0,085 % Ameisensäure in 95 % Acetonitril

Nach der Trennung wurden die getrennten Peptide auf ein MALDI-Target (Prespotted AnchorChip PAC 384 HCCA, Fa. Bruker) gespottet (1 μl / Spot) und nach Abschluss der Chromatographie vollständig getrocknet. Die gesamte Platte wurde für ca. 2 sec. in ein Becherglas mit 1 Liter Waschpuffer (10 mM $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,1 % TFA) getaucht. Anschließend wurde die Platte erneut getrocknet.

Für eine Messung der Proben über ESI-Q-TOF wurde die CapLC direkt mit dem Synap G1 der Fa. Waters gekoppelt.

Fließmittel-Gradient:

Zeit [min]	% B
0	0
10	0
64	50
66	90
76	90
76,1	0
86	0

3.9 In-vitro-Kinase-Reaktion

Die reversible Phosphorylierung an Hydroxylgruppen von Aminosäureresten gilt als eine der wichtigsten Regulationen von intrazellulären Signalkaskaden. Hierbei wird das γ -Phosphat von einem Phosphatgruppendonator, zumeist ATP, auf ein Substratprotein übertragen. Dieser Transfer wird von Proteinkinasen katalysiert, die einen festen Komplex mit ihrem Substratprotein eingehen. Zum Nachweis der Phosphorylierung von HSP90-alpha, -beta, p23 und aha1 durch die Casein Kinase II (CK II), wurden die gereinigten rekombinanten Proteine in Gegenwart von reinem ATP und CK II bei 30 °C für 15 – 30 min inkubiert. Die Reaktion von 10 μ g Substratprotein und 5 μ g CK II wurde in einem 45 μ l Reaktionsansatz in Kinasepuffer (20 mM Tris (pH 7,4), 0,1 mM EGTA, 0,1 % (V/V) beta-Mercaptoethanol, 2 mM MgCl₂ und 30 nM ATP) durchgeführt und durch Kochen in SDS-Probenpuffer (s. II 3.1) bzw. Einfrieren bei – 20 °C gestoppt.

3.10 Bindungs-ELISA

Über einen Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) werden in erster Linie Proteine, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Toxine über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Bei diesem Verfahren wird ein Enzym chemisch an einen Antikörper gekoppelt und dessen katalytische Reaktion dient als Nachweis für die Bindung des Antikörpers an das zu bestimmende Antigen. Die üblicherweise eingesetzten Substrate zeigen dies durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz an. Anhand der Signalstärke kann auch eine quantitative Bestimmung der Antigenkonzentration erfolgen. Durch Kombination unterschiedlicher Antikörper und Proteine können mit diesem Verfahren auch Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Der schematische Aufbau des Bindungs-ELISA – um das Bindeverhalten von HSP90 und dessen Co-chaperone nachzuweisen – ist in Abb. 3.19 dargestellt.

- HEPES-Puffer: 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 5mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 7,3
- TMB Puffer: 24,3 mM Zitronensäure, 51,4 mM Na₂HPO₄, pH 5,0
- Fänger-Antikörper: 1 μ g/ml anti-HSP90 (610419) in 100 mM NaHCO₃, pH 9,6
- Detektions-Antikörper: 1 : 5000 anti-p23 in HEPES + 0,5 % BSA
- Nachweis-Antikörper: 1 : 5000 anti-rabbit-POD in HEPES
- HSP90-Lösung: 0,1 μ g/ml rek. HSP90 in HEPES + 0,5 % BSA
- p23-Lösung: Konzentrationsreihe In HEPES-Puffer ohne Tween
- Blockierlösung: Blocking Reagent for Elisa, Fa. Roche Diagnostics GmbH
- Nachweisreagenz: 1 Tablette TMB in 1 ml DMSO + 9 ml TMB-Puffer + 2 μ l H₂O₂
- Stopplösung: Schwefelsäure 25 %

Für diese Versuche wurden die rek. hergestellten Proteine (p23, HSP90-alpha und HSP90-beta) – wie unter II 3.9 beschrieben – in vitro phosphoryliert und in unterschiedlichen Kombinationen im Versuch eingesetzt. Alle Puffer und Lösungen wurden frisch hergestellt.

Durchführung:

	Inkubation:
- 100 µl Fänger-Antikörper pro Kavität	4°C über Nacht
- 250 µl Blockierlösung	1 h RT
- 3 x waschen mit 250 µl HEPES-Puffer	
- 100 µl HSP90-Lösung	2 h RT + 4 °C über Nacht
- 3 x waschen mit 250 µl HEPES-Puffer	
- 100 µl p23-Lösung	2 h RT + 4 °C über Nacht
- 3 x waschen mit 250 µl HEPES-Puffer	
- 100 µl Detektions-Antikörper	1,5 h RT
- 3 x waschen mit 250 µl HEPES-Puffer	
- 200 µl Nachweis-Antikörper	1 h RT
- 3 x waschen mit 250 µl HEPES-Puffer	
- 100 µl Nachweisreagenz	5 – 15 min.
- 50 µl Stopplösung	
- Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm)	

4 Massenspektrometrische Methoden

4.1 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Bei der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) Massenspektrometrie wird ein Kokristallat von Probe und Matrix mittels Laserenergie verdampft und ionisiert. Während dieses Prozesses geht ein Teil der Laserenergie, die von der Matrix aufgenommen wird, auf den Analyten über und es entstehen zum großen Teil einfach geladene Ionen. Für das Kokristallat werden Probe und Matrix in einem molaren Verhältniss von 1:1000 bis 1:10000 gemischt, auf einen leitfähigen Probenträger aufgebracht und das Lösemittel evaporiert. Das Kristallat wird unter Hochvakuum in der Ionenquelle des Massenspektrometers mit intensiven Impulsen einer kurzwelligen Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden ausgesetzt. Die erzeugten Ionen werden durch ein elektrostatisches Feld in der Quelle des Massenspektrometers auf eine kinetische Energie von einigen Kiloelektronenvolt beschleunigt. Aufgrund von unterschiedlichen Masse/Ladungs- (m/z) Verhältnissen (aber gleicher kinetischer Energie) werden die Ionen in der Beschleunigungsstrecke der Quelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht. Die Separierung der Ionen erfolgt in der folgenden, feldfreien Driftstrecke. Aufgrund der Geschwindigkeitsdifferenzen treffen die Ionen entsprechend ihres m/z -Verhältnisses zu unterschiedlichen Zeiten auf den Detektor am Ende der Driftstrecke. Durch Kalibrierung mit geeigneten Referenzmolekülen können die exakten Flugzeiten bekannter Masse bestimmt werden. Die exakte Masse des Analyten kann somit aufgrund der benötigten Zeit innerhalb der Driftstrecke bestimmt werden. Entsprechend dieser sehr genauen elektronischen Messung der Zeit wird diese Methode als MALDI-„*Time-Of-Flight*“-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) bezeichnet.

In der feldfreien Driftstrecke zerfällt ein Teil der beschleunigten Ionen aufgrund der durch die Ionisierung zugeführten Energie spontan. Diese so genannte metastabile Fragmentierung wird auch als PSD (*post source decay*) bezeichnet. Dieses Phänomen kann für weitere wertvolle Informationen zur Struktur des ursprünglichen Moleküliions genutzt werden.

Die nach dem Zerfall enthaltenen Fragmentionen werden hierzu nach einer gewissen Flugstrecke einer zweiten Beschleunigungsspannung ausgesetzt. Durch die veränderten m/z -Verhältnisse der Fragmente werden diese wiederum auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht und die benötigte Flugzeit in der verbleibenden Driftstrecke lässt auch hier eine sehr genaue Massenbestimmung zu. Diese erneute Beschleunigung erfolgt über eine sog. Lيفةinheit, die in die Flugstrecke integriert wird. Zusätzlich zur Beschleunigung der Fragmentionen ermöglicht die Lيفةinheit eine selektive Abtrennung störender Ionen durch ein elektrisches Feld das nur zum Zeitpunkt des Eintreffens der zu

untersuchenden Masse (Muttermasse) unterbrochen wird. Die Fragmente (Tochtermassen) besitzen zu diesem Zeitpunkt noch die gleiche Geschwindigkeit wie die Muttermasse und können mit dieser in die Liftzelle eindringen. In Abb. 2.3 ist das Fragmentierungsmuster von Peptiden dargestellt. Diese Hauptfragmentserien wurden durch Roepstorff und Fohlman, 1984, beschrieben und benannt.

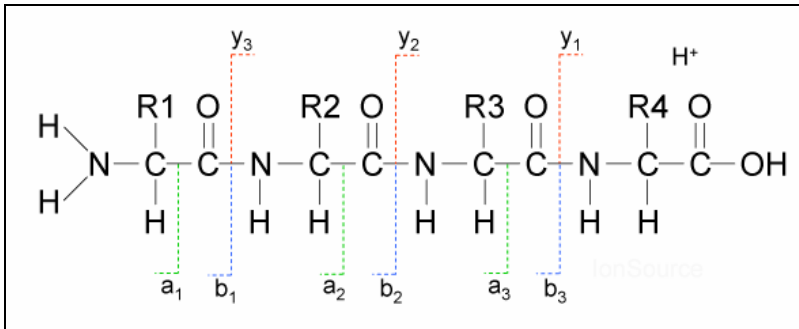


Abb. 2.3: Nomenklatur der Peptidfragmentierung nach Roepstorff und Fohlman

Die am häufigsten auftretenden Fragmente werden als a-, b- und y-Ionen bezeichnet. Die a- und b-Ionen sind N-Terminale und die y-Ionen C-Terminale Fragmente.

4.1.1 Probenvorbereitung Peptide

- Waschpuffer (WP): 10 mM (NH₄)H₂PO₄ + 0,1 % TFA
- Umkristallisierungspuffer: Ethanol / Aceton / WP (6 / 3 / 1)

Bei der hier verwendeten Matrix handelte es sich um die α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA), die sich besonders zur Ionisierung von Peptiden eignet. Von der HCCA wurde eine gesättigte Lösung in Aceton / WP (970 μ l / 30 μ l) hergestellt und auf das MALDI-Target (Anchor Chip®, Fa. Bruker Daltonics) aufgetragen. Nach dem Trocknen der Matrix wurde ca. 1 μ l Probe aufgegeben und erneut bei RT getrocknet. Durch Aufgabe von ca. 2 μ l WP und direkter Abnahme wurde die Probe gewaschen. Zum Abschluss wurde 1 μ l Umkristallisierungspuffer aufgegeben und wieder vollständig bei RT getrocknet.

4.1.2 Probenvorbereitung Proteine

Für Moleküle größer 6000 Da wird im Gegensatz zur Analyse von Peptiden Sinapinsäure (SA) als Matrix verwendet. Von der SA wurde eine Lösung mit der Konzentration von 35 mg/ml in 50% Acetonitril + 0,1 % TFA hergestellt. Je 1 μ l der Matrix wurde auf einem MALDI-Target (MTP 384 target plate ground steel TF, Fa. Bruker Daltonics) mit 1 μ l Proteinlösung gemischt und bei RT getrocknet.

4.1.3 Messparameter

Die MS-Analysen wurden mit dem Ultraflex III MALDI-TOF/TOF von Bruker Daltonik GmbH durchgeführt.

Folgende gerätespezifische Einstellungen wurden für die Messungen im positiven Reflektor-Modus vorgenommen:

Ionenquelle 1: 25,0 kV

Ionenquelle 2: 21,4 kV

Linse: 9,6 kV

Reflektor 1: 26,3 kV

Reflektor 2: 13,7 kV

Die Laserenergie wurde entsprechend an die Probe angepasst. Für jede Probe wurden jeweils zehn Spektren aus unterschiedlichen Bereichen des Spots aufsummiert. Jedes Spektrum wurde mit 100 Laserschüssen (Frequenz: 100 Herz) in einem Massenbereich von m/z 500 – 5000 aufgenommen.

Die MS/MS-Fragmentierung wurde mit der LIFT-Methode und folgenden Einstellungen durchgeführt:

Ionenquelle 1: 8,10 kV

Ionenquelle 2: 7,30 kV

Linse: 3,60 kV

Reflektor 1: 29,50 kV

Reflektor 2: 13,85 kV

Lift 1: 19,00 kV

Lift 2: 3,95 kV

Die Isolationsweite betrug 0,5% der Vorläuferionenmasse. Die Massengenauigkeit für alle extern kalibrierten Analysen betrug < 50ppm für MS und < 1Da für Fragmente der MS/MS-Analyse.

Zur Kalibrierung des Gerätes wurde der Peptide calibration standard II von der Fa. Bruker Daltonics verwendet. Das Lyophilisat wurde in 1250 µl 0,1 % Trifluoressigsäure aufgenommen. 1 µl dieser Lösung wurde wie die Probe behandelt. In Tabelle 2.1 sind die darin enthaltenen Peptide mit ihrer monoisotopischen Masse aufgeführt.

Tabelle 2.1: Peptide calibration standard II

Peptid	[M+H]⁺ Mono isotopic
Bradykinin 1-7	757.3992
Angiotensin II	1046.5418
Angiotensin I	1296.6848
Substance P	1347.7354
Bombesin	1619.8223
Renin Substrate	1758.9326
ACTH clip 1-17	2093.0862
ACTH clip 18-39	2465.1983
Somatostatin 28	3147.4710

Die Auswertung der Analysen wurde mit der Software von Bruker FlexAnalysis und BioTools durchgeführt.

4.2 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Bei dem Elektro-Spray-Verfahren wird ein hohes positives oder negatives Potential an eine die Analytlösung führende Kapillare angelegt. Das angelegte elektrische Feld durchdringt diese und erzeugt, je nach Feldrichtung, positive oder negativ geladene Ionen. Im Zusammenspiel mit einer Gegenelektrode am Analysatorteil des Massenspektrometers und des hieraus resultierenden starken elektrischen Feldes werden die geladenen Teilchen an der Oberfläche der Messlösung angereichert. Die geladenen Gegenionen wandern zur Kapillare und werden dort entladen. Durch diese Wechselwirkungen der Analytmoleküle mit dem starken elektrischen Feld (Anreicherung an der Flüssigkeitsoberfläche) und der entgegen wirkenden Oberflächenspannung der Flüssigkeit entsteht am Ende der Kapillare ein Taylor-Konus, d.h. eine kegelförmige Deformation der Flüssigkeitsoberfläche. Die entstehenden Tröpfchen zerfallen auf dem Weg zum Analysator in immer kleinere Mikrotropfen, bis das gesamte Lösemittel verdampft ist und die Analytionen einzeln in der Gasphase vorliegen. Die Entstehung der Mikrotröpfchen ist auf Lösemittelverlust der Tropfen und dem hieraus resultierendem Erreichen der Raleigh-Grenze zurückzuführen. Hierbei übersteigt die elektrostatische Abstoßung der gleichgeladenen Analytmoleküle im Tropfen dessen Oberflächenspannung und dieser zerfällt. Im ESI wird dieser Zerfall durch Anlegen einer hohen Temperatur und Einbringen eines Gasstromes um den Flüssigkeitsnebel unterstützt. Der Transfer findet bei Atmosphärendruck statt und lässt sich in 4 Schritte unterteilen (s. Abb. 2.4):

1. Die Bildung von kleinen geladenen Tröpfchen aus Elektrolyten. Diese besitzen einen Durchmesser von wenigen Mikrometern und sind hochgeladen.
2. Kontinuierliche Lösungsmittelverluste der Tröpfchen durch Verdampfen, infolge dessen die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt. Dies geschieht bei konstanter Ladung, bis der Radius r das Rayleigh-Limit unterschreitet.
3. Spontaner Zerfall der Tröpfchen in viele kleine Mikrotröpfchen mit nur wenigen Nanometern Durchmesser (Coulomb-Explosionen).
4. Vollständige Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer.

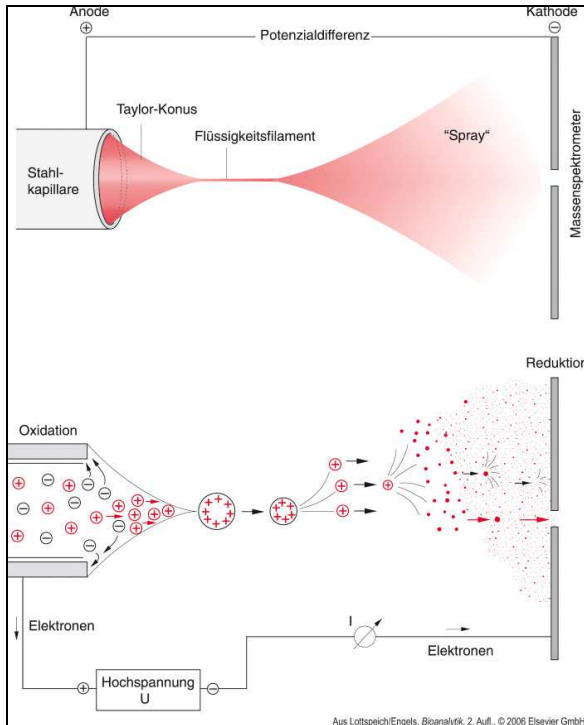


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses

Im oberen Teil der Abbildung ist der makroskopische und im unteren Teil der mikroskopische ESI-Prozess dargestellt. Im Verlauf dieser Elektrospray-Ionisation werden die Ionen aus der Lösung durch Desolvatisierung in die Gasphase gebracht.

Die desolvatisierten Ionen können je nach Größe und Struktur des Moleküls einfach bzw. mehrfach geladen sein. Dadurch können die mittels Elektro-Spray-Verfahrens (ESI) gewonnenen Daten von Peptiden eine enorme Komplexität erlangen. Die Ladung z eines Peptides kann viele verschiedene Ladungszustände annehmen und muss zur Auswertung dekonvuliert, d. h. die theoretisch einfach geladene Masse berechnet werden. Hierzu können sowohl die Abstände der verschiedenen Isotopenpeaks eines Ladungszustandes (berechnet über MaxEnt3 algorithmus, monoisotopische Masse) oder auch die Summenpeaks verschiedener Ladungszustände (berechnet über MaxEnt1 algorithmus, durchschnittliche Masse) herangezogen werden.

4.3 Messparameter

Wie unter 3.8 beschrieben erfolgte die Trennung von je 8 µl Hydrolysat über eine CapLC und die anschließende Messung wurde mit einer Lock-Spray-Quelle durchgeführt. Mittels dieser Quelle kann die Kalibration des Massenspektrometers kontinuierlich überprüft werden, ohne einen Kalibranten in den Analytstrom einzubringen. Hierzu sind in der Quelle 2 Kapillaren (Analyt- und Referenz-Kapillare) eingebaut, die bei gleichen Spannungsparametern abwechselnd als Probenkapillare eingesetzt werden können. Durch den Analyt-Kanal wurde die Probe aus der CapLC ins ESI-Q-TOF eingebracht. Durch den Referenzkanal wurde Glufib mit einer Konzentration von 2 pmol/µl zugeführt. Während einer Messung wurde der Kallibrator alle 30 Sekunden für eine Sekunde vermessen. In der restlichen Zeit wurde ausschließlich die Probe zugeführt. Nach der Messung erfolgte ein Einpunkt-Abgleich mit der vorangegangenen Kalibration. Die Grundkalibration wurde an die tatsächlichen Werte des Referenzkanals angepasst, um durch z. B. Temperaturveränderungen auftretende Änderungen der Driftstrecke zu kompensieren. Die Anpassung erfolgt über 2 Messungen der Referenzsubstanz (30 Sekunden Abstand). Die erhaltenen Kalibrationsparameter wurden auf die Probenspektren zwischen diesen beiden Messpunkten übertragen.

Geräteeinstellung:

Capillary:	3,0 kV
Sampling Cone:	30,0
Extraction Cone:	2,8
Source Temp.:	100 °C
Desolvation Temp.:	250 °C
Cone Gas Flow:	30 L/Hr
Desolvation Gas Flow:	500 L/Hr

Messungen und Auswertung der Analysen wurden mit den Programmen MassLynx und PLGS Global Server (Waters GmbH) durchgeführt.

III Ergebnisse

In humanen Zellen sind zwei Isoformen von HSP90 im Zytosol bekannt, HSP90-alpha und HSP90-beta. Beide Varianten entstanden aus einer Gen-Duplikation vor rund 500 Millionen Jahren (Moore et al. 1998, Krone und Sass 1994).

HSP90-alpha besitzt ein Molekulargewicht von 84,66 kDa (724 Aminosäuren), wohingegen HSP90-beta eine geringfügig kleinere Masse von 83,26 kDa (732 Aminosäuren) aufweist. Wie in Abb. 3.1 zu sehen ist, ergibt sich für einen Sequenzvergleich der beiden Isoformen mittels Clustal W2 eine Sequenzhomologie von ~ 86 %. Da diese hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz ein großes Problem bei der Zuordnung der PTM zu der jeweiligen Isoform darstellen kann, wurde diese Problematik bereits bei der Auswahl der analytischen Methode berücksichtigt.

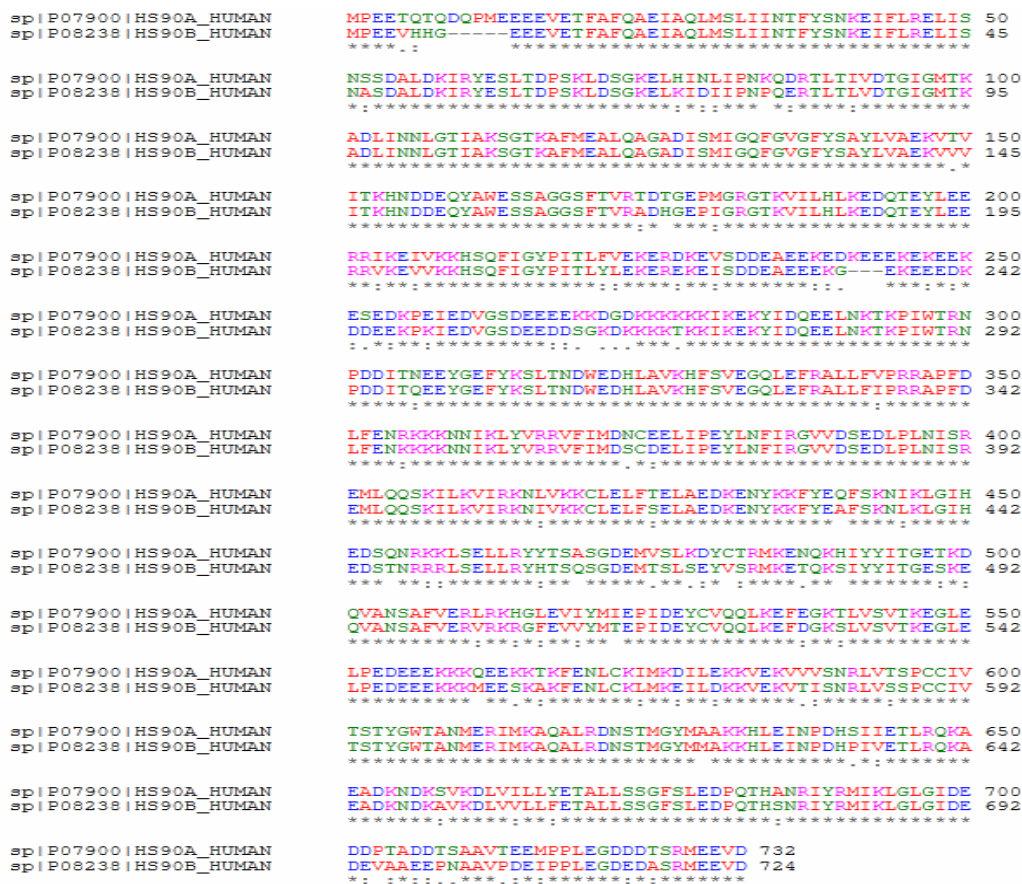


Abb. 3.1: Clustal W2 Alignment von humanem HSP90-alpha und -beta
 Für die Sequenzhomologie ergibt sich ein Wert von ~ 86 %. Die Übereinstimmung in der Aminosäureabfolge sind mit einem * gekennzeichnet.

1 Qualitative Bestimmung posttranslationaler Modifikationen an HSP90

1.1 Auswahl der Analysemethode

Eine Anforderung an eine geeignete biochemische Analysenmethode stellte die hohe Zahl an bereits bekannten Modifikationen wie Phosphorylierungen an Serin, Threonin und Tyrosin sowie Acetylierungen an Lysin (s. Tabelle 3.1) dar. Als am besten geeignet wurde eine Vorgehensweise in Betracht gezogen, bei dem das gereinigte Protein mittels proteolytischer Hydrolyse in definierte Peptide zerlegt wird, die anschließend mittels MALDI-MS-MS bzw. ESI-MS-MS charakterisiert werden. Diese Methode wurde einem immunchemischen Verfahren mittels phospho- bzw. acetyl-spezifischen Antikörpern vorgezogen, da diese eine eindeutige Lokalisation der PTM in der Proteinsequenz zulässt.

Tab. 3.1: Bekannte Posttranslationale Modifikationen an HSP90-alpha und -beta

HSP90-alpha (Accession: P07900)		HSP90-beta (Accession: P08238)	
Aminosäure	PTM	Aminosäure	PTM
5	Phosphothreonine	226	Phosphoserine
7	Phosphothreonine	255	Phosphoserine
224	N6-acetyllysine	261	Phosphoserine
231	Phosphoserine	275	N6-acetyllysine
252	Phosphoserine	284	N6-acetyllysine
263	Phosphoserine	297	Phosphothreonine
313	Phosphotyrosine (by similarity)	305	Phosphotyrosine (by similarity)
399	Phosphoserine	307	Phosphoserine
410	N6-acetyllysine	354	N6-acetyllysine
443	N6-acetyllysine	399	N6-acetyllysine
458	N6-acetyllysine	402	N6-acetyllysine
489	N6-acetyllysine	435	N6-acetyllysine
492	Phosphotyrosine (by similarity)	452	Phosphoserine
576	N6-acetyllysine	481	N6-acetyllysine
585	N6-acetyllysine	484	Phosphotyrosine
		532	Phosphoserine
		568	N6-acetyllysine
		624	N6-acetyllysine
		718	Phosphoserine

Quelle: Protein Knowledgebase (UniProtKB); die unterschiedlichen PTM wurden farblich hervorgehoben.

1.2 Methodenetablierung

1.2.1 Herstellung von rekombinantem HSP90

Zur Entwicklung einer reproduzierbaren enzymatischen Proteolysemethode wurden größere Mengen an rekombinantem (rek.) HSP90-alpha und -beta benötigt. Diese Proteine wurden als His-Tev-Proteine in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Ni-Chelat-Chromatographie gereinigt. Um die endogene Form der Proteine zu generieren, wurde der unspezifische Teil, der His-Tev-Linker, unter Zuhilfenahme der Tev-Protease proteolytisch abgespalten und über eine Größenausschluß-Zentrifugation abgetrennt. Die Herstellung und Reinigung der rekombinanten Proteine wurde mit freundlicher Unterstützung von K. Waurisch in der Abteilung MS-RBN-PDA1 und Pia Stroh in der Abteilung MS-RBN-CDE durchgeführt. Diese so prozessierten Proteine wurden für alle weiteren Versuche eingesetzt.

