

---

Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried  
Abteilung für Zelluläre Biochemie

Struktur-Funktions-Analyse von Hop:  
Tpr-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen

Clemens Scheufler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. W. Baumeister  
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner  
3. Hon.-Prof. Dr. F.U. Hartl,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 19.10.2000 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.12.2000  
angenommen.



---

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis Juni 2000 am Max-Planck-Institut für Zelluläre Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Herrn Dr. I. Moarefi angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank. Durch sein außerordentliches Engagement und eine persönliche, mit großem Zeitaufwand verbundene Betreuung entstand eine fruchtbare Zusammenarbeit. Seine uneingeschränkte Unterstützung und sein aufmunternder Optimismus trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. W. Baumeister danke ich für die Betreuung an der Technischen Universität München mit der Übernahme der Erstkorrektur.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. F.-U. Hartl meinen Dank aussprechen. Seine persönliche und fachliche Unterstützung sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut waren mir eine große Hilfe.

Herrn A. Brinker bin ich für eine gewinnbringende Zusammenarbeit mit zahlreichen Diskussionen und Anregungen dankbar.

Große Unterstützung erhielt ich auch von vielen Mitarbeitern innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe. Für die unterschiedlichsten Hilfestellungen möchte ich namentlich Frau I. Gilbert, Herrn Dr. R. Siegert, Herrn H. Sondermann, Herrn Dr. R. Albrecht und Herrn Dr. L.-O. Essen hervorheben.

Herr Dr. G. Bourenkov, Frau Dr. V. Stojanov und Herr Dr. M. Campel standen mir bei Datensammlungen an den Synchrotronen in Hamburg, Grenoble und Brookhaven zur Seite.

Für die Durchführung analytischer Arbeiten (Massenspektrometrie, Proteinsequenzierung) sowie für die Synthese von Peptiden möchte ich mich bei den Mitarbeitern der entsprechenden Serviceeinrichtungen des Max-Planck-Instituts bedanken.



# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	3
2	Einleitung .....	5
2.1	Proteinfaltung in der Zelle .....	5
2.2	Das Hsp90-Chaperonsystem .....	7
2.3	Das Kochaperon Hop .....	11
2.4	Tpr-Motive .....	12
2.5	Zielsetzung .....	14
3	Materialien und Methoden .....	15
3.1	Materialien .....	15
3.1.1	Substanzen .....	15
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	15
3.2	Biochemische Methoden .....	17
3.2.1	Plasmide und Bakterienstämme .....	17
3.2.2	Plasmidtransformation in <i>E.coli</i> .....	17
3.2.3	Kultivierung und Aufarbeitung von <i>E.coli</i> .....	18
3.2.4	Proteinreinigung .....	19
3.2.4.1	Proteinisolierungen der Domänen Tpr1S, Tpr2A und Tpr2B .....	19
3.2.4.2	Proteinisolierungen der Domänen Tpr1L, Tpr2S, Tpr2L und Tpr1+2 .....	20
3.2.5	Proteinanalytische Methoden .....	20
3.2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	20
3.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	21
3.2.5.3	Limitierte Proteolyse .....	22
3.2.5.4	Massenspektrometrie .....	22
3.2.5.5	N-terminale Sequenzierung .....	22
3.2.6	Peptidsynthese .....	22
3.3	Röntgenkristallographische Methoden .....	23
3.3.1	Grundlagen und Überblick .....	23
3.3.1.1	Grundlagen der Beugungstheorie .....	23
3.3.1.2	Schritte einer Röntgenstrukturanalyse .....	26
3.3.2	Durchgeführte Methoden .....	30
3.3.2.1	Proteinkristallisation .....	30
3.3.2.2	Datensammlung und Datenreduktion .....	31
3.3.2.3	Strukturlösung .....	31

3.3.2.4	Modellbau und Strukturverfeinerung .....	32
3.3.2.5	Analyse und Darstellung .....	32
4	Ergebnisse .....	33
4.1	Die Domänenstruktur von Hop.....	33
4.2	Isolierung und Kristallisation der Proteine .....	35
4.3	Kristallstrukturen der Tpr1-Domäne von Hop .....	40
4.3.1	Struktur von Tpr1L.....	40
4.3.2	Struktur von Tpr1S .....	47
4.3.3	Strukturen von Tpr1S mit Hsc70-Peptid .....	49
4.4	Kristallstrukturen der Tpr2-Domäne von Hop .....	57
4.4.1	Struktur von Tpr2A mit Hsp90-Peptid .....	57
4.4.2	Struktur von Tpr2S .....	65
5	Analyse und Diskussion.....	71
5.1	Struktur-Funktions-Analyse von Hop.....	71
5.1.1	Bindung von Hop an Hsc/Hsp70.....	71
5.1.2	Bindung von Hop an Hsp90 .....	74
5.1.3	Vergleich der Interaktionen .....	78
5.2	Vergleich mit anderen Tpr-Proteinen .....	81
5.2.1	Strukturvergleich der Tpr-Domänen von Hop und PP5 .....	81
5.2.2	Weitere Kochaperone mit Tpr-Motiven .....	81
5.2.3	Mögliche Hsc/Hsp70 oder Hsp90 bindende Proteine.....	82
5.2.4	Funktion des Tpr-Motivs von Tom20 .....	84
5.3	Vergleich mit anderen peptidbindenden Domänen .....	85
5.3.1	PDZ-Domänen.....	85
5.3.2	14-3-3-Domänen.....	85
6	Literaturverzeichnis.....	87
7	Anhang .....	96
7.1	Sequenz von Hop .....	96
7.2	Abkürzungen.....	97
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	99
7.4	Tabellenverzeichnis .....	100

# 1 Zusammenfassung

Das eukaryotische Protein Hop (*engl. heatshock organizing protein*) ist ein Kochaperon der molekularen Chaperone Hsc/Hsp70 und Hsp90. Hop bindet gleichzeitig an Hsc/Hsp70 und Hsp90, wodurch ein Übergang eines an Hsc/Hsp70 gebundenen Substrats auf Hsp90 ermöglicht wird. Die Wechselwirkungen zwischen Hop und den Chaperonen werden durch Tpr-Domänen (*engl. tetratricopeptide repeat*) innerhalb von Hop vermittelt.

Durch limitierte Proteolyse konnten die Grenzen der Tpr-Domänen von Hop bestimmt werden. Die N-terminale Tpr1-Domäne von Hop besteht aus drei Tpr-Motiven und vermittelt die Bindung an Hsc/Hsp70. Die C-terminale Tpr2-Domäne wird durch die zwei Subdomänen Tpr2A und Tpr2B mit jeweils drei Tpr-Motiven aufgebaut und ermöglicht die Interaktion mit Hsp90. Die ermittelten Domänen wurden rekombinant exprimiert und Protokolle der Proteinisolierung und Kristallisation erarbeitet. Die Strukturen dieser Proteinfragmente wurden mit röntgenkristallographischen Methoden bestimmt.

Die Tpr-Domänen von Hop (Tpr1, Tpr2A, Tpr2B) besitzen eine konservierte Faltung, die aus sieben antiparallel verlaufenden Helices besteht. Die konstante geometrische Abfolge der Helices resultiert in einer leicht gebogenen Anordnung der Domänen ähnlich einer gekrümmten Hand.

Die Strukturanalyse von Tpr1 und der Sequenzvergleich verschiedener Tpr-Domänen führten zu der Annahme, dass die Tpr-Domänen von Hop kurze C-terminale Sequenzmotive von Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 erkennen und binden. Diese Annahme konnte anhand von Kristallstrukturen verschiedener Domänen-Peptid-Komplexe bestätigt werden.

Die Tpr1-Domäne von Hop erkennt spezifisch die sieben C-terminalen Aminosäuren von Hsc70, die Tpr2A-Domäne bindet spezifisch die fünf C-terminalen Aminosäuren von Hsp90. Beide Peptide enden mit dem EEVD-Motiv, das innerhalb der zytosolischen Formen von Hsc/Hsp70 und Hsp90 konserviert ist. Die Peptide werden auf der konkaven Seite der Tpr-Domänen in einer linearen Form gebunden. Das C-terminale Aspartat von EEVD fungiert dabei als zweifacher Carboxylat-Anker, der von konservierten Resten innerhalb der Tpr-Domänen, der Carboxylat-Klammer, gebunden wird. Die Spezifität von Tpr1 bzw. Tpr2A bei der Erkennung der C-terminalen Aminosäuren von Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 wird durch unterschiedliche hydrophobe Interaktionen N-terminal zum EEVD-Motiv vermittelt.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. und Moarefi, I. (2000). Structure of TPR Domain-Peptid Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell* 101, 199-210.



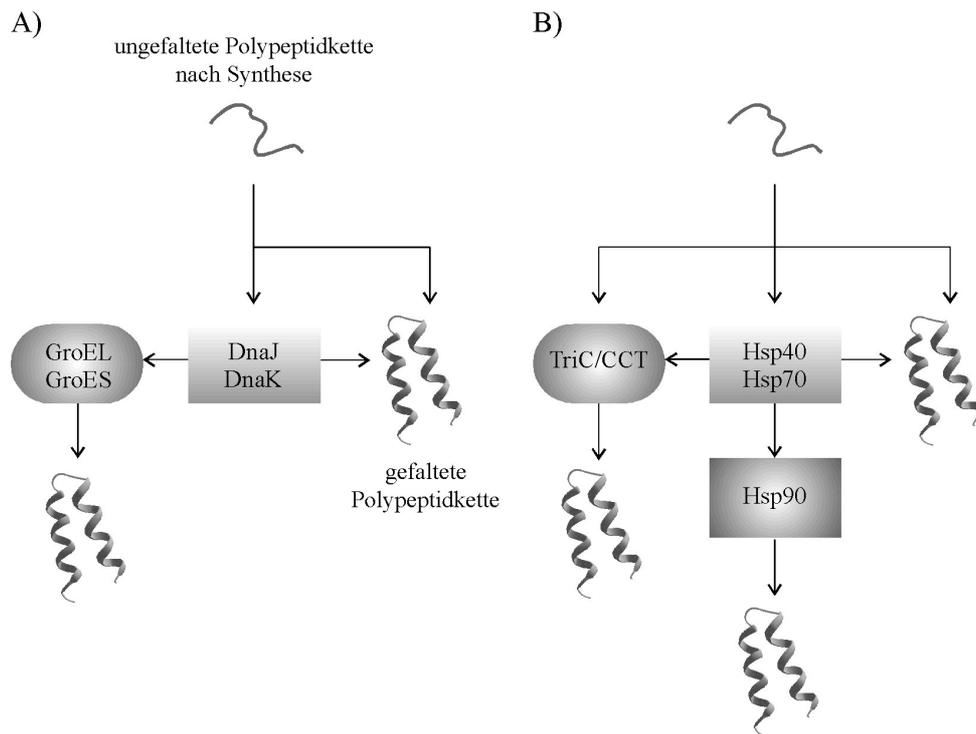
## 2 Einleitung

### 2.1 Proteinfaltung in der Zelle

Die Synthese neuer Polypeptidketten ist für die Zelle ein energieaufwendiger Prozess. Pro Aminosäurerest werden dabei mehrere energiereiche Phosphatbindungen verbraucht. Neu synthetisierte Polypeptidketten sind für die Zelle aber nur dann von Wert, wenn die Proteine ihren korrekt gefalteten, nativen Zustand erreichen. Die Information der dreidimensionalen Proteinstruktur ist in der Aminosäuresequenz enthalten (Anfinsen, 1973). Dadurch kann eine vollständige Faltung in die aktive Proteinkonformation prinzipiell erst nach Synthese der kompletten Polypeptidkette erfolgen. Da entfaltete bzw. nicht vollständig gefaltete Proteine hydrophobe Bereiche exponieren, ist besonders bei den hohen Proteinkonzentrationen innerhalb einer Zelle die Aggregation gegenüber der Proteinfaltung energetisch begünstigt (van den Berg *et al.*, 1999). Um die Proteinaggregation und somit den irreversiblen Verlust von neu synthetisierten bzw. entfaltenen Polypeptidketten zu verhindern, wurden Schutzmechanismen entwickelt. Proteine, die derartige Schutzfunktionen vermitteln, gehören zur Klasse der molekularen Chaperone. Durch eine regulierte und zyklische Bindung bzw. Freisetzung interagieren molekulare Chaperone mit labilen, aggregationsnahen Konformationen anderer Proteine und halten diese in einem (rück)faltungskompetenten Zustand. Dies erhöht die Ausbeute der Faltungsreaktion, erhöht jedoch i. d. R. nicht die Geschwindigkeit der Faltung. Molekulare Chaperone sind bei der Faltung von Proteinen beteiligt, tragen aber keine sterischen Information bei und sind nicht Bestandteile der gebildeten Strukturen.

Die Unterstützung der Proteinfaltung durch molekulare Chaperone beschränkt sich nicht ausschließlich auf die *de novo*-Faltung neu synthetisierter Polypeptidketten. Eine Unterdrückung der Proteinaggregation durch Chaperone erfolgt auch unter zellulären Stressbedingungen, wie z. B. Hitzeschock, Exposition gegenüber hohen Konzentrationen an oxidierenden Substanzen oder Änderungen der osmotischen Bedingungen, die zu einer konformationellen bzw. kovalenten Inaktivierung vorhandener Proteine führen können. Diese Funktion der molekularen Chaperone erklärt auch, warum viele der Chaperone unter Stressbedingungen vermehrt synthetisiert werden und zur Klasse der Hitzeschock-Proteine (Hsp) gehören. Neben den stress-induzierten Isoformen existieren auch konstitutiv exprimierte Homologe (Hsc, *engl.* heat shock cognate protein).

Die fundamentale Bedeutung der molekularen Chaperone für die Zelle spiegelt sich auch in dem hohen Grad der Konservierung einzelner Chaperonsysteme zwischen verschiedenen Organismen wider. Die Anzahl der Chaperone im Organismus korreliert in hohem Maße mit dessen Komplexität (Pahl *et al.*, 1997).



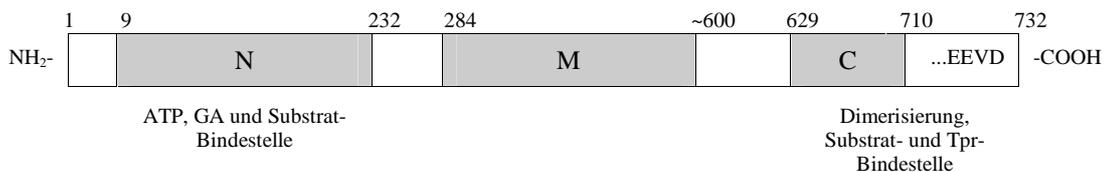
**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der wichtigsten Chaperonsysteme für A) Bakterien und B) Eukaryoten. Die möglichen Faltungswege sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das zentrale Chaperonsystem in Bakterien wird durch DnaJ und DnaK (Hsp70) aufgebaut (vgl. Abbildung 2.1). Ca. 85% aller *E.coli*-Proteine falten entweder spontan oder über das DnaJ/K-System, ca. 15% benötigen das GroEL/ES-System um ihren nativen Zustand zu erreichen (Netzer & Hartl, 1998). Die vergleichbaren eukaryotischen Chaperonsysteme sind das Hsp40/Hsp70- und das TriC-System. Ergänzend zu diesen beiden Systemen findet sich in Eukaryoten noch das spezialisierte Hsp90-System. Hsp90 ist ein stark konserviertes Hitzeschockprotein, das selbst unter physiologischen und stressfreien Bedingungen einen zellulären Proteinanteil von 1 - 2 % einnimmt. Mutationsstudien in Hefen zeigten, dass Hsp90 für das Überleben der Zellen essentiell ist (Parsell & Lindquist, 1993). Im Gegensatz dazu ist das bakterielle Homolog HtpG für Bakterien nicht essentiell. Zudem existieren in Bakterien keine Homologen zu den Kochaperonen, die das komplexe, eukaryotische Hsp90-System benötigt (s. u.). Das eukaryotische Hsp90-Chaperonsystem hat somit kein vollständiges Äquivalent in Bakterien.

Ausführliche Beschreibungen und detaillierte Darstellungen der Funktionen verschiedener Chaperonsysteme finden sich in den Zusammenfassungen von Agashe & Hartl, 2000; Feldman & Frydman, 2000; Smith, 2000; Buchner, 1999; Ellis, 1999; Smith *et al.*, 1998; Sigler *et al.*, 1998; Netzer & Hartl, 1998; Johnson & Craig, 1997; Hartl, 1996.

## 2.2 Das Hsp90-Chaperonsystem

Die Bedeutung und Funktion des Hsp90-Systems für die zelluläre Proteinfaltung ist bis heute noch nicht genau etabliert. *In vitro*-Experimente zeigten, dass die isolierten N- und C-terminalen Domänen von Hsp90 die Aggregation entfalteter Modellproteine unterdrücken können und Hsp90 somit eine generelle Chaperonaktivität besitzt (vgl. Abbildung 2.2; Young *et al.*, 1998; Scheibel *et al.*, 1998). Demnach könnte das Hsp90-System eine universelle Faltungsmaschinerie analog dem Hsp70-System sein und einen alternativen Faltungsweg für neu synthetisierte bzw. entfaltete Proteine bereitstellen. *In vivo*-Untersuchungen zeigten jedoch, dass Hsp90 quantitativ nur eine geringe Rolle in der *de novo*-Proteinfaltung spielt (Nathan *et al.*, 1997). Vielmehr ist das Hsp90-Chaperonsystem hoch spezialisiert und nur für die Faltung weniger Proteine zuständig. Als Substrate von Hsp90 konnten hauptsächlich Proteine verschiedener Signaltransduktionen, wie z. B. Steroidhormonrezeptoren und Proteinkinasen, identifiziert werden. Dabei hat Hsp90 neben einer reinen Chaperonfunktion auch eine Funktion im Aufbau und der Regulierung bestimmter Signalkaskaden (Smith, 2000).



**Abbildung 2.2** Charakterisierung der Domänenstruktur von Hsp90 (Rind) mittels Verdau durch Protease (Stebbins *et al.*, 1997). Proteaseresistente Fragmente sind grau hinterlegt. Die bisher bekannten Funktionen der Domänen sind eingetragen.

Hsp90 liegt unter physiologischen Bedingungen als Dimer vor und besteht aus drei proteaseresistenten Domänen (vgl. Abbildung 2.2). Analog zu Hsp70 bindet die N-terminale Domäne von Hsp90 an ATP. Inzwischen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität für die *in vitro*- und *in vivo*-Funktion von Hsp90 essentiell ist (Grenert *et al.*, 1999; Panaretou *et al.*, 1998; Obermann *et al.*, 1998). Zwischen den Kristallstrukturen der nukleotidfreien N-terminalen Domäne von Hsp90 und den ATP- bzw. ADP-gebundenen Komplexstrukturen der Domäne konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Prodromou *et al.*, 1997A; Prodromou *et al.*, 1997B). Trotz dieser Beobachtung scheint eine regulierte Konformationsänderung von Hsp90 durch äußere Faktoren wahrscheinlich. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Hsp90 zeigten unter Einfluss von ATP oder Hitzeschock eine signifikante Reorganisation der Hsp90-Dimerstruktur (Maruya *et al.*, 1999). Eine genauere Charakterisierung und die Einbindung dieses Mechanismus in die Funktion des Hsp90-Chaperonsystems bedarf weiterer Untersuchungen.

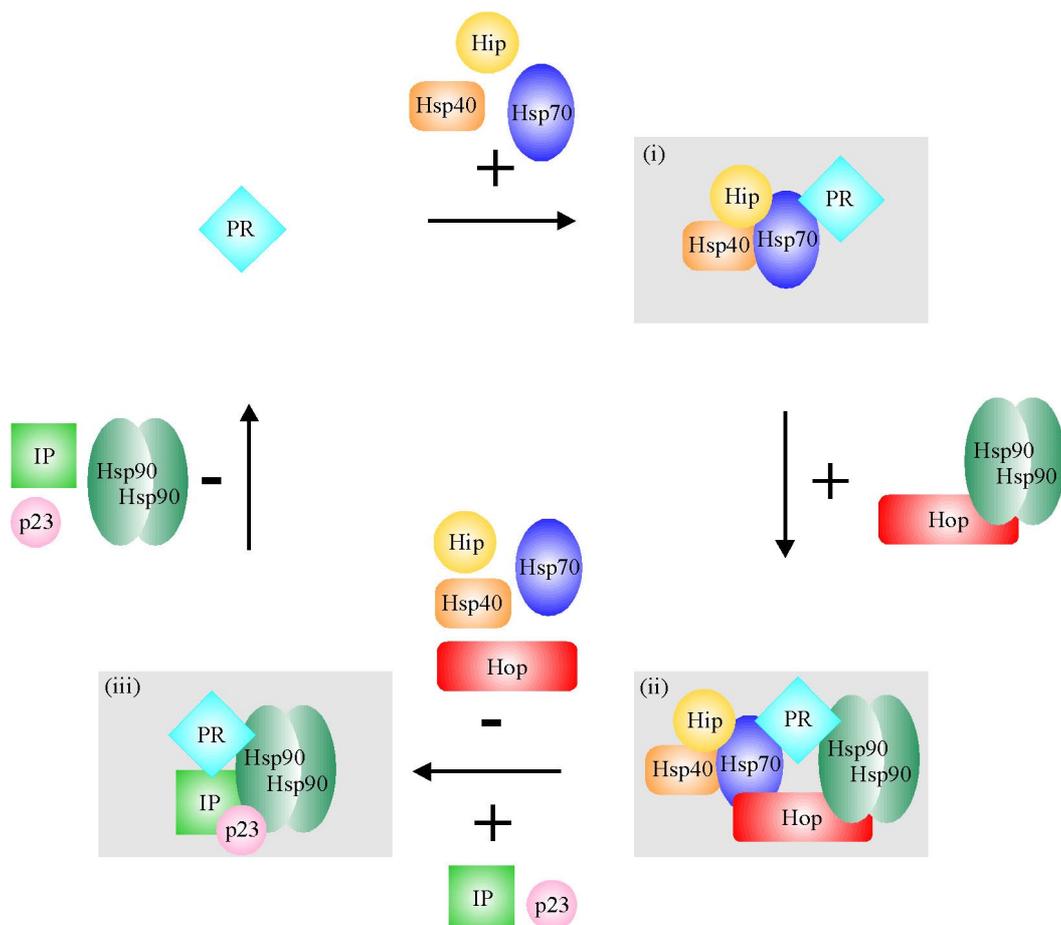
Isoliertes Hsp90 kann seine Substrate nicht selbständig falten bzw. aktivieren. Für ein funktionelles Hsp90-System benötigt Hsp90 weitere Partnerproteine (vgl. Tabelle 2.1). Zu diesen Partnerproteinen gehört auch das eigenständige Hsp70-Chaperonsystem mit seinen Kochaperonen, das seinerseits die identifizierten Hsp90-Substrate (z. B. Steroidrezeptoren) nicht selbständig falten kann (Pratt & Toft, 1997; Johnson *et al.*, 1996).

**Tabelle 2.1** Bekannte Partnerproteine von Hsp90. Einige der Partnerproteine besitzen selbst Chaperonaktivität.

Name	Funktion	Chaperonaktivität	Tpr-Protein
Hsp70	Chaperon	ja	nein
Hsp40	Hsp70-Kofaktor	ja	nein
Hip	Hsp70-Kofaktor	nein	ja
Hop	Hsp70-Hsp90-Kofaktor	nein	ja
p23	Hsp90-Kofaktor	ja	nein
p50 <sup>Cdc37</sup>	spezifischer Hsp90-Kofaktor für Kinasen	ja	nein
FKBP51	Prolylisomerase (Immunophilin)	nein	ja
FKPB52	Prolylisomerase (Immunophilin)	nein	ja
CyP40	Prolylisomerase (Immunophilin)	nein	ja
PP5	Serin/Threonin-Phosphatase	nein	ja

Je nach Substrat konnten *in vivo*-verschiedene heterooligomere Komplexe zwischen Hsp90, dem Substrat und einzelnen Kochaperonen identifiziert werden. Viele der Kochaperone besitzen so genannte Tpr-Motive (*engl.* tetratricopeptide repeat, s. u.), die die Interaktionen zwischen den Kochaperonen und Hsp70 bzw. Hsp90 vermitteln (vgl. Tabelle 2.1 und Abbildung 2.3).

Die am besten charakterisierten Substrate von Hsp90 gehören zur Klasse der Steroidhormonrezeptoren. Mit Hilfe von *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten konnten verschiedene Chaperon-Substrat-Komplexe identifiziert und ein Modell zur Hsp90-vermittelten Faltung von Steroidrezeptoren erstellt werden (vgl. Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3** Faltung und Regulierung des Progesteronrezeptors durch das Hsp90-Chaperonsystem. IP: Immunophilin (FKBP51, FKBP52 oder CyP40). PR: Progesteronrezeptor.

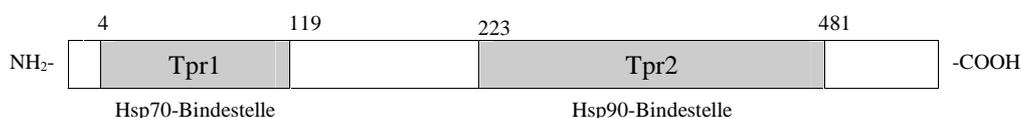
Eine direkte Bindung des Progesteronrezeptors (PR) an Hsp90 ist nicht möglich, sondern erfordert das Hsp70-Chaperonsystem (Pratt & Toft, 1997). Ein erster Rezeptor-Chaperon-Komplex entsteht durch die Bindung von Hsp70 an den Rezeptor, Hsp40 und das Kochaperon Hip (*engl. Hsc70 interacting protein*, vgl. Abbildung 2.3i; Prapapanich *et al.*, 1998). Danach entsteht ein intermediärer Komplex, dessen Aufbau durch die Interaktion von Hop (*engl. Hsp organizing protein*) mit Hsp90 und dem Hsp70-Rezeptorkomplex vermittelt wird (vgl. Abbildung 2.3ii; Chen & Smith, 1998). Dieser Komplex ermöglicht die Bindung des Rezeptors an Hsp90, erlaubt jedoch noch keine Interaktion zwischen Hormon und Rezeptor. Der reife Rezeptorkomplex besteht neben dem bindungskompetenten Progesteronrezeptor aus p23 und einem der drei Immunophiline FKBP51, FKBP52 oder CyP40 (vgl. Abbildung 2.3iii). In Glucocorticoidrezeptor-Komplexen wurde anstelle eines der Immunophiline auch die Serin/Threonin-Phosphatase PP5 gefunden (Silverstein *et al.*, 1997). Der Übergang vom intermediären zum reifen Rezeptorkomplex erfolgt durch die Bindung von p23 und einem

Immunophilin bei gleichzeitiger Freisetzung von Hsp40, Hsp70, Hip und Hop. Der genaue Ablauf dieser Transformation sowie die Stöchiometrien der intermediären und reifen Rezeptorkomplexe sind noch nicht genau bestimmt. Alle Komplexe des Faltungszyklus sind transient, wobei der reife Rezeptorkomplex eine höhere Lebensdauer besitzt und somit die ständige Verfügbarkeit von bindungskompetenten Rezeptoren gewährleistet ist. Der gesamte Faltungszyklus dauert mehrere Minuten und wird in Abwesenheit des Hormons unter ATP-Verbrauch ständig durchlaufen. In Anwesenheit des Hormons kann das Steroid den Rezeptor im bindungskompetenten und reifen Komplex binden. Die Hormonbindung erhöht dabei nicht die Dissoziationskonstante des reifen Komplexes, sondern verhindert den Wiedereintritt des Rezeptors in den Faltungszyklus (Smith, 1993).