1.2.2 Theoretischer proteolytischer Verdau von HSP90

Die höchste Massengenauigkeit im Besonderen bei der MALDI-MS-MS-Analyse von Peptiden wird in einem Massebereich von m/z 500 - 3000 Da erzielt; dies entspricht einer Aminosäuresequenz von drei bis max. 20 Aminosäuren. Um eine effektive Spaltung der beiden HSP90-Isoformen in diesem Bereich zu gewährleisten, wurden theoretische Hydrolysen mit den gängigsten Proteasen sowie mit chemischen Agentien wie z. B. BrCN durchgeführt. Durch den hohen Gehalt an Lysin und Arginin wurde – wie erwartet – ein geeignetes Peptid-Muster für den theoretischen Verdau mit Trypsin erhalten. Jeweils zwei Regionen im N-Terminus und eine im C-Terminus bei HSP90-alpha und -beta zeigten relativ große Peptide, die bei der MALDI-Analyse Probleme bereiten könnten. Die „Charged-Linker-Region“ AS 223 – 279 in der alpha- und AS 218 – 271 in der beta-Form (s. Abb. 1.6) zeichnet sich durch eine sehr hohe Wiederholung der sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure sowie der basischen Aminosäure Lysin aus. Durch Hinweise in der Literatur (Siepen *et al.*, 2007) musste davon ausgegangen werden, dass eine Hydrolyse an Lysin/Arginin, das sich in der Nachbarschaft von sauren Aminosäuren befindet, relativ langsam stattfindet – im Vergleich zu Lysin/Arginin-Resten im restlichen Molekül. Dies könnte zu einer erhöhten Bildung von sog. „missed cleavages“ führen, die bei der Auswertung berücksichtigt werden müssten.

Für Chymotrypsin konnten ebenfalls relativ gute Spalt-Muster gezeigt werden, jedoch zeichnet sich diese Protease durch eine hohe Unspezifität aus, die zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führen könnte. Weiterhin besitzt Chymotrypsin keine Spaltstelle in der Charged-Linker-Region, das zu einem kompletten Verlust dieser Region

bei der Analyse führen würde, da das entstehende Fragment deutlich größer als 3000 Da wäre. Bei der Etablierung des proteolytischen Verdaus wurde besondere Aufmerksamkeit auf den zeitlichen Verlauf und das Protein/Protease-Verhältnis gelegt. Bezüglich des zeitlichen Verlaufs ist bekannt, dass lange Inkubationszeiten seitengruppespezifische Modifikationen wie z. B. Deamidierung von Asparagin und Oxidation von Methionin hervorrufen. Weiterhin kann ein zu großes Verhältnis von Trypsin zum Protein unspezifische Schnittstellen der Protease begünstigen. Diese unerwünschten Nebenreaktionen erschweren eine Auswertung bzw. führen zum Verlust dieser Peptide bei der anschließenden Auswertung über die Mascot-Datenbank.

Der tryptische Verdau wurde zunächst mittels des ProteoExtract All-in-One Trypsin Digestion Kit der Fa. Calbiochem durchgeführt.

1.2.3 Optimierung der proteolytischen Hydrolyse von HSP90 mittels Trypsin

Zur Bestimmung der optimalen Verhältnisse beim tryptischem Verdau wurde als erstes der Einfluss der Inkubationszeit bei der Hydrolyse an rekombinantem HSP90-alpha getestet. Es wurde jeweils ein Inkubationsansatz mit 2 µg HSP90 und 0,1 µg Trypsin hergestellt. Die generierten Hydrolysate wurden – wie unter II 4.1 beschrieben – auf dem MALDI-Target aufgebracht und gemessen. Die Massenspektren wurden mit dem Mascot-Programm (www.matrixscience.com) ausgewertet, eine Peptid Toleranz von 0,1 Da und eine missed-cleavages-Rate von max. 2 wurde eingestellt. Die Beurteilung erfolgte anhand der Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Inkubation von 2h im Vergleich zu 4h die Ausbeute nur noch geringfügig von 55 % auf 60 % anstieg. Bei einer Inkubation über 4h fiel der Wert wieder leicht auf 58 % ab. Eine zweite Messung dieser Proben wurde hinsichtlich der Messbarkeit von MS/MS-Spektren der identifizierten Peptide durchgeführt. Für diese Messung wurden jeweils 24 Spots der Hydrolysate auf das Target aufgebracht. Mit der WARP-LC Software von Bruker wurde eine automatische Messung durchgeführt; hierbei wurde von jedem Spot ein MS-Spektrum und anschließend von den generierten Massendaten die entsprechenden MS/MS-Spektren aufgenommen. Die komplexen Einstellungen bei der Durchführung dieser Messungen wurden für alle Proben gleich gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Die Auswertung der Messungen wurde wieder mit der Mascot-Software durchgeführt, als Parameter wurden jetzt 0,2 Da für die Peptid-Toleranz, 1 Da für die MS/MS-Toleranz und wieder eine missed-cleavages-Rate von max. 2 eingestellt. Es wurden nur die MS/MS-Spektren für die Beurteilung benutzt,

die eine eindeutige Zuordnung anhand ihrer Fragment-Ionen-Serie zuließen. Auch hier stellte sich heraus, dass das zeitliche Optimum bei 4 h lag. Deutlicher als bei der Auswertung der MS-Spektren konnte hier gezeigt werden, dass die MS/MS-Daten von 27 % (2 und 4 h) auf 16 % (über Nacht) abfielen. Dieser Abfall kann – wie unter III 1.2.2 erwähnt – unspezifischen Modifikationen zugeordnet werden. Die Inkubationszeit von 4 h wurde für alle weiteren Versuche genau eingehalten.

1.2.4 Trennung der Hydrolysate mittels Kapillar-HPLC (CapLC)

Um das PTM-Muster von HSP90 zu charakterisieren, reichte die direkte Bestimmung aus dem tryptischen Verdau mit einer Sequenzabdeckung von nur 27 % nicht aus. Bei einer hohen Konzentration von Peptiden in der Probe kann es zu starken Wechselwirkungen zwischen den Molekülen kommen, die einen negativen Einfluss auf die massenspektrometrische Messungen haben. Aus diesem Grund musste ein geeignetes Verfahren zur Auftrennung der komplexen Peptidmischung erarbeitet werden. Für diese Problemstellung ist die chromatographische Auftrennung der Peptide mittels Reversed-Phase-Chromatographie die am besten beschriebene Methode. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass auf den Einsatz von ionischen Detergentien im Fließmittel verzichtet werden kann, die einen negativen Einfluss auf die darauffolgende massenspektrometrische Bestimmung hätten. Wie unter II 3.8 beschrieben, wurden 8 µl (maximales Volumen an der CapLC) der tryptisch verdauten Probe direkt injiziert. In Abb. 3.2 ist ein Chromatogramm (UV-Detektion) für den tryptischen Verdau von rek. HSP90-alpha dargestellt. Die Probe wurde über einen Zeitraum von 70 Min. bei einem Fluss von 10 µl/min getrennt. Alle 6 sek. wurde 1µl Eluat auf ein MALDI-Target aufgebracht (Prespotted AnchorChip Target, Matrix: HCCA (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid), 384 Spots Fa. Bruker). Durch den langen Gradienten ergaben sich somit 700 Proben, die auf 2 MALDI-Targets gespottet wurden. Zu Beginn und am Ende der Chromatographie konnten die Proben durch eine ungünstige Zusammensetzung des Fließmittels nicht optimal mit der HCCA kristallisiert werden. Wie in Abb. 3.2 gezeigt, konnten nur gute Messergebnisse in dem gekennzeichneten Bereich zwischen 13 und 64 Minuten erzielt werden.

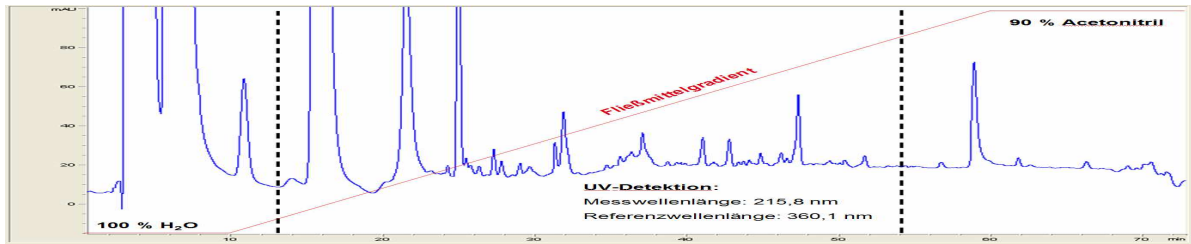


Abb. 3.2: UV-Chromatogramm der tryptisch verdauten Probe von rek. HSP90-alpha

Die UV-Spur der getrennten Peptide ist in blau dargestellt und der eingestellte Fließmittelgradient in rot. Zwischen den gestrichelten Linien ist der Bereich (13 – 64 Minuten) gekennzeichnet, in dem eine Auswertung der Peptide möglich war.

Wie schon unter III 1.2.3 erwähnt, wurden beide Targets auch hier mit einem automatischen WARP-LC-Lauf gemessen. Eine Auswertung über die Mascot-Software konnte hier durch die große Menge an Daten nicht mehr durchgeführt werden; da das Hauptaugenmerk auf den MS/MS-Daten lag, wurden die MS-Daten nicht gesondert ausgewertet. Für die Beurteilung der MS/MS-Spektren wurde BioTools™, eine weitere Software der Fa. Bruker, angewendet. Es konnte gezeigt werden, dass ein sehr großer Bereich der Aminosäuresequenz des rekombinanten HSP90-alpha abgedeckt wurde. Es zeigten sich jedoch Teilsequenzen mit einer hohen Dichte an sauren bzw. basischen Aminosäuren, die nicht detektiert wurden. Ein sehr großer Bereich war die Charged-Linker-Region, die unter diesen Bedingungen nicht erfasst wurde. Da durch die Analyse der Probe ohne chromatographische Auftrennung Peptidfragmente dieser Region nachgewiesen wurden, konnte ein Verlust dieser geladener Peptide nicht an einem unvollständigen Verdau des Proteins liegen, sondern musste andere Ursachen haben. Da geladene Aminosäuren meist ionische Wechselwirkungen mit Anionen bzw. Kationen eingehen, wurde vermutet, dass diese hoch geladenen Peptide in ihrer Salzform zu Beginn der RP-Chromatographie mit hohem Anteil an Wasser im Fließmittel von der Säule eluieren. Wie oben erwähnt, konnten die Proben am Anfang der Trennung, bei einem hohen wässrigen Anteil, nicht auf dem Target kristallisiert werden. Eine Bestimmung in diesem Bereich war daher nicht möglich. Aus diesem Grund wurde bei der Probenvorbereitung, insbesondere bei der Proteolyse, auf den Einsatz von ionischen Zusätzen verzichtet. In Versuchen zeigte sich, dass der enzymatische Verdau von HSP90 in reinem Wasser durchgeführt werden konnte und dass somit eine deutlich höhere Ausbeute von geladenen Peptiden im Messbereich erzielt wurde. Wie zuvor erwähnt, entstehen bei HSP90 im C- und N-Terminus bezüglich ihrer geringen Anzahl an Lysin und Arginin relativ große Peptide bei einem tryptischen Verdau. Das C-Terminale-Fragment konnte trotz seiner hohen Masse eindeutig bestimmt werden. Der Nachweis der N-terminalen-Hydrolyse gelang erst durch eine zweite Analyse, bei der Chymotrypsin als Verdauungs-Enzym eingesetzt wurde. Durch diese Kombination konnte eine

Sequenzabdeckung von über 80 % erzielt werden, was zur Beurteilung des PTM-Musters an endogenem HSP90 ausreichen sollte.

1.3 Beurteilung von endogenem HSP90

1.3.1 Lokalisation von HSP90-alpha und -beta aus Zelllysaten im SDS-Gel

Im nächsten Schritt sollte die an rekombinant hergestelltem HSP90-alpha etablierte Methode an endogenem HSP90 getestet werden. Hierzu wurden vier humane Zelllinien, die Tumor-Zelllinien A2780 (Ovarialkarzinom) und HCT116 (Kolokarzinom) sowie die Nicht-Tumor-Zelllinien HFFF2 (Foetal Foreskin Fibroblast) und HS68 (Foreskin Fibroblast) – wie unter II 2.1 beschrieben – kultiviert. Die Zelllysate wurden – wie unter II 3.1 beschrieben – durch SDS-PAGE getrennt und die Protein-Banden durch Coomassiefärbung detektiert (s. II 3.2). Zur genauen Lokalisierung der beiden HSP90-Isoformen wurde ein Westernblot mit HSP90-alpha bzw. -beta spezifischen Antikörpern durchgeführt (s. II 3.3). Wie erwartet, zeigte sich durch den hohen Gehalt an HSP90 bei der Coomassiefärbung eine deutliche Bande bei 90 kDa, die durch die Westernblot-Ergebnisse eindeutig HSP90-alpha und -beta zugeordnet werden konnten. Eine Trennung der beiden Formen ist durch die SDS-PAGE jedoch nicht gelungen. In der SDS-Page als auch im Westernblot konnte für die Zelllinie HCT116 die stärkste Färbung der HSP90-Bande detektiert werden (s. Abb. 3.3), die auf den höchsten Gehalt an HSP90 hindeutet. Um eine genügend große Menge an Protein zu erhalten, wurde diese Zelllinie für die weiteren Versuche benutzt.

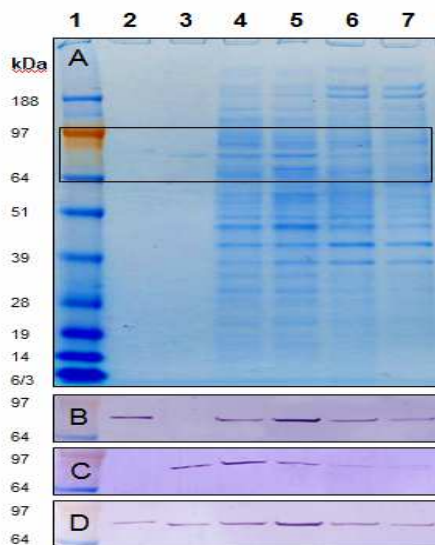


Abb. 3.3: Detektion von HSP90 in Zelllysaten

Je 8 µg Gesamtprotein der Zelllysate aus den Tumor-Zelllinien A2780 und HCT116 sowie den Nicht-Tumor-Zelllinien HFFF2 und HS68 wurden mittels SDS-Page getrennt und Coomassie bzw. Immunchemisch gefärbt. Als Vergleich wurden je 30 ng der rekombinanten Proteine HisTev-HSP90-alpha (lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht proteolytisch gespalten vor) und HSP90-beta aufgetragen.

Spurbelegung: **1)** Proteinmarker **2)** HisTev-HSP90-alpha **3)** HSP90-beta **4)** A2780 **5)** HCT116 **6)** HFFF2 **7)** HS68

A) Coomassiefärbung

B) Anti-HSP90-alpha mouse monoclonal antibody 610419

C) Anti-HSP90-beta mouse monoclonal antibody 5E12

D) Anti-HSP90 rabbit polyclonal antibody 4874

1.4 Analyse von endogenem HSP90-alpha und -beta aus der Zelllinie HCT116

1.4.1 Bestimmung der unmodifizierten Peptide

Bei der Methodenetablierung mittels rekombinant hergestelltem HSP90-alpha wurden für die Analyse 2 µg Protein eingesetzt (s. III 1.2.3). Um die gleiche Menge an endogenem HSP90-alpha und -beta aus Zelllysaten zu gewinnen, musste das gesamte HSP90 aus 200 µg Gesamtprotein isoliert werden, da der Gehalt an HSP90 ~ 1 % des Gesamtproteins in der Zelle beträgt (vgl. Csermely *et al.*, 1998). Da das Protein vor der massenspektrometrischen Bestimmung mittels Trypsin proteolytisch gespalten wird, konnte die entsprechende HSP90-Bande direkt nach der Trennung aus dem SDS-Gel herausgeschnitten werden. Der tryptische Verdau von HSP90 wurde in der Gel-Matrix durchgeführt und die generierten Peptide konnten aus dieser extrahiert werden. Durch dieses Vorgehen konnte gewährleistet werden, dass die Gesamtheit des endogen vorliegenden HSP90 in der Analyse erfasst wurde.

200 µg Gesamtprotein aus dem Zelllysate der humanen Zelllinien HCT116 wurde über die SDS-PAGE getrennt. Da sich ein sehr großes Auftragsvolumen an Probe durch die Probenvorbereitung ergab, mussten mehrere Banden von der gleichen Probe in der SDS-PAGE aufgetragen werden, die anschließend ausgeschnitten, vereinigt und hydrolysiert wurden. Wie unter II 3.7, II 3.8 und II 4.1 beschrieben, wurde die Probe aufgearbeitet, chromatographisch getrennt und über MALDI analysiert. Die Analyse wurde jeweils mit Trypsin und Chymotrypsin durchgeführt. In Abb. 3.4 ist die Auswertung für beide HSP90-Isoformen dargestellt.

HSP90-alpha						HSP90-beta					
10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
MPEETQIQDD	PMEEEEVETF	AFQAEIAQLM	SLIINTFYSN	KEIFLRELIS	NSSDALDKIR	MPEEVHGESE	EVETFAFQAE	IAQLMSLIIN	TFYSNKEIFL	RELISNASDA	LDKIRYESIT
70	80	90	100	110	120	70	80	90	100	110	120
YESLTDPSKL	DSGKELHINL	IPNKQDRILT	IVDTGIGMTK	ADLINNLGTI	AKSGTKAFME	DPSKLDGSGE	LKIDIIIPNFQ	ERTLTLVDTG	IGMTKADLIN	NLGTIARSGT	KAFMEALQAG
130	140	150	160	170	180	130	140	150	160	170	180
ALQAGADISM	IGQFCVGFYS	AYLVAAEKVTY	ITKHNDDQY	AWESSAGGSF	TVRTDTGPEM	ADISMIQGQFG	VGFYSAYLVA	EKVVVITKHN	DDEQYAWESS	AGGSFTVRAD	HGEPIGRGTK
190	200	210	220	230	240	190	200	210	220	230	240
GRGTKVILHL	KEDQTEYLEE	RIKKEIVKHH	SQFIGYPITL	FVEKERDKEV	SDDEAEKED	VILHLKEDQT	EYLEERRVKE	VVKKHSQFIG	YPIITLYLEKE	REKEISDDEA	EEKEGEKEEE
250	260	270	280	290	300	250	260	270	280	290	300
KEEKEKEEEK	ESEDKPEIED	VGSDEEEEEK	DGDKKKKKKI	KEYIDQEEL	NKTKPIWTRN	DKDDEEKPKI	EDVGSDEEED	SGDKKKKTK	KIKEKYIDQE	ELNKTPIWT	RNPDDITQEE
310	320	330	340	350	360	310	320	330	340	350	360
PDDITNEEYG	EFYKSLTNDW	EDHLAVKHFS	VEGQLEFRAL	LFVPRRAPFD	LFENRKKKNN	YGEFYKSLTN	DWEDHLAVKH	FSVEGQLEFR	ALLEIIPRRAP	FDLFENKKKK	NNIKLYVRRV
370	380	390	400	410	420	370	380	390	400	410	420
IKLYVRRVFI	MNCEELIPE	YLNFRIGVVD	SEDLPLNISR	EMLQQSKILK	VIRKNLVKCC	FIMDSCDELI	PEYLNFRIGV	VSEDLPLNI	SREMLQQSKI	LKVIRKNIVK	KCLELFSELA
430	440	450	460	470	480	430	440	450	460	470	480
LELFTLAED	KENYKFFYEQ	FSKNIKLGIH	EDSQNRKKLS	ELLRYYSAS	GDEMSVLKDY	EDKENYKFFY	EAFSKNLKLG	IHEDSTNRRR	LSELLRYHTS	QSGDEMTSLS	EYVSRMKETQ
490	500	510	520	530	540	490	500	510	520	530	540
CTRMKENQKH	IYYITGEFK	QVANSAFVR	LRKHGLEVIY	MIEPIDEYCV	QQLKEFEKGT	KSIYYITGES	KEQVANSFV	ERVRRKGFV	YVMTEPIDEY	CVQQLKEFDG	KSLVSVTRKEG
550	560	570	580	590	600	550	560	570	580	590	600
LVSVTKEGLE	LPEDEEEKK	QEEKTKFEN	LCKIMKDILE	KKVEKVVVSN	RLVTSPPCCV	LELPEDEEEK	KRMEESKAF	ENLCKLMKEI	LDKVKVETI	SNRLVSSPCC	IVTSTYGWTA
610	620	630	640	650	660	610	620	630	640	650	660
TSTYGTWAM	ERIMKAQALR	DNSTMGYMAA	KKHLEINPDH	SIETLRQKA	EADKNDKSVK	NMERIMKAQA	LRDNSTMGYM	MAKKHLEINP	DHPIVETLRQ	KAEADKNDKA	VKDLVLLLEF
670	680	690	700	710	720	670	680	690	700	710	720
DLVILLYETA	LLSSGFSLED	PQTHANRIYR	MIKLGLGIDE	DDPTADDTSA	AVTEEMPPLE	TALLSSGFSL	EDPQTHSNRI	YRMIKLGLGI	DEDEVAEEEP	NAAVPPEIPP	LEGDEDAISM
730											
GDDDTSRMEE	VD					EEVD					

Abb. 3.4: Sequenzabdeckung von endogenem HSP90-alpha und -beta aus der Tumorzelllinie HCT116. Die blau markierten Bereiche stellen die Peptidfragmente aus dem tryptischen Verdau dar, in rot sind die Peptide aus der Hydrolyse mit Chymotrypsin dargestellt. Schwarz sind die Regionen gekennzeichnet, die mit beiden Methoden nicht erfasst wurden.

Für die Bestimmung der Sequenzabdeckung wurden alle MS-MS-Daten bis zu einem Score von 100 herangezogen, da die entsprechenden MS-MS-Spektren noch eine hohe Zahl an Fragment-Ionen zeigten (mind. 25% der Fragmentionen aus einer Serie), die einen zuverlässigen Rückschluss auf das entsprechende Peptid zuließen. Kleinere Peptide, aus drei bis max. sechs Aminosäuren, zeigten sogar noch bis zu einem Score von 40 ein gutes Fragment-Ionen-Muster (min. 2 Fragmentionen aus einer Serie), so dass diese auch noch in die Auswertung mit einbezogen wurden. Die hohe Sequenzabdeckung konnte nur erzielt werden, da eine bis dato wenig beschriebene unspezifische Modifikation von Methionin bei der Auswertung der Spektren mit berücksichtigt wurde (Jones *et al.*, 1994). Bei der genaueren Betrachtung einiger MS/MS-Spektren, die eine um 48,003 Da kleinere Masse aufwiesen als die zu erwartende Masse, konnte eine eindeutige Zuordnung der Fragmentionen zu den Spektren erfolgen, wenn dieser Massenverlust Methionin zugeordnet wurde. Der Verlust von 48,003 Da bedeutet, dass von der Seitenkette das Fragment CH₃-SH von Methionin abgespalten wurde. Diese Modifikation wird während der Probenvorbereitung durch die Behandlung mit Iodacetamid zur Blockierung der Cysteine-Reste hervorgerufen und wurde – wie auch die Carbamidomethyl-Addition an Cystein durch Iodacetamid – bei der Auswertung der Spektren berücksichtigt. In Abb. 3.5 ist ein Fragmentionenspektrum mit der entsprechenden Methioninmodifikation dargestellt.

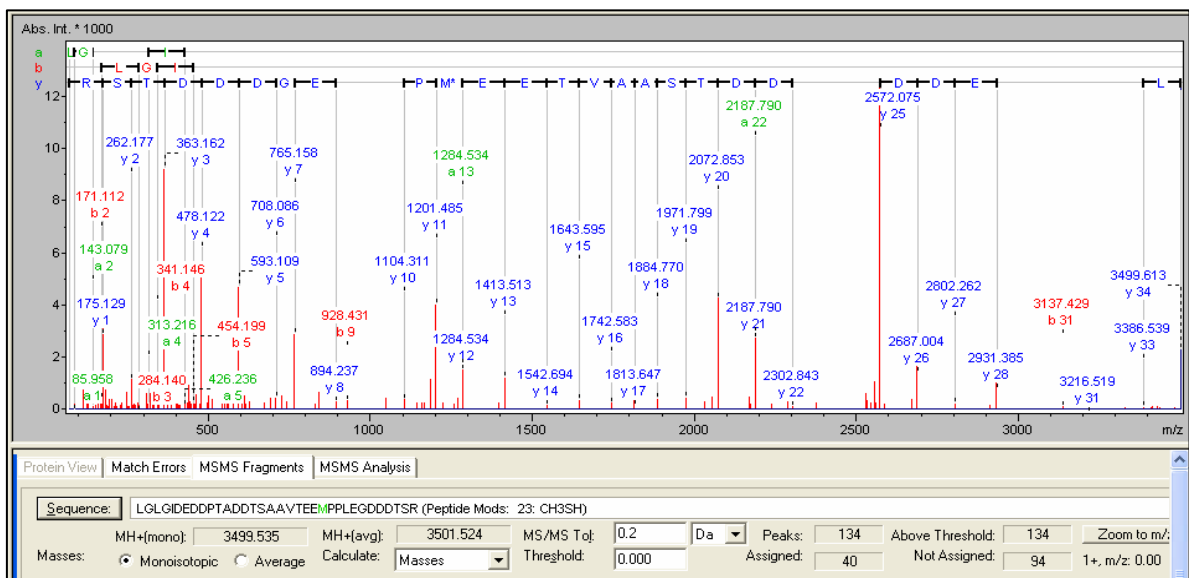


Abb. 3.5: MS/MS-Spektrum eines C-Terminalen Peptids von HSP90-alpha mit unspezifischer Seitenkettenmodifikation von Methionin

Die fast vollständige y-Ionen-Serie des C-Terminalen Peptids LGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLGGDDTSTR aus HSP-90 ist in blau dargestellt. Die Modifikation von Methionin wird in der y-Ionen-Serie durch einen Stern gekennzeichnet und in der Sequence durch eine grüne Markierung. Zur Auswertung der MS/MS-Spektren wurde in der Auswertematrix eine Modifikation von Methionin (- 48,003 Da) eingepflegt, was einen Verlust der CH₃SH-Gruppe aus der Seitenkette der Aminosäure bedeutet. Die Massengenauigkeit der Muttermasse betrug 0,057 Da und für die MS/MS-Toleranz wurde ein Wert von 0,2 Da eingestellt.

Jones und Kollegen zeigten, dass diese Modifikation von Methionin durch milde Reaktionsbedingungen bei der Reduktion und Alkylierung im Verlauf der Probenvorbereitung unterdrückt werden kann. Das hohe Auftreten dieser Modifikation in dieser Arbeit kann darauf zurückgeführt werden, dass die vollständige Probenvorbereitung, Reduktion, Alkylierung sowie der tryptische Verdau in einer komplett salzfreien Umgebung durchgeführt wurde, was eher drastischen als milden Reaktionsbedingungen entspricht.

1.4.2 Prüfung auf posttranslational modifizierte Peptide

Die unter III 1.4.1 generierten Messdaten wurden auf die derzeit bekannten PTM unter Anwendung der beiden Software Tools „Sequenz-Editor“ und „BioTools“ analysiert. Auf eine zu Beginn dieser Arbeit neu entdeckte Modifikation, die Acetylierung von Serin bzw. Threonin, wurde ebenfalls geprüft. Diese neue Modifikation, die eine Phosphorylierung der MAPKK6 (mitogen-activated protein kinase kinase 6) und somit deren Aktivierung blockiert, wurde von Mukherjee *et al.* 2006/2007 durch YopJ aus *Yersinia pestis* beschrieben. Da die Phosphorylierung an Tyrosin auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt, wurde auch auf eine Acetylierung an Tyrosin geprüft.

Bei der Auswertung konnten außer den Phosphorylierungen an Serin in Position 263 in HSP90-alpha und 255 in HSP90-beta keine weiteren PTM detektiert werden. In Abb. 3.6 sind die Fragmentationspektren der beiden Phosphopeptide abgebildet. Während der MS/MS-Analyse der Peptide im Lift-Modus wird die Phosphatgruppe zusammen mit einem Wassermolekül aus dem Peptid gelöst und aus dem Serin und dem benachbarten Glycin entsteht ein Fragment, dem die Masse 18,015 Da (H_2O) fehlt (Serin + Glycin – 18,015). Durch den Nachweis dieses dehydrierten Fragments in der γ -Ionen-Serie konnte eine eindeutige Zuordnung der Phosphorylierung erfolgen, obwohl beide Peptide in ihrer Sequenz zwei mögliche Serin-Phosphorylierungsstellen beinhalten.

Die beiden Phosphopeptide, die durch die MALDI-Analyse bestimmt wurden, befinden sich in der „charged linker“-Region von HSP90-alpha bzw. -beta. In dieser Region der beiden Proteine liegen jeweils noch zwei bekannte Phosphorylierungsstellen, die bei der MALDI-Analyse nicht detektiert wurden. Da die Analyse über die Elektrospray-Ionisierung (ESI) eine deutlich höhere Empfindlichkeit aufweist, wurde der Versuch wiederholt und die Probe nach der Trennung über die CapLC nicht auf ein MALDI-Target gespottet, sondern direkt am SYNAPT nach der Elution von der chromatographischen Säule mittels ESI-Q-TOF bestimmt. Hier konnten nun zusätzlich die beiden Serin-Phosphorylierungen in

Position 231 der Alpha-Isoform und in Position 226 der Beta-Isoform eindeutig über MS/MS-Sequenzierung nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7).

Außer diesen bereits bekannten Serin-Phosphorylierungen konnten durch diese Analysen weder eine weitere der in Tab. 3.1 aufgeführten PTM noch eine zu diesem Zeitpunkt unbekannte PTM detektiert werden.

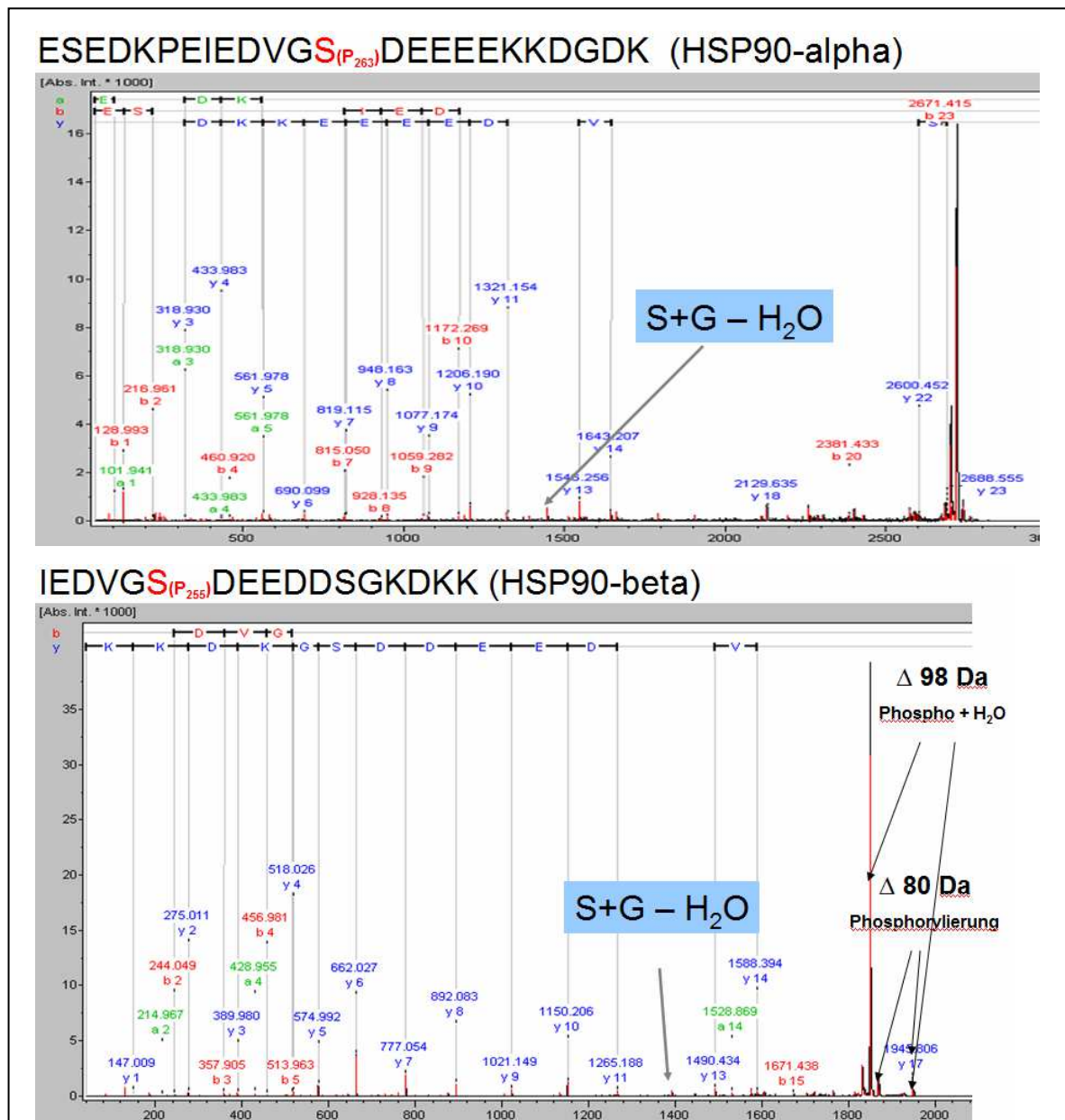


Abb. 3.6: MALDI-MS/MS-Spektren der Phosphopeptide aus HSP90 alpha und beta

HSP90 aus der Zelllinie HCT116 wurde isoliert und tryptisch verdaut. Nach Auftrennung der Peptidgemische über RP-Chromatographie wurden die Peptide mittels MALDI-MS bestimmt und über MS-MS-Experimente sequenziert. Zur Beurteilung der MS/MS-Spektren wurden die a- b- und y-Ionen-Serien ausgewertet und farblich markiert. Für das Phosphopeptid aus der HSP90-beta-Isoform ist der Verlust der Phosphatgruppe (79,966 Da) und der Phosphatgruppe + H₂O (97,981 Da) von der Muttermasse gesondert markiert. Durch Dehydrierung des Peptids (Verlust der Phosphatgruppe + H₂O) während der MS/MS-Analyse entstand aus Phospho-Serin und dem benachbarten Glycin ein Fragment, das von der Software nicht zugeordnet werden konnte. Durch diese Masse aus Serin + Glycin - H₂O (blau hinterlegt) und den hieraus resultierenden Sequenzabbruch konnte die Phosphorylierung eindeutig S263 in HSP90-alpha und S255 in HSP90-beta zugeordnet werden.

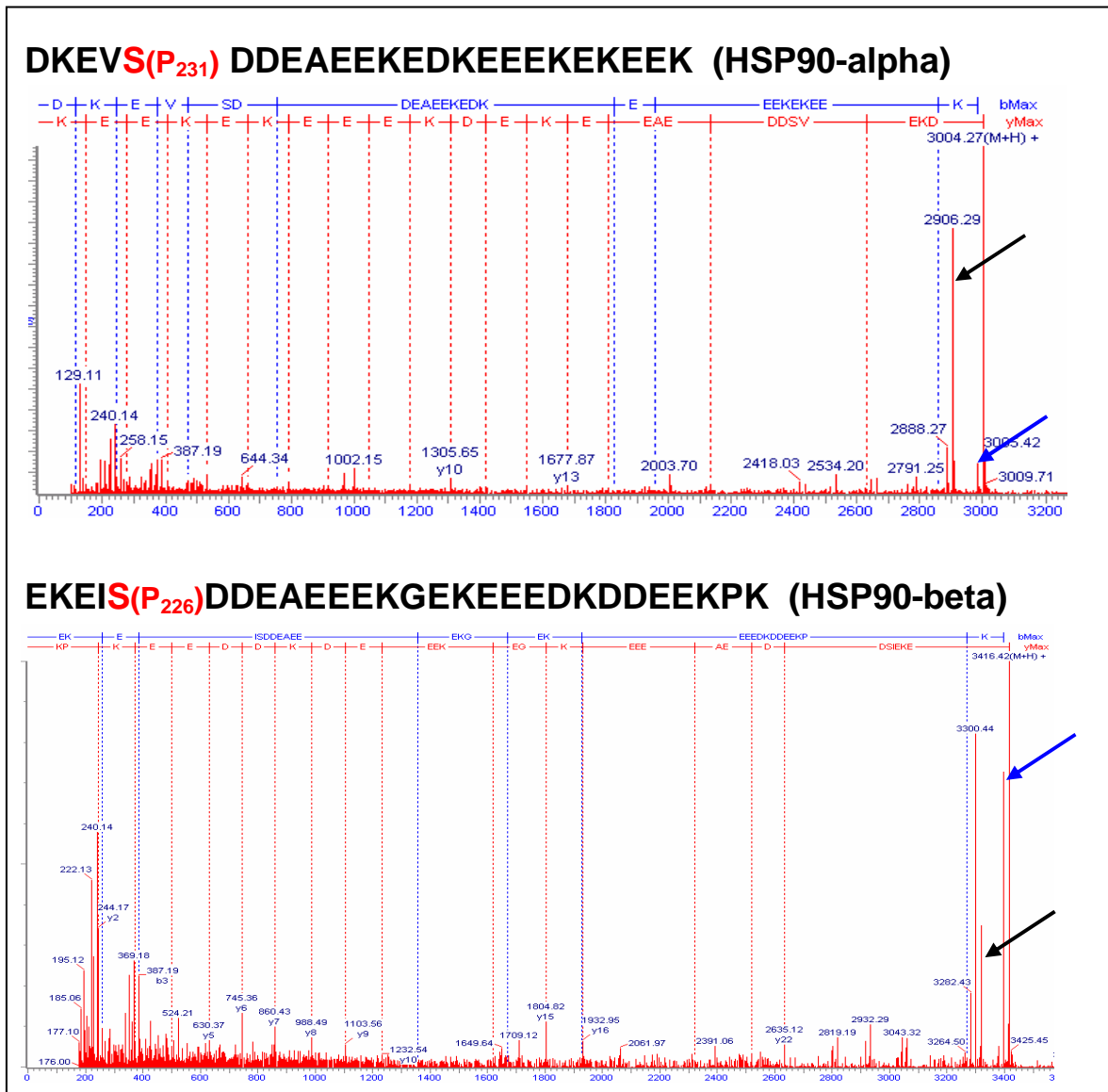


Abb. 3.7: ESI-MS/MS-Spektren der Phosphopeptide aus HSP90 alpha und beta

HSP90 aus der Zelllinie HCT116 wurde isoliert und tryptisch verdaut. Nach Auftrennung der Peptidgemische über RP-Chromatographie wurden die Peptide mittels ESI-MS bestimmt und über MS-MS-Experimente sequenziert. Zur Beurteilung der MS/MS-Spektren wurden die b- und y-Ionen-Serien ausgewertet und farblich markiert. Für beide Phosphopeptide ist der Verlust der Phosphatgruppe + H₂O (97,981 Da, schwarzer Pfeil) und von H₂O (18,015 Da, blauer Pfeil) von der Muttermasse gesondert markiert. Durch diesen Verlust konnte eindeutig gezeigt werden dass es sich bei beiden Peptiden um ein phosphoryliertes Peptid handelt. Da die Sequenzen beider Peptide jeweils nur eine möglich Serin-Phosphorylierungsstelle enthalten, ließ sich die Phosphorylierung für HSP90alpha eindeutig Serin 231 und Serin 226 in HSP90-beta zuordnen.

2 Quantitative Bestimmung der HSP90-Isoformen und deren Phosphorylierungen in der CLR

Die ESI-Methode, die zum qualitativen Nachweis der Phosphopeptide S231 und S266 benutzt wurde, zeichnet sich im Gegensatz zur MALDI-Methode dadurch aus, dass hier die Messung der Proben direkt durch Kopplung der CapLC an das SYNAPT durchgeführt werden kann. Hieraus ergab sich eine deutlich kürzere Analysenzeit und ein deutlich höherer Probendurchsatz. In erster Linie wurde diese Methode etabliert, um eine semiquantitative Bestimmung der vier detektierten Phosphopeptide in unterschiedlichen Proben durchzuführen. Durch den tryptischen Verdau beider HSP90-Proteine konnten trotz hoher Sequenzhomologie von HSP90-alpha und -beta Peptide generiert werden, die anhand ihrer Masse eindeutig einer Isoform zugeordnet werden konnten. Dies wurde genutzt, um neben der semiquantitativen Bestimmung der Phosphopeptide parallel den Gehalt beider HSP90-Proteine zu bestimmen. Durch Erstellen von Kalibrationsgeraden dieser Peptide aus den rekombinant hergestellten Proteinen konnte eine quantitative Bestimmung von HSP90-alpha und -beta in nur einer Probenaufarbeitung erfolgen.

2.1 Qualifizierung des Messsystems CapLC und Synapt

Zur Überprüfung des Messsystems wurde von mehreren Proben die Intensität eines mitgeführten internen Standards (Glufib; EGVNDNEEGFFSAR) ausgewertet. Bei der Probenvorbereitung (s. II 3.7) wurde dem Lösungsmittel (0,1%ige TFA) für die Rekonstitution der Probe 0,5 pmol Glufib zugesetzt. Die Einstellungen während der chromatographischen Trennung und der anschließenden Messung am Synapt wurden – wie unter II 4.3 beschrieben – eingestellt und für alle Experimente gleich gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten. Da im Gegensatz zur MALDI-Messung nicht nur einfach, sondern auch mehrfach geladene Ionen entstehen, mussten die Messdaten zur Auswertung dekonvoliert werden, d. h., es erfolgte eine computergestützte Umrechnung der mehrfach geladenen Ionen auf ihre neutralen ungeladenen Massen. Diese Dekonvolution wurde mit der Software BioPharmaLynx V1.1 der Fa. Waters durchgeführt. Diese Berechnung wurde auch hier für alle Proben mit den gleichen Parametern durchgeführt.

Anhand dieser Auswertung sollte gezeigt werden, dass eine Vergleichbarkeit der Messwerte innerhalb einer Messreihe und auch voneinander unabhängiger Messreihen gewährleistet werden kann. Die Messdaten und die Werte der statistischen Auswertung sind in Abb. 3.8 und Tab. 3.2 aufgeführt.

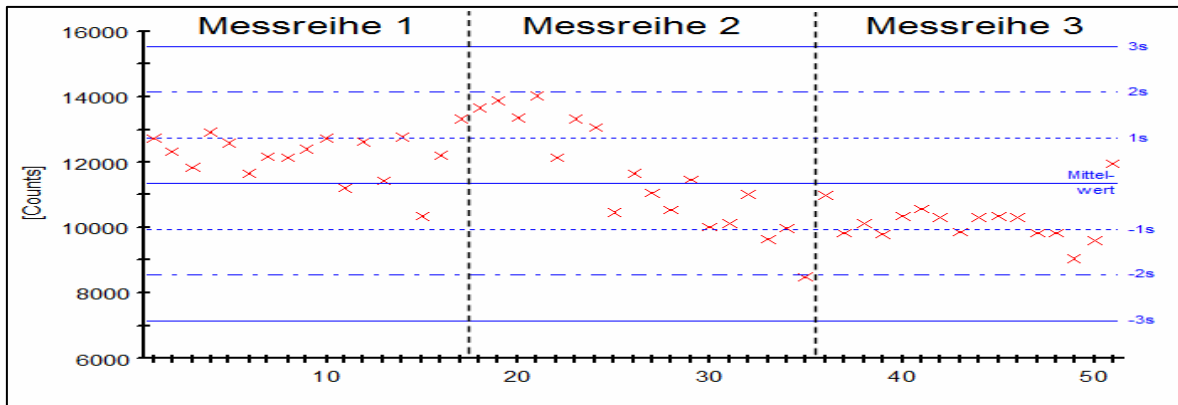


Abb. 3.8: Auswertung der MS-Daten des internen Standards Glufib in drei unabhängigen Messreihen
 Von drei unabhängigen Messreihen aus Standard- und Messproben wurden die Werte (Counts) für den internen Standard aus den Messdaten ermittelt. Die Daten wurden mit der Auswertesoftware „Validat“ ausgewertet. Ein Trend in den Messreihen konnte für Messreihe 2 über den Trendtest nach Neuman ermittelt werden, das gleiche gilt für die Auswertung der drei Messreihen untereinander. In Messreihe 1 und 2 konnte kein Trend festgestellt werden, dafür enthielten diese jeweils einen Ausreißer, der über den Test nach Grubbs bestimmt wurde.

Tab. 3.2: Statistische Auswertung des internen Standards Glufib von drei unabhängigen Messreihen

Messreihe	Anzahl [n]	Mittelwert [counts]	sd [counts]	s _{rel} [%]	Trendtest nach Neumann	Ausreißertest nach Grubbs
1	17	12200	732	6.00	-	+
2	18	11549	1676	14.51	+	/
3	16	10188	643	6.31	-	+
1 - 3	51	11339	1397	12.29	+	/

sd: Standardabweichung; s_{rel}: relative Standardabweichung

Der Trendtest nach Neumann bewertet die Daten nach ihrem zeitlichen Verlauf: Ein Trend liegt nach diesem Verfahren dann vor, wenn ab mindestens vier aufeinander folgenden Werten wachsende bzw. fallende Werte beobachtet werden. In Messreihe 2 und bei der Beurteilung von allen drei Messreihen konnten eindeutig fallende Werte beobachtet werden, die durch diesen Test verifiziert wurden. Dieser Trend, der in Messreihe 2 festgestellt wurde, zeigt, dass ein Vergleich der Messwerte hier zu falschen Ergebnissen führen würde. Dieses gilt auch für den Vergleich unterschiedlicher Messreihen. Die Messreihen 1 und 3 zeigen eine annähernde Normalverteilung, was eine Auswertung der Daten zulassen würde, jedoch zeigen diese jeweils einen Ausreißer, der durch den Test nach Grubbs identifiziert wurde. Anhand dieser Daten zeigte sich, dass eine einfache Auswertung der Rohdaten hier nicht möglich ist. Um trotzdem eine Vergleichbarkeit der Proben innerhalb einer und zwischen zwei Messreihen zu gewährleisten, wurden alle Messdaten unter Zuhilfenahme des mitgeführten internen Standard Glufib normiert. Hierzu wurde für Glufib ein Wert von 10 000 counts festgelegt und alle Messwerte auf diese Bezugsgröße umgerechnet.

2.2 Semiquantitative Bestimmung der Phosphopeptide

2.2.1 Detektion der Phosphopeptide im Verlauf der CapLC

Die Sequenzierung der Phosphopeptide erfolgte - wie zuvor beschrieben - über MS/MS-Experimente mittels MALDI bzw. ESI; für die semiquantitative Bestimmung wurden nur die MS-Daten der tryptisch hydrolysierten Proben nach der chromatographischen Trennung am Synapt über ESI aufgenommen. Durch die sehr hohe Massengenauigkeit dieser Bestimmung konnten die Phosphopeptide aufgrund ihrer Masse eindeutig identifiziert und ihre Intensität (counts) bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte auch hier wieder über die Software BioPharmaLynx V1.1 von der Fa. Waters, um die Messwerte zu dekonvolvieren und die Intensitäten der ungeladenen Peptide zu berechnen. In Tabelle 3.3 sind die Daten der vier Phosphopeptide aufgeführt. Diese Ergebnisse zeigten, dass alle vier Peptide mit einer sehr hohen Genauigkeit (s. Δ Masse) bestimmt werden konnten. Auffälligerweise zeigten drei der vier Phosphopeptide eine sehr hohe Zahl an nicht hydrolysierten Schnittstellen, das einen negativen Einfluss auf die Bestimmung haben könnte. Da jedoch die entsprechenden stärker bzw. noch weniger hydrolysierten Peptide mit nur sehr geringen Intensitäten bzw. gar nicht gemessen wurden, konnte angenommen werden, dass diese Hydrolyseprodukte die Hauptvarianten der enzymatischen Spaltung darstellen. Um diese Annahme zu festigen, wurden Versuche durchgeführt, die eine Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse bestätigen sollte.

Tab. 3.3: Messergebnisse der Phosphopeptide aus HSP90-alpha und -beta

Peptidsequenz	„missed cleavages“	Masse [Da]	Δ Masse [Da]	Ladung
HSP90-alpha				
DKEVSp ₂₃₁ DDEAEEKEDKEEEEKEEEK	5	3003,2607	0,002	3
ESEDKPEIEDVGS ₂₆₃ DEEEKKDGDKK	3	2943,2388	0,002	3
HSP90-beta				
EKEISp ₂₂₆ DDEAEEKGEKEEEDKDDEEKPK	4	3415,4256	0,006	3
IEDVGS ₂₅₅ DEEDDSGKDKK	2	1944,7892	0,006	2
RT: retention time				

Wie schon unter III 1.2.2 erwähnt wurde, haben die sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure in der Nachbarschaft von Lysin bzw. Arginin einen negativen Einfluss auf die Hydrolyse durch Trypsin. Für die in Tabelle 3.3 aufgeführten Peptide trifft dies für alle nicht hydrolysierten Lysin-Reste zu. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt durch die zusätzliche negative Ladung der Phosphatgruppe noch verstärkt wird.

2.2.2 Bestimmung der Reproduzierbarkeit (Phosphopeptide)

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision, wurde eine 5-fach-Bestimmung eines Zelllysates aus der Zelllinie HCT116 durchgeführt. Es wurden fünf Mal je 100 µg Gesamtprotein, wie unter II 4.3 beschrieben, getrennt aufgearbeitet und analysiert. Die Zelllinie HCT116 wurde gewählt, da bei der Kultivierung und Lyse dieser Zelllinie die größte Ausbeute an Gesamtprotein und somit auch an HSP90 erzielt werden konnte. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der Messungen graphisch dargestellt und in Tabelle 3.4 die dazugehörige statistische Auswertung.

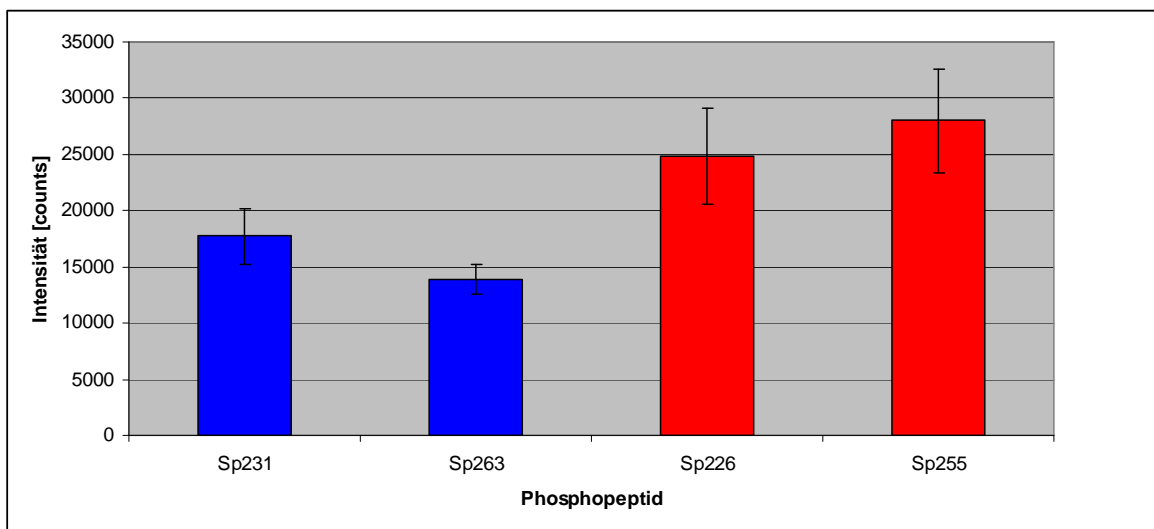


Abb. 3.9: Wiederholpräzision der HSP90-Phosphopeptidbestimmung aus Lysat der Zelllinie HCT116

HSP90 aus der Zelllinie HCT116 wurde isoliert und tryptisch verdaut. Nach Auftrennung der Peptidgemische über RP-Chromatographie wurden die Peptide mittels ESI-MS bestimmt. Der Mittelwert aus den Rohdaten von $n = 5$ Bestimmungen wurde ermittelt und für alle 4 Phosphopeptide graphisch dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Variationskoeffizient. In blau sind die Phosphopeptide aus HSP90-alpha und in rot die aus HSP90-beta abgebildet.

Tab. 3.4: Statistische Auswertung der Phosphopeptidbestimmung aus HCT116

Messreihe	Anzahl [n]	Mittelwert [counts]	Variationskoeffizient [counts]	Variationskoeffizient [%]
Sp231	5	17745	2477	13
Sp263	5	13924	1361	9
Sp226	4*	24822	4251	17
Sp255	5	28005	4565	16

* ein Ausreißer wurde festgestellt und nicht in die Auswertung einbezogen

2.2.3 Lineares Verhalten der Phosphopeptid-Bestimmung

Zusätzlich zur Wiederholpräzision wurde noch das lineare Verhalten der Phosphopeptide bei der Bestimmung geprüft. Hierzu wurden die restlichen Proben aus der Bestimmung der Reproduzierbarkeit (s. III 2.2.2) vereinigt und an der Speedvac unter Vacuum konzentriert. Dies wurde durchgeführt, um die Phosphopeptide zu konzentrieren und somit einen größeren Bereich bei der Bestimmung der Linearität abzudecken. Von der konzentrierten Probe wurde eine Verdünnungsreihe in 0,1 %iger TFA hergestellt (Verdünnungsfaktor 2). Die Analyse der Probe erfolgte, wie zuvor beschrieben, wieder unter den gleichen Messbedingungen. In Abbildung 3.10 ist das lineare Verhalten der vier Phosphopeptide graphisch dargestellt.

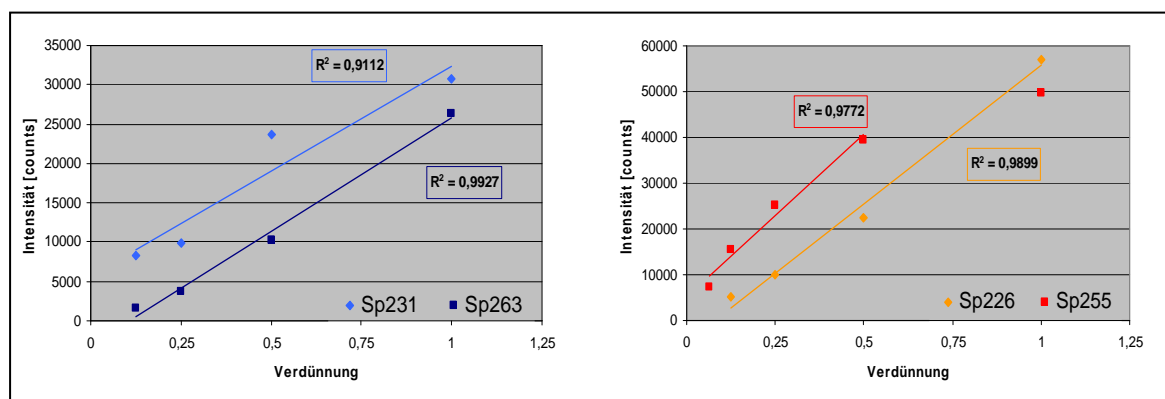


Abb. 3.10: Lineares Verhalten der Phosphopeptide

Die Probelösungen aus der Bestimmung der Wiederholpräzision wurden vereinigt und konzentriert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 2) aus der konzentrierten Probe erstellt. Die Proben wurden über eine RP-Chromatographie getrennt und mittels ESI-MS bestimmt. Die Ergebnisse der Phosphopeptide ($n = 1$) wurden graphisch gegen die Verdünnung aufgetragen. Für alle vier Phosphopeptide konnte ein lineares Verhalten in einem Bereich von ca. 5 000 – 35 000 counts für HSP90-alpha (blau) und ca. 5 000 – 60 000 counts für HSP90-beta Sp226 (rot) festgestellt werden. Die einzige Ausnahme bildete das Phosphopeptid Sp255 aus HSP90-beta. Dieses zeigte im oberen Bereich der Verdünnungsreihe kein lineares Verhalten mehr, dafür konnte bei dieser Probe noch eine Messung bei der letzten Verdünnung erzielt werden, bei der für die restlichen Peptide schon die Nachweisgrenze erreicht wurde. Für dieses Peptid konnte ein lineares Verhalten im Bereich von ca. 5 000 – 40 000 counts bestimmt werden.