Zu den Hsp90-abhängigen Substraten gehören auch bestimmte Protein-Kinasen, wie z. B. Raf-1 (Stancato *et al.*, 1993), Cdk4 (Stepanova *et al.*, 1996) sowie einige Kinasen der Src-Familie (Hartson & Matts, 1994). Die Assoziation der Kinasen mit Hsp90 wird vermutlich durch das Kochaperon p50<sup>Cdc37</sup> vermittelt (Silverstein *et al.*, 1998). Die Abhängigkeit dieser Kinasen vom Hsp90-Chaperonsystem hat eine regulatorische Funktion auf die Aktivität der Kinasen (Hartson *et al.*, 1998).

## 2.3 Das Kochaperon Hop

Humanes Hop, auch als p60 bzw. Sti1p aus Hefe bekannt, ist ein Kochaperon, dessen physiologische Funktion in der Verbindung der Hsp70- und Hsp90-Chaperonsysteme besteht. Durch die Bindung von Hop an Hsp70 und Hsp90 wird eine räumliche Nähe zwischen den Chaperonen erzeugt und ein effektiver Übergang von an Hsp70 gebundenen Substraten auf Hsp90 ermöglicht (vgl. Abbildung 2.3ii; Morishima *et al.*, 2000). Hop selbst besitzt keine Chaperonaktivität (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996).



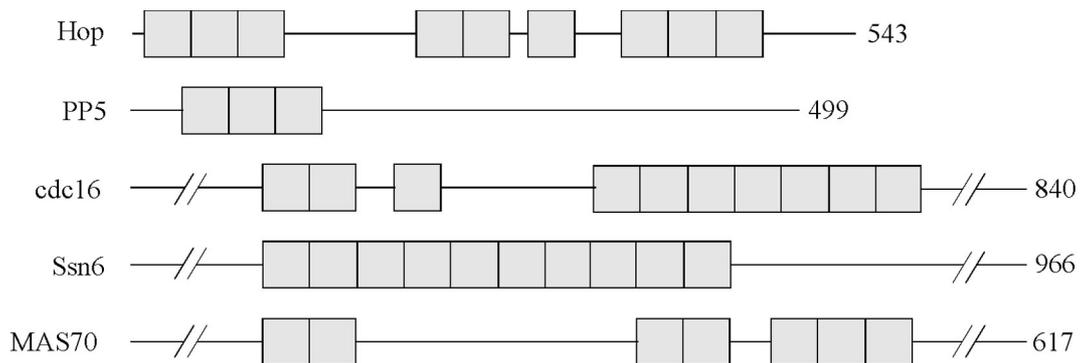
**Abbildung 2.4** Aufbau von Hop. Die Grenzen der beiden Tpr-Domänen Tpr1 und Tpr2 sind eingezeichnet.

Hop ist ein hoch konserviertes eukaryotisches Protein, das aus 543 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 62.6 kDa besitzt (vgl. Anhang 7.1). Die Sequenzidentität zwischen Hop und dem Hefe-Homolog Sti1p beträgt 42%. Die Sequenz von Hop enthält neun Tpr-Motive, die in zwei Blöcken organisiert sind (vgl. Abbildung 2.4; Honore *et al.*, 1992).

Anhand von Deletionsmutanten war gezeigt worden, dass die Tpr-Bereiche für die Interaktionen zwischen Hop und Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 essentiell sind (vgl. Abbildung 2.4). Der N-terminale Tpr-Bereich von Hop (Tpr1, drei Tpr-Motive) vermittelt die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von Hsc/Hsp70, und der C-terminale Tpr-Bereich (Tpr2, sechs Tpr-Motive) vermittelt die Interaktion mit Hsp90 (Demand *et al.*, 1998; Lassel *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996). Die Bindung von Hop an Hsp70 und Hsp90 ist ATP-unabhängig und hat keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von Hsp70 (Chen *et al.*, 1996). Dagegen wird die ATPase-Aktivität von Hsp90 bei der Interaktion mit Hop inhibiert (Prodromou *et al.*, 1999). Die Bindung von Hop an Hsp90 erfolgt an die C-terminale Domäne von Hsp90 (vgl. Abbildung 2.2; Carrello *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1998). Die C-terminale Domäne von Hsp90 ist die einzige Tpr-Bindestelle innerhalb von Hsp90 und kann neben der Tpr2-Domäne von Hop auch mit den Tpr-Domänen der Kochaperone FKBP51/52, CyP40 und PP5 interagieren (Buchner, 1999; Dolinski *et al.*, 1998; Marsh *et al.*, 1998; Pratt & Toft, 1997).

## 2.4 Tpr-Motive

Tpr-Motive sind schwach konservierte Sequenzmotive mit einer Länge von 34 Aminosäuren. Sie wurden in Regulatoren der Zellmitose entdeckt (Sikorski *et al.*, 1990). Heutzutage sind weit über 200 Proteine mit Tpr-Motiven bekannt. Die meisten dieser so genannten Tpr-Proteine besitzen mehrere Tpr-Motive (3 - 16), die in der Regel direkt aufeinanderfolgend in Tpr-Domänen organisiert sind (vgl. Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5** Schematische Darstellung einiger Tpr-Proteine. Tpr-Motive sind als Kästchen eingetragen. Hop und PP5: *H.sapiens*; Cdc16, Ssn6 und MAS70: *S.cerevisiae*.

Tpr-Proteine finden sich in den verschiedenen Zellkompartimenten aller Organismen, wie z. B. Zellkern, Zytoplasma oder Mitochondrien. Sie besitzen keine einheitliche biochemische Funktion, sondern sind bei einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt. Dazu gehören u. a. die Zellzykluskontrolle, die Proteinfaltung sowie mitochondrialer und peroxisomaler Proteintransport (Goebel & Yanagida, 1991). Die Funktion der Tpr-Motive innerhalb von Tpr-Proteinen ist die Vermittlung spezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen. Wie im Fall von Hop konnte dies durch Mutagenese- und Deletionsmutanten für viele weitere Tpr-Proteine gezeigt werden (s. o.; Lamb *et al.*, 1995). Die Sequenzanalyse unterschiedlicher Tpr-Proteine lieferte folgenden Tpr-Konsensus (Sikorski *et al.*, 1990):

**Tabelle 2.2** Vergleich des Tpr-Konsensus mit den drei Tpr-Motiven der Tpr1-Domäne von Hop. Konsensuspositionen sind fett gedruckt.

		4	7	8	11		20	24	27	32					
Tpr-Konsensus	...	<b>W</b>	..	<b>L</b> <b>G</b>	..	<b>Y</b>	.....	<b>A</b>	...	<b>F</b>	..	<b>A</b>	.....	<b>P</b>	..
Hop_Tpr1	4	VNELKE <b>KGN</b> KALS	7	8	11	SVGNIDDA	20	24	27	32	LQCYSE <b>A</b> IKLDPHN	37			
Hop_Tpr1	38	HVLYSN <b>RS</b> AAYAKK	72	75	78	81	84	87	90	93	96	99	102	105	
Hop_Tpr1	72	GKGY <b>SR</b> <b>KAA</b> ALEFLNR	108	111	114	117	120	123	126	129	132	135	138	141	

Innerhalb des Tpr-Konsensus existiert keine streng konservierte Position. Die Konservierung beschränkt sich eher auf die Größe und die Hydrophobie einzelner Aminosäuren (vgl. Tabelle 2.2) und resultiert in einer konservierten Faltung. Die Tertiärstruktur eines Tpr-Motivs besteht aus zwei antiparallel verlaufenden  $\alpha$ -Helices (A/B) und konnte erstmals in der Kristallstruktur der Tpr-Domäne der Serin/Threonin-Phosphatase 5 beobachtet werden (Das *et al.*, 1998). Die Packung der beiden Helices A und B eines Tpr-Motivs wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Resten des Tpr-Konsensus dominiert.

Eine Serie von Tpr-Motiven resultiert in einer regulären Abfolge antiparallel verlaufender Helices (*engl.* helical repeat), die ein Gerüst für den Aufbau einer Proteinbindedomäne bilden. Sequenzpositionen außerhalb des Tpr-Konsensus sind für die Bildung charakteristischer und einzigartiger Oberflächen verantwortlich und tragen zur Spezifität der einzelnen Domänen bei.

Tpr-Motive können als Basismodule für den Aufbau von Proteinbindedomänen verstanden werden. Die Anzahl der Tpr-Motive, sowie kleine Insertionen zwischen einzelnen Tpr-Motiven sind dabei Variablen und erlauben unterschiedliche Konfigurationen zur Erfüllung der individuellen biochemischen Funktion der verschiedenen Tpr-Proteine.

## 2.5 Zielsetzung

Vorrangiges Bestreben dieser Arbeit war eine Struktur-Funktions-Analyse des Kochaperons Hop. Aus Vorversuchen war bekannt, dass natives Hop für die Kristallisation ungeeignet ist. Daher sollte zunächst eine Charakterisierung der Domänenstruktur von Hop mittels limitierter Proteolyse erfolgen. Die Strukturen der so ermittelten Fragmente sollten dann durch röntgenkristallographische Methoden aufgeklärt werden. Parallel dazu sollten von Herrn A. Brinker im Rahmen seiner Dissertation Bindungsstudien zwischen den ermittelten proteaseresistenten Fragmenten und Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 durchgeführt werden.

Die Verfügbarkeit von Strukturinformationen von Hop in Kombination mit Bindungsdaten würden einen wichtigen Beitrag zum tieferen Verständnis der Funktionsweise des Hsp70/Hsp90-Chaperonsystems liefern. Da Hop über die Tpr-Domänen mit Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 interagiert, könnten zusätzlich grundlegende Erkenntnisse über die Wirkungsweise einer Tpr-vermittelten Protein-Protein-Wechselwirkung gewonnen werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Substanzen

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

#### 3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ADSC (Povay, USA): Quantum-4 CCD-Detektor

Beckman (München): Kühlzentrifuge J-6B, Kühlzentrifuge Avanti J-25, Kühlzentrifuge GS-6R, UV-VIS-Spektralphotometer DU 640, pH-Meter  $\Phi$ 34

BioRad (München): Elektrophoresekammer Mini-Protean II, 5-ml-EconoS-Säule

Charles Supper Company (USA): Doppelfokussierendes Spiegelsystem 7616

Deutsches Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg): Synchrotron-Messstation BW6 (MPG/GBF), Synchrotron-Messstation X31 (EMBL)

Eppendorf (Hamburg): Kühlzentrifuge 5417R, Laborzentrifuge 5415C

European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich): Synchrotron Messstation ID14-3 (EMBL)

Hampton Research (Laguna Niguel, USA): Crystal Screen und Crystal Screen II, Kristallisationsplatten VDX, silikonisierte Glasplättchen

MarResearch (Hamburg): Image Plate MAR300, MARCCD-Detektor

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

Millipore (Eschborn): Deionisierungsanlage Milli-Qplus PF, Sterilfilter 0.45  $\mu$ m Millex-HA

Misonix Incorporated (New York, USA): Ultraschall-Gerät Ultrasonic Processor XL

National Synchrotron Light Source (NSLS, Brookhaven, USA); Synchrotron-Messstation X12B

Olympus (Hamburg): Stereomikroskop SZH10

Oxford Cryostreams (Oxford, England): Cryostream Oxford

Pall-Filtron (Northborough, USA): Ultrafiltrations-Einheit Jumbosep, Macrosep, Microsep (10 kDa cut-off)

Pharmacia (Uppsala, Schweden): FPLC-System ÄKTAexplorer100, Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalting, Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 Superdex 200, 1-ml- bzw. 5-ml-ResourceQ

Precision Scientific (Chicago, USA): Thermoschrank BOD815

Qiagen (Valencia, USA): Nickelchelat Matrix Ni-NTA Superflow

Rigaku (Berlin): Röntgengenerator RU-200

## 3.2 Biochemische Methoden

### 3.2.1 Plasmide und Bakterienstämme

Alle verwendeten Konstrukte wurden von Herrn Dr. I. Moarefi über EheI- und HindIII-Schnittstellen in den Expressionsvektor pPROEX HTa (4750 bp) der Firma Life Technologies kloniert. Der Vektor codiert N-terminal einen Histidinanker (sechs Histidine), den so genannten His-Tag, gefolgt von einem Abstandhalter und einer spezifischen Schnittstelle (Erkennungssequenz: ENLYFQ↓G) für die TEV-Protease (*engl. Tobacco Etch Virus*). Die Proteine wurden somit als Fusionsproteine mit einem His-Tag versehen exprimiert. Dies ermöglichte eine schnelle und effiziente Abtrennung durch Metallaffinitätschromatographie mit der Möglichkeit, den His-Tag danach mittels TEV-Protease zu entfernen (Parks *et al.*, 1994; Polayes *et al.*, 1996). Bei erfolgreicher Transformation von *E.coli* vermittelt der Vektor eine Ampicillinresistenz.

Zur rekombinanten Expression nativer Proteine wurde der Bakterienstamm *E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) eingesetzt. Der methioninauxotrophe Stamm *E.coli* B834 (DE3) pLysS (Novagen) wurde für die Expression von selenomethioninmarkiertem Protein verwendet. Beide Stämme besitzen das Plasmid pLysS, welches neben einer Chloramphenicolresistenz ein Gen für die Expression von Lysozym enthält. Nach Induktion der Zellen wird dadurch auch Lysozym exprimiert, das den Zellaufschluss durch Autolyse beschleunigt.

### 3.2.2 Plasmidtransformation in *E.coli*

*LB-Medium* (Luria-Bertani Medium; Sambrook *et al.*, 1989):

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren

*LB-Agarplatten:*

- 15 g/l Agar in LB-Medium, autoklavieren
- nach Abkühlung unter 60 °C mit Antibiotika versetzen
- in Petrischalen ausgießen

Ein 100-µl-Aliquot transformationskompetenter *E.coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. 50 - 100 ng Plasmid-DNA wurden zu den Bakterien pipettiert und der Ansatz 20 min auf Eis in-

kubiert. Die Bakterien erhielten einen Hitzeschock für 5 min bei 37 °C und wurden danach unter Zugabe von 200 µl vorgekühltem LB-Medium für 5 min auf Eis regeneriert. Der Ansatz wurde dann für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend vollständig auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 0.1 mg/ml, Chloramphenicol 0.025 mg/ml) ausplattiert. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.3 Kultivierung und Aufarbeitung von *E.coli*

#### *M9-Medium:*

- 200 ml M9-Salzlösung
- 2.0 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>
- 20 ml 20 % Glukoselösung
- 0.1ml 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### M9-Salzlösung:

- 64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O
- 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2.5 g NaCl
- 5.0 g NH<sub>4</sub>Cl
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### *TB-Medium* (Terrific Broth, 47.5 g/l TB-Pulver in H<sub>2</sub>O, autoklavieren):

- 12.0 g Bacto-Trypton
- 23.9 g Hefeextrakt
- 8.0 ml Glycerin
- 2.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 9.4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O
- pH 7.0 mit NaOH einstellen
- autoklavieren

#### *IMAC\_A-Puffer:*

- 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 300 mM NaCl
- 10 mM Imidazol
- pH 8.0 mit NaOH einstellen

#### *IMAC\_B-Puffer:*

- 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 300 mM NaCl
- 250 mM Imidazol
- pH 8.0 mit NaOH einstellen

Als Nährmedium von *E.coli* BL21 (DE3) Zellen zur Expression nativer Proteine diente TB-Medium. Für die Expression von selenomethioninmarkierten Proteinen wurden B834 (DE3) Zellen in Minimalmedium M9 (Sambrook *et al.*, 1989) unter Zugabe von 50 mg/l D,L-Selenomethionin kultiviert. Für ein beschleunigtes Zellwachstum wurde das Medium zusätzlich mit allen weiteren Aminosäuren (jeweils 50 mg/l) angereichert. Alle Medien waren mit Ampicillin und Chloramphenicol zu Endkonzentrationen von 0.1 mg/ml bzw. 0.025 mg/ml versetzt.

Die Kultivierung von 1-l-Flüssigkulturen erfolgte in 2.8-l-Schikanekolben unter Schütteln (250 rpm) bei 37 °C. Um eine konstante Sauerstoffzufuhr mittels Diffusion zu gewährleisten,

wurde übermäßige Schaumbildung durch Zugabe von ca. 50 µl AntiFoam Se-35 (Sigma) pro 1 l Flüssigkultur unterdrückt. Die Kolben wurden mit Bakterien einer Transformation angeimpft. Erreichten die Zellen eine  $OD_{600} \approx 0.7$  (optische Dichte bei  $\lambda = 600$  nm), wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0.4 mM induziert. Nach weiteren 6 - 8 h Inkubation wurde die Kultivierung beendet und die Zellen abzentrifugiert (30 min, 5000 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in IMAC\_A-Puffer resuspendiert (ca. 2.5 ml pro Gramm Feuchtmasse). Für den Zellaufschluss wurde das Pellet dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und aufgetaut. Nach Zugabe von Benzonase (Merck, 1 unit pro 1 ml Zellsuspension) wurde die Suspension auf Eis sonifiziert (10-s-Intervalle, 2 min) und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Aufschluss wurde dann abzentrifugiert (15 min, 70000 g, 4 °C), der klare Überstand abdekantiert, filtriert (0.45 µm Porengröße) und bis zur weiteren Aufreinigung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4 Proteinreinigung

Alle säulenchromatographischen Trennungen wurden mit dem FPLC-System ÄKTA-Explorer 100 durchgeführt. Die Aufarbeitungen nativer Proteine und der mit Selenomethionin markierten Proteine erfolgten nach den gleichen Protokollen.

#### 3.2.4.1 Proteinisolierungen der Domänen Tpr1S, Tpr2A und Tpr2B

Das ultrazentrifugierte Rohlysat wurde auf eine gegen IMAC\_A-Puffer äquilibrierte 10-ml-Nickelchelate-Säule (Ni-NTA Superflow) mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde dann mit Waschpuffer (5 % IMAC\_B-Puffer in IMAC\_A) gespült, bis die UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm) des Durchflusses stationär war. Das Protein wurde dann bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 100 % IMAC\_B-Puffer eluiert und anhand der UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm) fraktioniert. Für die Abspaltung der His-Tags wurde das Eluat über eine Entsalzungssäule (Flussrate 4 ml/min) auf 20 mM TRIS pH 8.5, 1 mM DDT umgepuffert. TEV-Protease wurde in einem Verhältnis von 1:20 bezüglich der Absorption bei 280 nm der Proteinlösung zugesetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken für 2 h inkubiert. Um geschnittenes Protein von ungeschnittenem Protein, der Protease (C-terminal mit einem Histidinanker ohne Schnittstelle versehen) und den entfernten His-Tags zu trennen, wurde der Spaltungsansatz erneut über eine mit IMAC\_A-Puffer äquilibrierte Nickelsäule (s. o., Flussrate 2 ml/min) gegeben. Um unspezifische Interaktionen mit der Säulenmatrix zu verhindern, wurden dem Spaltungsansatz 200 mM NaCl und 5 % IMAC\_B-Puffer zugesetzt. Das im Durchfluss enthaltene und gespaltene Protein wurde anhand der Absorption bei 280 nm fraktioniert und mittels Ultrafiltration über eine Membran mit 10 kDa Ausschlussvolumen

auf ca. 5 ml eingengt. Als letzter Reinigungsschritt und zur Überführung der Proteine in einen geeigneten Kristallisationspuffer wurde eine Gelfiltration (Flussrate 3 ml/min) durchgeführt. Als Elutionspuffer wurden wahlweise 10 - 50 mM TRIS-, HEPES- bzw. MES-Puffer mit pH-Werten zwischen 6.5 und 7.5 verwendet. Die resultierenden Fraktionen wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht und entsprechend vereinigt. Die gereinigten Proteinlösungen wurden dann aufkonzentriert (Macrosep bzw. Microsep), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4.2 Proteinisolierungen der Domänen Tpr1L, Tpr2S, Tpr2L und Tpr1+2

#### *SA-Puffer:*

- 20 mM HEPES pH 6.5
- 1 mM DDT

#### *QA-Puffer:*

- 20 mM TRIS pH 8.5
- 1 mM DTT

#### *SB-Puffer:*

- 20 mM HEPES pH 6.5
- 1 mM DDT
- 1 M NaCl

#### *QB-Puffer:*

- 20 mM TRIS pH 8.5
- 1 mM DTT
- 1 M NaCl

Die Reinigungen erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll, wurden jedoch nach der Abspaltung der His-Tags von den Proteinen durch eine Ionen-Austauschchromatographie erweitert. Die Konstrukte Tpr1L, Tpr2L und Tpr1+2 wurden über eine Anionen-Austauschersäule (1-ml- bzw. 5-ml-ResourceQ), das Konstrukt Tpr2S über eine Kationen-Austauschersäule (5-ml-EconoS) weiter gereinigt. Dafür wurden die vom His-Tag abgespaltenen Proteine (Durchfluss der zweiten Nickelsäule) über eine Entsalzungssäule (Flussrate 4 ml/min) in einen geeigneten Niedrigsalzpuffer überführt (SA-Puffer für EconoS, QA-Puffer für ResourceQ) und auf die entsprechenden Säulen aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten über 10 Säulenvolumen auf SB- bzw. QB-Puffer. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht und gemäß ihrer Reinheit vereinigt.

## 3.2.5 Proteinanalytische Methoden

### 3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem (Laemmli, 1970) wurde zur Expressionskontrolle und Überprüfung einzelner Reinigungsstu-

fen der Proteinisolation eingesetzt. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l 10 % APS-Lösung und 5  $\mu$ l TEMED pro 10 ml Volumen gestartet. Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 in 2x Probenpuffer gemischt, Bakterien nach erfolgter Zentrifugation direkt in 1x Probenpuffer aufgenommen, zur vollständigen Denaturierung für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert und vor dem Auftrag auf das Gel abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel in einer Mini-Protean II Gelkammer. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Marker von GibcoBRL (10 kDa Protein Ladder) verwendet. Die Gele wurden in Färbelösung für 30 - 60 min inkubiert und anschließend über mehrere Stunden in Entfärbelösung entfärbt.

*Sammelgel:*

- 4.5 % Acrylamid
- 0.1 % Bisacrylamid
- 125 mM TRIS / HCl pH 6.8
- 0.06 % SDS

*Trenngel:*

- 15 % Acrylamid
- 0.4 % Bisacrylamid
- 375 mM TRIS / HCl pH 8.8
- 0.1 % SDS

*2x Probenpuffer:*

- 120 mM TRIS pH 6.8
- 200 mM DTT
- 4 % SDS
- 20 % Glycerin
- 0.01 % Pyronine Y

*Laufpuffer:*

- 192 mM Glyzin
- 25 mM TRIS pH 8.3
- 1 % SDS

*Färbelösung:*

- 0.25 % Coomassie Blue R 250
- 40 % Ethanol
- 10 % Essigsäure
- in H<sub>2</sub>O

*Entfärbelösung:*

- 40 % Ethanol
- 10 % Essigsäure
- in H<sub>2</sub>O

### 3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden ausschließlich über UV-Absorptionsmessungen mittels eines UV-VIS-Spektralphotometer (DU 640) bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Die Proteinproben wurden in Puffer verdünnt und die Absorptionen gegenüber proteinfreier Pufferlösung bestimmt. Theoretische Extinktionskoeffizienten wurden aus den Proteinsequenzen berechnet (Pace *et al.*, 1995) und für die Umrechnung der Absorptionen in Konzentrationen nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz verwendet.

### **3.2.5.3 Limitierte Proteolyse**

Zur Bestimmung potenzieller Proteindomänen wurden mehrere Spaltungen mit der unspezifischen Protease Subtilisin durchgeführt. Hierfür wurde eine Subtilisin:Substrat-Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) in 20 mM HEPES pH 8.0 mit 50 mM Ammoniumsulfat für 60 min auf Eis inkubiert. Die Proteolysen wurden mit PMSF (0.1 mM Endkonzentration) gestoppt und mittels SDS-PAGE untersucht. Produkte mit definierten Abbaubanden wurden dann mit Hilfe von Massenspektrometrie und N-terminaler Proteinsequenzierung charakterisiert.

### **3.2.5.4 Massenspektrometrie**

Zur Charakterisierung und Identifizierung proteaseresistenter Proteinflragmente und zur Verifizierung von Methioninsubstitutionen durch Selenomethionineinbau wurden Molekulargewichte massenspektrometrisch bestimmt. Die Massenspektren wurden nach der Methode der Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (Mann, 1990) von der Abteilung für Membranbiochemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried aufgenommen.

### **3.2.5.5 N-terminale Sequenzierung**

N-terminale Sequenzierungen von Proteinen wurden über automatischen Edman-Abbau mittels einem Sequenziergerät von der Abteilung für Proteinanalytik am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

### **3.2.6 Peptidsynthese**

Die für die Kokristallisation verwendeten Peptide von Hsc70 und Hsp90 wurden von der Abteilung für Bioorganische Chemie am Max-Planck-Institut in Martinsried synthetisiert. Die Peptide waren N-terminal azetyliert.

## 3.3 Röntgenkristallographische Methoden

### 3.3.1 Grundlagen und Überblick

Eine angemessene Beschreibung der Theorie der Röntgenkristallographie und ihrer experimentellen Umsetzung ist äußerst umfangreich und würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem übersteigen. In diesem Teil der Arbeit werden deshalb nur einige Grundlagen der Beugungstheorie und die einzelnen Schritte einer Röntgenstrukturanalyse schematisch dargestellt. Umfassende Darstellungen der Methode finden sich in den Lehrbüchern von Drenth (1994), Massa (1994), McRee (1993), Giacovazzo (1992), McPherson (1982), Buerger (1977), Blundell & Johnson (1976) und Woolfson (1970).

#### 3.3.1.1 Grundlagen der Beugungstheorie

Um konstruktive Interferenz (Reflexe) bei der Beugung von Röntgenstrahlen an einem Einkristall beobachten zu können, müssen die geometrischen Beugungsbedingungen, die so genannten Laue-Gleichungen, erfüllt sein:

$$\begin{aligned}
 \vec{a} \cdot (\vec{s} - \vec{s}_0) &= h \cdot \lambda & \vec{s}_0 &= \text{Einheitsvektor in Richtung der einfallenden Strahlung} \\
 \vec{b} \cdot (\vec{s} - \vec{s}_0) &= k \cdot \lambda & \vec{s} &= \text{Einheitsvektor in Richtung der gebeugten Strahlung} \\
 \vec{c} \cdot (\vec{s} - \vec{s}_0) &= l \cdot \lambda & \lambda &= \text{Wellenlänge} \\
 & & h, k, l &= \text{ganze Zahlen} \\
 & & \vec{a}, \vec{b}, \vec{c} &= \text{Basisvektoren des Kristallgitters}
 \end{aligned}
 \tag{3.1}$$

Die skalare Formulierung dieser Bedingungen erfolgt durch die Bragg'sche Gleichung:

$$\begin{aligned}
 2d_{hkl} \sin \theta &= \lambda & \lambda &= \text{Wellenlänge} \\
 & & d_{hkl} &= \text{Netzebenenabstand} \\
 & & 2\theta &= \text{Beugungswinkel}
 \end{aligned}
 \tag{3.2}$$

Die Laue-Gleichungen beschreiben, unter welchen geometrischen Voraussetzungen Reflexe im Raum auftreten können. Beim Vorliegen einer unbekanntes Struktur können aus den geometrischen Lagen der Reflexe, sowie dem eventuell systematischen Fehlen von Reflexen an bestimmten Positionen im reziproken Gitter, die Gitterkonstanten und häufig auch die Raumgruppe des untersuchten Kristalls bestimmt werden. Die Reflexpositionen beinhalten jedoch noch keine Information über die Anordnung der Atome in der asymmetrischen Einheit der

Elementarzelle. Diese Information ist erst in der Verteilung der Reflexintensitäten im reziproken Raum, dem so genannten gewichteten reziproken Gitter enthalten.

Die Beugung eines kohärenten Röntgenstrahls an einer beliebigen Elektronendichteverteilung  $\rho(\vec{r})$  wird mathematisch durch die Fouriertransformation (FT) beschrieben:

$$F(\vec{r}^*) = \text{FT}[\rho(\vec{r})] = \int_V \rho(\vec{r}) \cdot \exp(2\pi \cdot i \cdot \vec{r} \vec{r}^*) d\vec{r} \quad (3.3)$$

Umgekehrt erhält man durch Rücktransformation von  $F(\vec{r}^*)$  die ursprüngliche Dichteverteilung:

$$\rho(\vec{r}) = \text{FT}^{-1}[F(\vec{r}^*)] = \int_{V^*} F(\vec{r}^*) \cdot \exp(-2\pi \cdot i \cdot \vec{r} \vec{r}^*) d\vec{r}^* \quad (3.4)$$

Die mit \* gekennzeichneten Vektoren gehören zum Fourierraum, der auch reziproker Raum genannt wird. Liegt eine nichtperiodische Elektronendichteverteilung vor, so ist die Fouriertransformierte eine kontinuierliche Funktion.

Eine dreidimensional periodische Elektronendichteverteilung eines Kristalls  $\rho(\vec{r})_{\text{Kristall}}$  kann als Faltung der Dichteverteilung in der Elementarzelle  $\rho(\vec{r})_{\text{EZ}}$  und der Gitterfunktion  $G(\vec{r})$  dargestellt werden:

$$\rho(\vec{r})_{\text{Kristall}} = \rho(\vec{r})_{\text{EZ}} * G(\vec{r}) \quad (3.5)$$

Mittels Fouriertransformation dieser Funktion erhält man unter Anwendung des Faltungssatzes das Beugungsbild:

$$F(\vec{r}^*)_{\text{Kristall}} = \text{FT}[\rho(\vec{r})_{\text{EZ}}] \cdot \text{FT}[G(\vec{r})] = F(\vec{r}^*)_{\text{EZ}} \cdot G^*(\vec{r}^*) \equiv \{F_{hkl}\} \quad (3.6)$$

$$\{F_{hkl}\} = \text{Menge der Strukturfaktoren}$$

Da die reziproke Gitterfunktion  $G^*(\vec{r}^*)$  diskret ist, existiert die Fouriertransformierte  $F(\vec{r}^*)_{\text{Kristall}}$  der Kristalldichtefunktion ebenfalls nur an den Punkten des reziproken Gitters. Dies entspricht der Aussage der Laue-Gleichungen.  $F(\vec{r}^*)_{\text{Kristall}}$  und damit auch  $\rho(\vec{r})_{\text{Kristall}}$  wird durch die Menge der i. Allg. komplexen Strukturfaktoren bestimmt. Mit  $\vec{h}$  als reziprokem Gittervektor folgt aus obiger Gleichung:

$$F_{hkl} = F(\vec{h}) = \int_{V_{EZ}} \rho(\vec{r})_{EZ} \cdot \exp(2\pi \cdot i \cdot \vec{r} \cdot \vec{h}) d\vec{r} = |F(\vec{h})| \cdot \underbrace{\exp[i \cdot \phi(\vec{h})]}_{\text{Phasenfaktor}} \quad (3.7)$$

Da im Beugungsexperiment nur Intensitäten messbar sind, geht die Phaseninformation, d. h. die Phasendifferenzen zwischen den Strukturfaktoren, verloren (Phasenproblem der Kristallographie):

$$I_{hkl,obs} \propto |F(\vec{h})_{obs}|^2 = |F_{hkl,obs}|^2 \quad (3.8)$$

Um mit den beobachteten  $|F_{hkl,obs}|$ , den so genannten Strukturamplituden, die Elektronendichteverteilung zurückrechnen zu können, müssen den einzelnen Strukturamplituden Phasenwerte zugeordnet werden. Die Berechnung dieser Phaseninformation erfolgt über das Strukturmodell, eine angenommene Elektronendichteverteilung. Mit dieser Modellichte werden theoretische Strukturfaktoren  $F_{hkl,calc}$  berechnet. Die darin enthaltenen Phasen  $\phi(\vec{h})_{calc}$  werden dann auf die observierten Strukturamplituden übertragen und ermöglichen eine Dichteberechnung, bei der die experimentell ermittelten Daten eingehen.

Dieses Prinzip ist nur dann erfolgreich, wenn die Modellichte in groben Zügen mit der tatsächlich vorhandenen Dichte übereinstimmt, also wesentliche Teile der Struktur richtig beschrieben sind. Das einfachste Modell zur analytischen Formulierung einer Elektronendichteverteilung ist das so genannte IAM-Modell (*engl.* independent atom model). Dabei wird die Verteilung durch eine Überlagerung der  $N$  thermisch verschmierten, kugelsymmetrisch angenommenen Elektronendichten  $\delta_j(\vec{r})$  der einzelnen Atome an den ermittelten Koordinaten innerhalb der Elementarzelle zusammengesetzt.

$$F_{hkl,calc} = F_{calc}(\vec{h}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi \cdot i \cdot \vec{r}_j \cdot \vec{h}) = |F_{calc}(\vec{h})| \cdot \exp[i \cdot \phi_{calc}(\vec{h})] \quad (3.9)$$

mit  $f_j(\vec{h}) = \int_V \delta_j(\vec{r}) \cdot \exp(2\pi \cdot i \cdot \vec{r} \cdot \vec{h}) d\vec{r}$

Der Atomformfaktor  $f_j(\vec{h})$ , auch atomarer Streufaktor genannt, ist dabei ein Maß für das Streuvermögen der Elektronenhülle eines freien Atoms, bezogen auf dasjenige eines punktförmigen Elektrons im Ursprung. Liegt die Energie der einfallenden Photonen in der Nähe einer Absorptionskante eines Atoms, so findet resonante Streuung, auch anomale Dispersion genannt, statt. Resonante Streuung wird phänomenologisch durch Addition eines energieabhängigen Real- und Imaginärteils zum Atomformfaktor berücksichtigt.

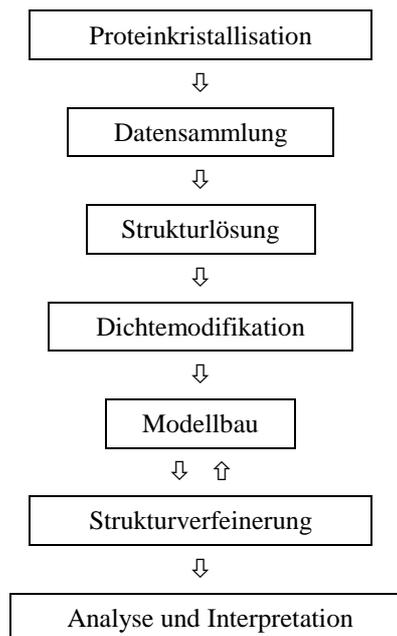
(3.10)

$$f_j(\vec{h}, E) = f_j(\vec{h}) + f'(E) + i \cdot f''(E)$$

Die Korrekturterme  $f'$  und  $f''$  sind über die Kramers-Kronig-Relation verknüpft.  $f'$  ist i. Allg. negativ und kann das Streuvermögen eines Atoms bei Wellenlängen nahe der Absorptionskante erheblich variieren. Dieser Effekt wird bei der MAD-Phasierung (*engl. multiple anomalous dispersion*) zur Strukturlösung verwendet.

### 3.3.1.2 Schritte einer Röntgenstrukturanalyse

In Abbildung 3.1 sind die notwendigen Schritte einer Röntgenstrukturanalyse als Übersicht dargestellt. Im folgenden Text werden nun kurze Erläuterungen zu den einzelnen Teilschritten gegeben.



**Abbildung 3.1** Flussdiagramm einer Röntgenstrukturanalyse

#### Proteinkristallisation

Die Grundlage jeder Röntgenstrukturanalyse ist die Existenz geeigneter Kristalle, die hochaufgelöste Beugungsbilder liefern können. Dies ist prinzipiell eine schwierige Aufgabe, da alle Parameter für optimales Kristallwachstum empirisch ermittelt werden müssen. Voraussetzung für die Kristallisation ist die Bildung stabiler Kristallisationskeime aus einer übersättigten Lösung. Dies erfolgt durch langsame Erhöhung der Protein- und Fällungsmittelkonzentration mittels Diffusion oder Dialyse innerhalb eines geschlossenen Systems. Variablen

der Kristallisation sind z. B. pH-Wert, Pufferart, Konzentration und Art des Fällungsmittels, Temperatur, Ionenstärke, Proteinkonzentration, Proteinreinheit, Detergenzien, Additive und Probenvolumen (McPherson, 1990). Zum Auffinden einer ersten Kristallisationsbedingung werden so genannte 'Sparse-Matrix-Screens' (Jancarik & Kim, 1991) pipettiert. Die Screens enthalten eine begrenzte Anzahl unterschiedlichster Kristallisationsbedingungen, die aufgrund einer statistischen Analyse bekannter Kristallisationsbedingungen zusammengestellt sind. Die Auswertung eines Sparse-Matrix-Ansatzes liefert in der Regel Hinweise für weiter optimierte Kristallisationsansätze. Verschiedene Techniken der Kristallisation sind: Kristallisation im hängenden oder sitzenden Tropfen (*engl.* hanging drop, sitting drop), Kristallisation unter Öl oder Kristallisation mittels Mikro-Dialyse (Übersicht: Ducruix & Grige, 1992).

### **Datensammlung**

Für die Vermessung der Kristallreflexe, des so genannten intensitätsgewichteten reziproken Gitters, müssen die Beugungsbedingungen nach Laue bzw. Bragg erfüllt werden. Dies erfolgt durch Oszillation eines im Röntgenstrahl zentrierten Einkristalls. Während der Kristalldrehung um kleine Winkelbereiche  $\Delta\omega$  ( $0.5 - 2.0^\circ$ ) werden die entstehenden Beugungsmuster durch einen Flächendetektor aufgenommen. Der gesamte Winkelbereich, der für einen vollständigen Datensatz durchfahren werden muss, ist von der Kristallsymmetrie und der Kristallorientierung abhängig. Um möglichst konstante Beugungseigenschaften der Kristalle über den Zeitraum einer Datensammlung zu gewährleisten, werden die Proben kontinuierlich gekühlt. Als Strahlungsquellen dienen Röntgeneratoren und Synchrotronspeicherringe. Synchrotronstrahlung zeichnet sich gegenüber charakteristischer Strahlung konventioneller Röntgenröhren durch eine höhere Intensität, eine geringere Divergenz und der freien Wahl der Wellenlänge innerhalb des kontinuierlichen Synchrotronspektrums aus.

### **Datenreduktion**

Um aus den bei einer Datensammlung gemessenen Rohdaten beobachtete Strukturamplituden zu erhalten, müssen noch einige Berechnungen und Korrekturen durchgeführt werden. Diese Arbeitsschritte werden als Datenreduktion bezeichnet und enthalten u. a. die Skalierung der einzelnen Beugungsbilder, die Berechnung integraler Nettointensitäten aus den Zählraten der Reflexe unter Berücksichtigung von Untergrundstrahlung, eine Polarisationskorrektur und die Lorentzkorrektur, die von der Aufnahmegeometrie abhängig ist. Zur Beurteilung der Qualität eines Datensatzes wird durch Vergleich symmetrieäquivalenter Reflexintensitäten der so genannte  $R_{\text{sym}}$ -Wert (*engl.* reliability index) berechnet.

### **Strukturlösung**

Das Auffinden eines ersten Strukturmodells oder äquivalent richtiger Phaseninformation bezeichnet man als Strukturlösung. Für kleine Moleküle können Phasen ohne zusätzlichen experimentellen Aufwand mit den Direkten Methoden (Karle & Hauptmann, 1950; Harker &

Kasper, 1948) berechnet werden. Unter der Annahme, dass die Elektronendichte im Kristall überall positiv ist und von lokal konzentrierten Dichtemaxima (Atomizität) aufgebaut wird, lassen sich einschränkende statistische Beziehungen zwischen Phasen bestimmter Reflexklassen ableiten. Anhand weniger Startphasen (6 - 12 Reflexe) können somit für alle weiteren Reflexe Phasen berechnet werden. Durch systematische Variation der Startphasen und der Einführung von Qualitätskriterien wird der richtige Phasensatz zur Lösung der Struktur gesucht. Die Anwendung dieser Methode zur Lösung von Proteinstrukturen ist jedoch äußerst beschränkt und gelang bisher nur für wenige kleine Proteine ( $< 1000$  Nichtwasserstoffatome) bei atomaren Auflösungen ( $< 1.2 \text{ \AA}$ ).

Für die Lösung von Proteinstrukturen entwickelte Methoden sind Multipler Isomorpher Ersatz (MIR, *engl.* multiple isomorphous replacement), Multiple Anomale Dispersion (MAD, *engl.* multiple anomalous dispersion) und Molekularer Ersatz (MR, *engl.* molecular replacement). In bestimmten Fällen können auch Kombinationen der einzelnen Phasierungstechniken eingesetzt werden.

Für die MIR-Methode müssen Proteinkristalle durch den Einbau schwerer Atome (z. B. Hg, Pt, Au) in das Kristallgitter modifiziert und vermessen werden. Der Einbau erfolgt in der Regel durch Einlegen nativer Kristalle in Lösungen entsprechender Schwermetallverbindungen. Die Reflexintensitäten einer solchen Derivatstruktur weichen messbar von denen der nativen Kristalle ab. Ist durch die Anlagerung der Schweratome die Metrik des Kristalls (Gitterkonstanten) nicht zu stark verändert, so spricht man von einem isomorphen Derivat. Unter diesen Voraussetzungen sind die Intensitätsänderungen ausschließlich auf die eingebauten Schweratome zurückzuführen. Die Lokalisierung der Schweratomlagen aus den observierten Intensitätsunterschieden kann dann mittels Patterson-Techniken (Patterson, 1934; Patterson, 1935) oder Direkten Methoden erfolgen und ist Grundlage zur Berechnung eines ersten Phasensatzes. Für eine erfolgreiche Phasierung werden mindestens zwei unterschiedliche Derivate benötigt.

Die Phasierung mit der MAD-Methode erfordert die Anwesenheit eines oder mehrerer anomal streuenden Atome im Kristallverband, deren Absorptionskanten bei technisch zugänglichen und für Röntgenstrukturanalysen sinnvollen Wellenlängen liegen (Hendrickson, 1991). Die unterschiedlichen anomalen Beiträge bei verschiedenen Wellenlängen um die Absorptionskante führen zu Intensitätsunterschieden zwischen den einzelnen Datensätzen, die analog zur MIR-Methode für die Phasierung verwendet werden. Für eine eindeutige Phasierung müssen Datensätze bei mindestens zwei Wellenlängen vermessen werden, jedoch ist eine Überbestimmung des Systems durch eine weitere Wellenlänge ratsam. Eine erfolgreich durchgeführte MAD-Phasierung kann anhand eines einzigen Kristalls sehr genaue Phasen bis zur Auflösungsgrenze liefern. Dies ist möglich, da bei der Vermessung aller Wellenlängen an ei-

nem Kristall in der Regel keine Isomorphieprobleme auftreten. Als Standardtechnik zur Markierung eines Kristalls mit einem anomalen Streuer hat sich die Bioinkorporation von Selenomethionin in Proteine etabliert.

Sind Ähnlichkeiten zwischen der gesuchten Struktur und einer bereits bekannten Struktur zu erwarten (Sequenzhomologie), so kann die Phasierung durch Molekularen Ersatz (Rossmann, 1972; Huber, 1965; Rossmann & Blow, 1962; Hoppe, 1957) erfolgen. Dies erfordert die korrekte Platzierung der bekannten Struktur in der Elementarzelle der zu lösenden Kristallstruktur. Für die Bestimmung der Transformation wird zuerst die Orientierung der Suchstruktur, anschließend die Translation ermittelt. Das Suchverfahren kann im direkten oder im reziproken Raum durchgeführt werden und wird mit Hilfe von Korrelationskoeffizienten und weiteren Qualitätskriterien überwacht.

### **Dichtemodifikation**

Ist ein erster experimenteller Phasensatz ermittelt, kann die Elektronendichte mittels Fouriertransformation berechnet werden. Die Qualität dieser Dichten ist jedoch häufig unzureichend und ihre Interpretation oft nicht eindeutig. Zur Verbesserung der Phasen und somit der Genauigkeit einer Elektronendichte sind zusätzliche Informationen nötig. Diese werden in Form von Randbedingungen formuliert und in einem iterativen Prozess zur Phasenverbesserung verwendet. Mögliche Randbedingungen sind z. B.:

- Elektronendichte des Proteins (Polypeptidkette) muss kontinuierlich sein
- Elektronendichte muss bei hohen Auflösungen an Atompositionen gehäuft sein (Cowtan & Main, 1993)
- Proteinbereiche müssen hohe, Lösungsmittelbereiche niedrige Elektronendichten besitzen (Wang, 1985)

### **Modellbau und Strukturverfeinerung**

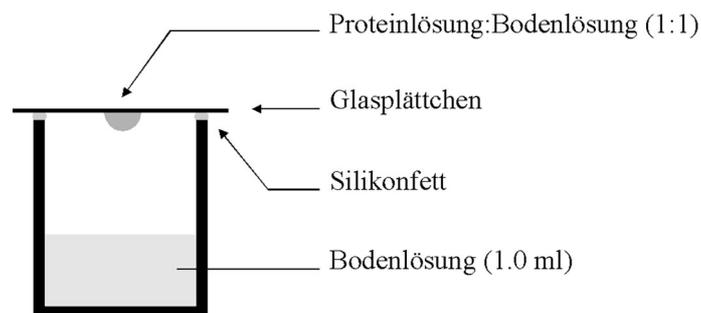
Ist ein optimierter Phasensatz berechnet, folgt die Interpretation der resultierenden Elektronendichte auf atomarer Basis. Unter Berücksichtigung der Proteinsequenz wird möglichst ein komplettes Strukturmodell in die Dichte eingepasst. Bei hohen Auflösungen und genauen Startphasen kann der Modellbau mit Hilfe von Computerprogrammen teilweise oder vollständig automatisiert werden. Bei der Strukturverfeinerung wird dann durch Optimierung der Modellparameter (Atompositionen, Temperaturfaktoren jedes Atoms) eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen Experiment und Strukturmodell angestrebt. Zur Erhöhung des Konvergenzradius einer Strukturverfeinerung werden stereochemische Randbedingungen (z. B. Bindungsabstände) eingeführt (Engh & Huber, 1991; Bränden & Jones, 1990; Konnert & Hendrickson, 1980; Jack & Levitt, 1978). Modellbau und Strukturverfeinerung werden zyklisch durchlaufen, bis keine weiteren Optimierungen möglich sind. Zur qualitativen Beurtei-

lung des ausverfeinerten und optimierten Strukturmodells, der so genannten Kristallstruktur, werden mehrere statistische Gütefaktoren berechnet (Dodson *et al.*, 1996; Brünger, 1992).

### 3.3.2 Durchgeführte Methoden

#### 3.3.2.1 Proteinkristallisation

Zur Kristallisation wurde ausschließlich die Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen eingesetzt (McPherson, 1982). Die gereinigten Proteine wurden mit Bodenlösung im Verhältnis 1:1 auf einem silikonisierten Glasplättchen gemischt, auf vorgefetteten Kristallisationsplatten (VDX-Platten, Hampton Research) über der Bodenlösung luftdicht verschlossen und bei  $T = 20\text{ °C}$  in einem Thermoschrank gelagert (vgl. Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2** Schematische Darstellung der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen

Für die Bestimmung erster Kristallisationsbedingungen wurden die kommerziell erhältlichen Sparse-Matrix-Screens 'Crystal Screen' und 'Crystal Screen II' bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen pipettiert. Konnte Kristallbildung beobachtet werden, so folgte eine Optimierung der Bedingung durch systematische Variation von pH-Wert, Pufferart, Fällungsmittelkonzentration, Fällungsmittelart und Proteinkonzentration. In einigen Fällen ließ sich die Qualität der Kristalle durch das Animpfen der Ansätze mit kleinen Kristallkeimen verbessern (*engl.* micro-seeding).

Für Datensammlungen bei 100 K ( $-173\text{ °C}$ ) müssen die Kristalle in einem geeigneten Puffer vorliegen, der die Bildung von Eiskristallen aus wässrigen Probenanteilen verhindert. Dies kann durch Einlegen vorhandener Proteinkristalle in einen Kryopuffer oder durch Kristallisation unter kryokompatiblen Bedingungen erfolgen. Um mechanischen und osmotischen Stress

auf die Proteinkristalle gering zu halten, wurde ausschließlich letztere Methode durch die Kokristallisation mit Glycerin oder Xylitol angewendet.

### 3.3.2.2 Datensammlung und Datenreduktion

Die Vermessung der Proteinkristalle erfolgte ausschließlich bei tiefen Temperaturen. Dafür wurden die Proben direkt in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und während den Datensammlungen mit kaltem Stickstoffgas aus einem Tieftemperatursystem (Oxford Cryostream) auf 100 K temperiert. Datensätze wurden an folgenden Strahlungsquellen aufgenommen:

**Tabelle 3.1** Auflistung der genutzten Strahlungsquellen

Strahlungsquelle	Ort	Strahlführung	Detektor
Röntgeneratore RU-200 (Rigaku), Spiegelsystem (Supper)	Martinsried	-	Image Plate MAR300
DESY	Hamburg	BW6	MARCCD
DESY	Hamburg	X31	Image Plate MAR300
ESRF	Grenoble	ID14-3	MARCCD
NLSL	Brookhaven	X12B	ADSC Quantum-4

Die Datenreduktionen erfolgten mit den Programmpaketen DENZO, SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) oder XDS (Kabsch, 1993).

### 3.3.2.3 Strukturlösung

Strukturlösungen nach der Methode des Molekularen Ersatz (MR) wurden mit dem Programm AMORE (Navazza, 1994) durchgeführt. Als Suchmodelle dienten dabei die Struktur der Tpr-Domäne der Protein Phosphatase 5 (Das *et al.*, 1998) oder im Rahmen dieser Arbeit gelöste Kristallstrukturen. Auf eine Phasenverbesserung durch Dichtemodifikationen wurde im Zusammenhang mit der MR-Methode verzichtet.

Neben der MR-Methode wurde auch die Phasierung mittels Multipler Anomaler Dispersion an den Absorptionskanten von Selen und Nickel durchgeführt. Die Positionierung der anomalen Streuer erfolgte mit Hilfe von Pattersonmethoden. Die Phasierungen anhand von MAD-Daten wurden mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) vorgenommen. Eine Verbesserung der experimentellen MAD-Phasen durch Dichtemodifikationen wurde im Anschluss mit dem Programm DM (CCP4, 1994) erreicht.

### 3.3.2.4 Modellbau und Strukturverfeinerung

Erste atomare Strukturmodelle wurden entweder manuell oder automatisch mit dem Programm wARP (Perrakis *et al.*, 1997) erstellt. Die Bearbeitung und Überprüfung der Modelle wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) vorgenommen.

Strukturverfeinerungen wurden mit den Programmen CNS (Brünger *et al.*, 1998) und SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1997) unter Berücksichtigung stereochemischer Randbedingungen durchgeführt. Als objektives Kriterium zur Beurteilung der Modellqualität wurden für die Berechnung von freien R-Werten 7 - 10 % der Reflexe von den Verfeinerungen ausgeschlossen (Kleywegt & Brünger, 1996; Brünger, 1992). Wassermoleküle wurden im Endstadium der Verfeinerungen in die Strukturmodelle aufgenommen. Die Erkennung potenzieller Wasserpositionen erfolgte anhand einer automatischen Peakanalyse der  $F_o - F_c$  Differenzdichte. Die Übernahme identifizierter Restdichtemaxima als Wassermoleküle erfolgte durch manuelle Inspektion am Grafikbildschirm.

### 3.3.2.5 Analyse und Darstellung

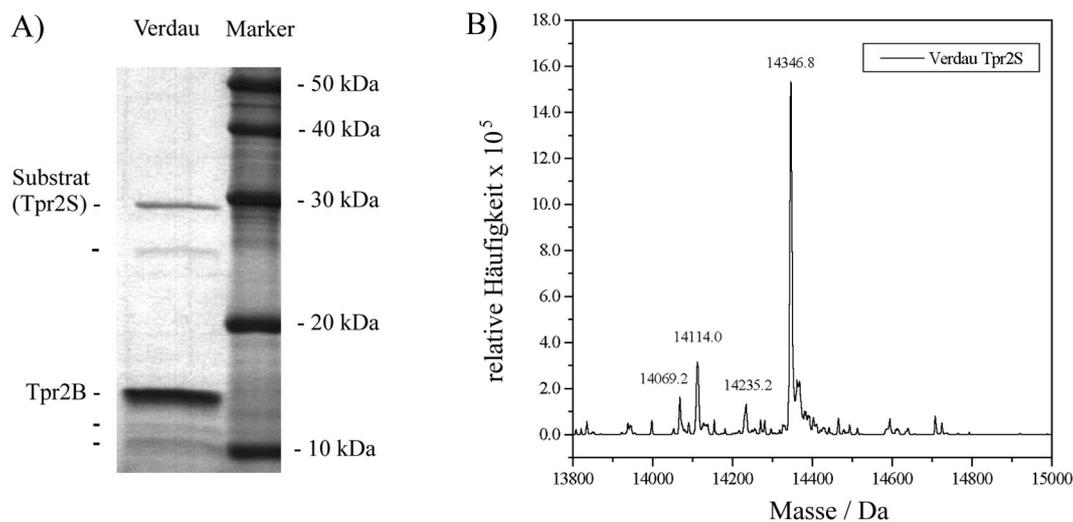
Für die Analyse der ermittelten Kristallstrukturen, den Vergleich mit anderen Strukturen und die graphische Aufarbeitung der Ergebnisse wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), RASTER3D (Merritt & Bacon, 1997), PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) und SWISS-PDBVIEWER (Guex & Peitsch, 1997) eingesetzt. Oberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) berechnet und dargestellt. Die Berechnung von Kontaktflächen erfolgte mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998). Die Durchführung von Sequenzvergleichen erfolgte mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Theoretische Molekulargewichte wurden mit dem Programm PAWS (ProteoMetrics) berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Domänenstruktur von Hop

In Vorversuchen von Herrn Dr. I. Moarefi durchgeführte Kristallisationsansätze zur Kristallisation von nativem Hop hatten leider keine Kristalle geliefert. Daher wurde versucht, durch limitierte Proteolyse mit Subtilisin möglichst kompakte, lösliche und proteolytisch stabile Proteinfragmente bzw. potenzielle Proteindomänen zu erhalten und diese strukturell und in Zusammenarbeit mit Herrn A. Brinker auch biochemisch zu charakterisieren.