Alle Phosphopeptide zeigten ein lineares Verhalten in einem ausreichend großen Messbereich der Bestimmung. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass eine Beurteilung unterschiedlicher Messproben gewährleistet ist. Bei allen weiteren Messungen wurde darauf geachtet, dass die Messwerte der Proben genau in diesem linearen Bereich der Bestimmung lagen. Bei Werten außerhalb dieser Grenzen wurde die Probenvorbereitung mit entsprechend mehr oder weniger Protein wiederholt.

2.3 Quantifizierung von HSP90-alpha und -beta

2.3.1 Erstellung von Kalibrationsgeraden zur quantitativen Bestimmung beider HSP90-Isoformen

Um eine quantitative Bestimmung der beiden HSP90-Isoformen neben der Analyse der Phosphopeptide durchzuführen, wurden Kalibrationsreihen mit rekombinant hergestelltem HSP90-alpha und -beta erstellt. Beide Proteine wurden - wie auch die Proben - der kompletten Probenvorbereitung unterzogen. Es wurden je 0,4, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 und 4,0 µg Protein im SDS-Gel getrennt und – wie unter II 3.7 beschrieben – einzeln aufgearbeitet. Da die Probe in 32 µl Lösungsmittel rekonstituiert wurde und nur 8 µl (1/4) zur Analyse eingesetzt wurde, konnte eine Kalibrationsgerade in Bereich von 0,1 – 1,0 µg erstellt werden. Für die Erstellung der Kalibrationsgeraden zur Bestimmung des HSP90-alpha bzw. -beta Gehalts der Proben wurden nur solche Peptide herangezogen, die keine potentiellen PTM (s. Tabelle 3.1) tragen und sich anhand ihrer Sequenz ausschließlich einer Isoform zuordnen ließen. In Tabelle 3.5 sind die Peptide für HSP90-alpha und -beta aufgelistet, die sich nach mehreren Messungen als am besten geeignet herausgestellt haben und exemplarisch die Messergebnisse aus einer Bestimmung.

Tab. 3.5: Messwerte und Auswertung der Kalibrationsgeraden von rek. HSP90-alpha und -beta

Peptidsequenz	„missed cleavages“	Masse [Da]	Ladung	m/z	Korrelationskoeffizient R ²
HSP90-alpha					
ELHINLIPNKQDR	1	1588,9	2	795,4	0,9892
KHSQFIGYPITLFVEK	1	1906,0	2	954,0	0,9739
DQVANSAFVER	0	1234,6	2	618,3	0,9888
KHLEINPDHSIETLR	1	1914,0	3	639,0	0,9843
HSP90-beta					
ELKIDIIPNPQER	1	1563,9	2	782,9	0,9887
KHSQFIGYPITLYLEK	0	1936,1	2	969,0	0,9982
EQVANSAFVER	0	1248,6	2	625,3	0,9991
HLEINPDHPIVETLR	0	1781,9	2	892,0	0,9971

Anhand der Korrelationskoeffizienten (R²) zeigte sich, dass sich die Peptidintensitäten im Messbereich von 0,1 – 1,0 µg linear verhalten, was eine Auswertung in diesem Bereich zuließ. Die entsprechenden Peptid-Intensitäten aus den Messproben wurden anhand der ermittelten Kalibrationsgeraden ausgewertet und die vier Ergebnisse gemittelt. Eine Auswertung erfolgte jedoch nur, wenn die Messergebnisse auch innerhalb des Kalibrationsbereichs lagen. Als weiteres Auswertekriterium wurde festgelegt, dass mindestens drei der vier Werte pro HSP90-Isoform sich nicht um mehr als ± 0,2 % vom

Endergebnis unterschieden. Wicht ein Messwert ab, wurde dieser nicht mit in die Mittelwertbildung einbezogen. Die später aufgeführten Ergebnisse für HSP90-alpha und -beta wurden somit aus mindestens 3 Bestimmungen gemittelt.

2.3.2 Bestimmung der Reproduzierbarkeit (Gehaltsbestimmung HSP90-alpha und -beta)

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurden die Messdaten aus III 2.2.2 über die mitgeführten Kalibrationsreihen der rek. Proteine ausgewertet. In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse und die statistischen Auswertungen aufgeführt.

Tab. 3.6: Statistische Auswertung der quantitativen HSP90-alpha und -beta Bestimmung

Isoform	Anzahl [n]	Einzelwerte					Mittelwert [%]	sd [%]	s _{rel} [%]
		[%]							
HSP90-alpha	5	1,1	1,2	1,0	1,2	1,0	1,1	0,08	8
HSP90-beta	5	1,5	1,8	1,5	1,8	1,6	1,6	0,15	9

sd: Standardabweichung; s_{rel}: relative Standardabweichung

Obwohl es sich bei dieser Bestimmung um eine sehr komplexe Methode handelt, bei der sehr viele kritische Faktoren bei der Probenaufarbeitung, der Durchführung der Messung als auch bei der Auswertung einen Einfluss auf die Güte der Ergebnisse haben, konnten hier sehr gute reproduzierbare Ergebnisse bestimmt werden.

2.3.3 Qualifizierung des Analyseverfahren zur quantitativen Bestimmung von HSP90 aus Zelllysaten (Wiederfindung)

Um zu zeigen, dass eine bekannte Menge an HSP90-alpha und -beta durch die komplexe Probenvorbereitung und Messung in Zelllysaten bestimmt werden kann, wurden zu einem Zelllysate (HCT116 Probe 72 h kultiviert) unterschiedliche Mengen an rek. hergestelltem Protein beider Isoformen zudosiert. Die für das Zelllysate zuvor ermittelten Gehalte an HSP90-alpha betragen 1,3 % und für die beta-Variante 2,3 %. Für alle Proben wurde die gleiche Menge an Gesamtprotein vorgelegt, so dass die Messprobe einem Proteingehalt von 10 µg Gesamtprotein entsprach. Demzufolge enthielten die Proben jeweils 0,1 µg HSP90-alpha und 0,2 µg HSP90-beta. Es wurden insgesamt 4 Aufstockproben hergestellt, indem die rek. hergestellten Proteine so zudosiert wurden, dass die Messproben jeweils 0,1, 0,2, 0,4 bzw. 0,6 µg beider HSP90-Isoformen enthielten. Der zuvor beschriebene Arbeitsbereich der Bestimmungsmethode wurde somit für alle

Proben eingehalten. Alle Proben wurden separat im SDS-Gel getrennt und aufgearbeitet. In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse der Wiederfindung abgebildet.

Tab. 3.7: Ergebnisse zur Qualifizierung der quantitativen Bestimmung von HSP90 (Wiederfindung)

Probe	Soll-Wert [μg]		Ist-Wert [μg]		Abweichung [μg]		Wiederfindung [μg]	
	HSP90- α	HSP90- β	HSP90- α	HSP90- β	HSP90- α	HSP90- β	HSP90- α	HSP90- β
HCT116 72 h	0,13	0,23	0,10	0,23	0,03	0,00		
0,1 μg	0,23	0,33	0,19	0,35	0,04	-0,02	0,1	0,1
0,2 μg	0,33	0,43	0,30	0,47	0,03	-0,04	0,2	0,2
0,4 μg	0,53	0,63	0,46	0,65	0,07	-0,02	0,4	0,4
0,6 μg	0,73	0,83	0,53	0,71	0,20	0,12	0,4	0,5

Vergleicht man das Ergebnis der Basisprobe (HCT116, 72 h) mit der zuvor ermittelten Probe, kann man noch einmal sehen, dass die Methode geeignet ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Die Wiederfindung wurde berechnet, indem das Ergebnis der Basisprobe vom ermittelten Wert der Probe abgezogen wurde. Dies zeigte, dass HSP90-alpha und -beta bis zu einer Zudosierung von je 0,4 μg genau analysiert werden konnten. Ab einer Zudosierung von 0,6 μg konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse mehr erzielt werden, von daher sollte der Einsatz von zu hohen Mengen an HSP90 für die quantitative Bestimmung der beiden HSP90 Proteine vermieden werden. Der hieraus resultierende relativ kleine Arbeitsbereich von 0,1 – 0,4 μg ist jedoch vollkommen ausreichend, da diese Mengen an HSP90 problemlos aus Zellkulturproben isoliert werden können. Proben, bei denen die Konzentration an HSP90 den Arbeitsbereich überschritt, wurden verdünnt und noch einmal analysiert. Die Bestimmung der Phosphopeptide wurde ebenfalls aus den reanalysierten Proben durchgeführt, um auch hier eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, da die Peptidkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Ionisierbarkeit und somit auf das Detektionsverhalten im Verlauf der ESI-Bestimmung hat.

2.3.4 Erstellung von Kalibrationsgeraden aus den nicht-phosphorylierten Peptiden aus der Charged Linker Region

Die Messdaten aus den Kalibrationsreihen als auch aus den Proben zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurden hinsichtlich der vier nicht-phosphorylierten Peptide aus der Charged Linker Region (CLR) beider HSP90-Isoformen ausgewertet. Es konnte für keines der vier Peptide eine entsprechende Kalibrationsgerade mit ausreichender Linearität erstellt werden, um eine reproduzierbare Quantifizierung durchzuführen. Auch in den Proben aus der Wiederholpräzision zeigte sich, dass die unphosphorylierten Peptide in den Proben nachweisbar waren, jedoch sehr stark variierten. Im Gegensatz zu den Phospho-Peptiden zeigte sich hier eine sehr hohe Varianz in der Anzahl der nicht-hydrolysierten Schnittstellen und somit eine hohe Anzahl an unterschiedlich großen Peptiden. Für Trypsin ist diese verminderte Hydrolyse von Lysin/Arginin bei Anwesenheit saurer Aminosäuren in der Nachbarschaft beschrieben. Da dieses Verhalten für die phosphorylierte CLR nicht beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die zusätzlichen Phosphatgruppen einen positiven Einfluss auf eine einheitliche Hydrolyse dieser Region haben. Ein Versuch, die Proben aus dem Verdau mit Chymotrypsin auszuwerten, scheiterte daran, dass das Hydrolyseprodukt - die vollständige CLR - durch ihre Größe auch nicht als mehrfach geladene Masse bei der Auswertung über ESI detektiert werden konnte. Somit konnte keine direkte Gegenüberstellung bzw. Differenzanalyse von phosphoryliertem *versus* nicht-phosphoryliertem HSP90 durchgeführt werden.

2.4 Anwendung der etablierten Methode an Zelllysaten unterschiedlicher Zelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass der Gehalt an HSP90 einen Anteil von ca. 1% vom Gesamtprotein in der Zelle beträgt. Die Zelllysate mussten dementsprechend so aufgearbeitet werden, dass die injizierte Menge nicht über oder unter die unter III 2.1 – 2.3 ermittelten Arbeitsbereiche für die quantitative Bestimmung des HSP90-alpha- und -beta-Gehalts sowie der semiquantitativen Bestimmung der Phosphopeptide lag. Zur Analyse der unbehandelten Zellkulturen wurde eine Proteinmenge von ca. 100 µg Gesamtprotein im SDS-Gel getrennt, aufgearbeitet und individuell verdünnt. Insgesamt wurden acht unterschiedliche Zelllinien getestet, die Tumor-Zelllinien A2780, HCT116, SKBR3 und A431, die Nicht-Tumor-Zelllinien HS68 und HFFF2 und die Primärzelllinien HUVEC und NHDF.

2.4.1 Quantifizierung von HSP90-alpha und -beta

In Abbildung 3.11 sind die prozentualen Anteile an HSP90-alpha und -beta in Bezug auf das Gesamtprotein dargestellt. Die Werte wurden aus $n = 3$ Bestimmungen gemittelt. Der Gehalt an HSP90-alpha ist um das Doppelte bzw. Dreifache in den Tumor-Zelllinien erhöht, mit Ausnahme der Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780. Deutlich größer ist der Unterschied im HSP90-beta-Gehalt der Tumor-Zelllinien: Diese enthalten deutlich mehr HSP90-beta als die Nicht-Tumor-Zelllinien, A2780 und A431 sogar über 2%.

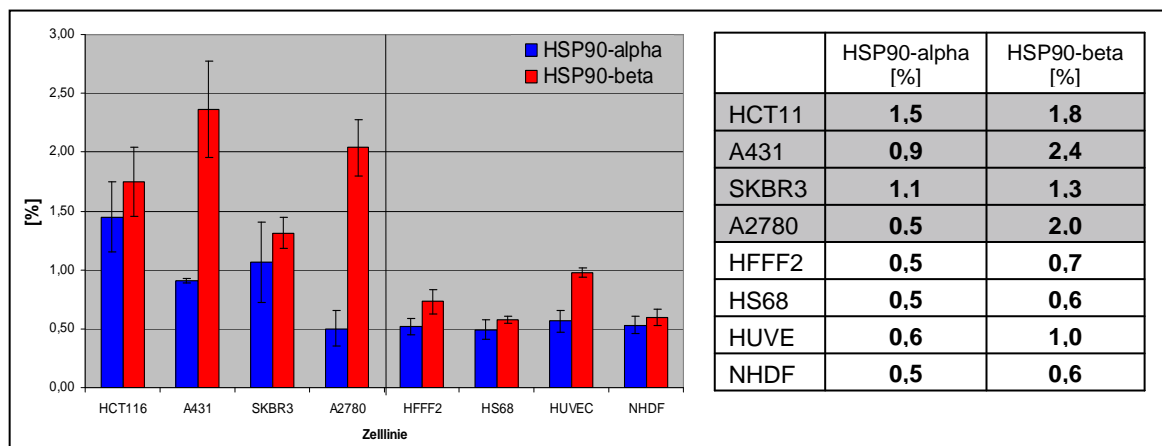


Abb. 3.11: Prozentualer Gehalt an HSP90-alpha und -beta in unterschiedlichen Zelllinien

Die Zelllinien wurden 48 h kultiviert, gewaschen und lysiert. Die Lysate wurden im SDS-Gel getrennt und die HSP90-Banden ausgeschnitten. Die Proteinmengen wurden entsprechend der Kapazität der Analysenmethode angeglichen. Die isolierten HSP90-Banden jeder Zelllinie wurden vereinigt, tryptisch verdaut, über RP-Chromatographie getrennt und mittels ESI-MS analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software BioPharmaLynx V1.1. Die unterschiedlichen Gehalte für HSP90-alpha sind in blau und für HSP90-beta in rot graphisch dargestellt. Die mittlere Abweichung der $n = 3$ Bestimmungen sind durch die Fehlerbalken gekennzeichnet. In der Tabelle wurden die Ergebnisse für die Tumorzelllinien grau hinterlegt.

2.4.2 Beurteilung der HSP90-Phosphopeptid-Intensitäten

Die in Abbildung 3.12 aufgeführten Phosphopeptid-Intensitäten der 8 Zelllinien wurden aus den Messdaten der zuvor beschriebenen Auswertung der HSP90-Gehalte ermittelt. Alle Intensitäten wurden auf eine Proteinmenge von $1 \mu\text{g}$ Gesamtprotein der Zelllinie normiert.

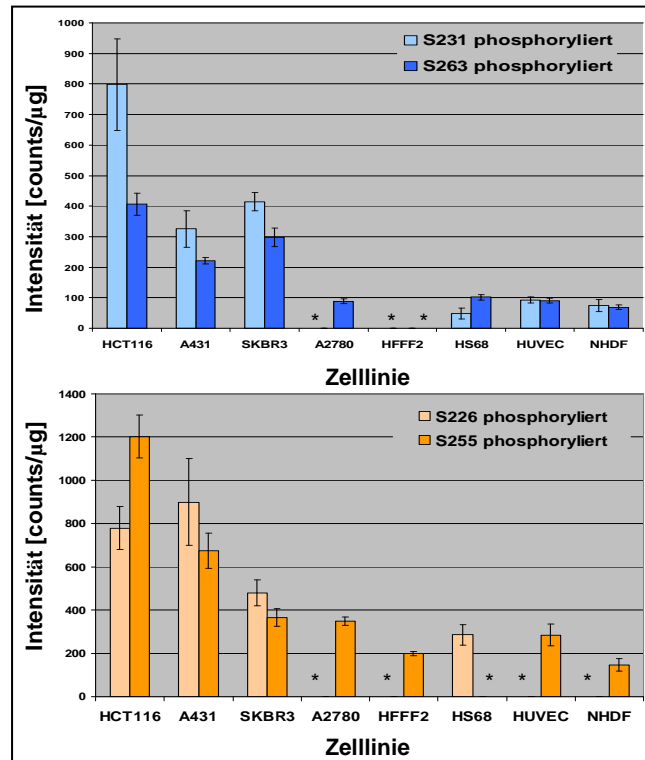


Abb. 3.12: Intensitäten der Phosphopeptide aus der CLR von HSP90-alpha und -beta in unterschiedlichen Zelllinien

Die Zelllinien wurden 48 h kultiviert, gewaschen und lysiert. Die Lysate wurden im SDS-Gel getrennt und die HSP90-Banden ausgeschnitten. Die Proteinmengen wurden entsprechend der Kapazität der Analysenmethode angeglichen. Die isolierten HSP90-Banden jeder Zelllinie wurden vereinigt, tryptisch verdaut, über RP-Chromatographie getrennt und mittels ESI-MS analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software BioPharmaLynx V1.1. Die Phosphopeptide, die HSP90-alpha zugeordnet werden können, sind in hellblau und blau dargestellt, die zu HSP90-beta in gelb und orange. Die mittlere Abweichung der $n = 3$ Bestimmungen sind durch die Fehlerbalken gekennzeichnet. Für die mit einem Stern * gekennzeichneten Proben lag die Intensität unter der Nachweisgrenze der Methode.

Wie schon unter III 1.3.1 für die Zelllinien HCT116, A2780, HFFF2 und HS68 im Westernblot gezeigt wurde, unterscheidet sich der jeweilige Proteingehalt der Zelllinien stark. Der Gehalt an beiden HSP90-Isoformen ist in den Tumor-Zelllinien deutlich erhöht. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Intensitäten der Phosphopeptide in den Tumorzelllinien im Vergleich zu den Nicht-Tumor-Zelllinien deutlich erhöht sind. Auffällig ist jedoch, dass der Vergleich des HSP90 Gehalts nicht im direkten Zusammenhang zur Phosphorylierung der jeweiligen Isoform steht. Dies ist besonders deutlich im direkten Vergleich der HSP90-beta Phosphopeptidintensität und dem Gesamtgehalt dieses Proteins bei HCT116 und A2780 zu sehen. Obwohl die Zelllinie A2780 fast einen identischen Gehalt an HSP90-beta wie HCT116 zeigt, wurde die 3-fache Intensität des Phosphopeptids S255 in HCT116 detektiert. Das zweite Phosphopeptid S226 lag in A2780 sogar unter der Nachweisgrenze und in HCT konnte dieses Peptid mit sehr hohen Intensitäten gemessen werden.

3 Zusammenhang zwischen der HSP90-Phosphorylierung in der CLR und ATPase-Inhibitoren

3.1 Affinitätsreinigung von HSP90 aus Zelllysaten mittels ATPase-Inhibitor Geldanamycin

In Anlehnung an die Versuche von Kamal *et al.*, 2003, der zeigen konnte, dass HSP90 aus Tumorzellen eine 100fach höhere Bindungsaffinität zu 17AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) im Vergleich zu HSP90 aus normalen Zellen besitzt und dies über Bindungsversuche mit biotinylierten Geldanamycin (bioGA, Derivat von 17AAG) aus unterschiedlichen Zelllinien zeigen konnte, wurden diese Versuche, wie unter II 3.4 beschrieben, nachgestellt. Die über dieses Verfahren isolierten HSP90-Fraktionen wurden mit der neu etablierten Methode charakterisiert, um zu untersuchen, ob phosphoryliertes HSP90 die aktive Form dieses Proteins in der Zelle darstellt. Dazu wurden Lysate der beiden Tumor-Zelllinien HCT116 und A2780 sowie der Nicht-Tumor-Zelllinien HFFF2 und HS68 benutzt. Mit den Standard-NP40-Zelllysaten konnte kein HSP90 über diese Affinitätsreinigung isoliert werden. Daraufhin wurde der von Kamal beschriebene Lysepuffer (20 mM HEPES, pH 7,3, 1 mM EDTA, 5mM MgCl₂ und 100 mM KCl) verwendet. Da dieser Lysepuffer kein Solubilisierungs-Detergent enthält, wurden die Zellen nach Zusatz des Puffers für fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt. Zur Kontrolle wurde als Vergleich eine Probe unter identischen Bedingungen – jedoch ohne bioGA – mitgeführt. In Abb. 3.13 A wurden für die Zelllinie HCT116 die resultierenden Zellüberstände und Eluate im SDS-Gel mittels Coomassiefärbung abgebildet. In Spur 5 ist zu erkennen, dass das Eluat aus der Affinitätsreinigung mit bioGA im Gegensatz zu der Kontrolle ohne bioGA (Spur 6) eine deutlich größere Menge an HSP90 enthält. Somit konnte sichergestellt werden, dass es sich nicht um eine unspezifische Bindung handelt. Da es sich auch hier um ein relativ großes Volumen an Eluat handelte, musste die Probe – wie zuvor – über mehrere Spuren getrennt und aufgearbeitet werden (s. Abb. 3.13 B). Aus den beiden Nicht-Tumor-Zelllinien und aus A2780 konnte keine bzw. eine minimale Anreicherung von HSP90 festgestellt werden; von daher konnte eine Analyse nur für das Isolat aus HCT116 erfolgen. Von dem Hydrolysat der affinitäts-gereinigten Probe wurde zusätzlich am MALDI ein Massenspektrum aufgenommen und über die Mascot-Datenbank (www.matrixscience.com) ausgewertet. Dieses Profil (peptid mass fingerprint) sollte zeigen dass die Affinitätsreinigung erfolgreich war und sich keine weiteren Proteine unter der HSP90-Bande befanden; dies konnte durch die statistische Auswertung in der Mascot-Datenbank bestätigt werden (s. Abb. 3.14). Von der restlichen Probe wurde eine Doppelbestimmung über das unter III 2 beschriebene Verfahren durchgeführt und ein Gehalt von < 0,1 µg HSP90-alpha und 0,2 µg HSP90-beta festgestellt. HSP90-alpha lag

am unteren Limit der Auswertegrenze und es konnten keine Phosphopeptide nachgewiesen werden. Für HSP90-beta konnte das Phosphopeptid Sp255 am unteren Limit mit einer Intensität von 4700 counts bestimmt werden. Durch diese Affinitätsreinigung konnte nicht genügend HSP90 isoliert werden, um eine aussagekräftige Beurteilung des Phosphorylierungsstatus dieser Probe zu treffen. Ein scale up des Verfahrens wurde nicht durchgeführt, da der Einsatz einer größeren Menge an Zelllysats nötig wäre. Die hieraus resultierende Probenaufarbeitung ist in der Praxis jedoch nicht mehr handhabbar.

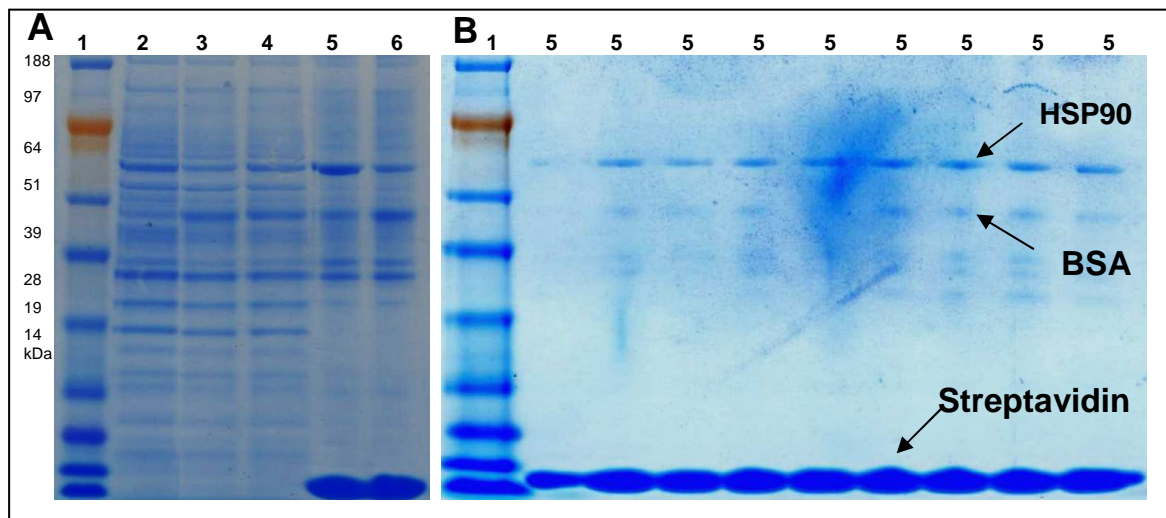


Abb. 3.13: Affinitätsreinigung von HSP90 mittels bioGA aus der Zelllinie HCT116

Zellsuspensionen der Zelllinie HCT116 wurden fünf Minuten im Ultraschallbad bei RT behandelt und anschließend bei 4000g fünf Minuten zentrifugiert. Je 1,0 ml Überstand (Proteingehalt 1,31 mg/ml) wurde für die Affinitätsreinigung eingesetzt. 250 µl Streptavidin-Sepharose-Beads wurden mit BSA (Bovine serum albumin) blockiert und mit biotinGeldanamycin (bioGA) gesättigt. Der Zellüberstand wurde mit den Beads 3h bei 4°C inkubiert. Ein Vergleich wurde ohne bioGA mitgeführt. Die Ansätze wurden gewaschen, im SDS-Gel getrennt und Coomassie gefärbt. Spurbelegung: **1)** Proteinmarker **2)** Zelllysats HCT116 **3)** Zelllysats nach Affinitätsreinigung mit bioGA **4)** Zelllysats nach Affinitätsreinigung ohne bioGA **5)** Eluat nach Affinitätsreinigung mit bioGA **6)** Eluat nach Affinitätsreinigung ohne bioGA. Bei ca. 64 kDa ist BSA zu erkennen, das zum Blockieren der Streptavidin-Sepharose-Beats benutzt wurde.

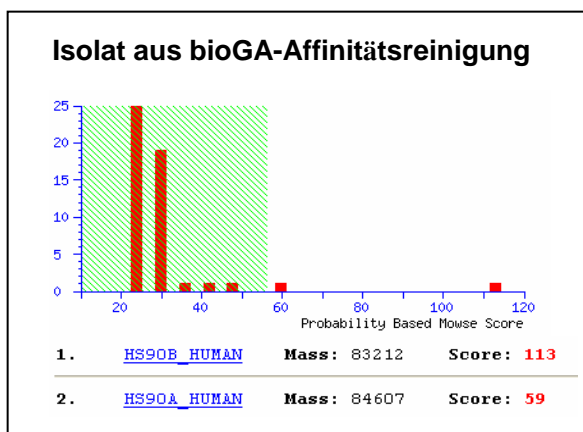


Abb. 3.14: Peptide mass fingerprint der bioGA-Affinitäts gereinigten Probe aus HCT116

Die über Affinitäts-Chromatographie gereinigte Probe (Abb. 3.13 A Spur 5) wurde tryptisch hydrolysiert, mittels MALDI-MS bestimmt und über MASCOT peptide mass fingerprint unter www.matrixscience.com ausgewertet. Der Protein Score berechnet sich aus $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass die beobachtete Übereinstimmung ein zufälliges Ereignis ist. Ein Protein Score von > 56 ist signifikant ($p < 0.05$). Anhand dieser Auswertung zeigte sich für beide HSP90-Isoformen ein Score größer 56; keine weiteren Proteine konnten mit einer ähnlichen Wahrscheinlichkeit bestimmt werden.

3.2 Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 *in vivo*

3.2.1 Auswirkung auf die Zelllinie HCT116

Da bei der Affinitätsreinigung an bioGA-Beads keine ausreichend großen Mengen an HSP90 zur Analyse isoliert werden konnten, sollte ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung an HSP90 und der Inhibierung der ATPase-Aktivität *in vivo*, d. h. in lebenden Zellen, gezeigt werden. Wie sich im vorangegangenen Versuch zeigte, sind für die Analyse mittels ESI-MS große Mengen an HSP90 nötig. Aus diesem Grund wurde die Inhibierung der ATPase-Aktivität über 17AAG zuerst in der Zelllinie HCT116 durchgeführt. Diese zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an HSP90-alpha als auch an HSP90-beta aus und wie unter III 2.4.2 bestimmt wurde, konnten in dieser Zelllinie auch die höchsten Intensitäten der vier Phosphopeptide nachgewiesen werden.

Für diesen Versuch wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von 17AAG behandelt. Je 1×10^6 Zellen pro T75 Zellkulturflasche wurden ausgesät, ein Medienwechsel wurde nach 24 h durchgeführt und durch Zugabe von frischem Medium mit den entsprechenden Konzentrationen an 17AAG wurde der Versuch gestartet. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten sich die Zellen einmal verdoppelt und es befanden sich zu Beginn der Inhibierung ca. 2×10^6 Zellen in der Zellkulturflasche. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und – wie unter III 2 beschrieben – analysiert. Zur Beurteilung der eingesetzten Zellpopulationen bezüglich ihres Anteils der einzelnen Zellzyklus-Phasen wurde der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt (s. II 2.4). Es wurde bei der Ernte der Zellen darauf geachtet, dass die Gesamtheit der Zellen für alle Versuche in die Analyse einging. Die Zellen, die durch die Inhibierung nicht mehr adhärent wuchsen, wurden durch Zentrifugation des Kulturmediums gewonnen und nach Trypsinierung der restlichen Zellen der Probe wieder zugesetzt. Wie in Abbildung 3.15 B zu sehen ist, wurde eine Inhibierung des Zellwachstums ab einer Konzentration von 100 nM erreicht. Durch steigende Konzentrationen an 17AAG wurde ein Anstieg an apoptotischen Zellen beobachtet, was auch durch die anschließende FACS-Analyse (s. Abb. 3.15 A) bestätigt wurde. Beurteilt man nun die Daten für die Inhibitorkonzentrationen ab 100 nM, bei der kein Zellwachstum mehr stattfand, so ist eine deutliche Abnahme der Zellen in der S-Phase zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass eine Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase stattfand. Da jedoch auch die Zellen in der G0/G1-Phase abnahmen und ein Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase zu beobachten war, lässt dies darauf schließen, dass eine weitere Arretierung in der Zellteilungsphase einsetzte. Dies bestätigt die Beobachtungen, die von Hostein *et al* 2001 publiziert wurden.

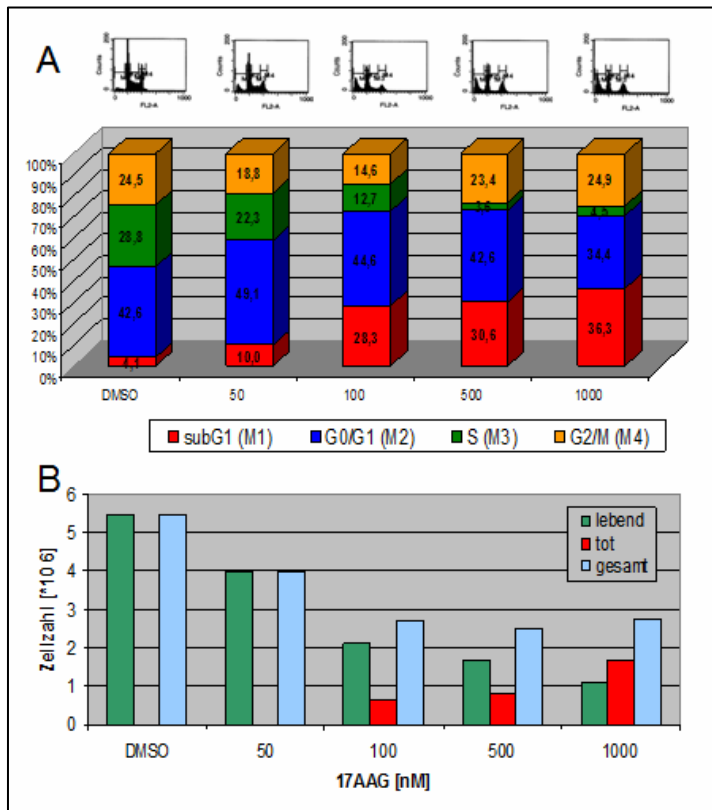


Abb. 3.15: Zellzyklus-Analyse der 17AAG inhibierten Zelllinie HCT116 mittels FACS

Die Zelllinie HCT116 wurde 48 h kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Mengen 17AAG versetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet. **A)** Zur Bestimmung der prozentualen Anteile der einzelnen Zellzyklus-Phasen der unterschiedlich stark inhibierten HCT116 Zellen wurde der DNA-Gehalt mittels Durchflusscytometrie bestimmt. Es wurden die Daten aus zwei unabhängigen Bestimmungen mit je 10 000 Events dargestellt. **B)** Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Zellen mit Trypanblau angefärbt und unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Ab einer Konzentration von ~ 100 nM 17AAG setzte die Apoptose ein und eine deutliche Abnahme der Zellen in der S-Phase war zu beobachten.

Durch diese Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die bereits publizierten Versuche mit 17AAG erfolgreich nachgestellt werden konnten und somit eine Beurteilung der Proben hinsichtlich ihres HSP90-Phospho-Profiles zuließ. In Abb. 3.16 sind die ausgewerteten Daten für den Gehalt an HSP90-alpha und -beta sowie die dazugehörigen Phosphopeptidintensitäten der beiden HSP90-Varianten dargestellt.

Wie zuvor erwähnt, konnte durch Einstellen einer 100 nM Konzentration an 17AAG eine komplette Inhibierung des Zellwachstums erreicht werden. Durch die Bestimmung des mittleren Gehalts an HSP90 in diesen Zellen konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine ca. 5-fache Erhöhung der Alpha- und eine Verdopplung der Beta-Isoform beobachtet werden. Dies weist auf eine Induktion der HSP90-Expression durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität. Beurteilt man nun in diesem Zusammenhang die HSP90-Phosphorylierung ist der Anstieg in fast identischem Maße für beide Phosphorylierungsstellen in HSP90-alpha und -beta zu beobachten – wie auch der Gehalt der beiden Proteine ansteigt.

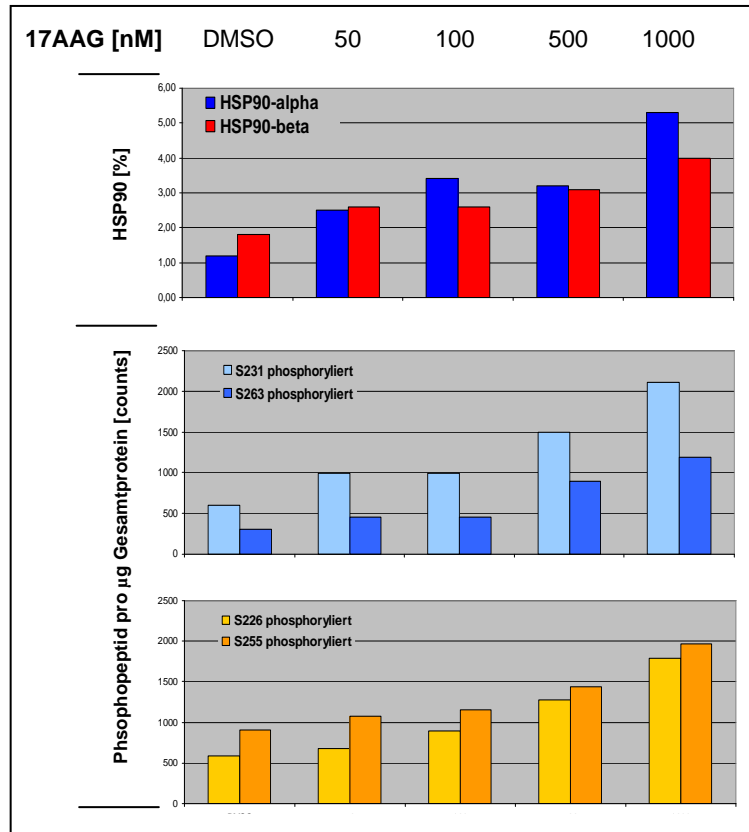


Abb. 3.16: HSP90-Gehalt und -Phosphorylierungsprofil der 17AAG inhibierten Zelllinie HCT116

Die Zelllinie HCT116 wurde 48 h kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Mengen 17AAG versetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mittels ESI-MS wurde der Gehalt (HSP90-alpha in blau und HSP90-beta in rot) in % vom Gesamtprotein und der Grad an Phosphorylierung (HSP90-alpha in hellblau und blau, HSP90-beta in gelb und orange) in counts pro μg Gesamtprotein für beide Isoformen bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Messungen der Probe durchgeführt und der Mittelwert aufgetragen. Durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 stieg der Gehalt an HSP90-alpha um das 5-fache und HSP90-beta um das 2-fache bei einer InhibitorKonzentration von 1000 nM an. In ungefähr gleichem Maße verhielten sich die Phosphopeptide der beiden Isoform. Die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 durch 17AAG induzierte deutlich die Expression von HSP90-alpha und auch dessen Phosphorylierung in der CLR.

Der Anstieg der beiden HSP90-Isoformen konnte durch Westernblot-Analysen mit HSP90-alpha und -beta spezifischen Antikörpern bestätigt werden (s. Abb. 3.18).

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren für HSP90-beta zwei Antikörper für die Phosphorylierung der beiden Serine in der CLR (Sp_{226} und Sp_{255}) erhältlich. Der Antikörper gegen Sp_{226} zeigte keine Färbung bei den Westernblotanalysen und der Antikörper gegen Sp_{255} detektierte auch das rekombinant hergestellte Protein sowie das rekombinante HSP90-alpha. Für die Beurteilung über Westernblot konnten diese beiden Antikörper nicht benutzt werden. In ELISA-Versuchen zeigten beide Antikörper das gleiche Verhalten wie im Westernblot.

3.2.2 Beurteilung der ATPase Inhibierung von HSP90 in der Zelllinie A2780

Um die Auswirkung auf ein Zellsystem zu untersuchen, das sich von der HCT116-Zelllinie unterscheidet, wurde noch die Tumor-Zelllinie A2780 mit einem niedrigeren Gehalt an HSP90 (insbesondere HSP90-alpha) hinsichtlich dessen ATPase-Inhibierung mit 17AAG untersucht. Diese Zelllinie zeigte eine geringe Ausgangs-Intensität der Phosphopeptide am unteren Limit der Bestimmungsgrenze der ESI-MS-Methode. Aus diesem Grund mussten relativ große Mengen an Zelllysate im SDS-Gel getrennt werden. Die Durchführung der Inhibierung wurde, wie unter III 3.2.1 beschrieben, analog zu HCT116 durchgeführt. Durch Vorversuche zeigte sich, dass für A2780 schon eine Konzentration von 25 nM ausreichte, um das Zellwachstum vollständig zu inhibieren und 100 nM die gleiche Wirkung auf die Zellen hatte wie 1000 nM bei HCT116. Um auch hier die Auswirkung auf die Phosphorylierung von HSP90 und dessen Induktion durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität zu beurteilen, wurde eine Einfachbestimmung von vier Konzentrationen zwischen 25 und 100 nM und einer DMSO-Kontrolle durchgeführt. Zusätzlich zur Bestimmung der HSP90-alpha und -beta Westernblots wurde die Auswirkung der Inhibierung auf die Degradation der beiden Serin/Threonin-Kinasen cRaf und Akt/PKB sowie der Hochregulation des Co-Chaperon HSP70 im Vergleich zu den Proben der Zelllinie HCT116 (s. III 3.2.1) mittels Westernblot bestimmt.

In Abb. 3.17 sind die ESI-MS-Ergebnisse der Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 in der Zelllinie A2780 dargestellt und die entsprechenden Westernblots von A2780 und HCT116 in Abb. 3.18. In der Zelllinie A2780 zeigte sich im Vergleich zu HCT116 ein unterschiedliches Verhalten auf die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90. Eine Verdopplung des HSP90-beta-Gehalts und der Intensität des detektierten Phosphopeptids wurde hier schon bei einer Inhibitor-Konzentration von 50 nM beobachtet. Bei höheren Konzentrationen des Inhibitors blieb der Gehalt an HSP90-beta in der Zelle konstant, die Phosphopeptid-Intensität fiel jedoch ab. Die Alpha-Isoform hingegen zeigte keine so starke Induktion der Proteinexpression wie die Zelllinie HCT116 auf 17AAG und das Maximum der Phosphopeptidintensitäten war schon bei einer Inhibitor-Konzentration von 25 nM erreicht. Auch hier fielen die Phosphopeptidintensitäten wieder ab, obwohl der Gehalt an HSP90-alpha konstant blieb bzw. leicht anstieg.

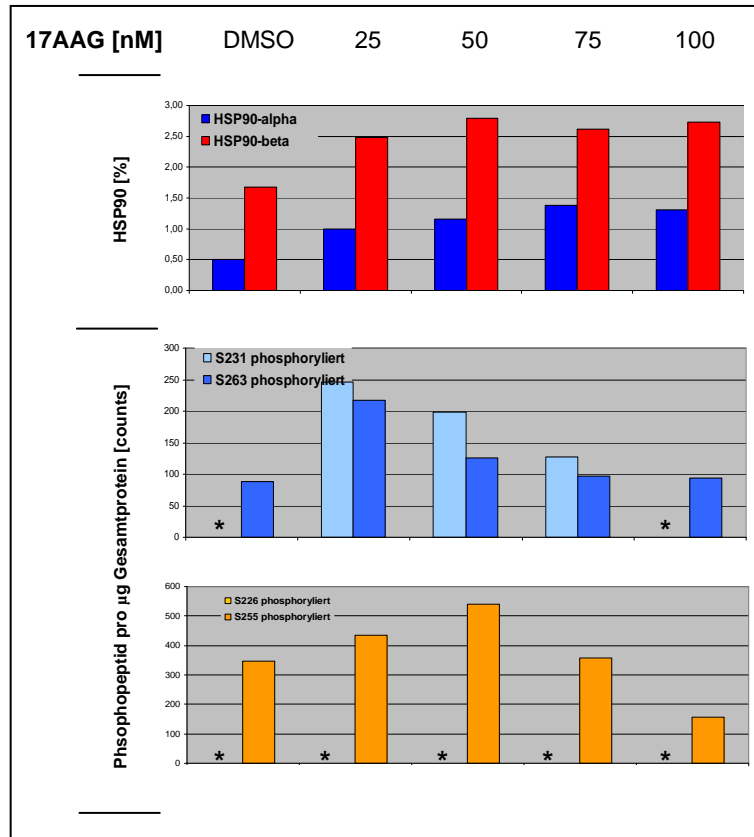


Abb. 3.17: HSP90-Gehalt und -Phosphorylierungsprofil der 17AAG inhibierten Zelllinie A2780

Die Zelllinie A2780 wurde 48 h kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Mengen 17AAG versetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mittels ESI-MS wurde der Gehalt (HSP90-alpha in blau und HSP90-beta in rot) in % vom Gesamtprotein und der Grad an Phosphorylierung (HSP90-alpha in hellblau und blau, HSP90-beta in gelb und orange) in counts pro μg Gesamtprotein für beide Isoformen bestimmt. Es wurde nur eine Einfachbestimmung durchgeführt. Durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 stieg der Gehalt an HSP90-alpha und -beta auf das Doppelte bei einer Inhibitorkonzentration von 50 nM an. Im Gegensatz zu HCT116 (s. Abb. 3.15) stiegen die Phosphopeptide von HSP90-alpha im gleichen Maße wie der Gehalt auf das ca. Doppelte bei 25 nM und fielen bei Erhöhung der Inhibitorkonzentration wieder ab. Für die Beta-Isoform konnte nur das Phosphopeptid in Position S255 nachgewiesen werden. Auch für dieses Peptid wurde ein Anstieg bis zu einer Konzentration von 50 nM und anschließendem Rückgang der Intensität zu beobachtet. Für die mit einem Stern * gekennzeichneten Proben lag die Intensität unter der Nachweisgrenze der Methode.

Durch die Westernblotanalyse von HSP90-alpha und -beta konnten der durch die ESI-MS-Auswertung der Proben bestimmte Anstieg beider Isoformen in beiden Zelllinien bestätigt werden. Sowohl HCT116 als auch A2780 zeigten durch den Anstieg der Inhibitorkonzentration für beide getesteten Serin/Threonin-Kinasen die erwartete Degradation. In A2780 reichte jedoch eine Konzentration von 25 nM an 17AAG aus, um ein Maximum des HSP70-Gehalts zu erreichen, der bei höheren Konzentrationen an Inhibitor gleich blieb bzw. wieder abfiel. In HCT116 stieg dieser bis zur maximalen Konzentration wie auch beide HSP90-Isoformen an.

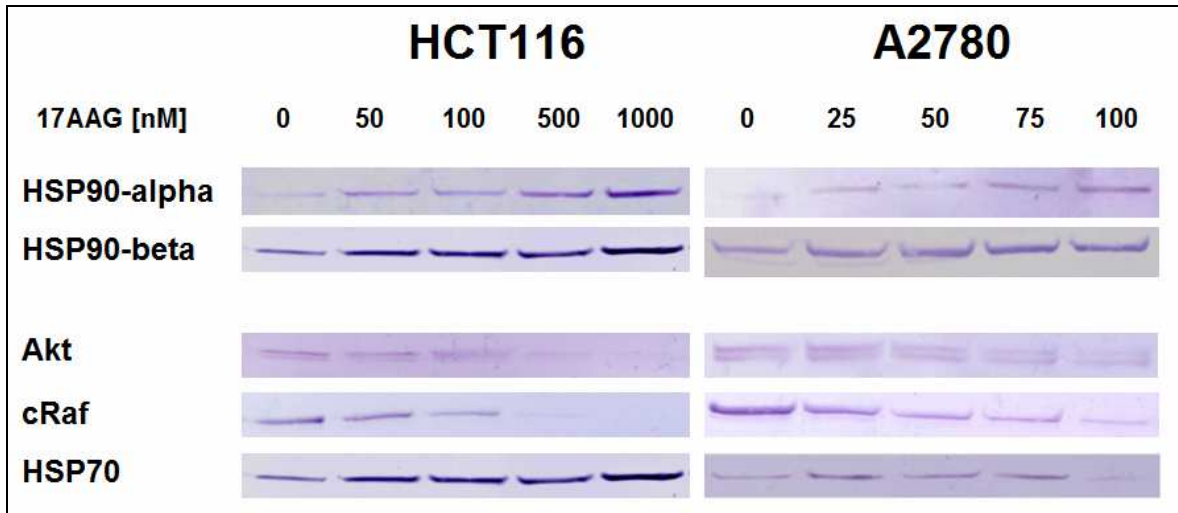


Abb. 3.18: Westernblotanalyse im Verlauf der Inhibierung der ATPase-Aktivität durch 17AAG von HSP90 in den Zelllinien HCT116 und A2780

Die Zelllinien HCT116 und A2780 wurden 48 h kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Mengen 17AAG versetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die gleichen Mengen an Gesamtprotein wurden für die unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen im SDS-Gel getrennt und immunchemisch mit den anti-mouse monoclonal Antibodies anti-HSP90-alpha und -beta (Fa. Acris), anti-Akt/PKB (Fa. Millipore), anti-c-Raf (Fa. BD Bioscience) und anti-HSP70 (Fa. Strssgen) gefärbt. HSP90-alpha und -beta zeigten in beiden Zellsystem einen Anstieg, der mit der ESI-MS-Auswertung korrelierte. Eine Degradation der Serin/Threonin-Kinasen zeigte sich für beide Zelllinien durch den Anstieg der Inhibitorkonzentration und auch die Hochregulation von HSP70 in HCT116. In A2780 stieg der HSP70-Gehalt bei 25 nM an und blieb bei höheren Konzentrationen an Inhibitor gleich bzw. fiel wieder ab. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei den Phosphopeptid-Intensitäten in Abb. 3.17.

4 HSP90-CLR-Phosphorylierung durch Arretierung in der G0/G1-Phase des Zellzyklus der Zelllinie HCT116

Bei der Zellzyklusanalyse der HSP90-Inhibierung durch 17AAG zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Zellen in der G2/M-Phase durch steigende Inhibitorkonzentrationen in der Zelllinie HCT116 (s. Abb. 3.15). Da auch die Phosphopeptid-Intensitäten und die Gehalte an HSP90-alpha und -beta mit zunehmender Inhibitorkonzentration stiegen, stellte sich die Frage, wie sich die Phosphorylierung von HSP90 in einer reinen G0/G1-Arretierung verhält. Die Zelllinie HCT116 wurde gewählt, da diese nach Erreichen der Konfluenz nur noch ein schwaches Wachstum zeigt und somit eine Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase erfolgt. Somit konnte auf den Einsatz von Zellzyklus-Inhibitoren verzichtet werden, die in unterschiedlichste Signalkaskaden eingreifen um einen G0/G1-Arrest zu erzeugen. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass HSP90 in diese Signalkaskaden involviert ist und somit eine unerwünschte Inhibitor induzierte Veränderung an HSP90 hervorgerufen wird. Es wurden 1×10^6 Zellen pro T75 Zellkulturflasche ausgesät. Nach einer Vorkultivierung von 24 h wurde das Kultivierungsmedium gewechselt, um Zellen, die den Split-Vorgang nicht überlebt haben, aus der Probe zu entfernen, da diese die anschließende Zellzyklus-Analyse verfälschen würden. Nach weiteren 24 h wurde der Versuch gestartet und täglich eine Flasche geerntet. Nach insgesamt 168 h (7 Tagen) wurde der Versuch abgebrochen, da bereits nach 120 h der Boden der Zellkulturflasche vollständig bewachsen war und kein weiteres Wachstum stattfand. Von zwei Proben wurde täglich eine FACS-Analyse durchgeführt (s. II 2.4) und von einer weiteren Probe wurde ein Lysat zur HSP90-Charakterisierung hergestellt und eingefroren. Die Probenaufarbeitung der Lysate erfolgte parallel und die Messung wurde innerhalb einer Messsequenz wie unter III 2 beschrieben, durchgeführt. Wie erwartet, konnte durch die Zellzyklus-Analyse gezeigt werden, dass der Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase zu Beginn von 39,1 % auf über 70 % nach 120 h anstieg und der Anteil der sich teilenden Zellen (S- und G2/M-Phase) von 51,8 % auf ca. 20 % reduziert wurde. Zur Veranschaulichung wurden die Mittelwerte der Daten aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit je 10 000 gemessenen Events graphisch dargestellt (s. Abb. 3.19). Der Gehalt für beide HSP90-Isoformen ist in allen sechs Messproben und somit über den gesamten Verlauf der Kultivierung fast annähernd identisch. Das gleiche gilt für die Phosphopeptide von HSP90-alpha. Bei den Phosphopeptiden von HSP90-beta ist jedoch ab dem fünften Tag (120 h) des Versuches, bei der sich die Zellen überwiegend in der G0/G1-Phase (s. Abb. 3.19) befanden, eine deutliche Abnahme um 1/3 der Intensität im Vergleich zu der Intensität bei erhöhter Zellteilung (48 – 96 h s. Abb. 3.20) zu erkennen.

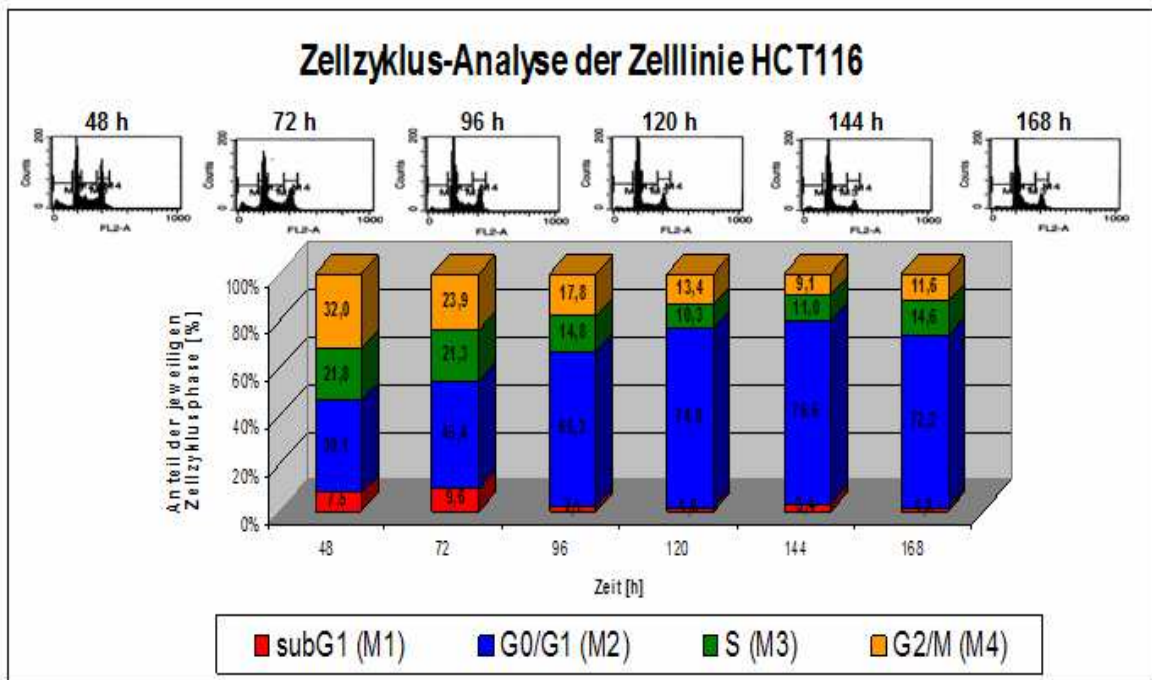


Abb. 3.19: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie HCT116 mittels FACS-Analyse

Die Zelllinie HCT116 wurde über einen Zeitraum von 168 h (7 Tagen) kultiviert. Ab dem zweiten Tag wurden täglich zwei Zellkultur-Flaschen geerntet und getrennt aufgearbeitet. Zur Bestimmung der prozentualen Anteile an Zellen in den einzelnen Zellzyklus-Phasen der unterschiedlich lange kultivierten Proben wurde der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden die Daten aus zwei unabhängigen Bestimmungen mit je 10 000 Events dargestellt. Im Verlauf der Kultivierung war ein deutlicher Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase zu erkennen.

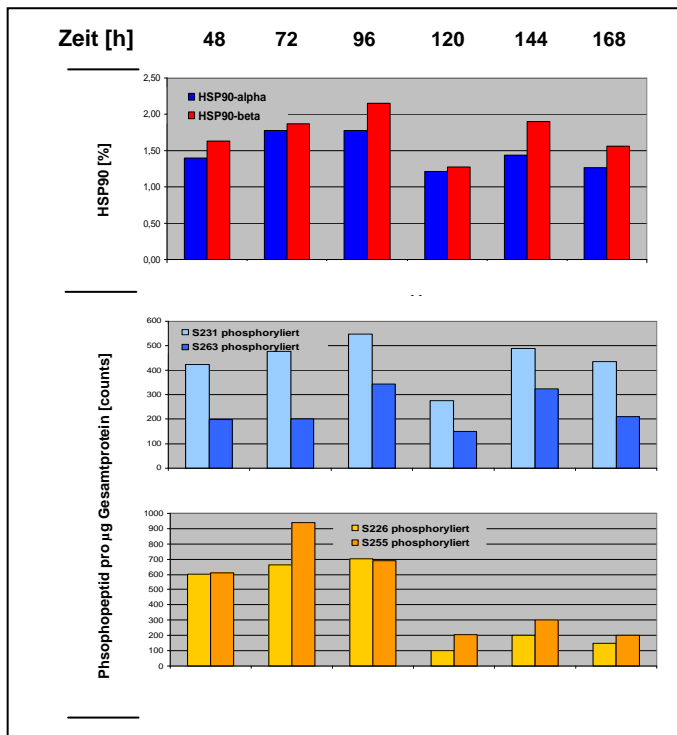


Abb. 3.20: HSP90-Gehalt und Phosphoprofil der Zelllinie HCT116

Die Zelllinie HCT116 wurde über einen Zeitraum von 168 h (7 Tage) kultiviert. Ab dem zweiten Tag wurde täglich eine Zellkulturflasche geerntet und die Zellen lysiert. Die Proben wurden parallel aufgearbeitet und mittels ESI-MS wurde der Gehalt (HSP90-alpha in blau und HSP90-beta in rot) in % pro Gesamtprotein und der Grad an Phosphorylierung (HSP90-alpha in hellblau und blau, HSP90-beta in gelb und orange) in counts pro µg Gesamtprotein ermittelt. Der Gehalt an HSP90-alpha und -beta als auch die Phosphopeptide von HSP90-alpha veränderten sich im Verlauf der Kultivierung über sieben Tage nicht. Die Phosphopeptide von HSP90-beta hingegen fielen nach 120 h Kultivierung auf 1/3 der vorherigen Intensität ab.