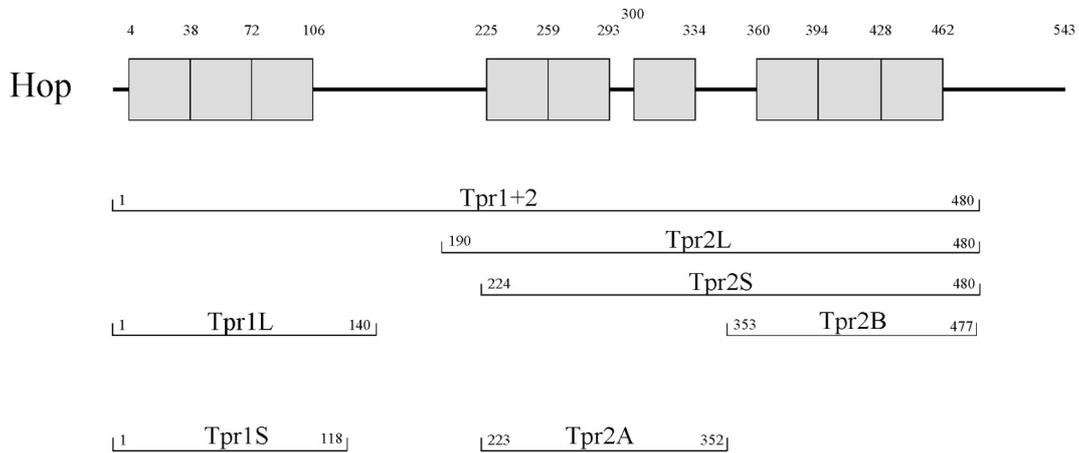
Als Substrate für die Spaltungsansätze dienten Hop oder bereits bestimmte proteaseresistente Fragmente. Die Identifizierung der Proteinfragmente erfolgte mittels Massenspektrometrie und N-terminaler Proteinsequenzierung. In Abbildung 4.1 sind exemplarisch die Ergebnisse für das Konstrukt Tpr2B zusammengestellt.



**Abbildung 4.1** Identifizierung des proteaseresistenten Fragments Tpr2B. A) SDS-Gel der Spaltung von Tpr2S. B) Massenspektrum des Verdauens von Tpr2S.

Als Substrat für die Spaltung mit Subtilisin diente hierbei das Konstrukt Tpr2S (Subtilisin:Tpr2S = 1:10). Die Massenbestimmung der dominierenden Abbaubande lieferte ein Molekulargewicht von 14346,8 Da. Die N-terminale Sequenzierung des Fragments ergab die Sequenz AYINPDLA. Diese Ergebnisse erlaubten eine eindeutige Identifizierung des proteaseresistenten Fragments Tpr2B (Ala353 - Asn477) mit einem theoretisch berechneten Molekulargewicht von 14347,4 Da.

Als proteaseresistente Fragmente konnten die Konstrukte Tpr1+2, Tpr2L, Tpr2S und Tpr2B identifiziert werden (vgl. Abbildung 4.2). Anhand dieser Ergebnisse und nach Verfügbarkeit der Kristallstruktur von Tpr1L wurden noch die Konstrukte Tpr1S und Tpr2A angefertigt.

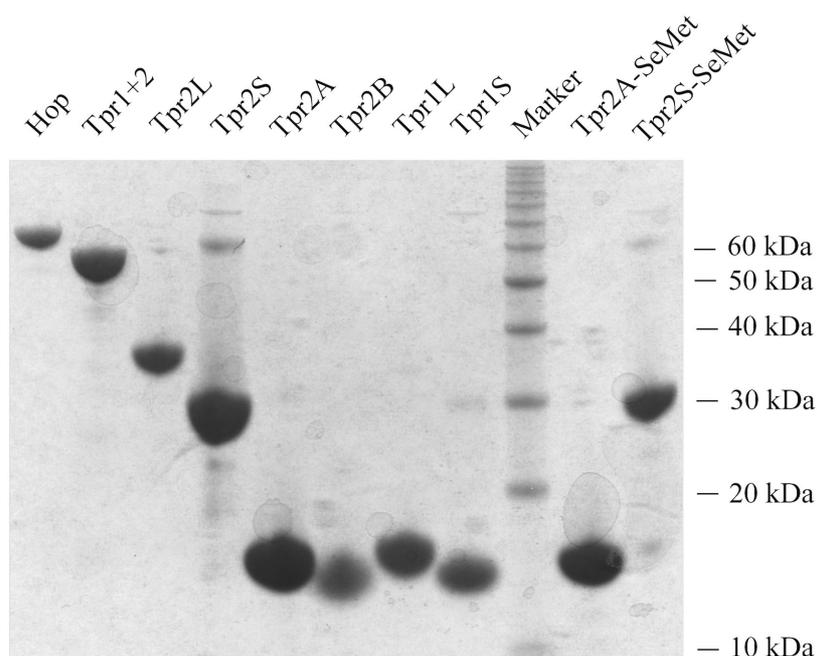


**Abbildung 4.2** Proteaseresistente Fragmente von Hop und verwendete Konstrukte. Tpr-Motive sind als Kästchen dargestellt. Die Nummerierungen beziehen sich auf die native Sequenz von Hop.

Alle identifizierten Fragmente bestehen fast ausschließlich aus Tpr-Motiven. Dabei scheinen drei Tpr-Motive die Basis für den Aufbau einer kompakten Faltungseinheit zu bilden. Die Grenzen der ermittelten Fragmente zeigen jedoch deutlich, dass neben den Tpr-Motiven noch N- und besonders C-terminale Sequenzbereiche Bestandteile der potenziellen Domänen sind. Die Anordnung der Tpr-Motive innerhalb der Sequenz von Hop und die ermittelten proteaseresistenten Fragmente erlauben eine grobe Einteilung in zwei Tpr-Domänen, wobei die zweite Domäne noch in die Subdomänen Tpr2A und Tpr2B unterteilt werden kann.

## 4.2 Isolierung und Kristallisation der Proteine

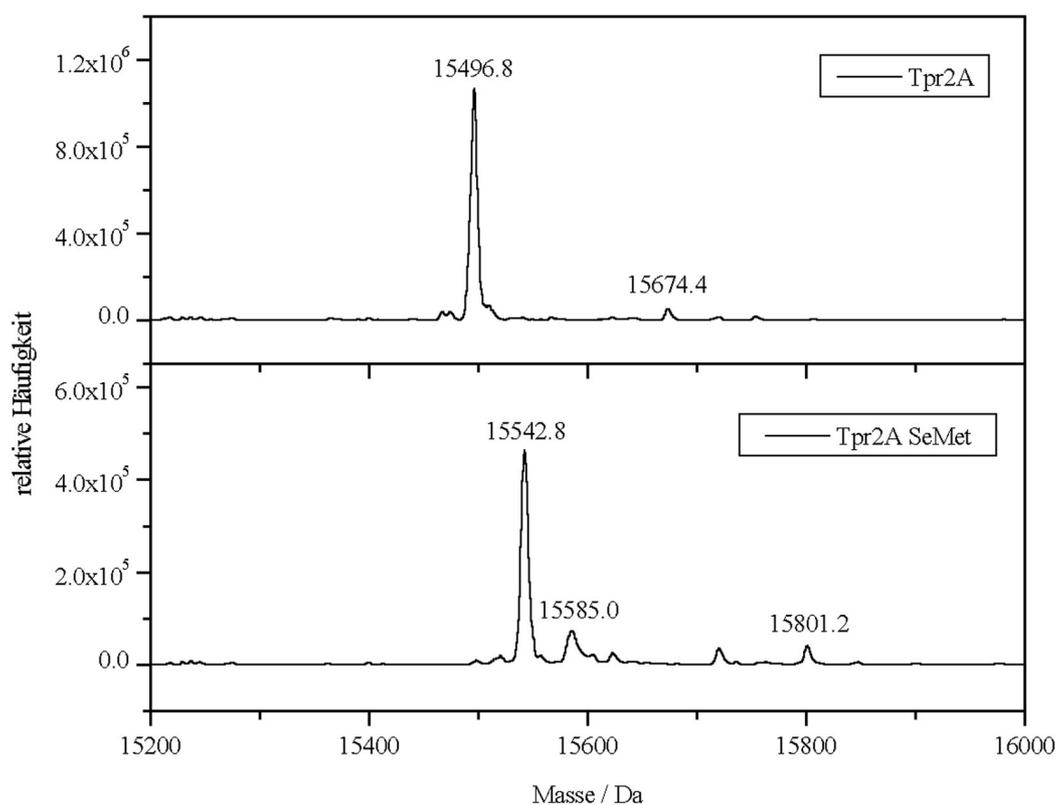
Die Expression und Reinigung der Proteine wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Sehr hohe Expressionsniveaus (50 - 150 mg pro 1 L Zellkultur) in Kombination mit den gewählten Reinigungsschritten erlaubten schnelle Proteinisolierungen mit hohen Reinheitsgraden. Abbildung 4.3 zeigt ein SDS-Gel aller zur Kristallisation eingesetzten Proben.



**Abbildung 4.3** SDS-Gel der isolierten Proteine. Um den Reinheitsgrad zu verdeutlichen, wurde das Gel deutlich überladen.

Die Überprüfung der Methioninsubstitution durch Selenomethionin für die MAD-Experimente der Konstrukte Tpr2A (1 Methionin) und Tpr2S (6 Methionine) erfolgte durch Vergleich der Molekulargewichte zwischen nativem und substituiertem Protein (vgl. Abbildung 4.4 und Tabelle 4.1). In beiden Fällen konnte anhand der Massenspektren eine quantitative Substitution belegt werden.

In Tabelle 4.1 sind die experimentell bestimmten Molekulargewichte der isolierten und zur Kristallisation eingesetzten Konstrukte aufgelistet. Die Ergebnisse der Kristallisationsversuche sind in den Tabellen 4.2 und 4.3 zusammengefasst.



**Abbildung 4.4** Molekulargewichte von nativem und mit Selenomethionin substituiertem Protein Tpr2A. Der Massenunterschied  $\Delta M = 46.0$  Da entspricht innerhalb der Messgenauigkeit der erwarteten Differenz  $\Delta M = 1 \cdot (M_{Se} - M_S) = 46.9$  Da.

**Tabelle 4.1** Molekulargewichte der verwendeten Proteine. Eingeklammerte Reste sind durch die Klonierung hinzugefügt und gehören nicht zur nativen Sequenz von Hop.

Konstrukt	Sequenz Hop	$M_{theo.} / Da$	$M_{exp.} / Da$	$\Delta M / Da$
Tpr1L	1-140 (G)MEQV...LESD	16150.1	16151.0	-0.9
Tpr1S	1-118 (G)MEQV...MEAR	13482.0	-	-
Tpr2A	223-352 (G)KQALK...QERL	15493.5	15496.8	-3.3
Tpr2A (SeMet)	223-352 (G)KQALK...QERL	15540.4	15542.8	-2.4
Tpr2B	353-477 (G)AYIN...AQYN	14404.5	14407.2	-2.7
Tpr2S	224-480 (GHL)QALK...NRHD	30353.4	30354.0	-0.6
Tpr2S (SeMet)	224-480 (GHL)QALK...NRHD	30634.8	30634.6	+0.2
Tpr2L	190-480 (G)MDEE...NRHD	33983.5	-	-
Tpr1+2	1-480 (G)MEQV...NRHD	55492.8	-	-

**Tabelle 4.2** Ergebnisse der Kristallisationsversuche. Mit Selenomethionin substituierte Proteine sind mit (Se) gekennzeichnet.

Konstrukt	Proteinlösung	Ansatz / $\mu$ l	optimierte Bedingung	Symmetrie
Tpr1L	30 mg/ml in 15 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT	2.0 + 2.0	22 % PEG 4000, 10 % Isopropanol, 100 mM Natriumcitrat pH 5.4, 15 % Glycerin, Micro-seeding	P2 <sub>1</sub>
Tpr1S	21 mg/ml in 15 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT	2.0 + 2.0	22 % PEG 4000, 100 mM Natriumacetat pH 5.1, 100 mM Ammoniumacetat, 10 % Xylitol, Micro-seeding	P2 <sub>1</sub>
Tpr2A	18 - 60 mg/ml in 15 mM TRIS pH 7.5, 1 mM DTT	2.0 + 2.0	keine Kristallisation	
Tpr2A (Se)	18 - 40 mg/ml in 15 mM TRIS pH 7.5, 1 mM DTT	2.0 + 2.0	keine Kristallisation	
Tpr2B	38 mg/ml in 15 mM TRIS pH 7.5, 1 mM DTT	2.0 + 2.0	16 % PEG 3350, 100 mM HEPES pH 7.2, 10 % Xylitol, Micro-seeding	-
Tpr2S	17 mg/ml in 10 mM MES pH 6.5, 2 mM DTT	2.0 + 2.0	26 % PEG 400, 100 mM MES pH 6.5, 20 % Glycerin, Micro-seeding	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Tpr2S (Se)	17 mg/ml in 10 mM MES pH 6.5, 2 mM DTT	1.5 + 1.5	24 % PEG 400, 100 mM MES pH 6.0, Micro-seeding	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Tpr2L	13 mg/ml in 10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT	1.5 + 1.5	30 % PEG 4000, 100 mM TRIS pH 8.0, 100 mM Natriumacetat, 15 % Glycerin	-
Tpr1+2	6 - 19 mg/ml in 10 mM HEPES pH 6.5, 1 mM DTT	1.3 + 1.3	keine Kristallisation	

Für die Konstrukte Tpr1L, Tpr1S, Tpr2B, Tpr2S und Tpr2L konnten erste Kristallisationsbedingungen mit Hilfe der Sparse-Matrix-Screens 'Crystal Screen' und 'Crystal Screen II' ermittelt werden (vgl. Materialien und Methoden).

Die Optimierung der gefundenen Kristallisationsbedingungen lieferte für die Konstrukte Tpr1L und Tpr1S stabile und große Kristalle (durchschnittliche Kristallgröße ca. 0.2 x 0.2 x 0.15 mm<sup>3</sup>) mit ausgezeichneten Beugungseigenschaften.

Kristalle von Tpr2B konnten morphologisch zwar optimiert werden, jedoch gelang es nicht, verwendbare Beugungsdaten zu sammeln. Die Kristalle waren extrem empfindlich gegenüber osmotischem und mechanischem Stress. Oft genügte nur das Öffnen der Kristallisationsansätze zur sichtbaren Zerstörung der Kristalle. Eine Erhöhung der Kristallstabilität durch

Kokkristallisation mit Salzen und Additiven bzw. der Versuch, Kristalle mit Glutaraldehyd zu vernetzen, blieben ohne Erfolg.

Für Tpr2S konnten anhand der Sparse-Matrix-Ansätze mehrere Kristallisationsbedingungen mit PEG 4000, PEG 8000 und PEG 20000 als Fällungsmittel ermittelt werden. Die Kristalle zeigten jedoch die gleichen unerwünschten Eigenschaften wie im Fall von Tpr2B. Eine Verbesserung der Kristallqualität gelang durch den Übergang zu PEG 400 als Fällungsmittel und dem Animpfen der Kristallisationsansätze mit kleinen Kristallkeimen.

Kristalle von Tpr2L zeigten einen extrem ausgeprägten nadelförmigen Habitus mit einem Nadeldurchmesser von maximal 10  $\mu\text{m}$  und einer Länge bis zu 400  $\mu\text{m}$ . Da Einkristalle dieser Abmessungen für konventionelle Beugungsmethoden zu klein sind, wurde versucht, das Dickenwachstum der Kristalle durch Variation der Kristallisationsparameter zu erhöhen. Alle Versuche führten jedoch zu keiner Verbesserung.

Von den Proteinen Tpr2A, Tpr2A (SeMet) und Tpr1+2 konnten trotz intensiver Suche keine Kristalle erhalten werden.

Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass für die Interaktionen zwischen Hop und Hsp/Hsc70 bzw. Hsp90 auf Chaperonseite die extrem C-terminalen Aminosäuren essentiell sind. Des Weiteren konnte die Interaktion zwischen Hop und Hsp90 seitens Hop auf den Bereich der Tpr2A-Domäne eingeschränkt werden. Daher wurden Peptide unterschiedlicher Länge entsprechend den C-terminalen Sequenzen von Hsc70 und Hsp90 für die Kokkristallisation mit Tpr1S und Tpr2A eingesetzt (C70\_12: GASSGPTIEEVD, C90\_8: TSRMEEVD, C90\_5: MEEVD). Alle Kristallisationsansätze wurden mit einem 1.3-molaren Überschuss an Peptid angesetzt. Die Kristallisationsergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

Äquivalent zur peptidfreien Kristallisation von Tpr1S konnte der Komplex mit C70\_12 unter gleichen Wachstumsbedingungen in der Raumgruppe  $P2_1$  kristallisiert werden. In einem Sparse-Matrix-Ansatz konnte zusätzlich eine Bedingung für tetragonales Kristallwachstum ermittelt werden. Für den Erhalt der tetragonalen Kristallform war die Verwendung von TRIS-Puffer und die Zugabe von Nickelionen zur Kristallisationsbedingung zwingend notwendig. Beide Kristallformen lieferten Beugungsbilder mit hoher Auflösung und wurden zur Strukturanalyse verwendet.

Durch Kokkristallisation des Peptids C90\_5 mit Tpr2A konnten Komplexkristalle erhalten werden. Dieser Komplex kristallisierte unter optimierten Bedingungen nach ca. 1 - 2 Wochen aus Präzipitat heraus und lieferte kleine, meist verwachsene Kristalle (durchschnittliche Kristallgröße ca.  $0.10 \times 0.05 \times 0.05 \text{ mm}^3$ ). Auch hier war die Zugabe von Nickelionen für die Kristallbildung erforderlich. Trotz ihrer geringen Größe waren die Kristalle aufgrund sehr guter Beugungseigenschaften für die Röntgenstrukturanalyse geeignet. Mit Selenomethionin

markierte Komplexkristalle von Tpr2A (SeMet) und C90\_5 (SeMet) wurden zur Struktur-  
lösung mittels der MAD-Technik verwendet.

Bemerkenswert ist, dass der Versuch, das längere Peptid C90\_8 für eine Komplexkristallisa-  
tion zu verwenden, scheiterte.

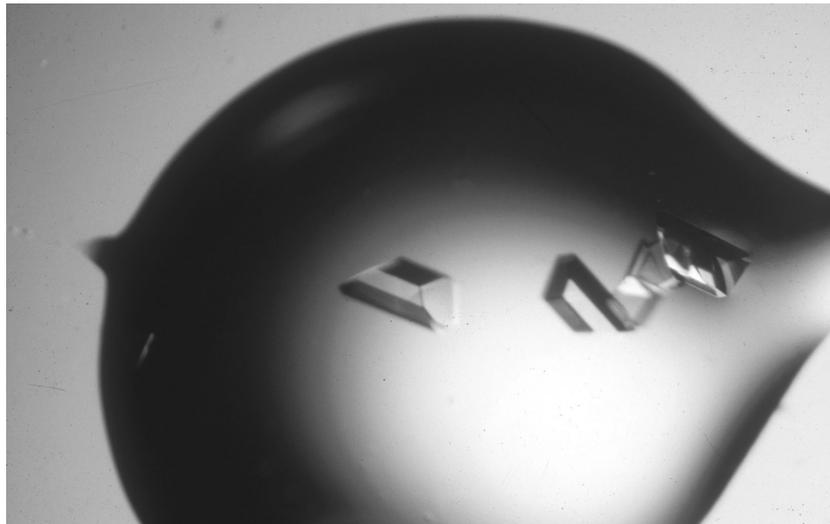
**Tabelle 4.3** Kristallisationsergebnisse der Domänen-Peptid-Komplexe. Mit Seleno-  
methionin substituiertes Protein bzw. Peptid ist mit (Se) gekennzeichnet.

<b>Konstrukt</b>	<b>Proteinlösung</b>	<b>Ansatz /<math>\mu</math>l</b>	<b>optimierte Bedingung</b>	<b>Symmetrie</b>
Tpr1S + Peptid C70_12 (1 : 1.3)	18 mg/ml in 15 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT	1.5 + 1.5	24 % PEG 4000, 100 mM Natriumacetat pH 5.1, 100 mM Ammoniumacetat, 10 % Xylitol, Micro-seeding	P2 <sub>1</sub>
Tpr1S + Peptid C70_12 (1 : 1.3)	18 mg/ml in 15 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT	1.5 + 1.5	24 % PEG MME 2000, 100 mM TRIS pH 8.5, 10 mM Nickelchlorid, 15 % Xylitol	P4 <sub>1</sub>
Tpr2A + Peptid C90_8 (1:1.3)	18 - 40 mg/ml in 15 mM TRIS pH 7.5, 1 mM DTT	1.5 + 1.5	keine Kristallisation	
Tpr2A + Peptid C90_5 (1 : 1.3)	18 mg/ml in 15 mM TRIS pH 7.5, 2 mM DTT	1.8 + 1.8	20 % PEG MME 2000, 100 mM TRIS pH 8.5, 5 mM Nickelchlorid, 10 % Xylitol	C2
Tpr2A (Se) + Peptid C90_5 (Se) (1 : 1.3)	14 mg/ml in 50 mM TRIS pH 7.5, 2 mM DTT	1.8 + 1.8	22 % PEG MME 2000, 150 mM TRIS pH 8.5, 5 mM Nickelchlorid, 10 % Xylitol	C2

## 4.3 Kristallstrukturen der Tpr1-Domäne von Hop

### 4.3.1 Struktur von Tpr1L

Die Aufnahme der Beugungsdaten von Tpr1L erfolgte auf einer Drehanode ( $U = 50 \text{ kV}$ ,  $I = 80 \text{ mA}$ ,  $\text{CuK}\alpha$ :  $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) bis zu einer maximalen Auflösung von  $1.7 \text{ \AA}$  anhand eines einzigen Kristalls. Der Kristall (ca.  $0.2 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}^3$ ) wurde aus der Wachstumsbedingung heraus direkt bei  $100 \text{ K}$  im Stickstoffstrom schockgekühlt. In einer kontinuierlichen Serie von Oszillationsaufnahmen (Drehwinkel  $\Delta\omega = 1.0^\circ$ , Belichtungszeit  $t = 1200 \text{ s}$ ) wurden insgesamt  $190^\circ$  vermessen. Die Datenreduktion wurde mit dem Programmpaket XDS (Kabsch, 1993) durchgeführt (vgl. Tabelle 4.5). Der Kristall zeigte monokline Symmetrie, und die Raumgruppe konnte anhand von axialen Auslöschungen innerhalb der  $0k0$ -Serie eindeutig als  $P2_1$  identifiziert werden.



**Abbildung 4.5** Kristalle der Tpr1L-Domäne. Deutlich zu erkennen ist das Kristallwachstum entlang der Seedingspur.

Die Strukturlösung erfolgte durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AMORE (Navazza, 1994). Als Grundlage für das Suchmodell diente die Kristallstruktur der Tpr-Domäne der Serin/Threonin-Phosphatase 5 (Das *et al.*, 1998; PDB-Code 1a17), die auf eine Polyalaninkette (Aminosäuren 22 - 149) mit einheitlichem Temperaturfaktor zurückgesetzt wurde. Die Suche wurde mit einem Pattersonradius von  $15 \text{ \AA}$  und einer Schrittweite von  $1.0^\circ$  im Auflösungsbereich von  $10 - 3.0 \text{ \AA}$  durchgeführt. Trotz der relativ geringen Sequenzidentität von 30 % zwischen PP5 und Tpr1L setzte sich nach Rotations- und Translationssuche die Lösung deutlich ab (vgl. Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4** Ergebnisse der Pattersonsuche. Parameter und Statistiken wie in AMORE (Navazza, 1994) definiert.

Lsg.- Nr.	Rotationswinkel [°]			Translationsvektor			Korrelation [%]	R-Wert [%]
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$t_x$	$t_y$	$t_z$		
1	127.2	112.0	232.8	0.364	0.0	0.250	33.5	51.9
2	293.8	155.4	30.3	0.023	0.0	0.396	21.2	56.4
3	119.8	41.5	185.6	0.046	0.0	0.479	19.6	57.3
4	308.2	82.7	345.1	0.432	0.0	0.250	22.1	55.4
...								

Nach Durchführung der Rotation und Translation (Lösung Nr.1) auf das Suchmodell wurde durch Anwendung der Kristallsymmetrie die Kristallpackung generiert und überprüft. Die Moleküle waren ohne Überlappungen dicht gepackt, und die Möglichkeit von Interaktionen zwischen den einzelnen Molekülen war gegeben.