5 Phosphorylierung der CLR von HSP90 durch die Casein-Kinase II

In vielen Publikationen wird die Casein-Kinase II als die physiologische Kinsase von HSP90 *in vivo* beschrieben. Der direkte Nachweis der Phosphorylierung in der CLR von HSP90 durch diese Kinase über massenspektrometrische Methoden wurde jedoch noch nicht erbracht. Aus diesem Grund wurden Versuche mit CK II-Kinase-Inhibitoren in lebenden Zellsystemen durchgeführt und die Proben mit der neu entwickelten massenspektrometrischen Bestimmung analysiert. Der *in vitro* Nachweis, und die Eignung der Methode, wurden durch eine in-vitro-Kinase-Reaktion von rek. HSP90-alpha und HSP90-beta mit rek. hergestellter CK II durchgeführt.

5.1 In-vitro-Kinase-Reaktion von rek. HSP90 und der CK II (Holoenzym)

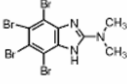
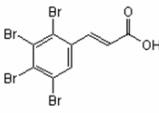
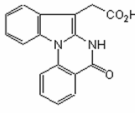
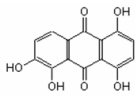
Wie unter II 3.9 beschrieben, wurde die in-vitro-Kinase-Reaktion an rek. HSP90-alpha und -beta durchgeführt. Das Verhältnis Protein zu Kinase wurde auf 1:1 eingestellt und die Reaktion durch Zusatz von ATP gestartet. Um eine Autophosphorylierung von HSP90 auszuschließen, wurde als Kontrolle ein Vergleichsansatz mitgeführt, dem außer der CK II alle restlichen Reagenzien zugesetzt wurden. Die Kinasereaktion wurde für 30 Minuten bei 30°C (optimale Temperatur für Kinasereaktionen) durchgeführt und durch Kochen der Reaktionslösung mit SDS-Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden im SDS-Gel getrennt, tryptisch verdaut und – wie unter III 2.2 beschrieben – analysiert. Die Beurteilung der Proben erfolgte direkt mit der Software BioPharmaLynx V1.1 der Fa. Waters, die eine spezielle Funktion zum direkten Vergleich von Proben bezüglich ihrer PTM-Muster besitzt. Weder in den Kalibrationsproben noch in den Vergleichsansätzen konnten die Massen der Phosphopeptide detektiert werden. Eine Autophosphorylierung von HSP90 konnte somit ausgeschlossen werden. Bei der Analyse der in-vitro-Kinase-Reaktionsproben konnten jeweils beide Phosphopeptide in der alpha- als auch der beta-Isoform nachgewiesen werden, was zeigt, dass die CK II in der Lage ist, beide HSP90-Isoformen *in vitro* zu phosphorylieren.

5.2 Inhibierung der HSP90-CLR-Phosphorylierung *in vivo*

5.2.1 Inhibierung der Casein Kinase II Aktivität über spezifische Inhibitoren

HSP90-alpha als auch -beta lässt sich *in vitro* durch die Casein-Kinase II (Holoenzym) phosphorylieren (s. III 5.1). In diesem Versuch sollte der *in-vivo*-Nachweis erbracht werden, dass die CK II die physiologische Kinase von HSP90 ist. Hierzu wurden Zellkulturen der Zelllinien HCT116 und A2780 mit unterschiedlichen CK II-Inhibitoren versetzt. In Tabelle 3.8 sind die Inhibitoren mit ihrer Strukturformel aufgeführt. Die Zellkulturen wurden 48 h kultiviert und anschließend mit ansteigender Konzentration der Inhibitoren versetzt (Konzentration s. Tab. 3.8). Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und – wie zuvor die Proben der 17AAG-Inhibierung (s. III 3.2.1) – aufgearbeitet und analysiert. Schon in Vorversuchen mit den in der Literatur angegebenen Konzentrationen der CK II-Inhibitoren konnte keine Auswirkungen auf die Zellsysteme beobachtet werden. Für DMAT gelang es nicht, die beschriebene Konzentration von 100 μM in der Zellkultur in Lösung zu halten. Unter dem Lichtmikroskop konnte nach Zugabe dieser Konzentration ein Auskristallisieren der Substanz festgestellt werden. Da durch Kristallisations-Effekte der Inhibitoren im Kultivierungsmedium keine aussagekräftige Beurteilung der Inhibierung auf die Zellsysteme erfolgen kann, wurde für die Probe der ESI-MS-Auswertung als höchste Inhibitor-Konzentration das Maximum der Löslichkeit von 1 μM für DMAT gewählt. Da bei allen anderen Inhibitoren ebenfalls keine Veränderung im Zellwachstum bei den angegebenen Konzentrationen beobachtet werden konnte, wurde auch hier die maximale Löslichkeit als oberste Konzentration gewählt. Bei der Auswertung konnte weder eine Veränderung der Konzentration von HSP90-alpha und -beta noch eine Veränderung im Phosphorylierungsprofil beider Isoformen detektiert werden (Daten nicht aufgeführt). Es kann davon ausgegangen werden dass unter diesen Bedingungen die CK II-Inhibitoren nicht in die Zellen eindringen konnten, da selbst bei den höchsten Konzentrationen keinerlei Veränderung des Wachstums oder der Morphologie der Zellen beobachtet wurde.

Tab. 3.8: CK II-Inhibitoren

	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole, DMAT					
	DMAT [μM]	DMSO	0,25	0,5	0,75	1
	(E)-3-(2,3,4,5-Tetrabromophenyl)acrylic acid, TBCA					
	TBCA [μM]	DMSO	1	5	10	50
	5-Oxo-5,6-dihydroindolo[1,2-a]quinazoline-7-acetic acid, IBA					
	IQA [μM]	DMSO	0,1	0,5	1	10
	1,2,5,8-Tetrahydroxy-9,10-anthraquinone, Quinalizarin					
	Quinalizarin [μM]	DMSO	0,5	1	10	50

5.2.2 Allgemeine Inhibierung der Kinase-Aktivität durch Staurosporin

Da die Versuche mit den CK II-Inhibitoren keine Ergebnisse lieferten, sollte zumindest gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der CLR von HSP90 nicht durch Autophosphorylierung *in vivo*, sondern durch eine Kinase erfolgt. Der Breitspektrum-Kinase-Inhibitor Staurosporin ist in der Lage, in einer Vielzahl von Zellen Apoptose zu induzieren. Staurosporin bindet mit deutlich höherer Affinität in der ATP-Bindungstasche vieler Kinasen und inhibiert dadurch deren Kinase-Aktivität. Eine eindeutige Zuordnung der physiologischen Kinase kann durch die niedrige Selektivität von Staurosporin jedoch nicht erfolgen. Die Zelllinie HCT116 wurde nach 48 h Kultivierung mit DMSO (Kontrolle), 2,5 und 5 μM Staurosporin versetzt und nach weiteren 24 h Inkubation geerntet und lysiert. Die Proben wurden im SDS-Gel getrennt, die HSP90 Banden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit der ESI-MS-Methode wurde der Phosphorylierungs-Status bestimmt. Die mit Staurosporin behandelten Proben zeigten schon bei 2,5 μM einen deutlichen Anstieg an apoptotischen Zellen und somit einen Erfolg der allg. Kinase-Inhibierung. Bei der Auswertung der Phosphopeptide konnte eine deutliche Abnahme der Phosphopeptide und eine Zunahme von unphosphorylierten Peptiden aus der CLR beobachtet werden. Die Zunahme von HSP90-alpha und auch -beta wurde nicht festgestellt. Dies schließt eine Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 aus, da hierdurch, wie zuvor mit 17AAG gezeigt wurde, ein deutlicher Anstieg beider Proteine erfolgen müsste. Eine Inhibierung von HSP90 ist auch auszuschließen, da die ATP-Bindung an HSP90 im Gegensatz zu der Bindung an Kinasen in einer anderen Form, in der sog. Bergerat-Falte (s I 2.2), erfolgt. Somit konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Kinase für die Phosphorylierung an HSP90 verantwortlich ist.

6 Bindungsverhalten von Co-Chaperonen in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus

Auffälligerweise kann man bei sehr vielen Co-Chaperonen das typische Phosphorylierungs-Motiv (S-X-X-E/D) der CK II finden. Für einige dieser Bindungspartner, die entscheidend in die Aktivierung von HSP90 eingreifen, konnte auch eine Phosphorylierung dieser Serin-Reste nachgewiesen werden. In Tabelle 3.9 sind einige der wichtigeren Co-Chaperone von HSP90 mit ihren Peptidsequenzen, die dieses CK II-Motiv enthalten, aufgeführt.

Tab. 3.9: HSP90 Co-Chaperone und ihre CK II-Phosphorylierungsstellen

Bindungsprotein	Aminosäuresequenz		identifiziert
p23 Prostaglandin E-Synthetase	145 – 160	DDD S QD S DDEKMPDLE	ja
	110 – 118	EDD S DEDMS	ja
Aha1 Aktivator von HSP90	110 – 118	DEN S VDEVEI	nein
cdc37 HSP90 Chaperon	9 – 18	HIEV S DDEDE	ja
Hop HSP70-Hsp90 Organisations Protein	478 – 486	RHD S PEDVK	ja
HSP70 Hitzeschockprotein 70	633 – 641	SGPT T IEEVD	nein
FKBP52 Peptidyl-proly cis-trans isomerase	140 - 147	EDL T EEED	nein

6.1 In-vitro-Phosphorylierung der Co-Chaperone Aha1 und p23

Zur Analyse der Auswirkungen auf die Bindung zu HSP90-alpha bzw. -beta wurden das als HSP90-Inhibitor beschriebene Protein p23 und der HSP90-Aktivator Aha1 ausgewählt. Beide Proteine wurden, wie unter II 3.9 beschrieben, mit rek. CK II (Holoenzym) in einer *in-vitro*-Kinase-Reaktion phosphoryliert. Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen wurde der Grad an Phosphorylierung ausgewertet. Durch MS-Experimente am MALDI konnte an Aha1 keine Phosphatgruppe nach der Kinasereaktion detektiert werden. Wohingegen an p23 eine Massenerhöhung von 240 Da gemessen werden konnte, was einer 3-fachen Phosphorylierung entspricht. Durch Messung der Kinetik stellte sich heraus, dass eine vollständige Phosphorylierung schon nach 30 Minuten erzielt werden konnte. In Abb. 3.21 sind die MS-Spektren der MALDI-MS-Messung von p23 abgebildet. Als Vergleich wurde ein Ansatz ohne CK II aber mit ATP durchgeführt, um eine Autophosphorylierung auszuschließen.

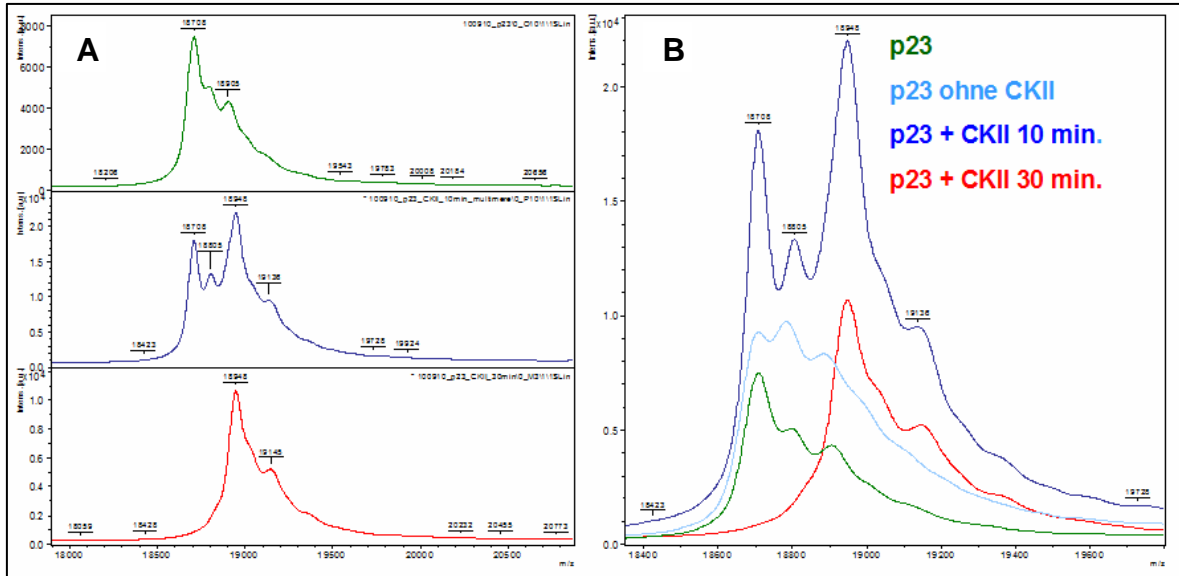


Abb. 3.21: *In-vitro*-Phosphorylierung von p23 mit Casein Kinase II

Für die *in-vitro*-Kinase-Reaktion mit p23 und Casein Kinase II wurde ein Verhältnis von Protein zu Kinase von 1:1 eingestellt und durch Zugabe von ATP gestartet. Die Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt und nach 10 bzw. 30 min. durch Mischen der Reaktionslösung mit der Matrix für die MALDI-Bestimmung gestoppt. **A)** In grün ist das MS-Spektrum für p23, in blau für ein Inkubation von 10 min. und in rot für 30 min. abgebildet **B)** Overlay der MS-Spektren: p23 unbehandelt (grün), Reaktionsansatz ohne CK II (hellblau), Kinaseaktion 10 min. (blau) und 30 min. (rot). Der Anstieg der Masse um 240 Da von 18 708 Da auf 18 948 entspricht einer 3-fachen Phosphorylierung. Nach einer Inkubation von 30 min. konnte eine vollständige Phosphorylierung von p23 erzielt werden. Eine Autophosphorylierung kann ausgeschlossen werden, da im Vergleichsansatz ohne CK II (hellblau) keine Phosphorylierung detektiert werden konnte.

6.2 Nachweis der Phosphorylierungsstellen an p23 durch MALDI-MS/MS-Analyse

Alle drei Phosphorylierungsstellen von p23 in Position Ser-113, Ser-148 und S-151 die das Motiv für die CK II tragen, wurden durch Phosphoproteom-Analysen bereits identifiziert (Oppermann *et al.*, 2009). Zum direkten Nachweis wurde das phosphorylierte Protein mit Trypsin verdaut und über ein MS/MS-Experiment über MALDI bestimmt. Durch das Fehlen von Lysin und Arginin im Bereich der bekannten Serin-Phosphorylierungsstellen konnte durch tryptischen Verdau nur ein Peptid mit einer Masse von 3621 (FSEMMNMGDEDVDLPEVDGADDD S_p QDS p DDEK) Da generiert werden. Diese Masse liegt an der oberen Bestimmungsgrenze der MALDI-Analyse. Durch Phosphorylierung an zwei Serin-Resten erhöht sich die Masse um weitere 160 Da und die Ionisierbarkeit wird durch die Phosphorylierungen weiter abgeschwächt. Da diese beiden Phosphorylierungen durch die CK II schon beschrieben sind (s. Tabelle 3.9), wurden keine weiteren Analysen durchgeführt. Für Ser-113 konnte das Peptid DWEDDS p DEDMSNFDR generiert und auch sequenziert werden. In Abb. 3.22 ist die Sequenzanalyse des Phosphopeptids über MALDI-MS-MS abgebildet.

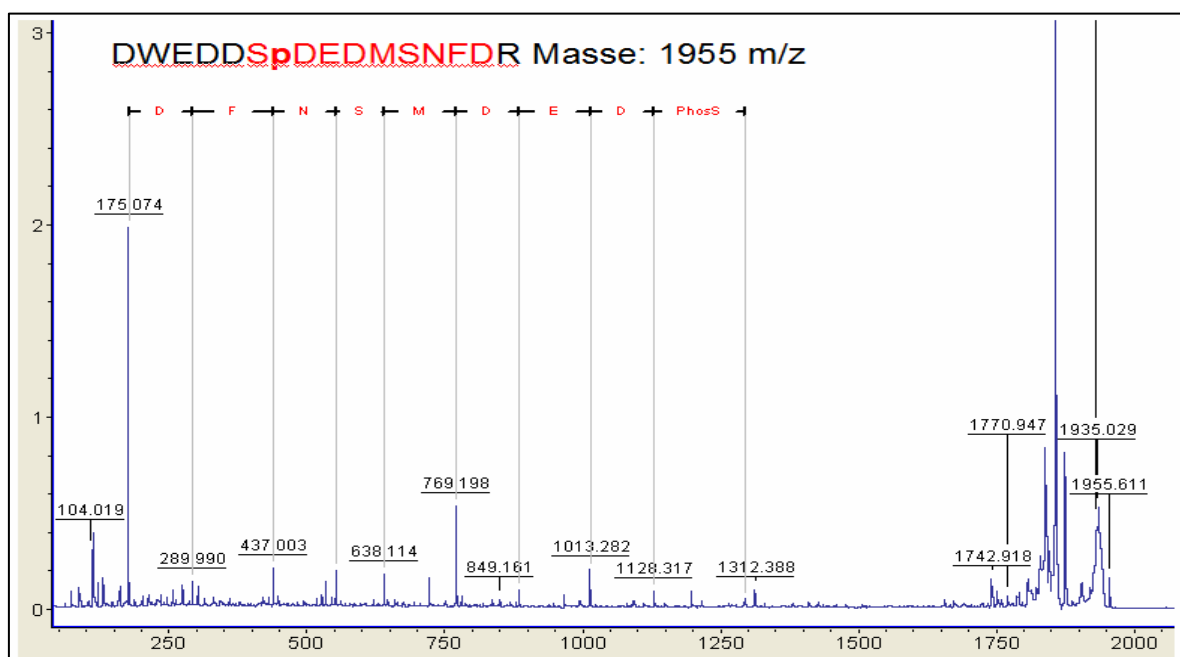


Abb. 3.22: Sequenzanalyse des durch CK II *in vitro* phosphorylierte Serin in p23

Durch Casein-Kinase II phosphoryliertes p23 wurde tryptisch verdaut und die generierten Peptide mittels MALDI-MS/MS analysiert. Für das phosphorylierte Peptid DWEDDS p DEDMSNFDR konnte eine neun Aminosäure große Teilsequenz nachgewiesen werden, was für eine eindeutige Zuordnung ausreichend ist.

6.3 Bindungs-Assay von p23 und Aha1 an HSP90-alpha und -beta

Für p23 und auch Aha1 konnte durch Co-Kristallisation und anschließender Strukturanalyse die Bindungsdomäne in HSP90 bestimmt werden. So bindet p23 im Bereich der ATP-Bindungsstasche im N-Terminus und Aha1 in der Mitteldomäne von HSP90. Da beide Proteine in der Nähe der CL-Region von HSP90 binden, war es von Interesse, ob die Phosphorylierung durch die CK II einen Einfluss auf die Ausbildung der Protein-Komplexe hat. Ein Bindungs-ELISA wurde zur Untersuchung dieser Fragestellung entwickelt (s. II 3.10). Um eine unkontrollierte Ausrichtung von HSP90 an die Mikrotiterplatte (MTP) zu vermeiden, wurde HSP90 über einen C-terminal-spezifischen monoklonalen Antikörper an die MTP gebunden. Somit war der N-Terminus frei für die Bindung der Co-Chaperone. Nach Inkubation mit den Bindungspartnern wurde ein spezifischer Antikörper für diese zum Nachweis eingesetzt. In Abb. 3.23 ist dieser schematische Aufbau anhand der p23-Bindung dargestellt.

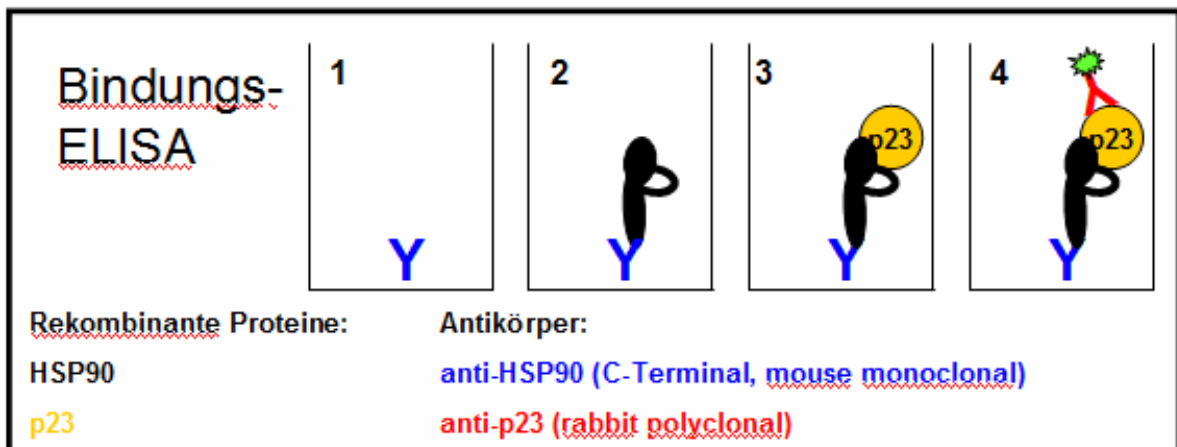


Abb. 3.23: Schematische Darstellung des Bindungs-ELISA zwischen HSP90 und p23

Der anti-HSP90 C-Terminal-spezifische Antikörper wurde an die MTP gebunden und anschließend mit HSP90-alpha bzw. -beta (phosphoryliert und unphosphoryliert) abgesättigt. Zur Bindung des Cochaperons wurde dies in seiner phosphorylierten bzw. unphosphorylierten Form für 24 h bei 5 °C zugesetzt und anschließend mit einem geeigneten Antikörper nachgewiesen.

Es wurden alle möglichen Kombinationen mit HSP90-alpha und -beta jeweils in der phosphorylierten und unphosphorylierten Form mit den Co-Chaperonen durchgeführt. Mit dem Cochaperon Aha1 konnte keine Bindung in diesem ELISA nachgewiesen werden. Obwohl durch die Kinasereaktion keine Phosphorylierung an Aha1 nachgewiesen werden konnte, wurden auch diese Proben im Bindungs-ELISA eingesetzt. Da bei diesen Versuchen ATP im Überschuss zugesetzt wurde, erfolgte hierdurch der Nachweis, dass die Anwesenheit von ATP keinen aktivierenden Einfluss auf die Bindung zwischen Aha1 und HSP90 hat. Für p23 ist bekannt, dass dieses Cochaperon nur in Anwesenheit von ATP in der ATP-Bindungsstasche an HSP90 bindet. Für diese Versuche wurde p23 aus

den *in-vitro*-Kinase-Ansätzen mit bzw. ohne CK II eingesetzt. Beide Ansätze enthielten ATP im Überschuss und es musste für diesen Versuch nicht gesondert zugesetzt werden. In diesem ELISA ist es gelungen, eine unterschiedliche Bindung zu den HSP90-Isoformen nachzuweisen. So erfolgte eine Bindung zwischen HSP90-beta und p23 in allen möglichen Kombinationen, eine Bindung zwischen HSP90-alpha und p23 konnte jedoch nur für die phosphorylierte p23-Form detektiert werden. Die unphosphorylierte Form von p23 zeigte im Vergleich nur eine sehr schwache Bindungsaffinität zu den Alpha-Varianten. In Abb. 3.24 ist die graphische Auswertung des Bindungs-ELISA abgebildet.

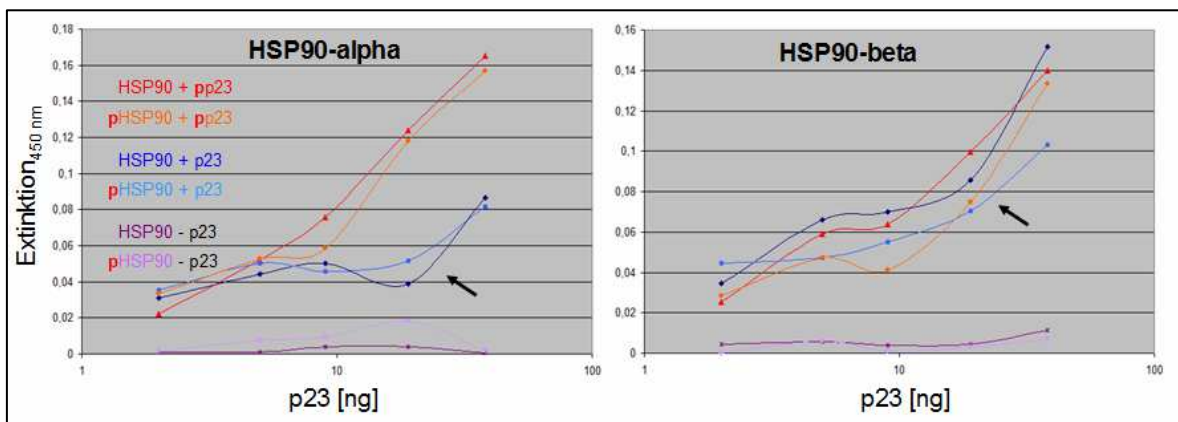


Abb. 3.24: Bindungs-ELISA zwischen HSP90 und p23

HSP90 wurde über einen C-Terminal-spezifischen Antikörper an eine MTP gebunden und mit p23 über Nacht bei 5°C inkubiert. Der Nachweis des an HSP90-gebundenen p23 erfolgte über einen spezifischen Antikörper. Beide Bindungspartner wurden in ihren phosphorylierten und unphosphorylierten Varianten gegeneinander ausgetestet. Für HSP90-beta ergaben sich kein Unterschiede hinsichtlich der Phosphorylierung beider Proteine und deren Bindung untereinander. Phosphoryliertes p23 (rot und orange) bindet jedoch deutlich stärker an HSP90-alpha (phosphoryliert und unphosphoryliert) als die unphosphorylierte Form von p23 (blau und hellblau). Mit einem schwarzen Pfeil ist der Bereich markiert, bei dem beide Proteine in einem molaren Verhältnis von 1:1 vorlagen. In lila sind die beiden Vergleichsansätze abgebildet, denen kein p23 zugesetzt wurde.

IV Diskussion

Die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 macht dieses Target für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente so interessant, da Tumor-Zellen selektiv auf diese Inhibitoren ansprechen. Zurzeit befinden sich über zehn HSP90-Inhibitoren in der klinischen Entwicklung, wobei 17AAG (Tanespimycin) bereits in Phase III getestet wird. Durch zahlreiche Veröffentlichungen wurde der grundlegende Mechanismus der ATP-Hydrolyse von HSP90 und die dadurch katalysierte Aktivierung der Substratproteine in letzter Zeit weitestgehend aufgeklärt, jedoch stellt sich immer noch die Frage, wodurch dieser Mechanismus *in vivo* in humanen Zellen reguliert wird. Im Fokus stand die Untersuchung von endogenem HSP90 hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen, die am Aktivierungs-Zyklus maßgeblich beteiligt sind. Durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 über 17AAG existiert eine Methode, durch die die Auswirkungen eines Eingriffs in diesen Aktivierungs-Mechanismus beurteilt werden konnte. Ein weiterer Punkt, der immer wieder Fragen aufwirft, ergibt sich aus der Tatsache, dass in humanen Zellen zwei Isoformen von HSP90 vorliegen. Die hohe Sequenzhomologie der alpha- und beta-Form erschwerte die Analysen dieser Arbeit, wurden jedoch als äußerst wichtig erachtet, da zwar die Aminosäuresequenz der ATP-Bindungstasche beider Proteine nahezu identisch ist, jedoch die angrenzenden Regionen, die entscheidend am ATP-Hydrolyse-Zyklus beteiligt sind (N-Terminus und CL-Region), die größten Sequenzunterschiede aufzeigen.

1 Qualitative und quantitative PTM-Analyse von endogenem HSP90-alpha und -beta

HSP90-alpha und -beta besitzen eine sehr hohe Sequenzhomologie von ca. 86 %; dies stellte eine große Herausforderung dar, eine geeignete Methode zu etablieren, die es zulässt, beide Proteine hinsichtlich ihres PTM-Musters zu charakterisieren. Da eine sehr hohe Anzahl von PTM an HSP90 in allen Regionen beschrieben wurde (s. Tabelle 3.1), musste eine Methode ausgewählt werden, die eine eindeutige Zuordnung in der Sequenz zu einer der beiden Isoformen zulässt. Da HSP90 abundant in humanen Zellen vorliegt, konnte dies ohne Probleme in ausreichenden Mengen aus zellulären Proben isoliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass der „charged Linkers“ von HSP90, der sich fast ausschließlich aus den geladenen Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Lysin zusammengesetzt, große Probleme bei der Analytik mit den derzeit gängigen

Analysenmethoden bereitete. Es ist jedoch gelungen eine Methode zu etablieren, mit der eine Beurteilung des gesamten Moleküls einschließlich der CLR möglich war (s. III 1). Bei der Beurteilung der HSP90-Isolate aus Tumor- und Nicht-Tumor-Zelllinien zeigte sich dass die in der CLR beschriebene Phosphorylierung in HSP90-alpha als auch in HSP90-beta nachgewiesen werden konnte. Durch diesen qualitativen Nachweis deutete sich eine höhere Intensität der phosphorylierten Proteine in den Tumor-Zelllinien an und konnte durch die speziell für diese Fragestellung entwickelte Methode (s. III 2) auch quantitativ bestätigt werden. Neben einem bis zu 5-fach höheren Gehalt an HSP90-beta und 3-fach höheren Gehalt an HSP90-alpha in den Tumor-Zelllinien konnten die phosphorylierten Varianten beider Proteine mit noch deutlich stärkeren Unterschieden bestimmt werden (s. III 2.4.1 und 2.4.2). Hierbei ist es erstmals gelungen, den Phospho-Status von HSP90-alpha als auch HSP90-beta in der CLR beider Proteine quantitativ in zellulären Proben zu bestimmen.

Um den Nachweis zu erbringen, dass diese phosphorylierte Form von HSP90 auch in der von Kamal *et al.*, 2003, publizierten „aktiven Form“ in Tumor-Zellen vorliegt, wurde HSP90 aus Lysaten von Tumor- und Nicht-Tumor-Zelllinien über die von ihnen beschriebenen Vorgehensweise isoliert (s. III 3.1). Die Mengen an HSP90, die über dieses Verfahren isoliert wurden, reichten für eine repräsentative Analytik jedoch nicht aus. Durch Inhibierungsversuche der ATPase-Aktivität von HSP90 mit 17AAG sollte nun an den Tumor-Zelllinien HCT116 und A2780 geprüft werden, wie sich diese Inhibierung auf die beiden Proteine und im besonderen auf die Phosphorylierung der CLR auswirkt (s. III 3.2). Die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 durch 17AAG konnte in beiden Zelllinien erfolgreich durch Induktion von HSP70 und Degradation der beiden Serin/Threonin-Kinasen cRaf und Akt/PKB nachgestellt werden (s. Abb. 3.18). Beide Zelllinien zeigten durch die Inhibierung mit 17AAG eine deutliche Induktion der HSP90-alpha als auch -beta Expression. Da im gleichen Maße wie der Gehalt beider Isoformen auch die Phosphorylierung beider Proteine anstieg, war ein eindeutiger Nachweis, dass die phosphorylierten Varianten die „aktive Form“ von HSP90 darstellen nicht gegeben. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass beide Zelllinien unterschiedlich auf diese Inhibierung reagierten. So zeigte sich, dass eine Induktion der Apoptose in der Zelllinie A2780 schon mit deutlich geringeren Mengen an 17AAG erfolgte als in HCT116 – trotz ähnlicher Gehalte an HSP90-alpha und -beta in den unstimulierten Proben. Die Phosphorylierung der CLR beider Proteine zeigte hier einen deutlich größeren Unterschied. Burrows und Kollegen zeigten, dass durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 ein Arrest der Zellen in allen Phasen des Zellzyklus stattfinden kann und dass dies stark von der Art des Inhibitors und von der Tumor-Zelllinie abhängt.

Die Zelllinie HCT116 zeichnet sich dadurch aus, dass sie nach Erreichen der Konfluenz ihr Wachstum einstellt; dieses Stadium wurde gewählt, um eine Population an Zellen zu generieren, die sich überwiegend in der G₀/G₁-Phase befinden (s. III 4). Im Verlauf dieses Versuchs zeichnete sich ab, dass die Phosphorylierung der CLR von HSP90-beta in diesem Stadium der Ruhephase signifikant zurückgegangen ist. Über diesen Versuch konnte zum ersten Mal eine Differenzierung der beiden Isoformen hinsichtlich einer posttranslationalen Modifikation, der Phosphorylierung in der CLR im Verlauf der Zellteilung, aufgezeigt werden. Es ist gelungen, die Phosphorylierung von HSP90-beta eindeutig der G₂/M-Phase zuzuordnen. Ob jedoch HSP90-alpha ausschließlich in der G₀/G₁-Phase phosphoryliert wird, konnte hier nicht geklärt werden und bleibt noch zu beweisen.

2 Phosphorylierung der CLR von HSP90 durch die CK II

Für beide Phosphorylierungsstellen in der CLR von HSP90-alpha und auch -beta konnte die Casein Kinase II durch das Erkennungsmotiv S-X-X-E/D als mögliche physiologische Kinase bestimmt werden. Auch in Co-Präzipitations-Versuchen wurden diese als Bindungspartner von HSP90 identifiziert (Dougherty *et al.*, 1987). Es wurde jedoch auch diskutiert, dass diese Bindung nicht in Verbindung mit der Phosphorylierung von HSP90 steht, sondern die CK II ein Substratprotein von HSP90 darstellt. Die CK II liegt als Holoenzym in einem Tetramer-Komplex aus je zwei alpha- und beta-Untereinheiten vor (Padmanabha and Glover 1994). Durch radioaktive Markierung mit ³²P wurde die *in-vitro*-Phosphorylierung von HSP90 mit CK II bereits bestätigt. Durch Wiederholung der *in-vitro*-Kinase-Reaktion (ohne radioaktive Markierung) mit den rekombinanten Proteinen ist in dieser Arbeit der direkte Nachweis von beiden Phosphorylierungen in HSP90-alpha und -beta in der CLR durch die CK II mit der neu etablierten Analysemethoden gelungen (s. III 5.1).

Ein eindeutiger Nachweis, dass es sich bei der CK II auch um die physiologische Kinase von HSP90 handelt, ist *in vivo* noch nicht über massenspektrometrische Analysen erfolgt. Über Inhibierungs-Versuche der CK II-Aktivität mit geeigneten Inhibitoren sollte dieser Nachweis an lebenden Zellen erbracht werden. Es wurden Versuche mit den beschriebenen CK II-Inhibitoren DMAT, TBCA, IBA und Quinalizarin durchgeführt und ausgewertet (s. III 5.2.1). Diese Substanzen weisen alle eine schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien auf und anhand ihrer Struktur wurde eine schlechte Zellpermeabilität vermutet. Die Konzentrationen bis zu der maximalen Löslichkeit, die in den Versuchen eingesetzt werden konnten, zeigten weder eine Veränderung in der Zell-Viabilität noch in

der Morphologie der Zellen. Auch bei der Auswertung der Proben konnte weder eine Veränderung des Phosphorylierungs-Musters an HSP90-alpha noch an HSP90-beta bestimmt werden. Durch die Inhibierung der allgemeinen Kinase-Aktivität mit dem Inhibitor Staurosporin konnte allerdings der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei diesen Phosphorylierungen nicht um eine Auto-Phosphorylierung von HSP90 *in vivo* handelt (III 5.2.2). Um den tatsächlichen Nachweis der CK II als physiologische Kinase von HSP90 zu erbringen, könnten unter Anwendung dieser Versuchsanordnung effizientere Inhibitoren oder auch ein siRNA-knockdown der CK II durchgeführt werden.

3 Phosphorylierung des Co-Chaperone p23 durch die CK II und ihre Auswirkung auf die Bindung zu HSP90

Auffälligerweise kann man bei sehr vielen Co-Chaperonen und Substratproteinen das typische Phosphorylierungs-Motiv (S-X-X-E/D) der CK II finden. Für einige dieser Bindungspartner, die entscheidend in die Aktivierung von HSP90 eingreifen, konnte auch eine Phosphorylierung dieser Serin-Reste nachgewiesen werden. Die Prostaglandin E Synthase 3 (p23) besitzt drei Serin-Reste mit dem typischen Erkennungsmotiv der CK II in seinem C-Terminus. Alle drei Stellen wurden bereits beschrieben und in dieser Arbeit konnte eine dreifache Phosphorylierung durch eine *in-vitro* Kinase-Reaktion von p23 mit der CK II bestätigt werden (III 6.1 und 6.2). Diese Homologie zu der CLR von HSP90 und die räumliche Nähe dieser PTM in der NBD im HSP90-p23-Tetramer-Komplex (s. Abb. 4.1) ließen darauf schließen, dass hier eine Regulation der Komplexbildung durch die Phosphorylierung stattfindet, was auch schon von Kobayashi *et al.* 2004 für die p23 Phosphorylierung veröffentlicht wurde. Des Weiteren wurde für die Aufklärung der Bindung beider Proteine durch Kristall-Struktur-Analysen der Homologe aus *S. cerevisiae* Sba1 und HSP82 von Ali *et al.*, 2006, die CLR von HSP82 (AS 221 – 255) durch die Aminosäuresequenz LQHMASVD ersetzt. Die Bindung beider Proteine wurde durch diese Mutation nicht beeinflusst. Weitere Bindungsversuche mit unterschiedlichen CLR-Mutationen von HSP82 und Sba1 (Hainzl *et al.*, 2009) zeigten jedoch, dass die Deletion der AS 211 – 259 gar keinen oder nur teilweisen Einfluss (AS 211 – 263) auf die Bindung beider Proteine hat; jedoch eine Entfernung von AS 211 – 266 bzw. 211 – 272 führte zu einem vollständigen Verlust der Bindung (s. Abb. 1.6). In den humanen Varianten HSP90-alpha und -beta befinden sich in diesen Mutationen beide Phosphorylierungsstellen der CK II (s. Abb. 1.6). Durch diese Abhängigkeit der CLR und der Bindung zu p23 wurde der Einfluss der Phosphorylierung auf das Bindeverhalten beider Proteine bestimmt. Beide Proteine zeigten in HSP90-beta, egal ob beide phosphoryliert oder unphosphoryliert

vorlagen, sehr gute Bindeeigenschaften. In HSP90-alpha hingegen fand eine Bindung nur statt, wenn p23 in der phosphorylierten Form eingesetzt wurde. Hierdurch gelang es erstmals, einen entscheidenden Unterschied zwischen HSP90-alpha und -beta in der Ausbildung der für die Chaperon-Aktivität essentiellen Komplex-Bildung mit dem Cochaperon p23 zu entdecken. Diese C-terminale Region von p23 und die CL von HSP90 scheinen eine entscheidende Rolle im Ablauf des Chaperone-Zyklus von HSP90 zu spielen. Woo *et al.*, 2009, zeigten, dass durch Caspase-induzierte Abspaltung des C-Terminus von p23 zwar die Bindung zu HSP90 nicht vermindert wurde, aber die Chaperone-Aktivität *in vitro* vollständig verloren ging. *In vivo* zeigte sich durch Überexprimierung einer p23-Mutation, ohne den C-Terminus, eine Unterdrückung der HSP90-Phosphorylierung im CL. Hieraus lässt sich ableiten, dass HSP90-alpha nur phosphoryliert werden kann, wenn p23 zuvor phosphoryliert wurde und an HSP90-alpha im Verlauf des Chaperon-Zyklus in der „closed“ Form gebunden hat. HSP90-beta wird von dieser p23-Phosphorylierung nicht beeinflusst und ist somit autark von diesem Mechanismus. Da davon ausgegangen werden kann, dass die Casein-Kinase II auch *in vivo* für diese Regulation verantwortlich ist, kann hiermit der Ablauf in der Zelle deutlich besser charakterisiert werden.

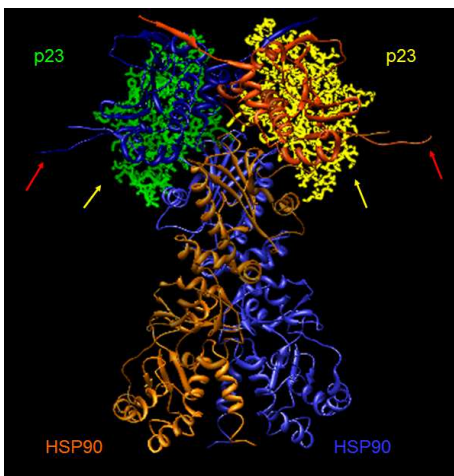


Abb. 4.1: Kristallstruktur des HSP82/Sba1-Komplexes

Hsp82-Sba1-Komplex *Saccharomyces cerevisiae* (HSP90/p23 homo sapiens) in der geschlossenen AMP-PNP gebundenen Form. Die Charged Linker Region (AS: 221 – 255) wurde ersetzt durch die Peptid-Sequenz LQHMASVD (PDB: 2CG9, Ali *et al.*, 2006). HSP90 ist in blau und orange dargestellt, das Co-Chaperon p23 in gelb und grün. Die fehlenden Sequenzen von HSP90 sind durch einen roten Pfeil und der C-Terminus von p23 durch einen gelben Pfeil markiert.

4 Einfluss der Casein Kinase II auf den HSP90-Chaperone-Zyklus in humanen Zellen – neue Erkenntnisse

Für den hier vorgestellten Mechanismus über den Ablauf der ATP-Hydrolyse von HSP90 sind das Co-Chaperon p23 und die Casein Kinase II zwei wichtige Co-Faktoren, die diesen Vorgang entscheidend beeinflussen. Für HSP90-alpha und -beta wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass diese in den Tumor-Zellen in höheren Konzentrationen vorliegen als in den Nicht-Tumor-Zellen; dieses Ergebnis wurde auch von anderen Forschergruppen publiziert. Die bereits bekannten Phosphorylierungen in der CLR beider Proteine waren zwar bekannt, konnte doch bis jetzt noch nicht quantitativ erfasst werden. Durch die Qualifizierung der Bestimmung des Phosphostatus beider Isoformen durch die ESI-MS-Quantifizierung ist es gelungen auch hier einen signifikant höheren Anteil dieser modifizierten Varianten in den Tumorzelllinien zu detektieren. Für das Co-Chaperon p23 und die Caseine Kinase II wurde ebenfalls eine erhöhte Expression und eine höhere Aktivität der CK II in Tumor-Zellen veröffentlicht (Simpson *et al.* 2010, Mollerup *et al.* 2003, Wang *et al.* 2006). Von Kamal und Kollegen wurde auch eine deutlich stärkere Bindung von HSP90 und p23 in den Tumorzelllinien und in Tumorgewebe nachgewiesen. Dies bestärkt die Annahme über einen entscheidenden Zusammenhang dieser drei Proteine in der Tumorzelle.

Allgemeiner Verlauf der Substrataktivierung

Für den Ablauf des Chaperon-Zyklus von HSP90 in der Zelle kann nun Folgendes angenommen werden. Nach der Ausbildung des Substratprotein-Komplexes mit HSP90-alpha und ATP bindet ausschließlich phosphoryliertes p23 an die Nukleotid-Bindungs-Domäne von HSP90-alpha in der „closed“ geschlossen Form (Tsutsumi *et al.* 2009 und Hessling *et al.* 2009). Diese Bindung, die eine Hydrolyse von ATP verhindert, wurde durch NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt (Karagöz *et al.* 2011). Da die Phosphorylierung des „charged Linkers“ von HSP90 erst nach der Bindung von p23 erfolgt, muss dies im Verlauf der ATP-Hydrolyse und Freisetzung des Substratproteins geschehen – oder die Phosphorylierung ist sogar der Initiator der ATP-Hydrolyse. Die Autophosphorylierung der CLR durch die Hydrolyse von ATP kann ausgeschlossen werden, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass durch die Inhibierung der allgemeinen Kinase-Aktivität durch Staurosporin die Phosphorylierung in der CLR von HSP90 herunterreguliert wird (III 5.2.2). Da die Phosphorylierung im Verlauf des Chaperonzyklus erst nach der Bindung von ATP und p23 erfolgt, handelt es sich bei phosphoryliertem HSP90 nicht um eine „aktive-Form“ von HSP90, sondern kann eher als

ein Marker für die Substrataktivierung durch das Chaperon angesehen werden. Für den Chaperon-Zyklus von HSP90-beta ist die Phosphorylierung von p23 nicht notwendig, eine Phosphorylierung der CLR erfolgt jedoch auch. In Abb. 4.2 ist diese Hypothese für HSP90-alpha und -beta graphisch dargestellt.

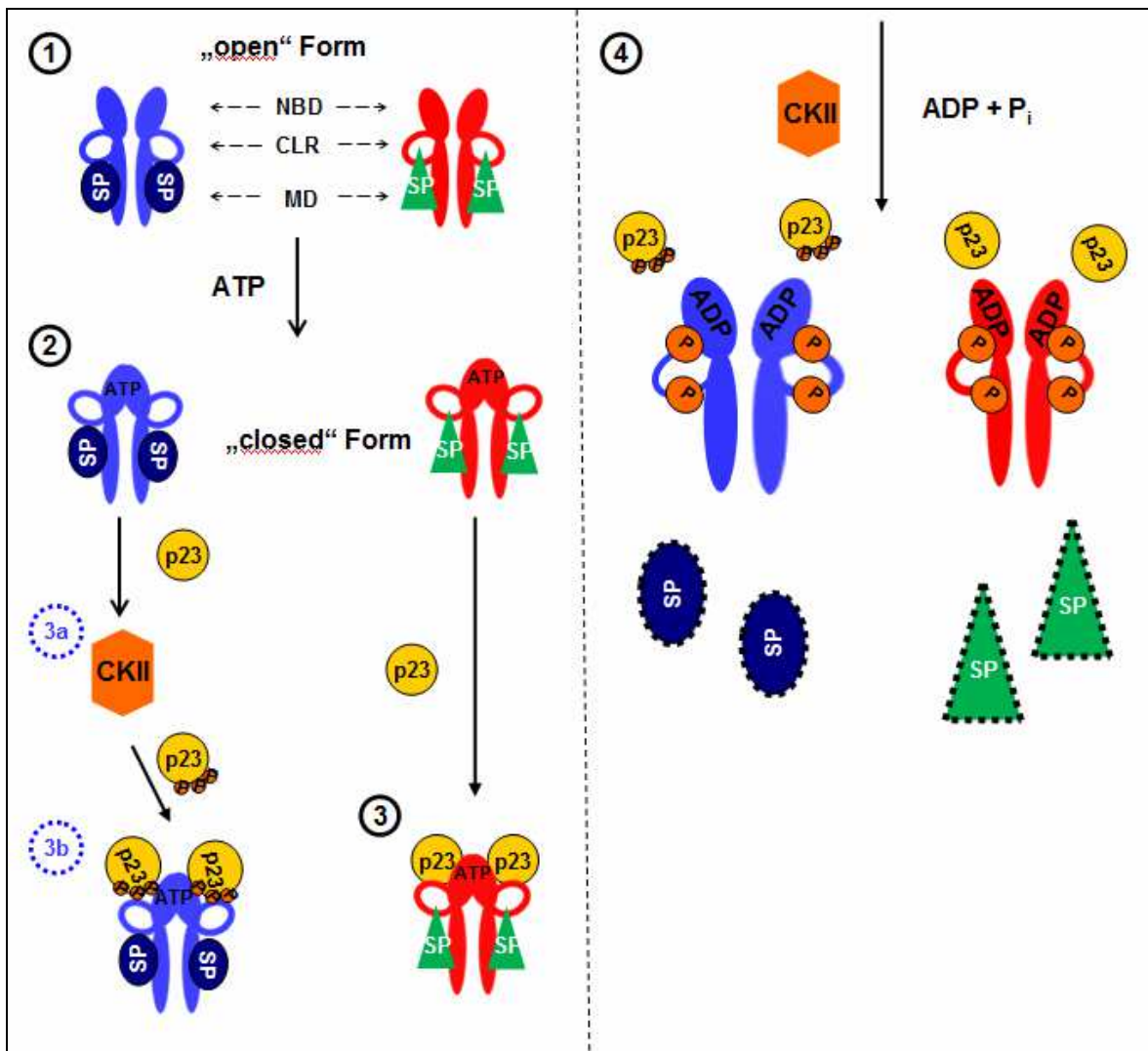


Abb. 4.2: HSP90-Chaperone-Zyklus

1: HSP90-alpha (blau) und -beta (rot) liegen als Dimere mit ihren Substratproteinen in der Mittel-Domäne (MD) in der „open Form“ vor. Das Substratprotein (SP) von HSP90-alpha ist als blaues Oval und das von HSP90-beta als grünes Dreieck dargestellt 2: In Anwesenheit von zwei Molekülen ATP erfolgt die Umstrukturierung der „Nukleotid-Bindungsdomänen“ (NBD) in die geschlossene Konformation 3: p23 bindet in der unphosphorylierten Form (oder phosphorylierten Form, hier nicht dargestellt) an HSP90-beta 3a: p23 wird durch die Casein Kinase II (CK II) phosphoryliert 3b: Ausschließlich Phospho-p23 bindet an HSP90-alpha 4: Die Casein Kinase II (CK II) phosphoryliert HSP90-alpha und HSP90-beta in der „charged Linker Region“ (CLR), ATP hydrolysiert zu ADP und P_i und die NBD geht wieder in die offene Konformation über. Die Substratproteine werden freigesetzt.

5 Ausblick

Dem „charged linker“ von HSP90 wurde bis vor kurzem relativ wenig Beachtung geschenkt. In letzter Zeit häufen sich jedoch die Hinweise in der Literatur, dass diese Region des Chaperons eine deutlich wichtigere Rolle im Verlauf des Chaperon-Zyklus spielt als bisher angenommen. Die Phosphorylierung der beiden Serinreste in dieser Region durch die Casein Kinase II ist zwar schon sehr lange bekannt, aber auch dieser Modifikation wurde bisher wenig Beachtung geschenkt. Fast alle strukturaufklärenden Modelle und auch das Bindeverhalten zu Substratproteinen und den Co-Chaperonen wurden mit Mutationen von HSP90 durchgeführt, bei denen ein Großteil der CLR entfernt wurde. Da in zahlreichen Substratproteinen und auch in den Co-chaperonen von HSP90 das Phosphorylierungsmotiv der Casein Kinase II zu finden ist, eröffnet sich hier ein weites Feld an Möglichkeiten, die Bindeeigenschaften von HSP90 und seinen Partnerproteinen in Abhängigkeit ihres CK II-Phospho-Status zu studieren. Wie in dieser Arbeit erstmals am Modell der HSP90/p23-Bindung gezeigt werden konnte, hat die Phosphorylierung von p23 durch die CK II hierbei einen entscheidenden Faktor in der differentiellen Substrataktivierung der in höheren Lebewesen vorkommenden Isoformen HSP90-alpha und -beta. Die Phosphorylierung der CLR von HSP90 spielte in diesem Zusammenhang keine Rolle. Wenige Hinweise auf die CK II abhängige Bindung zwischen HSP90 und seinen Substratproteinen wie z. B. Apaf1 (Apoptotic protease activatin factor 1), das nur an die unphosphorylierte Form von HSP90-beta bindet, und das Immunophilin FKBP52, das nur an HSP90 bindet wenn es selbst nicht durch die CK II phosphoryliert wurde, sind veröffentlicht (Kurokawa *et al.* 2008, Miyata *et al.* 1997).

Durch die Entwicklung der Analysenmethode auf Basis der Massenbestimmung über Elektrospray-Ionisation ist es gelungen, eine quantitative Aussage über den Phosphorylierungsstatus beider HSP90-Isoformen aus zellulären Proben zu bestimmen. Durch die Zusammenarbeit mit T. Eichhorn ist es innerhalb von Merck gelungen, eine effektivere Analysenmethode zu entwickeln, bei der deutlich geringere Mengen an Zelllysaten ausreichen und auf eine Isolierung von HSP90 aus diesen Proben verzichtet werden konnte. Die durch diese Methode ermittelten Ergebnisse wurden durch vergleichende Messungen mit den in dieser Arbeit erhobenen Werten qualifiziert. Da die Phosphorylierung der CLR von HSP90 als ein Marker für die Substrataktivierung herangezogen werden kann, besteht jetzt die Möglichkeit, HSP90-Inhibitoren und ihre Auswirkung auf beide HSP90-Isoformen im zellulären Umfeld zu testen. Wie schon unter IV 1 erwähnt wurde, zeigte sich, dass durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität von HSP90 ein Arrest der Zellen in allen Phasen des Zellzyklus stattfinden kann und dass dies

stark von der Art des Inhibitors und von der Tumor-Zelllinie abhängt. Dies kann jetzt unter Berücksichtigung dieser neuen Erkenntnisse beurteilt und auch durch entsprechende Messungen verifiziert werden. Nicht nur im Screening neuer effektiverer oder zielgerichteter HSP90-Inhibitoren findet diese neue Methode ihre Anwendung, sondern auch bei der Untersuchung von Casein Kinase II Inhibitoren. In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Phosphorylierung der CLR von HSP90 gelegt, in der Literatur sind jedoch viele weitere posttranslationale Modifikationen an HSP90-alpha und -beta beschrieben. Da hier gezeigt werden konnte, dass diese Phosphorylierung des „charged Linkers“ nicht unmittelbar mit einer Aktivierung der Nukleotid-Bindungs-Domäne in Verbindung gebracht werden konnte, bleibt in zukünftigen Arbeiten zu erforschen, ob eine andere posttranslationale Modifikation die Aktivierung bzw. Deaktivierung der ATP-Bindungstasche direkt induziert.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Analysenmethode auf Basis der Massenbestimmung über Elektrospray-Ionisation qualifiziert, mit der es möglich ist, den Gehalt beider in humanen Zellen vorliegenden isoformen Chaperone HSP90-alpha und HSP90-beta sowie deren Phosphorylierungsstatus in der sog. „charged linker“-Region (CLR) getrennt voneinander zu bestimmen. Die Quantifizierung dieser posttranslationalen Modifikation von HSP90 in der noch wenig untersuchten Region des Chaperons stellte eine besondere Herausforderung an das analytische Messsystem dar, da diese sich fast ausschließlich aus geladenen Aminosäuren zusammensetzt und eine hohe Sequenzhomologie der beiden Isoformen in humanen Zellen vorliegt. Mit dieser Methode ist es gelungen, sowohl die stärkere Expression beider Isoformen in Tumor-Zelllinien im Vergleich zu Nicht-Tumor-Zelllinien als auch signifikant höhere Level beider phosphorylierten Varianten in den Tumor-Zelllinien nachzuweisen. Des Weiteren konnte durch gezielte Arretierung der Tumor-Zelllinie HCT116 in der G0/G1-Phase des Zellzyklus der Nachweis erbracht werden, dass nur HSP90-alpha in diesem Ruhestadium der Zellteilung in der phosphorylierten Form vorliegt.