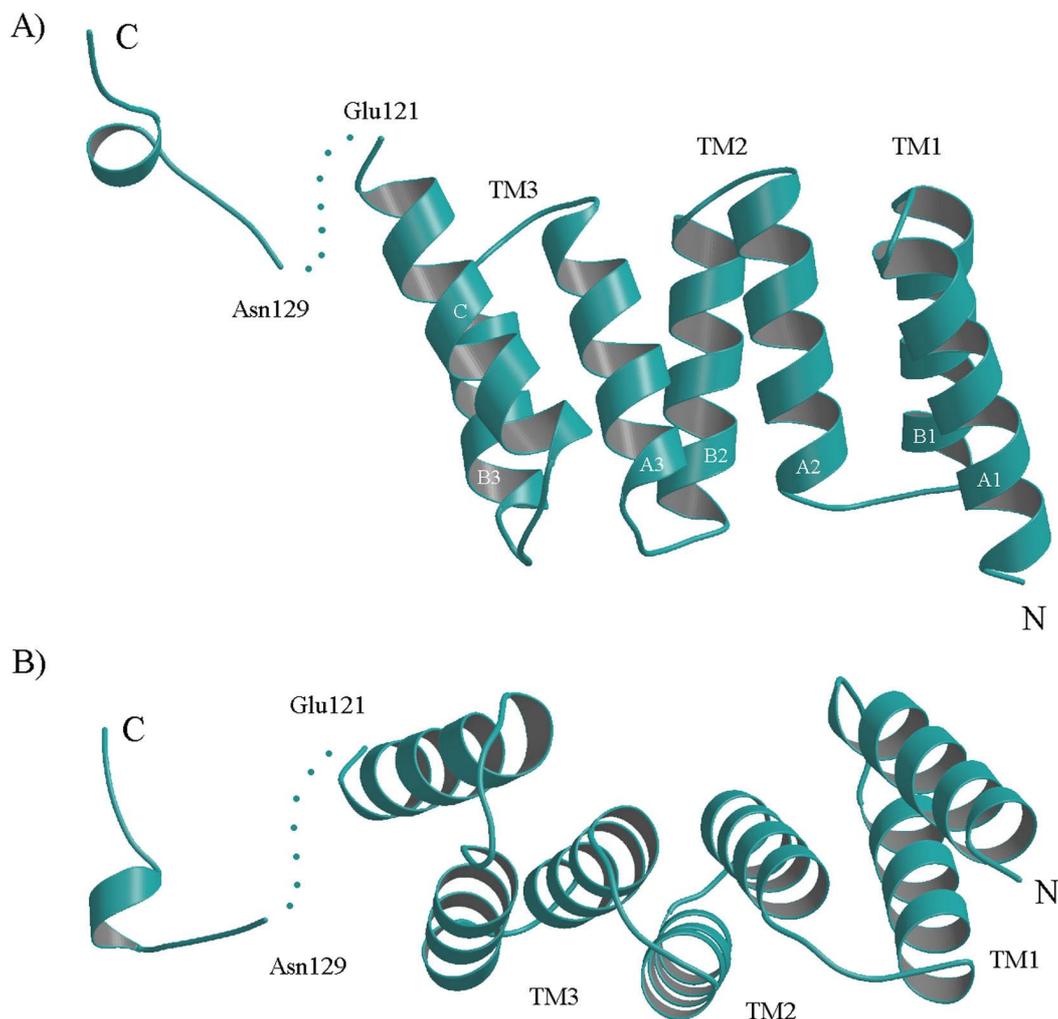
**Tabelle 4.5** Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung der Tpr1L-Domäne. Statistiken der höchsten Auflösungsschale stehen in Klammern.

Datensammlung <sup>a</sup>		Strukturverfeinerung <sup>b</sup>	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	Auflösungsbereich (Å)	15.0 - 1.7
Zellparameter	a = 28.22 Å	R-Wert (%) <sup>c</sup>	17.5
	b = 65.72 Å	freier R-Wert (%) <sup>c, d</sup>	22.0
	c = 31.94 Å	# Proteinatome	1070
	$\beta = 111.52^\circ$	# Wassermoleküle	145
Moleküle pro asym. Einheit	1	mittlerer Temperaturfaktor (Å <sup>2</sup> )	18.9
Auflösungsbereich (Å)	15.0 - 1.7 (1.8 - 1.7)		
Vollständigkeit (%)	91.7 (87.6)		
# gemessene Reflexe	38736 (5590)	RMS - Abweichungen:	
# einzigartige Reflexe	11007 (1646)	Bindungslängen (Å)	0.014
$\langle I \rangle / \langle \sigma_I \rangle$	16.7 (7.0)	Bindungswinkel (°)	1.6
R <sub>sym</sub> (%)	4.3 (17.7)		

<sup>a</sup>Statistiken aus XDS (Kabsch, 1988; Kabsch, 1993), <sup>b</sup>Statistiken aus CNS (Brünger *et al.*, 1998), <sup>c</sup>ohne Sigma cutoff,

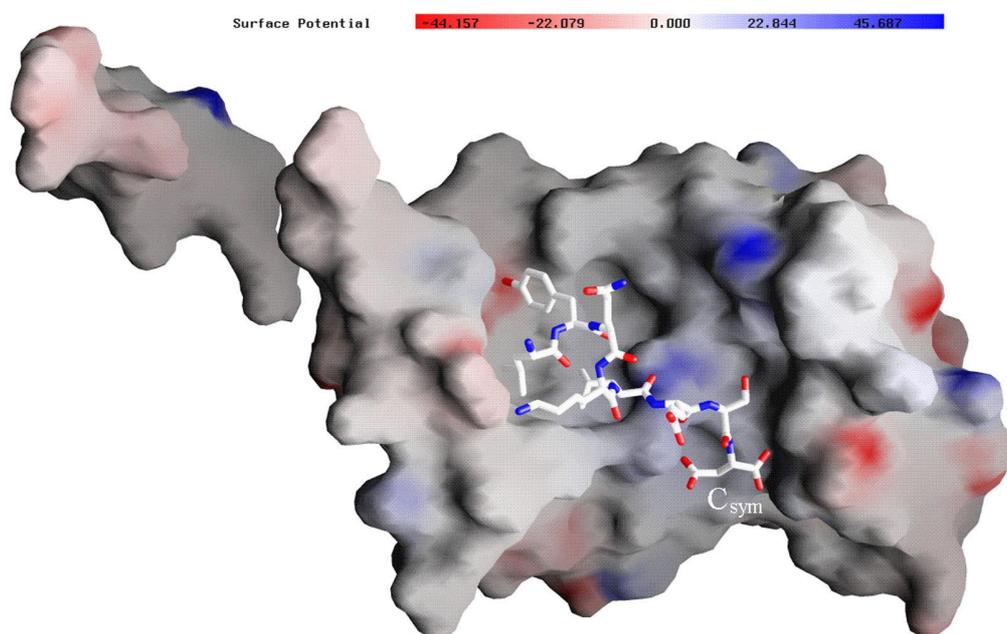
<sup>d</sup>Testdatensatz enthält 7 % aller Reflexe

Die Verfeinerung des Strukturmodells erfolgte nach Standardprotokollen (*engl.* rigid-body, simulated annealing) mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998). Für die Berechnung des freien R-Wertes wurden 7 % der Daten von der Verfeinerung ausgeschlossen. Ausgangspunkt der Verfeinerung war das nach Lösung 1 positionierte Suchmodell. Nach jedem Verfeinerungsschritt wurde eine  $2F_o - F_c$  Elektronendichte berechnet und das Modell manuell mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) angepasst. Im Endstadium der Verfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert und Wassermoleküle anhand einer  $F_o - F_c$  Dichtekarte in das Modell eingebaut (vgl. Tabelle 4.5).



**Abbildung 4.6** Bändermodell von Tpr1L. Der ungeordnete Strukturbereich ist mit Punkten angedeutet. A) N- und C-Terminus der Domäne sind gekennzeichnet. Helices A und B der drei aufeinanderfolgenden Tpr-Motive (TM1-TM3) und die flankierende Helix C sind markiert. B) Um 90° gedrehte Darstellung.

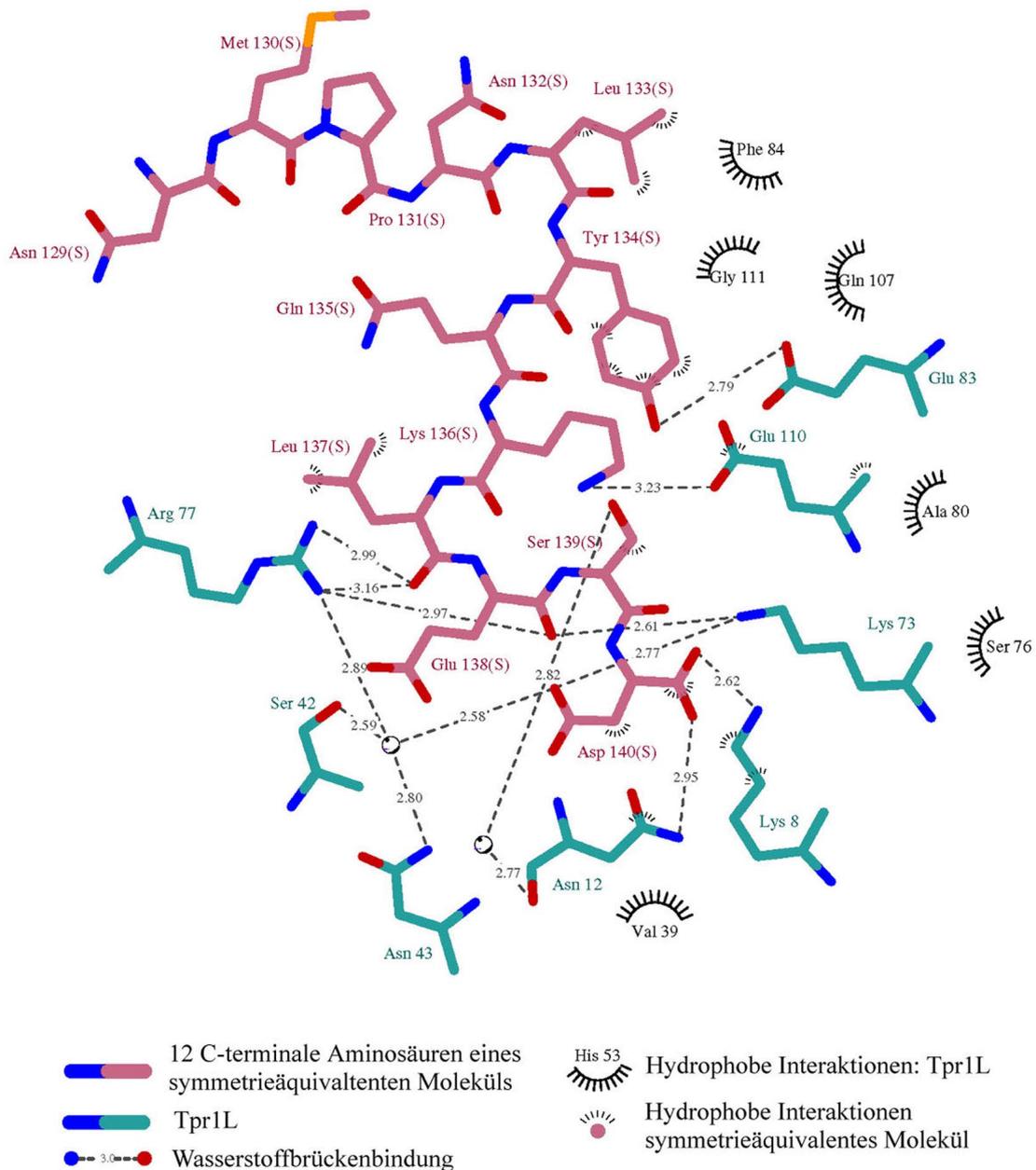
Die Proteinkette konnte bis auf den Bereich von Arg122-Phe128 vollständig in die Elektrodichte eingebaut werden. Für die fehlenden sieben Aminosäuren war trotz der hohen Auflösung und der guten Datenqualität keine interpretierbare Dichte vorhanden. Die Geometrie des verfeinerten Modells ist von guter Qualität. Die Standardabweichungen von den Idealwerten (Engh & Huber, 1991) betragen  $0.014 \text{ \AA}$  für Bindungslängen und  $1.6^\circ$  für Bindungswinkel. Die Abschätzung des mittleren Koordinatenfehlers durch einen Luzzati-Plot (Luzzati, 1952) ergab  $0.17 \text{ \AA}$ . Die Analyse der  $\phi$ - $\psi$ -Torsionswinkel anhand eines Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigte alle Aminosäuren in bevorzugten und erlaubten Bereichen.



**Abbildung 4.7** Das elektrostatische Potential auf der molekularen Oberfläche von Tpr1L. Die acht C-terminalen Aminosäuren eines symmetrieäquivalenten Moleküls sind strukturiert dargestellt. Der C-Terminus ist mit  $C_{\text{sym}}$  gekennzeichnet.

Jedes der Tpr-Motive besteht aus einem Paar antiparallel verlaufender Helices (Helix A und B) gleicher Länge (vgl. Abbildung 4.6). Die Winkel zwischen den Helixachsen A und B liegen bei ca.  $24^\circ$ . Die Struktur der einzelnen Tpr-Motive ist nahezu identisch. Die Hauptketten der Motive superpositionieren mit Standardabweichungen von  $0.52 \text{ \AA}$  für TM1 und TM2 bzw.  $0.74 \text{ \AA}$  für TM1 und TM3. Die Helixpackung innerhalb eines Tpr-Motivs zeigt die gleiche Geometrie wie die Packung von Helix B auf Helix A eines folgenden Tpr-Motivs. Dies gilt auch für die Packung der flankierenden Helix C auf Helix B des dritten Tpr-Motivs. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Helix C integraler Bestandteil der funktionsfähigen Domäne ist. Die geometrisch konstante Abfolge der sieben Helices resultiert in einer leicht gebogenen

Anordnung ähnlich einer gekrümmten Hand. Die Oberfläche der konkaven Seite wird dabei durch die A-Helices, die Oberfläche der konvexen Seite durch die B-Helices der Tpr-Motive dominiert (vgl. Abbildung 4.6B). Ein interessanter Aspekt der Kristallstruktur ist, wie auch in der Kristallpackung von PP5 beobachtet, die Ausbildung eines Kristallkontakts zwischen der Kavität der Tpr-Domäne und dem extremen C-Terminus eines symmetrieäquivalenten Moleküls (vgl. Abbildung 4.7). Abbildung 4.8 zeigt die beteiligten Aminosäuren nach ihren elektrostatischen und hydrophoben Interaktionen aufgeschlüsselt.



**Abbildung 4.8** Schematische Darstellung des Kristallkontakts zwischen der Tpr1L-Domäne und den C-terminalen Aminosäuren eines symmetrieäquivalenten Moleküls.

Überprüft man die seitens der Tpr-Domäne für den Kristallkontakt nötigen Aminosäuren in einem Sequenzvergleich der einzelnen Tpr-Domänen von Hop und PP5, so findet man Lys8, Asn12, Asn43, Lys73 und Arg77 in allen Domänen konserviert. Da diese Positionen nicht Teil des Tpr-Konsensus sind, scheinen sie von essentieller Bedeutung für die physiologischen Funktionen der Domänen zu sein (vgl. Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6** Sequenzvergleich der Tpr-Domänen von Hop und PP5. Blau markiert sind Aminosäuren, die beim Kristallkontakt innerhalb der Tpr1L-Struktur beteiligt und in den aufgeführten Tpr-Domänen vollständig konserviert sind. Nicht konservierte Reste der Interaktion sind grün markiert. Die wichtigsten Positionen des Tpr-Konsensus sind fett gedruckt.

Hop_Tpr1	4	VNEL <b>L</b> KE <b>KGN</b> KALS <del>V</del> GNIDDA <b>L</b> Q <b>CY</b> SE <b>A</b> IKLDPHN	37
Hop_Tpr2A	225	ALKE <b>L</b> EL <b>GN</b> DAYKKKDFDT <b>AL</b> KH <b>YDK</b> AKELDPTN	258
Hop_Tpr2B	360	AL <b>EE</b> <b>K</b> N <b>KGN</b> ECFQKGDYPQ <b>AM</b> KH <b>YTE</b> <b>A</b> IKRNP <b>KD</b>	393
PP5_Tpr	28	AEEL <b>L</b> TQ <b>AN</b> DYFKAKDYEN <b>A</b> IKF <b>YSQ</b> <b>A</b> IELNPSN	61
Hop_Tpr1	38	<b>H</b> V <b>L</b> Y <b>S</b> <b>NR</b> SAAYAKKGDYQK <b>A</b> YED <b>G</b> CK <b>T</b> VDLKPDW-----	71
Hop_Tpr2A	259	MTYIT <b>N</b> Q <b>A</b> AVYFEKGDY <b>NK</b> REL <b>CE</b> KA <b>I</b> EVGRENREDYRQ <b>I</b>	299
Hop_Tpr2B	394	AKLY <b>S</b> <b>NR</b> AACYTKLLEFQ <b>LAL</b> KD <b>CE</b> EC <b>I</b> QLEPTF-----	427
PP5_Tpr	62	AIYY <b>G</b> <b>NR</b> SLAYLRTECYGY <b>AL</b> GD <b>A</b> TR <b>A</b> IELDKKY-----	95
Hop_Tpr1	72	<b>G</b> <b>K</b> GY <b>S</b> <b>R</b> KA <b>AA</b> LE <b>F</b> LNRFEE <b>A</b> KRT <b>Y</b> EE <b>G</b> LKHEANN	105
Hop_Tpr2A	300	<b>A</b> KAYAR <b>I</b> GN <b>S</b> YFK <b>EE</b> KYKDA <b>I</b> H <b>F</b> Y <b>N</b> KS <b>L</b> AEHRTP	333
Hop_Tpr2B	428	<b>I</b> <b>K</b> GY <b>T</b> <b>R</b> KA <b>AA</b> LEAMKD <b>Y</b> TKAMDV <b>Y</b> Q <b>KAL</b> DL <b>D</b> SSC	461
PP5_Tpr	96	<b>I</b> <b>K</b> GY <b>Y</b> <b>R</b> AA <b>S</b> N <b>M</b> ALGKFRA <b>AL</b> RD <b>Y</b> ET <b>V</b> V <b>K</b> V <b>K</b> PHD	129

Anhand von Deletionsmutanten war gezeigt worden, dass die N-terminale Tpr-Domäne von Hop (Tpr1) für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von Hsp70 verantwortlich ist und die C-terminale Tpr-Domäne (Tpr2) die Interaktion mit Hsp90 vermittelt (Demand *et al.*, 1998; Lasse *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996). Auf Hsp90-Seite konnte der bindungsrelevante Bereich, wie im Fall von Hsp70, auf die C-terminale Domäne eingeschränkt werden (Carrello *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1998). Dabei ist das Vorhandensein der vier C-terminalen Aminosäuren von Hsp90 (EEVD), die auch innerhalb der Hsp70-Familie konserviert sind, für die Interaktion mit Hop zwingend notwendig (Chen *et al.*, 1998). Neben Hop binden auch die Tpr-Proteine CyP40, FKBP51, FKBP52 und PP5 an die C-terminale Domäne von Hsp90 (Buchner, 1999; Dolinski *et al.*, 1998; Marsh *et al.*, 1998; Pratt & Toft, 1997).

Die Sequenzähnlichkeit zwischen EEVD und dem C-Terminus von Tpr1L (137-140: LESD) legte die Vermutung nahe, dass der beobachtete Kristallkontakt innerhalb der Tpr1L-Struktur Teile einer physiologisch relevanten Interaktion zwischen der Tpr-Domäne und einem Substrat (vorzugsweise EEVD) imitiert.

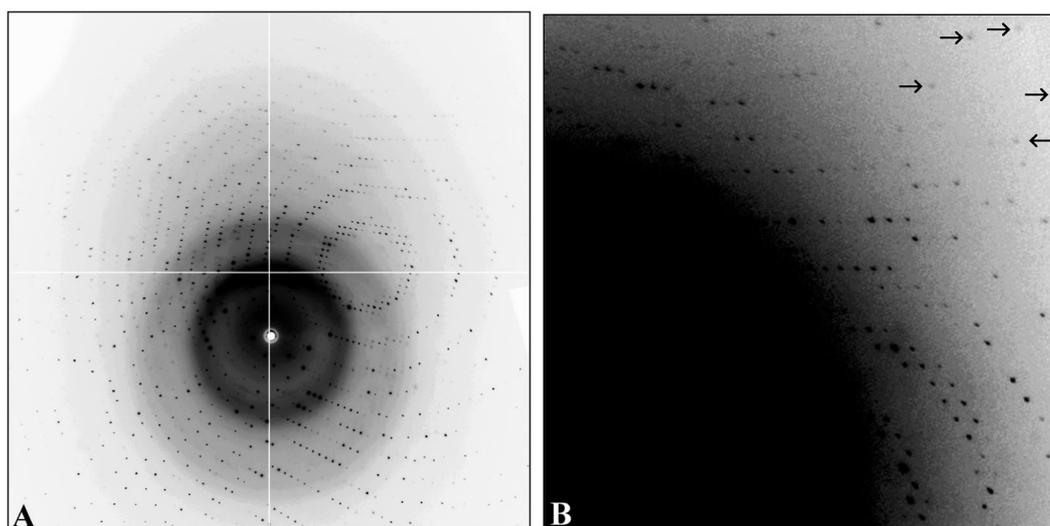
Bei detaillierter Betrachtung des Kristallkontakts konnte diese Arbeitshypothese weiter untermauert werden:

- die innerhalb der Domäne als konserviert identifizierten Reste Lys8, Asn12, Lys73 und Arg77 wechselwirken ausschließlich mit den letzten vier Aminosäuren LESD
- die konservierten Reste finden sich sowohl in Hsp70 assoziierenden, wie auch in Hsp90 assoziierenden Tpr-Domänen
- bis auf Asp140 wird keine Sequenzinformation ausgelesen, eine Interaktion mit dem in Hsp70 und Hsp90 konservierten Sequenzmotiv EEVD wäre durchaus denkbar

Die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse von Tpr1L waren Ausgangspunkt für weitere Experimente. Aufgrund des Kristallkontakts und des ungeordneten Bereichs innerhalb von Tpr1L wurde das verkürzte Konstrukt Tpr1S angefertigt. Die Existenz der konservierten Carboxylat-Klammer innerhalb der ersten drei Tpr-Motive von Tpr2S führten zur Anfertigung von Tpr2A. Für die Bestätigung der EEVD-Bindung durch die Tpr-Domänen von Hop wurden C-terminale Hsc70- bzw. Hsp90-Peptide mit den entsprechenden Tpr-Domänen kokristallisiert und die Kristallstrukturen der Domänen-Peptid-Komplexe bestimmt (s. u.).

### 4.3.2 Struktur von Tpr1S

Ein ultra-hochaufgelöster Datensatz der Tpr1S-Domäne wurde auf der Strahlführung X12B (NSLS, Brookhaven) anhand eines einzigen Kristalls aufgenommen. Der Kristall ( $0.2 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}^3$ ) wurde in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und während der Datensammlung bei  $T = 100 \text{ K}$  gehalten. Die Aufnahme der Beugungsdaten erfolgte mit einem CCD-Detektor (ADSC Quantum-4) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 0.949 \text{ \AA}$  (vgl. Abbildung 4.9). Um ein Auflösungslimit von ca.  $0.9 \text{ \AA}$  zu erreichen wurde für die Datensammlung der Detektor um  $2\theta = 15.0^\circ$  gegenüber der Primärstrahlachse ausgelenkt. Die Aufnahme der Beugungsdaten erfolgte in zwei Durchläufen bei gleicher Messgeometrie. Um den Linearitätsbereich des Detektors nicht zu überschreiten, wurden zuerst die stark streuenden und niedrig aufgelösten Reflexe bei geringer Belichtungszeit und geschwächtem Primärstrahl vermessen. Anschließend wurden in einem zweiten Durchlauf die hochaufgelösten Daten bei voller Primärstrahlleistung und längeren Belichtungszeiten aufgenommen.



**Abbildung 4.9** Diffractionsbild ( $\Delta\omega = 1.0^\circ$ ,  $2\theta = 15.0^\circ$ ) des Tpr1S-Kristalls. In beiden Bildteilen entspricht die rechte obere Detektorecke einer Auflösung von  $0.84 \text{ \AA}$ . A) Die Abbildung zeigt die volle Detektorfläche. B) Vergrößerung des rechten oberen Quadranten mit anderer Farbskalierung. Einige hochaufgelöste Reflexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Datenreduktion wurde mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt. Der Kristall zeigte monokline Symmetrie, und die Raumgruppe konnte anhand von axialen Auslöschungen entlang der  $0k0$ -Serie eindeutig als  $P2_1$  identifiziert werden (vgl. Tabelle 4.7).

Die Strukturlösung erfolgte durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AMORE (Navazza, 1994). Die Struktur von Tpr1L (aa1 - aa140 von Hop) wurde entsprechend dem Fragment Tpr1S (aa1 - aa118) verkürzt und diente als Suchmodell. Die ermittelte Lösung zeigte eine Korrelation von 78.5 % und einem R-Wert von 28.5 % im Auflösungsbereich von 10.0 - 3.0 Å (Statistiken wie in AMORE definiert).

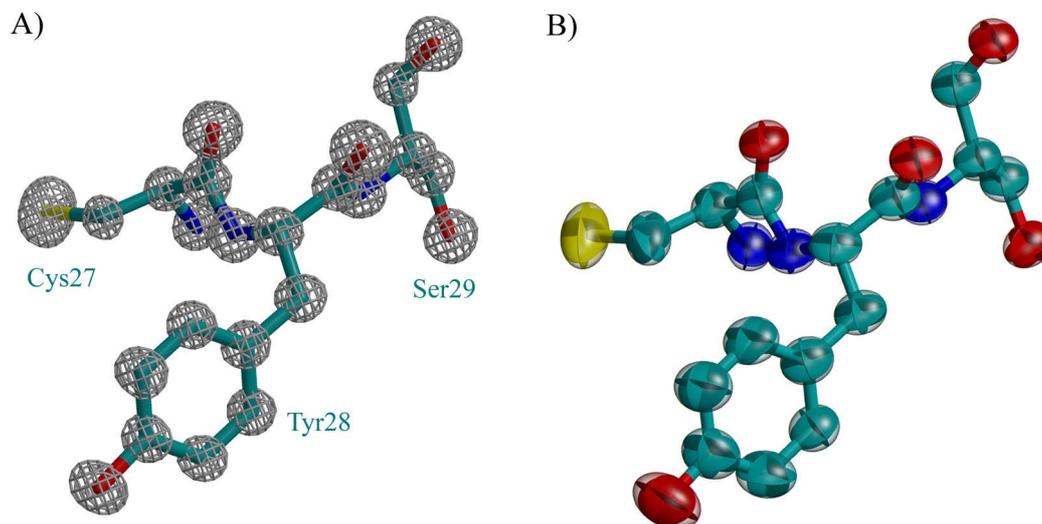
**Tabelle 4.7** Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung von Tpr1S. Statistiken der höchsten Auflösungsschale stehen in Klammern.

Datensammlung <sup>a</sup>		Strukturverfeinerung <sup>b</sup>	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	Auflösungsbereich (Å)	8.0 - 0.88
Wellenlänge (Å)	0.949	R-Wert (%) <sup>c</sup>	10.5
Zellparameter	a = 31.06 Å b = 43.62 Å c = 38.10 Å β = 101.74°	freier R-Wert (%) <sup>c, d</sup>	12.5
Moleküle pro asym. Einheit	1	# Proteinatome	996
Auflösungsbereich (Å)	20.0 - 0.88 (0.91 - 0.88)	# Wassermoleküle	267
Vollständigkeit (%)	95.4 (69.3)	RMS - Abweichungen:	
# gemessene Reflexe	285296	Bindungslängen (Å)	0.016
# einzigartige Reflexe	75383	Bindungswinkel (°)	1.9
<I> / <σ <sub>I</sub> >	36.3 (4.9)	mittlere Anisotropie <sup>e</sup> :	
R <sub>sym</sub> (%)	3.8 (9.2)	Proteinatome	0.463 ± 0.133
		Wassermoleküle	0.386 ± 0.137

<sup>a</sup>Statistiken aus SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997); <sup>b</sup>Statistiken aus SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1999); <sup>c</sup>ohne Sigma cutoff; <sup>d</sup>Testdatensatz enthält 10 % aller Reflexe; <sup>e</sup><A> = <E<sub>min</sub>/E<sub>max</sub>>, E<sub>min,max</sub> sind kleinster bzw. größter Eigenwert der Anisotropiematrix (Merritt, 1999)

Die Verfeinerung des Strukturmodells wurde mit dem Programm SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1999) durchgeführt. Nach jeder Verfeinerung wurde das Modell am Grafikbildschirm mittels dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) überprüft und die nötigen Korrekturen durchgeführt. Alle Verfeinerungszyklen erfolgten nach der CGLS-Methode (*engl.* conjugate gradient least squares). Nach dem Einbau von Wassermolekülen und der Verfeinerung individueller isotroper Temperaturfaktoren konvergierte das Modell bei einem R-Wert von 18.5 % und einem freien R-Faktor von 20.1%. Die atomare Auflösung der Daten erlaubte dann die Verfeinerung von anisotropen atomaren Temperaturfaktoren (vgl. Abbildung 4.10). Dabei fiel der freie R-Wert auf 15.1 %. Im Endstadium der Modelloptimierung wurden für 13 Reste alternative Seitenketten (*engl.* disorder) eingebaut und berechnete Wasserstoffatome bei der Verfeinerung berücksichtigt. Das ausverfeinerte Modell, bestehend aus allen 118 Amino-

säuren (Tpr1S) und 267 voll besetzten Wassermolekülen, konvergierte bei einem R-Wert von 10.5 % (freier R-Wert 12.5 %).