Da die Phosphorylierung der CLR von HSP90 als ein Marker für die Substrataktivierung herangezogen werden kann, besteht jetzt die Möglichkeit, Auswirkungen von z. B. HSP90-Inhibitoren auf beide HSP90-Isoformen hinsichtlich ihrer Expression und Phosphorylierung durch die Casein Kinase II (CK II) im zellulären Umfeld zu testen.

In-vitro konnte die Phosphorylierung der CLR von HSP90-alpha und -beta mit der CK II an den rekombinant hergestellten Proteinen nachgestellt werden. Dieses typische Phosphorylierungs-Motiv (S-X-X-E/D) findet man bei sehr vielen Co-Chaperonen wie auch bei der Prostaglandin E Synthase p23, das ebenfalls durch eine *in-vitro* Kinase-Reaktion mit der CK II an drei Positionen phosphoryliert wurde. Durch ein Binde-Assay zeigte sich, dass p23 nur in dieser modifizierten Form an HSP90-alpha bindet. Das Bindeverhalten von p23 an die beta-Isoform wird durch diese Phosphorylierung jedoch nicht beeinflusst. Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis des bis dato beschriebenen Chaperon-Zyklus von HSP90 und zeigen deutliche Unterschiede in den Aktivierungszyklen beider Isoformen auf. Da die Casein Kinase II hier entscheidend in den durch HSP90 vermittelten Aktivierungsprozess eingreift, eröffnet sich ein weites Feld an Möglichkeiten, diese Prozesse an weiteren Co-Chaperonen und Substratproteinen zu studieren.

V Literaturverzeichnis

Ali, M. M., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C., Pearl, L. H. (2006).

Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex.

Nature Vol. 440, No. 7087, 1013 – 1017

Aligue, R., Akhavan-Niak, H., Russell, P. (1994).

A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90.

The EMBO Journal Vol. 13, No. 24, 6099 – 6106

Aoyagi, S., Archer, T. K. (2005).

Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation.

Trends Cell Biol. Vol. 15, No. 11, 565 – 567

Banerji, U., O'Donnell, A., Scurr, M., Pacey, S., Stapleton, S., Asad, Y., Simmons, L., Maloney, A., Raynaud, F., Campbell, M., Walton, M., Lakhani, S., Kaye, S., Workman, P. and Judson, I. (2005).

Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies.

J Clin Oncol. Vol. 23, No. 18, 4152 – 4161

Barriere, H., Nemes, C., Du, K., Lukacs, G. L. (2007).

Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery.

Mol Biol Cell. Vol 18, No. 10, 3952 – 3965

Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E., Villén, J., Li, J., Cohn, M. A., Cantley, L. C., Gygi, S. P. (2004).

Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins.

Proc Natl Acad Sci USA Vol. 101, No. 33, 12130 – 12135

Beausoleil, S. A., Villén, J., Gerber, S. A., Rush, J., Gygi, S. P. (2006).

A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization.

Nat Biotechnol. Vol. 24, No. 10, 1285 – 1292

Blank, M., Mandel, M., Keisari, Y., Meruelo, D., Lavie, G. (2003).

Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin.

Cancer Res. Vol. 63, No. 23, 8241 – 8247

Brugge, J. S., Erikson, E., Erikson, R. L. (1981).

The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60^{src}, with two cellular proteins.

Cell Vol. 25, No. 2, 363 – 372

Burrows, F., Zhang, H., Kamal, A. (2004).

Hsp90 activation and cell cycle regulation.
Cell Cycle Vol.3, No. 12, 1530 - 1536

Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R., Welch, W. J. (1985).

The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein.
The EMBO Journal Vol. 4, No. 12, 3131 – 3135

Chadli, A., Bouhouche, I., Sullivan, W., Stensgard, B., McMahon, N., Catelli, M. G., Toft, D. O. (2000).

Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90.
Proc Natl Acad Sci USA Vol. 97, No. 23, 12524 – 12529

Chen, B., Zhong, D., Monteiro, A. (2006).

Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms.
BMC Genomics Vol. 7,

Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R. A., Honoré, B., Smith, D. F. (1996).

Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70.
Mol Endocrinol. Vol. 10, No. 6, 682 – 693

Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J., Solit, D. (2004).

Hsp90: the vulnerable chaperone.
Drug Discov Today Vol. 9, No. 20, 881 – 888

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., Mann, M. (2009).

Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.
Science Vol. 325, No. 5942, 834 – 840

Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Höhfeld, J., Patterson, C. (2001).

The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins.
Nat Cell Biol. Vol. 3, No. 1, 93 – 96

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z., Nardai, G., (1998).

The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review.
Pharmacol Ther. Vol. 79, No. 2, 129 – 168

Cunningham, C. N., Krukenberg, K. A., Agard, D. A. (2008).

Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90.
J Biol Chem. Vol 283, No. 30, 21170 – 21178

DeBoer, C., Meulman, P. A., Wnuk, R. J., Peterson, D. H. (1970).

Geldanamycin, a new antibiotic.

J Antibiot (Tokyo) Vol. 23, No. 9, 442 – 447

Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., Gygi, S. P. (2008).

A quantitative atlas of mitotic phosphorylation.

Proc Natl Acad Sci USA Vol. 105, No. 31, 10762 – 10767

Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P. A. (2007).

Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives.

Mol Cancer Res Vol. 5, No. 10, 981 – 989

Dollins, D. E., Warren, J. J., Immormino, R. M., Gewirth, D. T. (2007).

Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones.

Mol Cell. Vol. 28, No. 1, 41 – 56

Dougherty, J. J., Rabideau, D. A., Iannotti, A. M., Sullivan, W. P., Toft, D. O. (1987).

Identification of the 90 kDa substrate of rat liver type II casein kinase with the heat shock protein which binds steroid receptors.

Biochim Biophys Acta. Vol. 927, No. 1, 74 – 80

Dutta, R., Inouye, M. (2000).

GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily.

Trends Biochem Sci. Vol. 25, No. 1, 24 – 28

Eiseman, J. L., Lan, J., Lagattuta, T. F., Hamburger, D. R., Joseph, E., Covey, J. M., Egorin, M. J. (2005).

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[[2-dimethylamino)ethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C.B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts.

Cancer Chemother Pharmacol. Vol 55, No. 1, 21 – 32

Fang, Y., Fliss, A. E., Rao, J., Caplan, A. J. (1998).

SBA1 encodes a yeast Hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins.

Mol Cell Biol. Vol. 18, No. 7, 3727 – 3734

Farely F. W., Finkelstein, D. B. (1984).

Complete sequence of the heat shock-inducible HSP90 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem. Vol. 259, No. 9, 5745 – 5751

Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T. A., McCabe, T. J., Fujita, N., Tsuruo, T., Sessa, W. C. (2002).

Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release.

Circ Res. Vol. 90, No. 8, 866 – 873

Fujita, N., Sato, S., Ishida, A., Tsuruo, T. (2002).

Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1.

J Biol Chem. Vol. 277, No. 12, 10346 – 10353

Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K. H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., Horinouchi, S. (2002).

FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases.

Cancer Res. Vol. 62, No. 17, 4916 – 4921

Galigniana, M. D., Erlejman, A. G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C., Piwien-Pilipuk, G. (2010).

The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events.

Mol Cell Biol. Vol. 30, No. 5, 1285 – 1298

Gebhard, B., Schütz, G., Ecker, R. C., Steiner, G. E., Rudas, M., Gnant, M., Oehler, R. (1999).

MHC-class-I expression in human breast cancer correlates with nuclear localization of the 90 kDa heat-shock-protein.

Anticancer Res. Vol. 19, No. 6B, 5293 – 5297

Giorgianni, F., Zhao, Y., Desiderio, D. M., Beranova-Giorgianni, S. (2007).

Toward a global characterization of the phosphoproteome in prostate cancer cells: identification of phosphoproteins in the LNCaP cell line.

Electrophoresis Vol. 28, No. 12, 2027 – 2034

Hainzl, O., Lapina, M. C., Buchner, J., Richter, K. (2009).

The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function.

J Biol Chem Vol. 284, No. 34, 22559 – 22567

Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., Buchner, J. (1999).

Hsp26: a temperature-regulated chaperone.

The EMBO Journal Vol. 18, No. 23, 6744 - 6751

Hawle, P., Siepmann, M., Harst, A., Siderius, M., Reusch, H. P., Obermann, W. M. (2006).

The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins.

Mol Cell Biol. Vol. 26, No. 22, 8385 – 8395

Heibeck, T. H., Ding, S. J., Opresko, L. K., Zhao, R., Schepmoes, A. A., Yang, F., Tolmachev, A. V., Monroe, M. E., Camp, D. G. 2nd, Smith, R. D., Wiley, H. S., Qian, W. J. (2009).

An extensive survey of tyrosine phosphorylation revealing new sites in human mammary epithelial cells.

J Proteome Res. Vol. 8, No. 8, 3852 – 3861

Heiland, I., Brauer, D., Wittmann-Liebold, B. (1976).

Primary structure of protein L10 from the large subunit of Escherichia coli ribosomes.

Hoppe Seylers Z Physiol Chem. Vol. 357, No. 12, 1751 – 1770

Hershko, A., Ciechanover, A. (1992).

The ubiquitin system for protein degradation.

Annu Rev Biochem. 61, 761 – 807

Hessling, M., Richter, K., Buchner, J. (2009).

Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90.

Nat Struct Mol Biol. Vol. 16, No. 3, 287 – 293

Holzbeierlein, J. M., Windsperger, A., Vielhauer, G. (2010).

Hsp90: a drug target?

Curr Oncol Rep. Vol. 12, No. 2, 95 – 101

Hutchison, K. A., Stancato, L. F., Owens-Grillo, J. K., Johnson, J. L., Krishna, P., Toft, D. O., Pratt, W. B. (1995).

The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90.

J Biol Chem Vol. 270, No. 32, 18841 – 18847

Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., Catelli, M. G., Binart, N., Mester, J., Baulieu, E. E. (1984).

Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones.

Nature Vol. 308, No. 5962, 850 – 853

Jones, M. D., Merewether, L. A., Clogston, C. L., Lu, H. S. (1994).

Peptide Map Analysis of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor: Elimination of Methionine Modification and Nonspecific Cleavages.

Analytical Biochemistry Vol. 216, No. 1, 135 – 146

Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C., Burrows, F. J. (2003).

A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors.

Nature Vol. 425, No. 6956, 407 – 410

Karagöz, G. E., Duarte, A. M., Ippel, H., Uetrecht, C., Sinnige, T., van Rosmalen, M., Hausmann, J., Heck, A. J., Boelens, R., Rüdiger, S. G. (2011).

N-terminal domain of human Hsp90 triggers binding to the cochaperone p23.

Proc Natl Acad Sci USA Vol. 108, No. 2, 580 - 585

Kundrat, L., Regan, L. (2010).

Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by the cochaperone CHIP.

J Mol Biol. Vol. 395, No. 3, 587 – 594

Kurokawa, M., Zhao, C., Reya, T., Kornbluth, S. (2008).

Inhibition of apoptosome formation by suppression of Hsp90 β phosphorylation in tyrosine kinase-induced leukemias.

Mol Cell Biol. Vol. 28, No. 17, 5494 – 5506

Kobayashi, T., Nakatani, Y., Tanioka, T., Tsujimoto, M., Nakajo, S., Nakaya, K., Murakami, M., Kudo, I. (2004).

Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by phosphorylation.

J Biochem. Vol. 381, 59 – 69

Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M. C., McMahon, N., Toft, D. (1998).

The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins.

J Biol Chem. Vol. 273, No. 49, 32973 – 32979

Krone, P. H., Sass, J. B. (1994).

HSP 90- α and HSP 90- β genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos.

Biochem Biophys Res Commun. Vol. 204, No. 2, 746 – 752

Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., Finch, J. T. (1978).

Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA.

Nature Vol. 275, No. 5679, 416 – 420

Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W. (1989).

Two human 90-kDa heat shock proteins are phosphorylated *in Vivo* at conserved serines that are phosphorylated *in Vitro* by casein kinase II.

J Biol Chem. Vol. 264, No 5, 2431 – 2437

Lotz, G. P., Lin, H., Harst, A., Obermann, W. M. J. (2003).

Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone.

J Biol Chem. Vol. 278, No. 19, 17228 – 17235

Maruya, M., Sameshima, M., Nemoto, T., Yahara, I., (1999).

Monomer arrangement in HSP90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies.

J Mol Biol. Vol. 285, No. 3, 903 – 907

Mayer, M. P. (2010).

Gymnastics of molecular chaperones.

Mol Cell. Vol 39, No. 3, 321 – 331

Mayer, M. P. (2010).

Phosphotyrosine confers client specificity to Hsp90.

Mol Cell. Vol. 37, no. 3, 295 – 296

Mayya, V., Lundgren, D. H., Hwang, S. I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J. K., Rodionov, V., Han, D. K. (2009).

Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signalling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions.

Sci Signal. Vol. 2, No. 84, ra46

McLaughlin, S. H., Smith, H. W., Jackson, S. E. (2002).

Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein.

J Mol Bio. Vol. 315, No. 4, 787 – 798

McLaughlin, S. H., Sobott, F., Yao, Z. P., Zhang, W., Nielsen, P. R., Grossman, J. G., Laue, E. D., Robinson, C. V., Jackson, S. E. (2006).

The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins.

J Mol Biol. Vol. 356, No. 3, 746 – 758

Meggio, F., Marin, O., Pinna, L. A., (1994).

Substrate specificity of protein kinase CK2.

Cell Mol Biol Res. Vol. 40, No. 5-6, 401 - 409

Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S. M., Panaretou, B., Piper, P. W., Pearl, L. H. (2003).

Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions.

Mol Cell Vol. 11, No. 3, 647 - 658

Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Mark Roe, S., Vaughan, C. K., Vlasic, I., Panaretou, B., Piper, P. W., Pearl, L. H. (2004).

Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery.

The EMBO Journal Vol. 23, No. 6, 1402 - 1410

Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K., Yahara, I. (1991).

Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90.

J Biol Chem. Vol. 266, No. 16, 10099 - 10103

Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yahara, I. (1994).

The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function In Vivo.

Mol Cell Biol. Vol. 14, No. 2, 1459 – 1464

Miyata, Y., Chambrud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M. C., Renoir, J. M., Shirai, R., Catelli, M. G., Yahara, I., Baulieu, E. E. (1997).

Phosphorylation of immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: Regulation of HSP90-binding activity of FKBP52.

Cell Biology Vol. 94, No. 26, 14500 – 14505

Mollapour, M., Tsutsumi, S., Donnelly, A. C., Beebe, K., Tokita, M. J., Lee, M. J., Lee, S., Morra, G., Bourboulia, D., Scroggins, B. T., Colombo, G., Blagg, B. S., Panaretou, B., Stetler-Stevenson, W. G., Trepel, J. B., Piper, P. W., Prodromou, C., Pearl, L. H., Neckers, L. (2010).

Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function.

Mol Cell. Vol 37, No. 3, 333 – 343

Mollerup, J., Krogh, T. N., Nielsen, P. F., Berchtold, M. W. (2003).

Properties of the co-chaperone protein p23 erroneously attributed to ALG-2 (apoptosis-linked gene 2).
FEBS Lett. Vol. 555, No. 3, 478 – 482

Moore, S. K., Kozak, C., Robinson, E. A., Ullrich, S. J. and Appella, E. (1989).

Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments and evolutionary origin.
J Biol Chem. Vol. 264, No. 10, 5343 – 5351

Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J., Orth, K. (2006).

Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation.
Science Vol. 312, No. 5777, 1211 – 1214

Mukherjee, S., Hao, Y. H., Orth, K. (2007).

A newly discovered post-translational modification – the acetylation of serine and threonine residues.
Trends Biochem Sci. Vol. 32, No. 5, 210 - 216

Murphy, P. J., Kanelakis, K. C., Galigniana, M. D., Morishima, Y., Pratt, W. B. (2001).

Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate.
J Biol Chem. Vol. 276, No. 32, 30092 – 30098

Neckers, L. (2007).

Heat shock protein 90: the cancer chaperone.
J Biosci. Vol. 32, No. 3, 517 – 530

Obermann, W. M., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P., Hartl, F. U. (1998).

In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and hydrolysis.
J Cell Biol. Vol. 143, No. 4, 901 – 910

Ogiso, H., Kagi, N., Matsumoto, E., Nishimoto, M., Arai, R., Shirouzu, M., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Yokoyama, S. (2004).

Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex.
Biochemistry Vol. 43, No. 49, 15510 – 15519

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M. (2006).

Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks.
Cell Vol. 127, No. 3, 635 – 648

Oppermann, F. S., Gnäd, F., Olsen, J. V., Hornberger, R., Greff, Z., Kéri, G., Mann, M., Daub, H. (2009).

Large-scale proteomics analysis of the human kinome.
Mol Cell Proteomics Vol. 8, No. 7, 1751 – 1764

Oppermann, H., Levinson, W., Bishop, J. M. (1981).

A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein.

ProcNatl Acad Sci USA Vol. 78, No. 2, 1067 – 1071

Padmanabha, R., Glover, C. V. (1987).

Casein kinase II of yeast contains two distinct alpha polypeptides and an unusually large beta subunit.

J Biol Chem. Vol. 262, No. 4, 1829 – 1835

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., Pearl, L. H. (1998).

ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo.

The EMBO Journal Vol. 17, No. 16, 4829 – 4836

Perdew, G. H. (1988).

Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein.

J Biol Chem. Vol. 263, No. 27, 13802 – 13805

Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., Pearl, L. H. (1997).

Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone.

Cell Vol. 90, No. 1, 65 – 75

Prodromou, C., Pearl, L. H. (2003).

Structure and functional relationships of Hsp90.

Curr Cancer Drug Targets Vol. 3, No. 5, 301 – 323

Pratt, W. B., Toft, D. O. (2003).

Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery.

Exp Biol Med. Vol. 228, No. 2, 111- 133

Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Morishima, Y., Murphy, P. J. (2004).

Role of molecular chaperones in steroid receptor action.

Essays Biochem Vol. 40, 41 – 58

Rafestin-Oblin, M. E., Couette, B., Radanyi, C., Lombes, M., Baulieu, E. E. (1998).

Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine.

J Biol Chem. Vol. 264, No. 16, 9304 – 9309

Ranson, N. A., Clare, D. K., Farr, G. W., Houldershaw, D., Horwich, A. L., Saibil, H. R. (2006).

Allosteric signalling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes.

Nat Struct Mol Biol. Vol. 13, No. 2, 147 – 152

Roepstorff, P., Fohlman, J. (1984)

Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides
Biomed Mass Spectrom. Vol. 11, No. 11, 601

Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J., Buchner, J. (2003).

Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase.
J Biol Chem Vol. 278, No. 12, 10328 – 10333

Richter, K., Moser, S., Hagn, F., Friedrich, R., Hainzl, O., Heller, M., Schlee, S., Kessler, H., Reinstein, J., Buchner, J. (2006).

Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase Activity.
J Biol Chem. Vol. 281, No. 16, 11301 – 11311

Ritossa, F. (1962).

A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila.
Cellular and Molecular Life Sciences Vol. 18, No. 12, 571 – 573

Sakagami, M., Morrison, P., Welch, W. J. (1999).

Benzoquinoid ansamycins (herbimycin A and geldanamycin) interfere with the maturation of growth factor receptor tyrosine kinases.
Cell Stress Chaperones Vol. 4, No. 1, 19 – 28

Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J., Pratt, W. B. (1985).

Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein.
J Biol Chem. Vol. 260, No. 23, 12398 – 12401

Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T. (2000).

Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.
Proc Natl Acad Sci USA Vol. 97, No. 20, 10832 . 10837

Scheibel, T., Weikl, T., Buchner, J. (1998).

Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence.
Proc Natl Acad Sci USA Vol. 95, No. 4, 1495 - 1499

Scheibel, T., Siegmund, H. I., Jaenicke, R., Ganz, P., Lilie, H., Buchner, J. (1999).

The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain.
Proc Natl Acad Sci USA Vol. 96, No. 4, 1297 – 1302

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U., Moarefi, I. (2000).

Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine.
Cell Vol. 101, No. 2, 199 – 210

Schulte, T. W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D., Neckers, L. M. (1998).

Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin.

Cell Stress Chaperones Vol. 3, No. 29, 100 – 108

Scroggins, B. T., Robzyk, K., Wang, D., Marcu, M. G., Tsutsumi, S., Beebe, K., Cotter, R. J., Felts, S., Toft, D., Karnitz, L., Rosen, N., Neckers, L. (2007).

An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function.

Mol Cell Vol. 25, No. 1, 151 – 159

Shiau, A. K., Harris, S. F., Southworth, D. R., Agard, D. A. (2006).

Structural analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements.

Cell Vol. 127, No. 2, 329 – 340

Sharp, S. Y., Prodromou, C., Boxall, K., Powers, M. V., Holmes, J. L., Box, G., Matthews, T. P., Cheung, K. J., Kalusa, A., James, K., Hayes, A., Hardcastle, A., Dymock, B., Brough, P. A., Barril, X., Cansfield, J. E., Wright, L., Surgenor, A., Foloppe, N., Hubbard, R. E., Aherne, W., Pearl, L., Jones, K., McDonald, E., Raynoud, S. E., Dysdale, M., Workman, P. (2007)

Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazole/isoxazole amide analogues

Mol Cancer Ther Vol. 6, No. 4, 1198 - 19211

Siepen, J. A., Keevil, E. J., Knight, D., Hubbard, S. J. (2007).

Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics.

J Proteome Res. Vol. 6, No. 1, 339 – 408

Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Chen, M. S., Owens-Grillo, J. K., Chinkers, M., Pratt, W. B. (1997).

Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin.

J Biol Chem Vol. 272, No. 26, 16224 – 16230

Simpson, N. E., Lambert, W. M., Watkins, R., Giashuddin, S., Huang, S. J., Oxelmark, E., Arju, R., Hochman, T., Goldberg, J. D., Schneider, R. J., Reiz, L. F., Soares, F. A., Logan, S. K., Garabedian, M. J. (2010).

High levels of Hsp90 cochaperone p23 promote tumor progression and poor prognosis in breast cancer by increasing lymph node metastases and drug resistance.

Cancer Res. Vol. 70, No. 21, 8446 – 8456

Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitsev, K., Madden, B., McCormick, D. J., Toft, D. O. (1993).

Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70.

Mol Cell Biol. Vol. 13, No. 2, 869 – 876

Stancato, L. F., Silverstein, A. M. Owens-Grillo, J. K., Chow, Y. H., Jove, R., Pratt, W. B. (1997).

The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase.

J Biol Chem Vol. 272, No. 7, 4013 – 4020

Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U., Pavletich, N. P. (1997).

Crystal structure of an HSP90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent.
Cell Vol. 89, No. 2, 239 – 250

Thomas, J. G., Baneyx, F. (1998).

Roles of the Escherichia coli small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG in vivo.
J Bacteriol. Vol. 180, No. 19, 5165 – 5172

Travers, S. A., Fares, M. A. (2007).

Functional coevolutionary networks of the Hsp70-Hop-Hsp90 system revealed through computational analyses.
Mol Biol Evol. Vol. 24, No. 4, 1032 – 1044

Tsutsumi, S., Mollapour, M., Graf, C., Lee, C. T., Scroggins, B. T., Xu, W., Haslerova, L., Hessling, M., Konstantinova, A. A., Trepel, J. B., Panaretou, B., Buchner, J., Mayer, M. P., Prodromou, C., Neckers, L. (2009).

Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain.
Nat Struct Mol Biol. Vol. 16, No. 11, 1141 - 1147

Vidali, G., Gershey, E. L., Allfrey, V. G. (1968).

Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones.
J Biol Chem. Vol. 243, No. 24, 6361 – 6366

Vilenchik, M., Solit, D., Basso, A., Huezio, H., Lucas, B., He, H., Rosen, N., Spampinato, C., Modrich, P., Chiosis, G. (2004).

Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCI, a specific inhibitor of tumor Hsp90.
Chem Biol. Vol. 11, No. 6, 787 – 797

Wang, G., Ahmad, K. A., Unger, G., Slaton, J. W., Ahmed, K. (2006).

CK2 signaling in androgen-dependent and –independent prostate cancer.
J Cell Biochem. Vol. 99, No. 2, 382 – 391

Wegele, H., Muschler, P., Bunck, M., Reinstein, J., Buchner, J. (2003).

Dissection of the contribution of individual domains to the ATPase mechanism of Hsp90.
J Biol Chem. Vol. 278, No. 41, 39303 – 39310

Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E. U., Dougan, D. A., Tsai, F. T., Mogk, A., Bukau, B. (2004).

Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB.
Cell Vol. 119, No. 5, 653 – 665

Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J., Buchner, J. (2000).

C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle.

J Mol Biol. Vol. 303, No. 4, 583 – 592

Wendler, P., Shorter, J., Snead, D., Plisson, C., Clare, D.K., Lindquist, S., Saibil, H. R. (2009).

Motor mechanism for protein threading through Hsp104.

Mol Cell Vol. 34, No. 1, 81 – 92

Wendler, P. (2010).

HSP104 – ein eiskaltes Hitzeschockprotein.

BIOspektrum 06.10, 648 - 650

Whitelaw, M. L., Hutchison, K., Perdew, G. H. (1991).

A 50-kDa cytosolic protein complexed with the 90-kDa heat shock protein (hsp90) is the same protein complexed with pp60^{v-src} hsp90 in cells transformed by the Rous sarcoma virus.

J Biol Chem. Vol. 266, No. 25, 16463 - 16440

Whitesell, L., Shifrin, S. D., Schwab, G., Neckers, L. M. (1992).

Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition.

Cancer Res. Vol. 52, No. 7 1721 – 1728

Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E., Neckers, L. M. (1994).

Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60^{v-src} heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation.

Proc Natl Acad Sci. USA Vol 91, No. 18, 8324 – 8328

Woo, S. H., An, S., Lee, H. C., Jin, H. O., Sea, S. K., Yoo, D. H., Lee, K. H., Rhee, C. H., Choi, E. J., Hong, S. I., Park, I. C. (2009).

A truncated form of p23 down-regulates telomerase activity via disruption of Hsp90 function.

J Biol Chem. Vol. 284, No. 45, 30871 – 30880

Xu, L., Eiseman, J. L., Egorin, M. J., D'Argenio, D. Z. (2003).

Physiologically-based pharmacokinetics and molecular pharmacodynamics of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin and its active metabolite in tumor-bearing mice. J Pharmacokinetics Pharmacodyn.

Vol. 30, No. 3, 185 – 219

Yang, Y., Rao, R., Shen, J., Tang, Y., Fiskus, W., Nechtman, J., Atadja, P., Bhalla, K. (2008).

Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90 α in tumor cell invasion.

Cancer Res. Vol. 68, No. 12, 4833 – 4842

Yu, X., Guo, Z. S., Marcu, M. G., Neckers, L., Nguyen, D. M., Chen, G. A., Schrupp, D. S. (2002).

Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228.

J Natl Cancer Inst. Vol. 94, No. 7, 504 - 513

Zhang, J., Baker, M. L., Schröder, G. F., Douglas, N. R., Reissmann, S., Jakana, J., Dougherty, M., Fu, C. J., Levitt, M., Ludtke, S. J., Frydman, J., Chiu, W. (2010).

Mechanism of folding chamber closure in a group II chaperonin.

Nature Vol. 463, No. 7279, 379 – 383

Zhao, Y. G., Gilmore, R., Leone, G., Coffey, M. C., Weber, B., Lee, P. W. (2001).

Hsp90 phosphorylation is linked to its chaperoning function. Assembly of the reovirus cell attachment protein.

J Biol Chem. Vol. 276, No. 35, 32822 - 32827