**Abbildung 4.10** Aminosäuren Cys27, Tyr28 und Ser29 der verfeinerten Struktur von Tpr1S. A) Elektronendichte bei  $3\sigma$  konturiert. B) Schwingungsellipsoide mit 68 % Aufenthaltswahrscheinlichkeit.

### 4.3.3 Strukturen von Tpr1S mit Hsc70-Peptid

Der Komplex, bestehend aus Tpr1S und den 12 C-terminalen Aminosäuren von Hsc70 (C70\_12), kristallisierte in zwei verschiedenen Raumgruppen.

Von beiden Kristallformen wurden anhand eines einzigen Kristalls hochaufgelöste Datensätze auf der Strahlführung X12B (NLS) in Brookhaven aufgenommen. Die Kristalle wurden aus der Wachstumsbedingung heraus in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und während der Datensammlung durch ein Kühlsystem (Cryostream Oxford) auf  $T = 100$  K temperiert. Die monokline Kristallform zeigte ein ähnlich gutes Streuvermögen wie die peptidfreie Form. Aus Zeitgründen wurde die Auflösung dieser Datensammlung auf  $1.4 \text{ \AA}$  beschränkt. Die Daten der tetragonalen Form wurden jedoch bis zum Auflösungslimit von  $1.6 \text{ \AA}$  gesammelt. Mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) erfolgte die Indizierung und die Datenreduktion (vgl. Tabelle 4.8).

Die Indizierung der monoklinen Kristallform lieferte fast identische Gitterkonstanten im Vergleich mit der peptidfreien Kristallform von Tpr1S (vgl. Tabelle 4.7). Da durch die Peptidbindung keine globale Reorganisation der Tpr-Domäne zu erwarten ist, kann von nahezu voll-

ständiger Isomorphie zwischen der peptidfreien und peptidgebundenen Form ausgegangen werden.

**Tabelle 4.8** Statistiken der Datensammlungen des Peptidkomplex zwischen Tpr1S und C70\_12 für die monokline und tetragonale Kristallform. Statistiken der höchsten Auflösungsschalen stehen in Klammern.

<b>Datensammlung<sup>a</sup></b>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>
Wellenlänge (Å)	0.949	0.949
Zellparameter	a = 30.98 Å b = 43.43 Å c = 38.05 Å β = 102.32°	a = 75.47 Å c = 42.89 Å
Moleküle pro asym. Einheit	1	2
Auflösungsbereich (Å)	15.0 - 1.40 (1.45 - 1.40)	20.0 - 1.60 (1.66 - 1.60)
Vollständigkeit (%)	96.6 (91.2)	95.8 (75.2)
# gemessene Reflexe	66355	146181
# einzigartige Reflexe	18881	30804
<I> / <σI>	34.1 (6.7)	32.5 (3.3)
R <sub>sym</sub> (%)	2.8 (10.2)	4.1 (30.5)

<sup>a</sup>Statistiken aus SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997)

Für die tetragonale Kristallform konnten anhand von systematischen Auslöschungen entlang der 00l-Serie als mögliche Raumgruppen P4<sub>1</sub> oder P4<sub>3</sub> identifiziert werden. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) lieferte für zwei Komplexmoleküle pro asymmetrischer Einheit einen plausiblen Wert von  $V_{\text{Matthews}} = 2.1 \text{ Å}^3/\text{Da}$  mit einem entsprechenden Lösungsmittelanteil von ca. 40 %.

Da die monokline Kristallform des Komplexes isomorph mit der peptidfreien Kristallform ist, konnte auf eine Strukturlösung verzichtet werden und direkt mit der Strukturverfeinerung begonnen werden. Die Strukturlösung der tetragonalen Form erfolgte durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AMORE (Navazza, 1994). Als Suchmodell diente die verfeinerte Kristallstruktur der peptidfreien Domäne Tpr1S. Die Suche erfolgte in einem Auflösungsbereich von 10.0 - 3.0 Å und mit einem Pattersonradius von 20.0 Å. Nach Rotations- und Translationssuche konnte in der Raumgruppe P4<sub>1</sub> mit zwei positionierten Molekülen pro asymmetrischer Einheit eine deutliche Lösung gefunden werden: Korrelation 63.3 % und R-Wert 40.5

%). Die Lösung in der Raumgruppe  $P4_3$  zeigte eine wesentlich schlechtere Korrelation von 40.4 % (R-Wert 50.3 %).

Die Verfeinerungen der beiden Strukturen erfolgten nach Standardprotokollen mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998). Zur Berechnung der freien R-Werte wurden in beiden Fällen 10 % der Daten von der Verfeinerung ausgeschlossen. Die nichtkristallographische Symmetrie im Fall der tetragonalen Kristallform wurde bei der Verfeinerung aufgrund der hohen Auflösung der Daten nicht berücksichtigt. Die manuelle Optimierung der Modelle erfolgte am Grafikbildschirm mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) durch Anpassung und Ergänzung der Modelle anhand von  $2F_o - F_c$  bzw.  $F_o - F_c$  Dichtekarten. Im Endstadium der Verfeinerungen wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert und Wassermoleküle in das Modell aufgenommen (vgl. Tabelle 4.9).

In der monoklinen Kristallform waren die fünf C-terminalen Aminosäuren IEEVD des Peptids sichtbar. Für die fehlenden Aminosäuren des Peptids war trotz der hohen Auflösung keine interpretierbare Elektronendichte vorhanden. Das ausverfeinerte Strukturmodell, bestehend aus der kompletten Tpr-Domäne mit allen Seitenketten, den fünf Aminosäuren des Peptids und 173 Wassermolekülen, konvergierte bei einem R-Wert von 17.3 % (freier R-Wert 19.5 %). Die Abschätzung des mittleren Koordinatenfehlers durch einen Luzzati-Plot (Luzzati, 1952) ergab 0.16 Å. Die Analyse der  $\phi$ - $\psi$ -Torsionswinkel mit einem Ramachandran-Plot (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigte alle Aminosäuren in bevorzugten und erlaubten Bereichen.

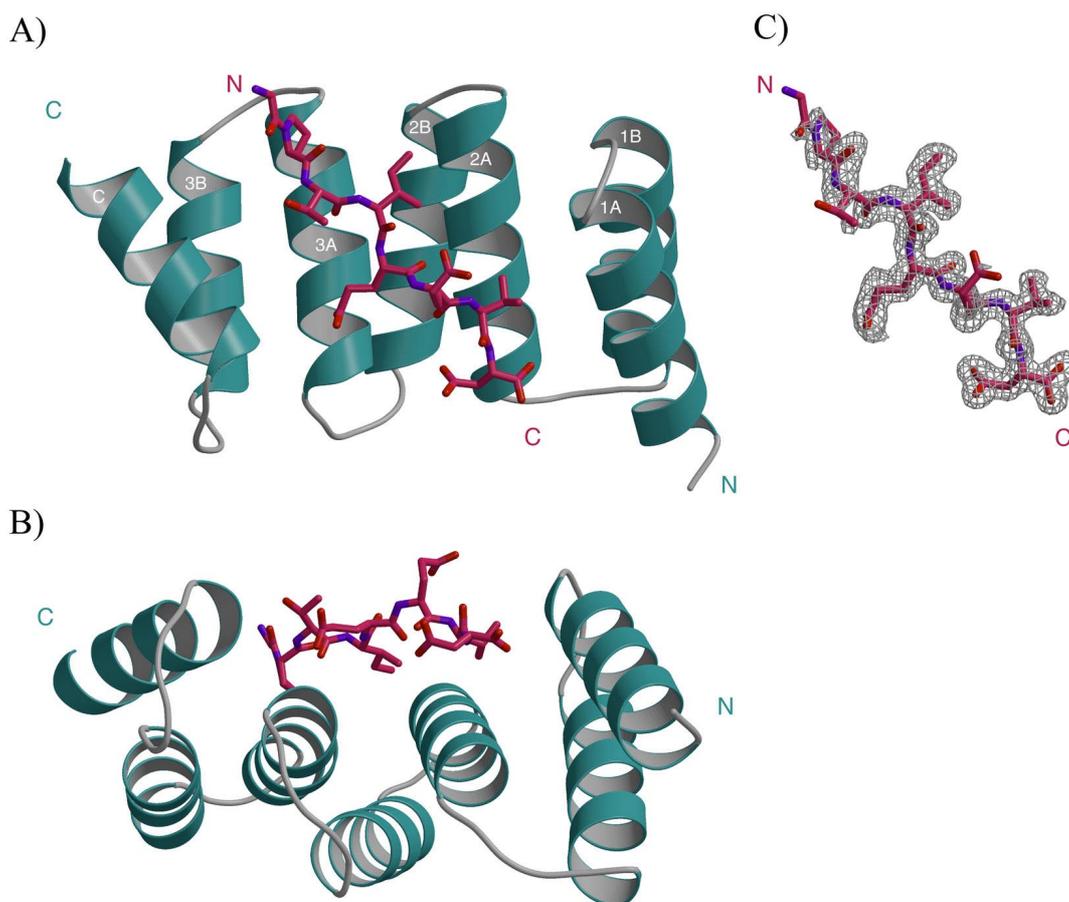
**Tabelle 4.9** Statistiken der Strukturverfeinerungen von Tpr1S im Komplex mit dem Hsc70-Peptid C70\_12.

Strukturverfeinerung <sup>a</sup>		
Raumgruppe	$P2_1$	$P4_1$
Auflösungsbereich (Å)	15.0 - 1.40	20.0 - 1.60
R-Wert (%) <sup>b</sup>	17.3	18.0
freier R-Wert (%) <sup>b,c</sup>	19.5	21.4
# Protein- / Peptidatome	948 / 42	1840 / 120
# Wassermoleküle	173	245
# Heteroatome	-	36
RMS - Abweichungen:		
Bindungslängen (Å)	0.009	0.008
Bindungswinkel (°)	1.3	1.3

<sup>a</sup>Statistiken aus CNS (Brünger *et al.*, 1998); <sup>b</sup>ohne Sigma cutoff; <sup>c</sup>Testdatensatz enthält 10 % aller Reflexe

Für die zwei kristallographisch unabhängigen Tpr-Domänen der tetragonalen Kristallform (Kette A/B) konnten die Reste A2 - A118 und B1 - B115 in die Dichte eingebaut werden. Die Positionen A2, B1, B2 und B110 wurden als Alanine modelliert, da keine signifikanten Dichten für die Seitenreste vorhanden waren. Die Inspektion der Differenzelektronendichte erlaubte für beide Tpr-Domänen (Kette A/B) den Einbau der letzten acht Aminosäuren GPTIEEVD des Peptides C70\_12 (Kette C/D). Für die fehlenden Aminosäuren (GASS) war keine interpretierbare Dichte vorhanden. Anhand der Differenzelektronendichte konnten zusätzlich noch vier Nickelatome und vier TRIS-Moleküle (jeweils zwei pro Monomer) identifiziert werden. Die Nickelatome und die TRIS-Moleküle wurden in das Modell eingebaut, da sich während der Kristallisation zeigte, dass beide Komponenten für den Aufbau der tetragonalen Kristallform zwingend notwendig sind. Zwei schwach besetzte Nickelatome sind an die Histidine A/B36 gebunden. Die Besetzung dieser Positionen wurde manuell auf 0.5 gesetzt, um die verfeinerten Temperaturfaktoren denen der Histidine anzupassen. Zwei weitere, voll besetzte Nickelatome sind an die Histidine A/B101 gebunden. Jedes dieser Nickelatome koordiniert zusätzlich zwei TRIS-Moleküle. Das ausverfeinerte Strukturmodell konvergierte bei einem R-Wert von 18.0 % (freier R-Wert 21.4 %). Die RMS-Abweichungen von den Idealwerten (Engh & Huber, 1991) betragen 0.008 Å für Bindungslängen und 1.3° für Bindungswinkel. Die Abschätzung des mittleren Koordinatenfehlers durch einen Luzzati-Plot (Luzzati, 1952) ergab 0.17 Å. Die Analyse der  $\phi$ - $\psi$ -Torsionswinkel anhand eines Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigte alle Aminosäuren in bevorzugten und erlaubten Bereichen. Die Koordinaten des ausverfeinerten Strukturmodells von Tpr1S/C70\_12 der tetragonalen Kristallform wurden bei der Protein-Datenbank hinterlegt (PDB-Code 1ELW). In beiden Kristallformen konnten nur Teile des Peptids C70\_12 in das Strukturmodell aufgenommen werden. Die Komplexstrukturen der beiden Kristallformen superpositionieren mit einer Standardabweichung von 0.58 Å. Warum in der monoklinen Kristallform nur die letzten fünf Peptidreste geordnet waren und in der tetragonalen Form die letzten acht Reste eine interpretierbare Elektronendichte zeigten, kann nicht eindeutig erklärt werden. Mögliche Ursachen könnten die unterschiedlichen Salzkonzentrationen der Kristallisationsbedingungen oder die verschiedenen Packungsinteraktionen aufgrund der unterschiedlichen Kristallsymmetrie sein. Die Diskussion der Struktur von Tpr1S im Komplex mit dem Peptid C70\_12 wird daher ausschließlich anhand der tetragonalen Kristallform durchgeführt.

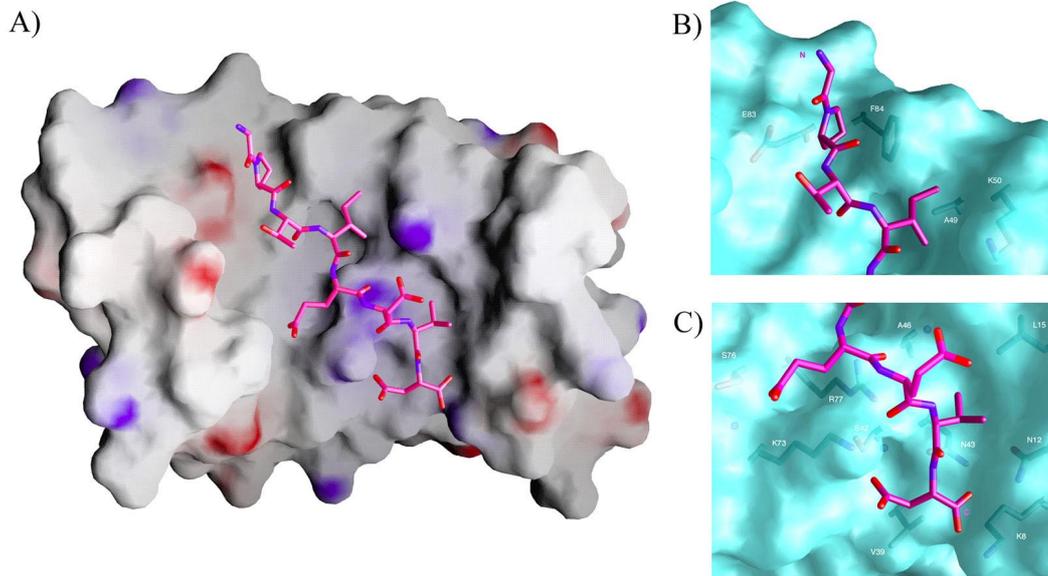
Die zwei kristallographisch unabhängigen Komplexe der asymmetrischen Einheit innerhalb der tetragonalen Kristallform superpositionieren mit einer Standardabweichung von 0.35 Å ( $C_{\alpha}$ -Atome des Tpr-Konsensus, Reste 4 - 104). Deshalb wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch auf eine getrennte Behandlung der zwei Komplexe verzichtet. Alle Abbildungen, Analysen und Diskussionen beziehen sich somit auf einen Tpr-Peptid-Komplex (Kette A und C) der tetragonalen Kristallstruktur.



**Abbildung 4.11** Bändermodell des Komplexes aus Tpr1S und C70\_12 (Kette A/C der tetragonalen Kristallform). Die N- und C-Termini der Domäne und des Peptids sind mit N bzw. C markiert. Helices A und B der drei Tpr-Motive sowie die flankierende Helix C sind gekennzeichnet. A) Frontansicht der Domäne. Das gebundene Peptid ist als Strichmodell dargestellt. B) Um 90° gedrehte Darstellung. C) 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> Elektronendichte bei einer Konturierung von 1.0  $\sigma$ . Für die Berechnung der Dichte wurde das Peptid vom Strukturmodell entfernt.

Die Beschreibung der Domänenstruktur erfolgte bereits anhand der Struktur von Tpr1L. Wie aufgrund des Kristallkontaktes in der Tpr1L-Struktur vermutet, wird das Peptid auf der konkaven Seite der Domäne gebunden (vgl. Abbildung 4.7, 4.11A/C und 4.12A). Die lineare Konformation des Peptids erlaubt die Ausbildung einer maximalen Kontaktfläche zur Tpr-Domäne. Dabei wird durch das Peptid die Kavität der Domäne vollständig ausgefüllt (vgl. Abbildung 4.11B). Diese Anordnung erlaubt der Tpr-Domäne eine spezifische Erkennung kurzer Peptidsegmente mit einer ausreichend hohen Affinität. Die Bindung von C70\_12 an Tpr1S erfolgt durch elektrostatische und hydrophobe Interaktionen. Alle elektrostatischen Wechselwirkungen liegen im Bereich des EEVD-Motivs. Die Peptidreste N-terminal zu EEVD bilden ausschließlich hydrophobe Interaktionen mit der Domäne aus (vgl. Abbildung

4.13). Für die folgende Beschreibung der Peptid-Domänen-Interaktion werden die Peptidreste beginnend vom C-Terminus als Asp0, Val-1, Glu-2, Glu-3, Ile-4, Thr-5, Pro-6 und Gly-7 benannt (vgl. Abbildung 4.12 und 4.13).



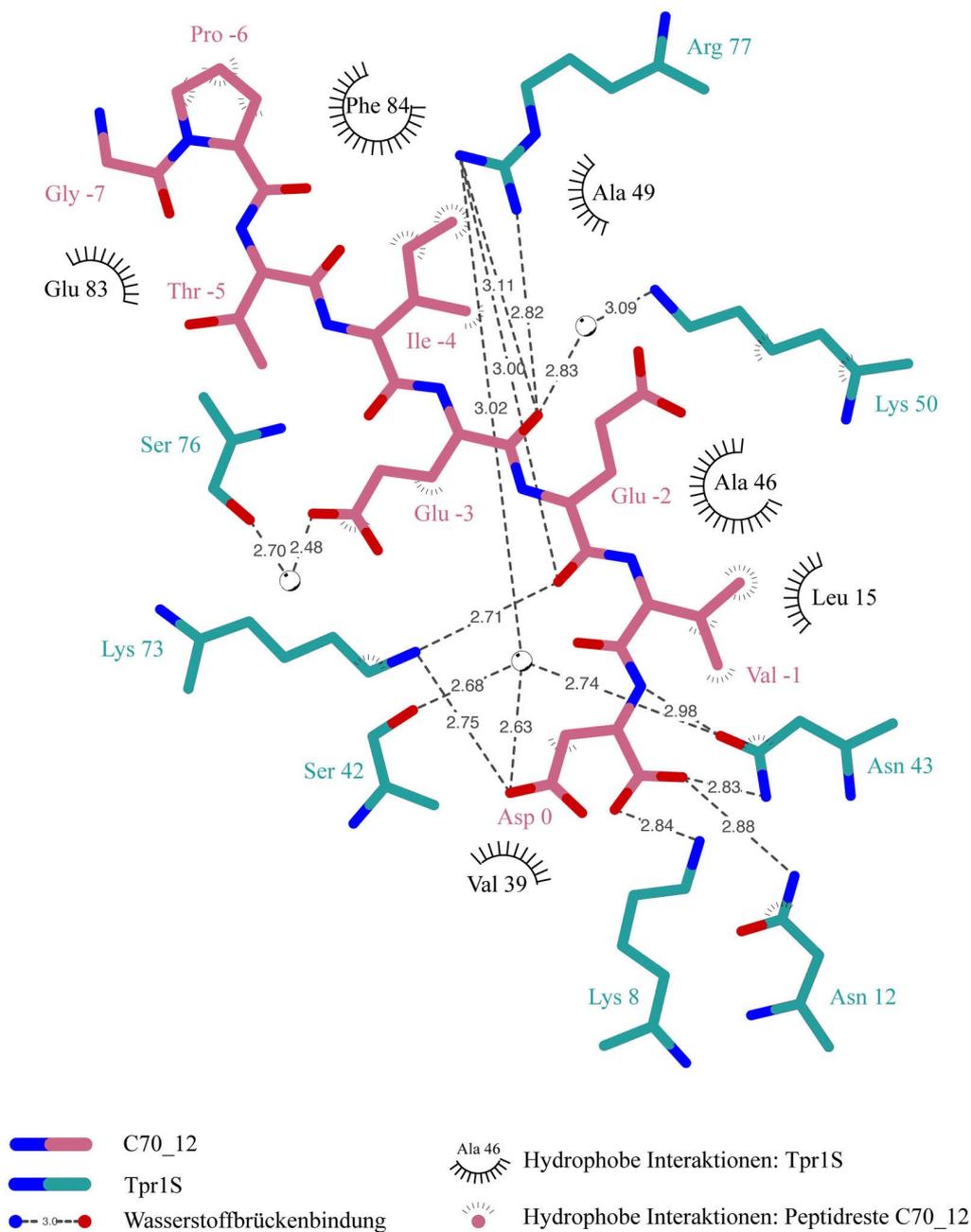
**Abbildung 4.12** A) Das elektrostatische Potential auf der molekularen Oberfläche von Tpr1S. Die acht sichtbaren Aminosäuren des Peptids C70\_12 sind strukturiert dargestellt. B/C) Details der elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und der Tpr-Domäne. Geordnete Wassermoleküle sind schematisch als kleine blaue Kugeln dargestellt.

### **Eine stark konservierte Carboxylat-Klammer innerhalb der Tpr-Domäne verankert das EEVD-Motiv**

Die bei der Peptiderkennung durch Wasserstoffbrücken ausgebildeten elektrostatischen Interaktionen können in drei Klassen unterteilt werden: sequenzunabhängige Interaktionen mit der Hauptkette des Peptids, sequenzspezifische Interaktionen mit Peptidseitenketten und Interaktionen mit dem C-terminalen Carboxylat der Peptidhauptkette (vgl. Abbildung 4.13).

Das C-terminale Aspartat des gebundenen Peptids (Asp0) ist entscheidend für die Bindung des Peptids an die Tpr-Domäne. Es liefert einen zweifachen Carboxylat-Anker, der durch die stark konservierten Reste Lys8, Asn12, Asn43 und Lys73, der so genannten Carboxylat-Klammer der Tpr-Domäne, ausgelesen wird (vgl. Abbildung 4.12C). Die Seitenkette von Asp0 ist die einzige Seitenkette innerhalb des Peptids, die eine direkte Wasserstoffbrückenbindung über Lys73 mit der Domäne ausbildet. Ein zusätzlicher Kontakt wird über ein stark geordnetes Wassermolekül vermittelt, das tetraedrisch durch die Seitenketten von Asp0,

Ser42, Asn43 und Arg77 koordiniert ist. Die Carboxylatgruppe der Peptidhauptkette von Asp0 wird durch drei starke Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten von Lys8, Asn12 und Asn43 der Tpr-Domäne platziert. Die Wichtigkeit der zweifachen Carboxylat-Klammer der Tpr-Domäne für die Peptidbindung zeigen auch die individuell verfeinerten Temperaturfaktoren der  $C_{\alpha}$ -Atome des gebundenen Peptids, die von  $16 \text{ \AA}^2$  für Asp0 kontinuierlich auf  $38 \text{ \AA}^2$  für Gly-7 ansteigen.



**Abbildung 4.13** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen der Tpr1S-Domäne und dem Hsc70-Peptid C70\_12.

Die meisten der direkten Wasserstoffbrückenbindungen von der Tpr-Domäne zum Peptid zielen auf die Hauptkette des Peptids und sind somit unabhängig von der Peptidsequenz: die Carbonylgruppe der Seitenkette von Asn43 bindet das Amid von Asp0, das Amin der Seitenkette von Lys73 bindet die Carbonylgruppe von Glu-2. Von besonderer Bedeutung ist das stark konservierte Arg77. Die Guanidiniumgruppe von Arg77 bildet drei direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylgruppen von Glu-2 und Glu-3 aus. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Peptidseitenketten der innerhalb der Hsp70/90-Familien stark konservierten Reste Glu-2 und Glu-3 des EEVD-Motivs keine direkten Kontakte mit der Tpr-Domäne ausbilden. Neben den bereits beschriebenen direkten elektrostatischen Interaktionen tragen die Reste Lys50 und Ser76 über geordnete Wassermoleküle zur Peptidbindung an die Tpr-Domäne bei. Zusätzlich zu den elektrostatischen Interaktionen im Bereich des EEVD-Motivs bildet Val-1 starke hydrophobe Wechselwirkungen mit Leu15 und Ala46 der Tpr-Domäne aus.

### **Hydrophobe Interaktionen N-terminal zum EEVD-Motiv vermitteln Spezifität**

Da die Sequenzen von Hsp/Hsc70 und Hsp90 jeweils mit EEVD enden, können die beschriebenen Interaktionen zwischen der Tpr-Domäne und dem EEVD-Motiv nicht zwischen den C-Termini von Hsp/Hsc70 und Hsp90 unterscheiden. Da die Bindung der Tpr1-Domäne von Hop an Hsp/Hsc70 spezifisch ist, stellt sich die Frage wodurch Spezifität erreicht wird. Anhand der Komplexstruktur wird offensichtlich, dass Spezifität durch zusätzliche Interaktionen von Peptidresten N-terminal zum EEVD-Motiv erzeugt wird. Diese Interaktionen sind ausschließlich hydrophober Natur und beinhalten die Seitenketten von Ile -4 und Pro-6 des gebundenen Hsc70-Peptids. Ile-4 bindet in eine hydrophobe Tasche, die durch die Reste Ala46, Ala49 und Lys50 der Helix 2A geformt wird. Pro-6 bindet in eine hydrophobe Tasche, die durch die Reste Glu83 und Phe84 von Helix 3A gebildet wird (vgl. Abbildung 4.12B und 4.13).

## 4.4 Kristallstrukturen der Tpr2-Domäne von Hop

### 4.4.1 Struktur von Tpr2A mit Hsp90-Peptid

Die Vermessung des nativen Komplexkristalls, bestehend aus der Tpr2A-Domäne und den fünf C-terminalen Aminosäuren MEEVD von Hsp90, erfolgte auf der Strahlführung ID14-3 in Grenoble (ESRF). Der Kristall ( $0.10 \times 0.05 \times 0.05 \text{ mm}^3$ ) wurde aus der Wachstumsbedingung heraus in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und über den Zeitraum der Datensammlung durch ein Kühlsystem (Cryostream Oxford) bei  $T = 100 \text{ K}$  gehalten. Die Aufnahme der Beugungsdaten bis zu einer Auflösung von  $1.9 \text{ \AA}$  erfolgte mit einem CCD-Detektor (MARCCD). Die Datenreduktion wurde mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt (vgl. Tabelle 4.10). Dabei konnte eindeutig die Raumgruppe C2 ermittelt werden.

**Tabelle 4.10** Statistiken der Datensammlung des nativen Komplexkristalls aus der Tpr2A-Domäne und dem Peptid C90\_5. Statistiken der höchsten Auflösungsschale stehen in Klammern.

Datensammlung <sup>a</sup>	
Strahlungsquelle	ESRF, ID14-3
Wellenlänge (Å)	0.9402
Raumgruppe	C2
Zellparameter	$a = 73.28 \text{ \AA}$ , $b = 48.27 \text{ \AA}$ , $c = 38.06 \text{ \AA}$ , $\beta = 91.30^\circ$
# Komplexmoleküle in asym. Einheit	1
Auflösungsbereich (Å)	15.0 - 1.9 (1.95 - 1.90)
Vollständigkeit (%)	97.1 (91.7)
$\langle I \rangle / \langle \sigma_I \rangle$	22.8 (9.0)
$R_{\text{sym}}$ (%)	3.8 (6.8)

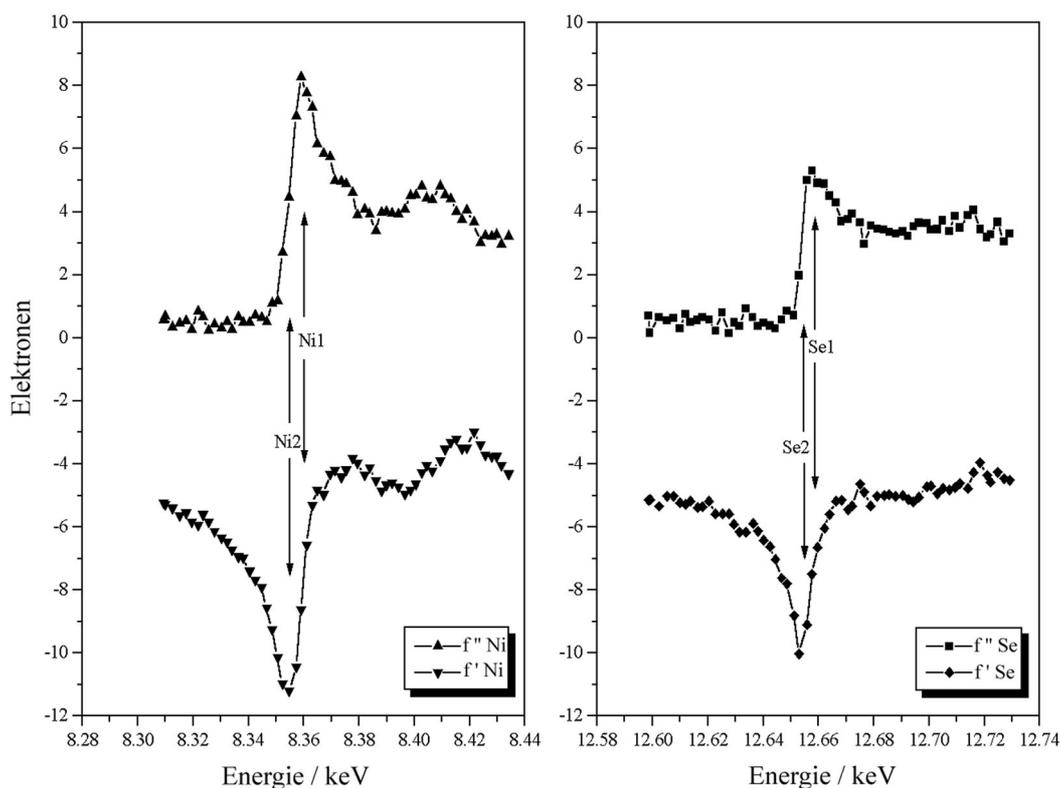
<sup>a</sup>Statistiken aus XDS (Kabsch, 1993)

Aufgrund der funktionellen und auch zu erwartenden strukturellen Ähnlichkeit von Tpr2A zur Tpr-Domäne der Serin/Threonin-Phosphatase PP5 und zur Tpr1S-Domäne von Hop wurde versucht, die Struktur durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AMORE (Navazza, 1994) zu lösen. Als Suchmodell dienten die Kristallstrukturen der Tpr-Domänen von PP5, Tpr1S und der Komplex von Tpr1S mit C70\_12. Trotz intensiver Suche bei systematischer Variation verschiedener Parameter, wie z. B. Länge des Suchmodells, Auflösung und Pattersonradius konnte keine Lösung gefunden werden. Dies deutet auf eine größere strukturelle Variation von Tpr2A im Vergleich mit Tpr1S und der Tpr-Domäne von PP5 hin.

Daher wurde der Komplex mit Selenomethionin markiert, um die Struktur nach der MAD-Methode zu lösen. Neben dem Ordnungsgrad der anomalen Streuer ist vor allem aber auch das Verhältnis zwischen der Anzahl der anomal streuenden Atome und der Molekülmasse der zu lösenden Kristallstruktur entscheidend für den Erfolg und die Qualität einer MAD-Phasierung. Da in der Sequenz von Tpr2A nur ein Methionin enthalten ist, wurde zur Sicherheit zusätzlich das Methionin des Peptids C90\_5 (MEEVD) durch Selenomethionin ersetzt. Da für die Komplexkristallisation die Zugabe von Nickelionen zwingend notwendig ist, wurde in einem Vorversuch überprüft, ob die Nickelionen fest in den Kristallverband aufgenommen werden. Dafür wurde ein Komplexkristall in nickelfreie Bodenlösung über mehrere Tage eingelegt, um überschüssige Nickelionen aus den Solvenskanälen des Proteinkristalls zu entfernen. Anschließend wurde von diesem Kristall auf der Strahlführung BW6 (DESY, Hamburg) ein Fluoreszenzspektrum im Energiebereich der Absorptionskante von Nickel aufgenommen. Anhand des Spektrums konnte eindeutig die Präsenz von Nickel im Kristall nachgewiesen werden. Für die MAD-Methode standen somit potenziell zwei Selenatome und mindestens ein Nickelatom als anomale Streuer zur Verfügung.

Die Aufnahme der MAD-Datensätze bis zu einer Auflösung von 2.1 Å erfolgte anhand eines einzigen Kristalls auf der Strahlführung BW6 (DESY, Hamburg) mit Hilfe eines CCD-Detektors (MARCCD). Der Komplexkristall wurde aus dem Wachstumspuffer heraus direkt in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und während den Datensammlungen durch ein Kühlsystem (Cryostream Oxford) bei  $T = 100$  K gehalten. Für die genaue Bestimmung der Wellenlängen der MAD-Datensätze wurden Fluoreszenzspektren im Energiebereich der Absorptionskanten von Nickel und Selen aufgenommen. Abbildung 4.14 zeigt die aus den Spektren aufgrund des anomalen Streuverhaltens berechneten energieabhängigen Korrekturterme  $f'$  und  $f''$  der Atomformfaktoren von Nickel und Selen.

Die Datensätze wurden jeweils vollständig und in folgender Reihenfolge aufgenommen: Ni1 (Maximum von  $f_{\text{Ni}}''$ ), Ni2 (Minimum von  $f_{\text{Ni}}'$ ), Se1 (Maximum von  $f_{\text{Se}}''$ ) und Se2 (Minimum von  $f_{\text{Se}}'$ ). Die Datenreduktionen wurden in der Raumgruppe C2 mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt (vgl. Tabelle 4.11).



**Abbildung 4.14** Anomales Streuverhalten von Nickel und Selen: berechnete Korrekturterme  $f''$  und  $f'$  zu den Atomformfaktoren aus Fluoreszenzspektren, die an dem Komplexkristall aus Tpr2A (Se) mit dem Peptid C90\_5 (Se) aufgenommen wurden.

Die Auswertung der MAD-Daten erfolgte als Pseudo-MIR-Daten (Ramakrishnan & Biou, 1997) mit verschiedenen Programmen der CCP4-Suite (CCP4, 1994). Zuerst wurden die einzelnen Datensätze mit dem Programm SCALEIT (CCP4, 1994) aufeinander skaliert. Der Datensatz mit minimalem  $f_{\text{Ni}}'$  (Ni2) diente dabei als Referenz bzw. nativer Datensatz. Die Position eines Nickelatoms konnte eindeutig anhand einer anomalen Differenzpattersonkarte des Datensatzes Ni1 (Maximum von  $f_{\text{Ni}}''$ ) bestimmt werden. Die gefundene Nickelposition wurde dann für die Berechnung eines ersten Phasensatzes mittels dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) verwendet. Die Phasenberechnung erfolgte auf Basis der Datensätze Ni1 und Ni2. Mit Hilfe dieser Phasen konnten dann die zwei Selenpositionen anhand einer anomalen Differenzfourierdichte des Datensatzes Se1 (Maximum von  $f_{\text{Se}}''$ ) bestimmt werden. Für den endgültigen Phasierungszyklus wurden dann die beiden Selenpositionen und die eine Nickelposition verwendet. Die Phasenverfeinerung erfolgte gegen alle vier Datensätze in einem Auflösungsbereich von 17.0 – 2.1 Å. Dabei diente Ni2 als nativer Datensatz, und die Datensätze Ni1, Se1 und Se2 wurden als Derivate behandelt (vgl. Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11** Statistiken der MAD-Datensammlung und MAD-Phasierung der Tpr2A-Domäne im Komplex mit den fünf C-terminalen Aminosäuren MEEVD von Hsp90. Statistiken der höchsten Auflösungsschale stehen in Klammern.

<b>Datensammlung<sup>a</sup></b>				
Strahlungsquelle	DESY, BW6			
Raumgruppe	C2			
Zellkonstanten	a = 73.45 Å, b = 48.28 Å, c = 38.03 Å, $\beta = 91.18^\circ$			
# Komplexmoleküle / asym. Einheit	1			
Auflösungsbereich (Å)	17-2.1 (2.14-2.10)			
	Ni1 <sup>b</sup>	Ni2 <sup>b</sup>	Se1 <sup>b</sup>	Se2 <sup>b</sup>
Wellenlänge (Å)	$\lambda = 1.4828$	$\lambda = 1.4840$	$\lambda = 0.9793$	$\lambda = 0.9798$
I / $\sigma_I$	22.3 (10.2)	22.8 (10.1)	23.8 (11.1)	25.6 (10.6)
Vollständigkeit (%)	93.0 (94.9)	98.8 (98.6)	96.8 (96.8)	88.0 (90.1)
R <sub>sym</sub> (%) <sup>b</sup>	2.8 (8.3)	3.3 (10.5)	3.3 (8.8)	3.1 (9.0)
<b>MAD - Phasierung<sup>c</sup></b>				
Anomale Streuer	1 Ni, 2 Se			
Auflösung (Å)	17.0 - 2.1			
Figure of merit	0.74			
R <sub>cullis_ano</sub>	0.64	0.87	0.65	0.85
Phasing power centric	0.48	-	1.51	1.30
Phasing power acentric	0.65	-	2.46	2.27

<sup>a</sup>Statistiken aus SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997); <sup>b</sup>Bijvoet-Paare getrennt behandelt; <sup>c</sup>Ungewichtete Statistiken aus MLPHARE (CCP4, 1994)

Für die Phasenverbesserung durch Solvensglättung und Histogrammanpassung wurde das Programm DM (CCP4, 1994) eingesetzt. Der FOM-Gütefaktor (*engl. figure of merit*) stieg dabei von 0.74 auf 0.88. Die resultierende Elektronendichte war von herausragender Qualität und zeigte sogar geordnete Wassermoleküle. Ungefähr 90 % des Strukturmodells konnten automatisch mit dem Programm wARP (Perrakis *et al.*, 1997) gebaut werden.

Die Überprüfung und Anpassung der Strukturmodells an die Elektronendichte erfolgte mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991). Die Strukturverfeinerung wurde mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998) nach Standardprotokollen gegen den nativen Datensatz im Auflösungsbereich von 10.0 - 1.9 Å ausgeführt. 10 % der Daten wurden von der Verfeinerung zur Berechnung des freien R-Wertes ausgeschlossen. Im Endstadium der Verfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert und Wassermoleküle in das Strukturmodell aufgenommen. Die Struktur konnte für die Tpr2A-Domäne von Lys223 bis Gln349 in die Elektronendichte eingebaut werden. Aufgrund schwacher Elektronendichten der Seitenketten im

Bereich der Aminosäuren A291 - A294 und A348 wurden diese als Alaninreste modelliert. Die Elektronendichte für die fünf Peptidreste MEEVD war gut konturiert und erlaubte die Aufnahme aller fünf Reste in das Strukturmodell. Das für die Phasierung benutzte Nickelion vermittelt einen Kristallkontakt von His321 und Lys325 zu His247 eines symmetrieäquivalenten Moleküls. Das endgültige Modell, bestehend aus 1086 Proteinatomen (44 für das Peptid), einem Nickelion und 152 geordneten Wassermolekülen, konvergierte bei einem R-Wert von 18.1 % (freier R-Wert 21.9 %). Die Standardabweichungen von geometrischen Idealwerten (Engh & Huber, 1991) betragen 0.008 Å für Bindungslängen und 1.2° für Bindungswinkel. Die Abschätzung des mittleren Koordinatenfehlers anhand eines Luzzati-Plots (Luzzati, 1952) ergab 0.19 Å. Die Analyse der  $\phi$ - $\psi$ -Torsionswinkel anhand eines Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigte alle Aminosäuren in bevorzugten und erlaubten Bereichen. Die Koordinaten des ausverfeinerten Strukturmodells wurden bei der Protein-Datenbank hinterlegt (PDB-Code 1ELR).

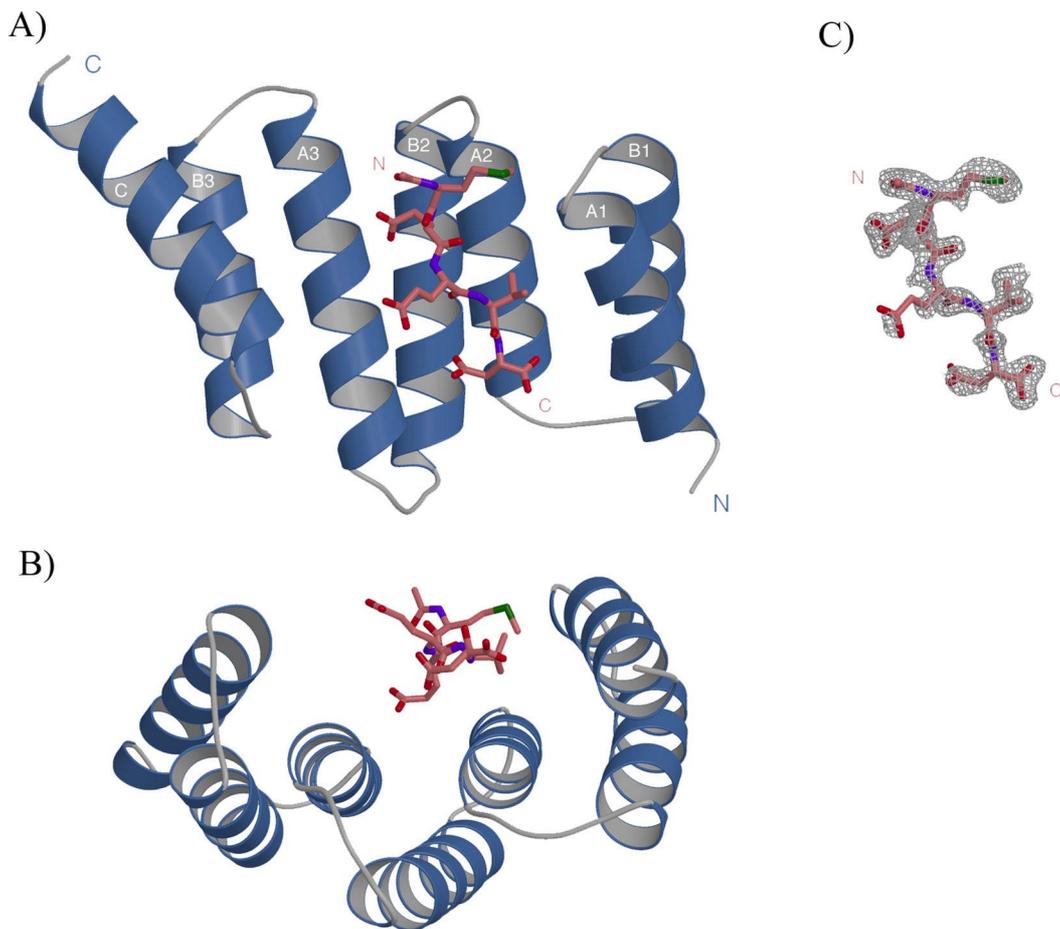
**Tabelle 4.12** Statistiken der Strukturverfeinerung von Tpr2A im Komplex mit den fünf C-terminalen Aminosäuren MEEVD von Hsp90.

<b>Strukturverfeinerung<sup>a</sup></b>	
Raumgruppe	C2
Auflösungsbereich (Å)	10.0 - 1.90
R-Wert (%) <sup>b</sup>	18.1
freier R-Wert (%) <sup>b, c</sup>	21.9
# Protein- / Peptidatome	1042 / 44
# Wassermoleküle	152
# Nickelatome	1
RMS – Abweichungen:	
Bindungslängen (Å)	0.008
Bindungswinkel (°)	1.2

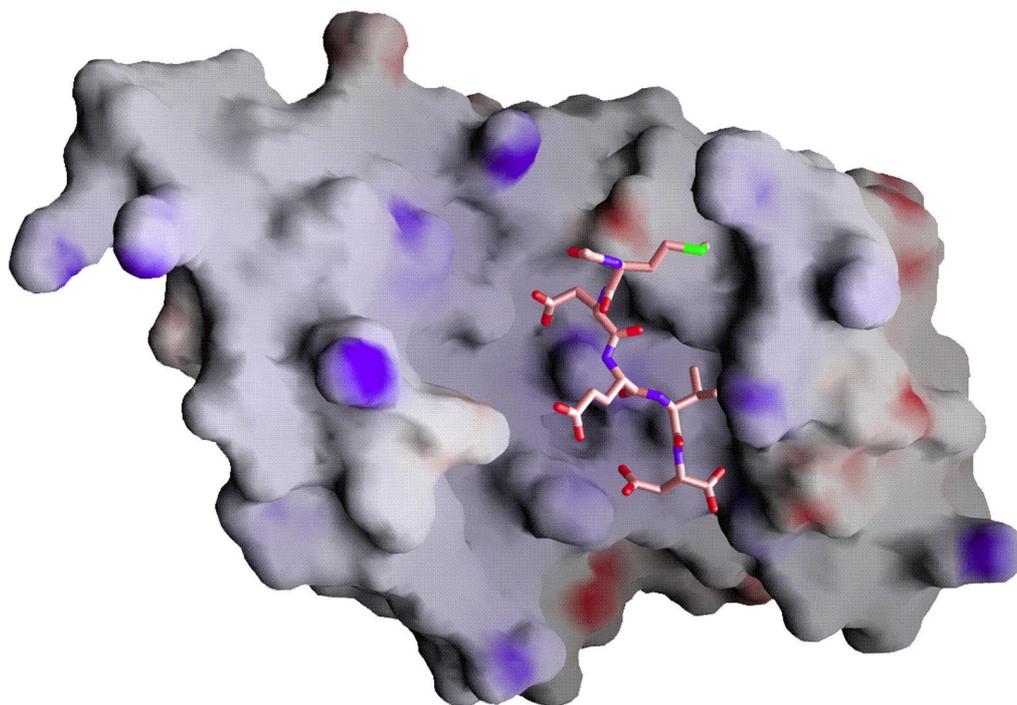
<sup>a</sup>Statistiken aus CNS (Brünger *et al.*, 1998); <sup>b</sup>ohne Sigma cutoff; <sup>c</sup>Testdatensatz enthält 10 % aller Reflexe

Die Struktur von Tpr2A zeigt das gleiche Faltungsmotiv wie die Tpr1-Domäne von Hop (vgl. Abbildung 4.11 und 4.15). Auch innerhalb der Tpr2A-Struktur bildet Helix C einen regulären Abschluss der sechs antiparallel verlaufenden Helices der drei Tpr-Motive. Analog zur Komplexstruktur von Tpr1S mit C70\_12 bindet die Tpr2A-Domäne das Hsp90-Peptid C90\_5 auf der konkaven Seite der Domäne (vgl. Abbildung 4.12 und 4.16). Im Vergleich zur Tpr1-Domäne von Hop und der Tpr-Domäne von PP5 besitzt Tpr2A eine Insertion von sieben Aminosäuren zwischen dem zweiten und dritten Tpr-Motiv (vgl. Tabelle 4.6). Die Insertion resultiert in Verlängerungen der Helices B2 und A3 um jeweils eine Windung, die jedoch keinen di-

rekten Einfluss auf die Peptidbindung haben. Trotz der konservierten Faltung hat die Superposition der Komplexstrukturen von Tpr2A und Tpr1S eine relativ hohe Standardabweichung von 1.8 Å. Die strukturellen Abweichungen zwischen den Tpr-Domänen Tpr1S und Tpr2A werden hauptsächlich durch eine stärkere Krümmung der Kavität innerhalb von Tpr2A verursacht (vgl. Abbildung 4.11B und 4.15B). Dies erklärt auch, warum die Struktur von Tpr2A nicht durch Molekularen Ersatz gelöst werden konnte.



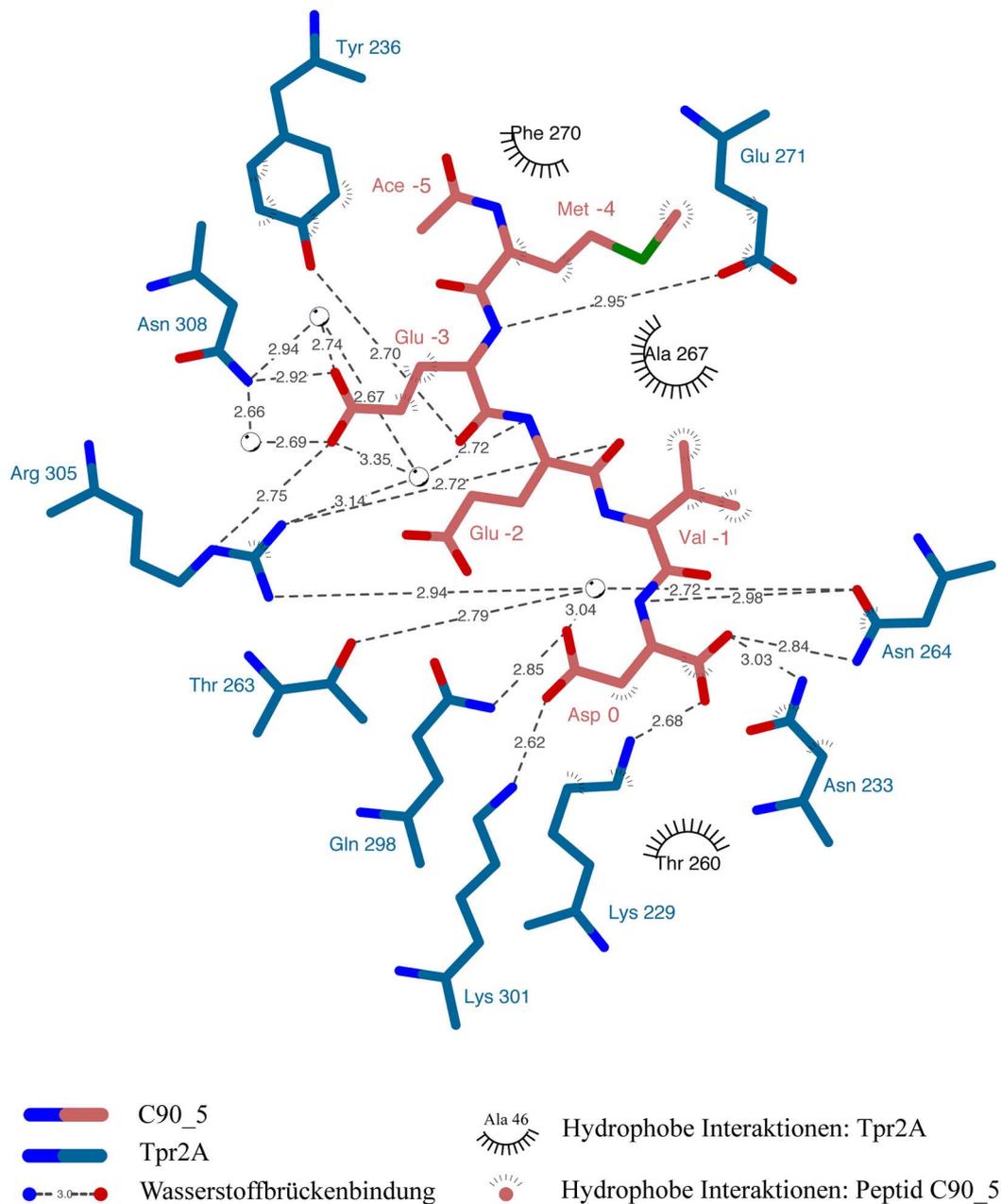
**Abbildung 4.15** Bändermodell des Komplexes aus Tpr2A und C90\_5. Die N- und C-Termini der Domäne und des Peptids sind mit N bzw. C gekennzeichnet. A) Frontansicht von Tpr2A. Die A/B-Helices der drei Tpr-Motive und Helix C sind beschriftet. Das Peptid ist strukturiert dargestellt. B) Um 90° gedrehte Abbildung. C) 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> Elektronendichte bei einer Konturierung von 1.0 σ. Für die Berechnung der Dichte wurde das Peptid vom Strukturmodell ausgeschlossen.



**Abbildung 4.16** Das elektrostatische Potential auf der Oberfläche von Tpr2A: rot-negativ, blau-positiv und grau-neutral. Die fünf Aminosäuren von C90\_5 sind als Strichmodell gezeichnet.

Für die folgende Analyse der Peptid-Domänen-Interaktion werden die Peptidreste vom C-Terminus beginnend als Asp0, Val-1, Glu-2, Glu-3 und Met-4 benannt (vgl. Abbildung 4.17). Das Muster der Peptidbindung zeigt große Ähnlichkeit zur Peptiderkennung der Tpr1-Domäne. Die Bindung des konservierten EEVD-Motivs wird durch elektrostatische Wechselwirkungen dominiert, der N-terminale Peptidbereich hingegen interagiert ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen.

Die Bindung des konservierten Carboxylat-Ankers (Asp0) erfolgt, wie bei der Tpr1-Domäne, durch eine zweifache Carboxylat-Klammer. Die Klammer wird durch die konservierten Reste Lys229, Asn233, Asn264 und Lys301 aufgebaut und durch Gln298 ergänzt, dessen Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Asp0 ausbildet. Ein durch die Seitenketten von Asp0, Thr263, Asn264 und Arg305 tetraedrisch koordiniertes Wassermolekül trägt auch hier zur Peptidbindung bei. Ein äquivalentes Wassermolekül wurde auch im Tpr1S-C70\_12-Komplex identifiziert. Daher kann angenommen werden, dass diese konservierte Wasserposition ein fester Bestandteil der Carboxylat-Klammer ist. Val-1 geht hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Asn233, Tyr236 und Ala267 ein.



**Abbildung 4.17** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen der Tpr2A-Domäne und dem Hsp90-Peptid C90\_5

Die in den Hsp70/90-Familien stark konservierten Reste Glu-2 und Glu-3 wechselwirken mit Tyr236, Glu271, Arg305 und Asn308. Der Carbonylrest der Hauptkette von Glu-2 geht eine direkte Wasserstoffbrückenbindung mit der Guanidiniumgruppe von Arg305 ein. Die Seitenkette von Glu-2 geht, wie auch schon im Tpr1S-C70\_12-Komplex beobachtet, keine Kontakte mit der Tpr-Domäne ein. Die Hauptkette des Peptidrestes Glu-3 bildet direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe von Tyr236 und der Carboxylgruppe der Seitenkette von Glu271 aus. Neben schwachen hydrophoben Wechselwirkungen bindet die Seiten-

kette von Glu-3 an die Guanidiniumgruppe von Arg305 und den Amidrest von Asn308. Zu den beschriebenen direkten Interaktionen trägt ein Netzwerk geordneter Wassermoleküle zur Bindung zwischen der Domäne und den Peptidresten Glu-2 und Glu-3 bei.

Der für die Spezifität relevante Peptidbereich beschränkt sich innerhalb der Komplexstruktur von Tpr2A mit C90\_5 auf das Methionin an der Position -4. Met-4 ist entscheidend für die Spezifität (vgl. 5 Analyse und Diskussion) und bindet in eine hydrophobe Tasche, die hauptsächlich durch die Aminosäuren Tyr236 und Glu271 geformt wird.

#### 4.4.2 Struktur von Tpr2S

Da die Kristalle von Tpr2S sehr anfällig gegenüber osmotischem und mechanischen Stress waren, gestaltete sich die Aufnahme der Beugungsdaten äußerst schwierig. Die schlechte Kristallqualität führte zu irregulären Beugungsbildern, was sich hauptsächlich in niedrigen Auflösungen bei extrem hohen Kristallmosaizitäten widerspiegelte. Um dennoch auswertbare Beugungsdaten zu erhalten, musste eine große Anzahl von Kristallen getestet werden. Nach ca. 50 Proben konnte ein Kristall gefunden werden, der indizierbare Reflexprofile lieferte.

Die Aufnahme der Beugungsdaten erfolgte an der Strahlführung X31 (DESY) mit Hilfe einer Image-Plate MAR300 bis zu einer Auflösung von 2.4 Å. Der Kristall (ca. 0.15 x 0.15 x 0.25 mm<sup>3</sup>) wurde aus der Wachstumsbedingung im kalten Gasstrahl eines Kühlsystems (Cryostream Oxford) bei T = 100 K schockgekühlt und während der Datensammlung bei 100 K temperiert. In einer kontinuierlichen Serie von Oszillationsaufnahmen (Drehwinkel  $\Delta\omega = 1.0^\circ$ , Dosis D = 12000 Einheiten) wurden insgesamt 90° vermessen. Die Datenreduktion wurde mit dem Programmpaket XDS (Kabsch, 1993) durchgeführt (vgl. Tabelle 4.13). Der Kristall zeigte orthorhombische Symmetrie, und die Raumgruppe konnte anhand von axialen Auslöschungen eindeutig als P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> festgelegt werden.

Da die Strukturen der Tpr-Domänen von PP5 und Tpr1 bzw. Tpr2A von Hop zu diesem Zeitpunkt noch nicht für eine Strukturlösung von Tpr2S durch Molekularen Ersatz zur Verfügung standen, wurde für die Strukturlösung die MAD-Methode ausgewählt. Die Kristalle von selenomethioninmarkiertem Tpr2S zeigten die gleichen unerwünschten Eigenschaften wie die nativen Kristalle. Für die Datensammlung mußten, wie im nativen Fall, sehr viele Kristalle überprüft werden. Die Aufnahme der MAD-Datensätze erfolgte auf der Strahlführung BW6 (DESY) mittels einem CCD-Detektor (MARCCD) bis zu einer maximalen Auflösung von 2.8 Å. Der Kristall wurde in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und während der Datensammlung durch ein Kühlsystem (Cryostream Oxford) auf T = 100 K temperiert. Die Bestimmung der Wellenlängen der einzelnen MAD-Datensätze erfolgte anhand eines Fluoreszenzspektrums um die Absorptionskante von Selen. Die Datensätze wurden jeweils

vollständig und in folgender Reihenfolge gesammelt: Se1 (Maximum von  $f''$ ), Se2 (Maximum von  $f'$ ) und Se3 (*engl.* remote). Aufgrund einer höheren Primärstrahlintensität wurde der Datensatz Se3 unterhalb der Absorptionskante gemessen, nicht wie normal üblich oberhalb der Kante. Für die Datenreduktion wurden die Programme DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) verwendet (vgl. Tabelle 4.13).

**Tabelle 4.13** Statistiken der Datensammlungen und MAD-Phasierung von Tpr2S. Statistiken der höchsten Auflösungsschale stehen in Klammern.

<b>Datensammlung</b>				
Strahlungsquelle	DESY, Hamburg			
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>			
# Moleküle / asym. Einheit	1			
	Nativ <sup>a</sup>	SeMet <sup>b, c</sup>		
Strahlführung	X31	BW6		
Zellkonstanten (Å)	a = 57.04 b = 59.06 c = 88.31	a = 58.54 b = 59.51 c = 87.90		
		Se1	Se2	Se3
Wellenlänge (Å)	$\lambda = 1.000$	$\lambda = 0.981$	$\lambda = 0.982$	$\lambda = 1.200$
Auflösungsbereich (Å)	20.0 – 2.4 (2.50 – 2.40)	15.0 – 2.8 (2.86 – 2.80)		15.0 – 3.0 (3.07 – 3.00)
I / $\sigma_I$	15.4 (9.5)	17.9 (6.8)	14.7 (4.1)	17.5 (5.6)
Vollständigkeit (%)	95.1 (96.5)	96.4 (95.9)	82.2 (81.8)	94.4 (89.8)
R <sub>sym</sub> (%) <sup>b</sup>	6.5 (11.4)	3.6 (10.6)	4.0 (15.1)	3.8 (11.7)
<b>MAD - Phasierung<sup>d</sup></b>				
Anomale Streuer	4 Se			
Auflösung (Å)	10.0 – 3.4			
Figure of merit	0.50			
R <sub>cullis_ano</sub>		0.65	0.76	0.98
Phasing power centric		0.35	-	0.43
Phasing power acentric		0.51	-	0.64

<sup>a</sup>Statistiken aus XDS (Kabsch, 1993); <sup>b</sup>Statistiken aus SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997); <sup>c</sup>Bijvoet-Paare getrennt behandelt; <sup>d</sup>Ungewichtete Statistiken aus MLPHARE (CCP4, 1994)

Die *ab initio*-Strukturlösung anhand der gesammelten MAD-Daten war nicht erfolgreich, da keine der sechs potenziellen Selenpositionen bestimmt werden konnte. Die Positionierung der Selenatome wurde anhand von anomalen und dispersiven Differenzpattersonkarten bei verschiedenen Auflösungen versucht. Auch die Einbeziehung der nativen Daten lieferte keine

auswertbare Lösung. Die Statistiken der einzelnen MAD-Datensätze zeigten zwar eine gute Qualität an, offensichtlich waren die anomalen und dispersiven Differenzen jedoch nicht ausreichend genau bestimmt. Für ein schwaches bzw. irreguläres MAD-Signal können folgende Ursachen in Betracht gezogen werden:

- schwaches bzw. abnehmendes Streuvermögen des Kristalls
- hohe Mosaizität des Kristalls (ca.  $1.7^\circ$ )
- zu hohe Strahlenexposition der Probe aufgrund zu langer Belichtungszeiten, die zur Kristallzerstörung und somit zu wachsender Nichtisomorphie führte
- geringer Ordnungsgrad der Methioninreste (Unordnung, alternative Seitenkettenkonformationen)
- äußere experimentelle Bedingungen, die über den Zeitraum der Datensammlung nicht stationär waren (z. B. Drift in der Primärstrahlenergie)

Nach Verfügbarkeit der Kristallstruktur von Tpr2A konnte die Struktur von Tpr2S durch eine Kombination der MR- und MAD-Methode doch gelöst werden. Zunächst konnte durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AMORE (Navazza, 1994) die Tpr2A-Domäne innerhalb von Tpr2S lokalisiert werden. Als Suchmodell diente die ausverfeinerte Kristallstruktur von Tpr2A (aa2 – aa124). Die Suche erfolgte mit einem Pattersonradius von  $18.0 \text{ \AA}$  und einer Schrittweite von  $1.0^\circ$  im Auflösungsbereich von  $15.0 - 3.0 \text{ \AA}$ . Nach Rotations- und Translationssuche setzte sich die Lösung deutlich ab (vgl. Tabelle 4.14). Der Versuch, eine weitere Tpr-Domäne zu platzieren, blieb erfolglos.

**Tabelle 4.14** Ergebnisse der Pattersonsuche. Parameter und Statistiken wie in AMORE (Navazza, 1994) definiert.

Lsg.- Nr.	Rotationswinkel [ $^\circ$ ]			Translationsvektor			Korrelation	R-Wert
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$t_x$	$t_y$	$t_z$	[%]	[%]
1	33.54	70.57	58.48	0.133	0.463	0.293	58.2	46.1
2	95.31	62.25	53.76	0.327	0.073	0.068	33.9	55.4
3	35.82	63.60	109.89	0.373	0.013	0.271	33.2	55.0
4	87.60	88.75	93.57	0.072	0.300	0.063	35.0	55.4
...								

Da in der Sequenz von Tpr2A ein Methionin enthalten ist, konnte mit Hilfe dessen Position die MAD-Phasierung initiiert werden. Anhand einer anomalen Differenzfourierdichte des Datensatzes Se1 (Maximum von  $f''$ ) konnten insgesamt vier der sechs möglichen Selenlagen identifiziert werden. Die Phasierung der MAD-Daten erfolgte als Pseudo-MIR-Daten mit dem

Programm MLPHARE (CCP4, 1994). Dabei diente Se2 (Minimum von  $f'$ ) als nativer Datensatz, und die Datensätze Se1 und Se3 wurden als Derivate behandelt. Aufgrund der schlechten Qualität der MAD-Daten konnte die Phasierung nur bis zu einer Auflösung von 3.4 Å durchgeführt werden (vgl. Tabelle 4.13). Der Phasenberechnung folgte dann eine Phasenverbesserung durch Solvensglättung und Histogrammanpassung mit dem Programm DM (CCP4, 1994). Die Qualität der resultierenden Elektronendichte war gering, zeigte jedoch Elektronendichten für einige fehlenden Helices von Tpr2B und eine signifikante Korrelation mit Aminosäuren der positionierten Tpr2A-Domäne. Der Einbau der fehlenden Aminosäuren und die Anpassung des Modells an die Elektronendichten erfolgte mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991). Die Verfeinerung des Strukturmodells von Tpr2S wurde nach Standardprotokollen mit dem Programmpaket CNS (Brünger *et al.*, 1998) gegen den nativen Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.4 Å vorgenommen. Für die Berechnung des freien R-Wertes wurden 7 % der Reflexe von der Verfeinerung ausgeschlossen (vgl. Tabelle 4.15). Im Endstadium der Verfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert und geordnete Wassermoleküle in das Strukturmodell aufgenommen.

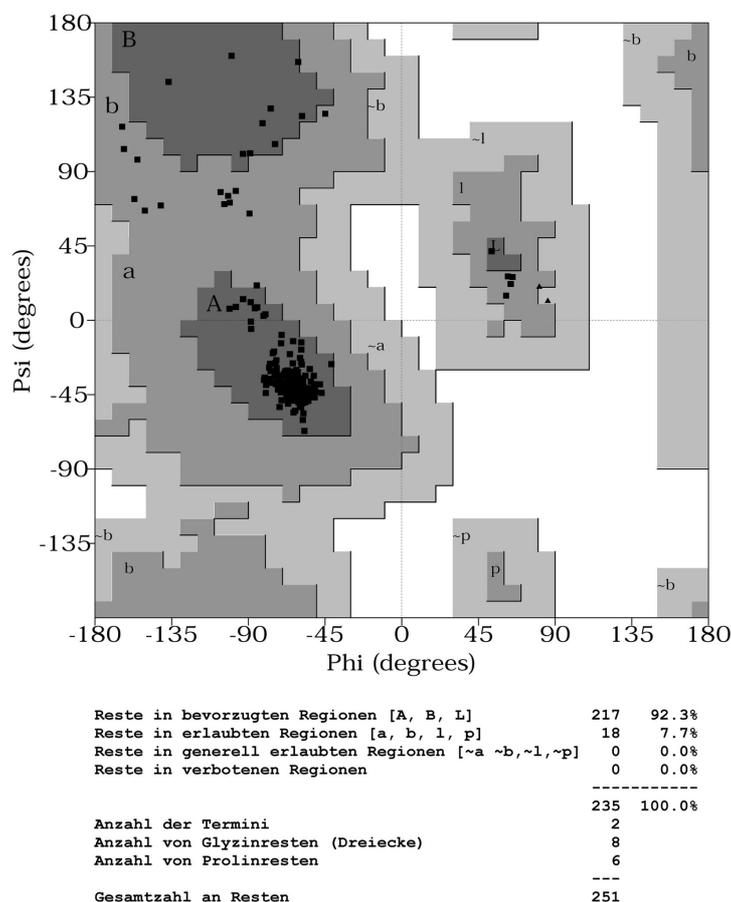
**Tabelle 4.15** Statistiken der Strukturverfeinerung von Tpr2S.

<b>Strukturverfeinerung<sup>a</sup></b>	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Auflösungsbereich (Å)	10.0 - 2.4
R-Wert (%) <sup>b</sup>	19.7
freier R-Wert (%) <sup>b, c</sup>	24.7
# Proteinatome	2031
# Wassermoleküle	130
RMS - Abweichungen:	
Bindungslängen (Å)	0.011
Bindungswinkel (°)	1.3

<sup>a</sup>Statistiken aus CNS (Brünger *et al.*, 1998); <sup>b</sup>ohne Sigma cutoff; <sup>c</sup>Testdatensatz enthält 7 % aller Reflexe

Die Hauptkette konnte bis auf die letzten acht Aminosäuren vollständig in die Elektronendichte eingepasst werden. Für die C-terminalen acht Aminosäuren war keine interpretierbare Dichte vorhanden. Die Aminosäuren Lys238, Lys252, Gln469 und Met472 zeigten keine signifikanten Dichten für die Seitenketten und wurden daher als Alanine modelliert. Das Strukturmodell aus 2031 Proteinatomen und 130 Wassermolekülen konvergierte bei einem R-Wert von 19.7 % (freier R-Wert 24.7 %). Die Geometrie des ausverfeinerten Modells ist von guter Qualität. Die Standardabweichungen von den Idealwerten (Engh & Huber, 1991) betragen 0.011 Å für Bindungslängen und 1.6° für Bindungswinkel. Die Abschätzung des middle-

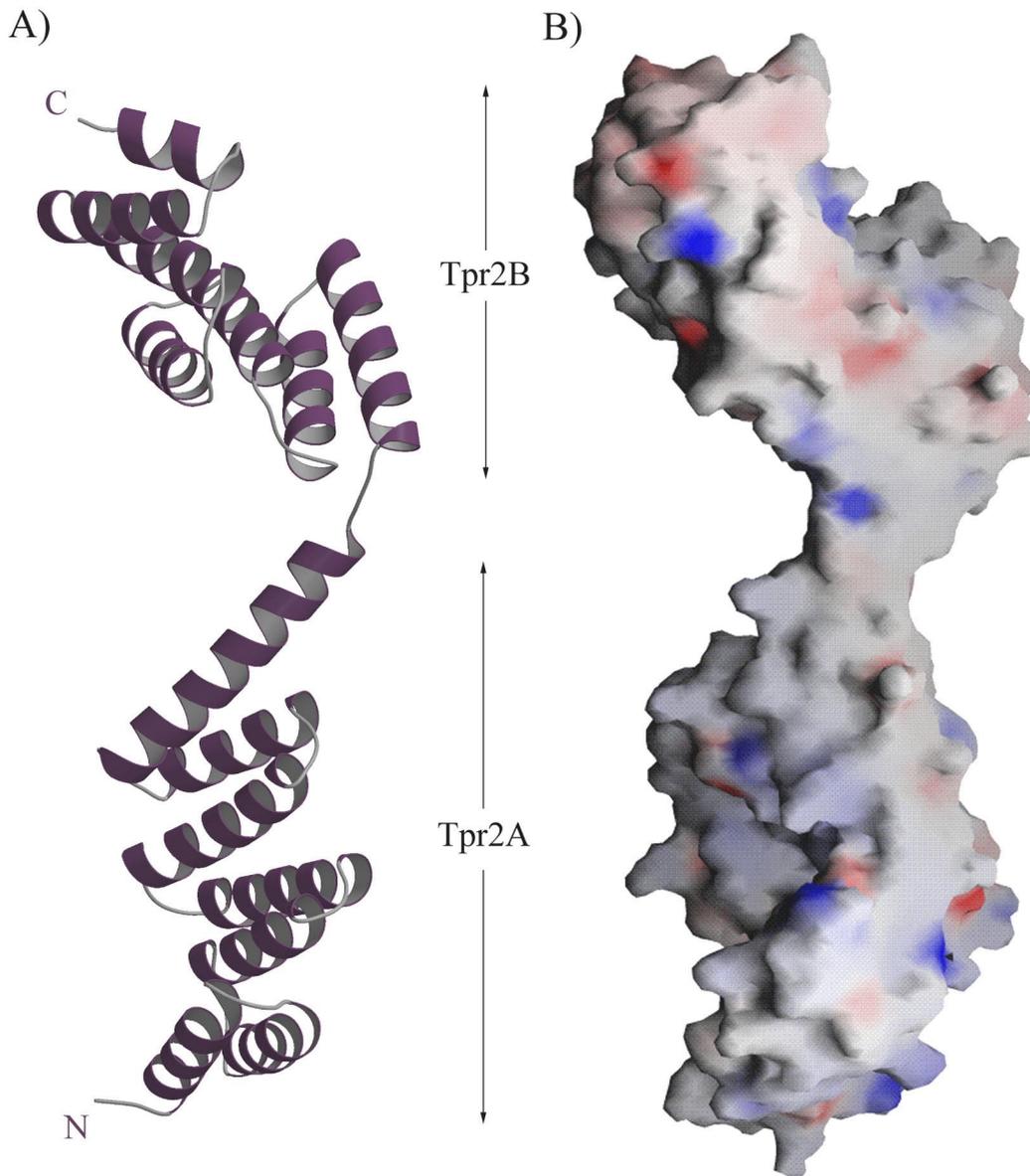
ren Koordinatenfehler durch einen Luzzati-Plot (Luzzati, 1952) ergab  $0.24 \text{ \AA}$ . Die Analyse der  $\phi$ - $\psi$ -Torsionswinkel anhand eines Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigte alle Aminosäuren in bevorzugten und erlaubten Bereichen (vgl. Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18** Ramachandran-Plot des ausverfeinerten Strukturmodells von Tpr2S. Alle Aminosäuren fallen auf bevorzugte bzw. erlaubte Bereiche.

Die Struktur von Tpr2S wird durch zwei Domänen aufgebaut: die bereits charakterisierte Tpr2A-Domäne und die Tpr2B-Domäne (vgl. Abschnitt 4.4.1 und Abbildung 4.19). Der Aufbau von Tpr2S durch zwei Domänen wurde anhand der Ergebnisse der Proteolysen (vgl. Abbildung 4.2) und der Sequenzvergleiche (vgl. Tabelle 4.6) erwartet. Die Faltung von Tpr2B ist identisch mit den Tertiärstrukturen der Tpr-Domänen von PP5, Tpr1 und Tpr2A: die drei Tpr-Motive bilden sechs antiparallel verlaufende Helices, die durch eine siebte Helix ergänzt werden. Die konstante Abfolge der sieben Helices resultiert in einer leicht gebogenen Anordnung. Auf der konkaven Seite von Tpr2B finden sich, analog zu den Tpr-Domänen von PP5, Tpr1 und Tpr2A, die konservierten Reste Lys364, Asn370, Asn399, Lys429 und Arg433 für die Ausbildung einer Carboxylat-Klammer (vgl. Tabelle 4.6). Die strukturelle und sequentielle

Konservierung von Tpr2B mit den Tpr-Domänen von PP5, Tpr1 und Tpr2A legt die Vermutung nahe, dass auch Tpr2B über seine Carboxylat-Klammer ein EEVD-Motiv binden kann. Die beobachtete Struktur von Tpr2S zeigt keine direkten Packungsinteraktionen zwischen Tpr2A und Tpr2B innerhalb eines Moleküls. Vielmehr erscheint die Verbindung der beiden Domänen hoch flexibel, was eine erweiterte Bewegungsfreiheit der beiden Domänen relativ zueinander erlaubt.



**Abbildung 4.19** Die Struktur von Tpr2S. Die zwei Unterdomänen Tpr2A und Tpr2B sind markiert. A) Bändermodell: N- und C-Terminus der Domäne sind gekennzeichnet. B) Das elektrostatische Potential auf der Oberfläche von Tpr2S.

## 5 Analyse und Diskussion

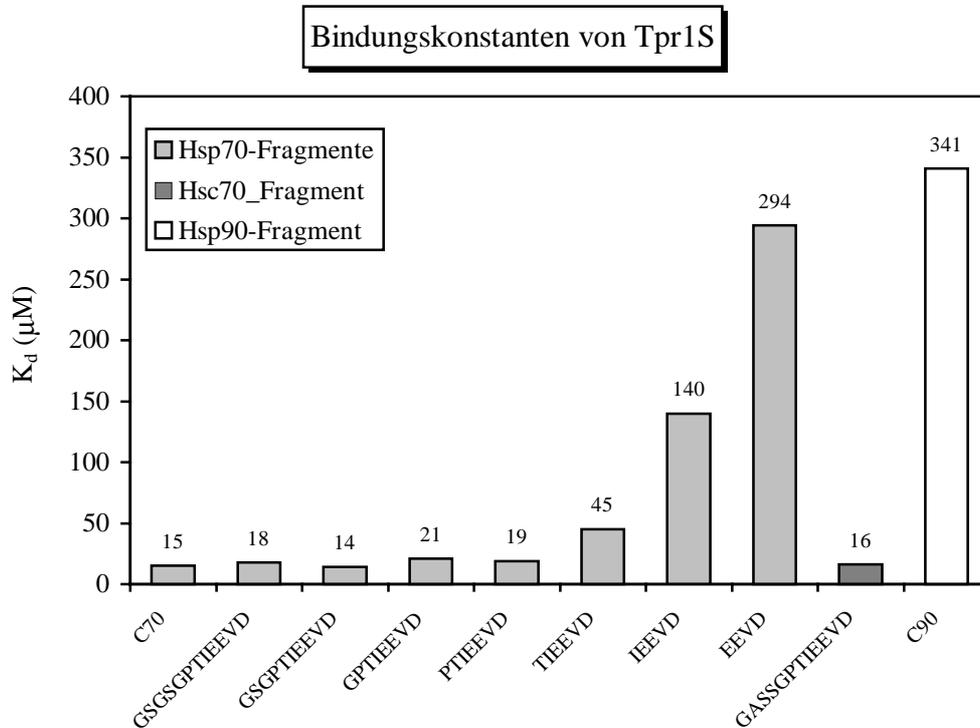
### 5.1 Struktur-Funktions-Analyse von Hop

Neben den vorgestellten Kristallstrukturen werden in die Analyse und Diskussion auch Ergebnisse aus Bindungsstudien zwischen Hsc/Hsp70- und Hsp90-Fragmenten an Hop einbezogen. Alle Bindungsstudien wurden von Herrn A. Brinker (Brinker, 1998; Brinker, 1999) im Rahmen seiner Dissertation angefertigt und erfolgten nach der Methode der Isothermischen-Titrations-Kalorimetrie (ITC; Wiseman *et al.*, 1989). Die Bindungsdaten zeigen, dass die Strukturen der Tpr-Peptid-Komplexe physiologisch relevant sind und die dominierenden Ausschnitte der Interaktionen zwischen Hop und Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 darstellen.

#### 5.1.1 Bindung von Hop an Hsc/Hsp70

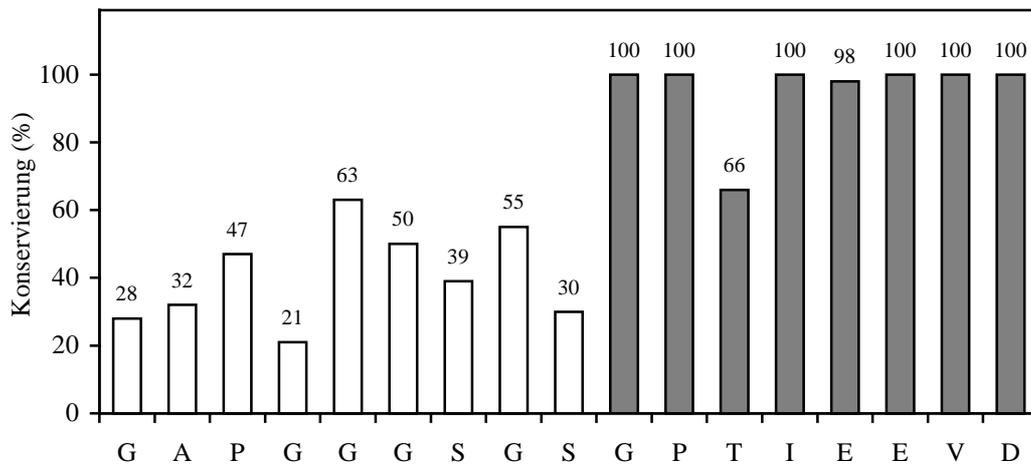
Durch Deletionsstudien konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Tpr1-Domäne von Hop an die C-terminale Domäne von Hsc/Hsp70 bindet (Demand *et al.*, 1998; Lassle *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996). Anhand des Kristallkontaktes innerhalb der Tpr1L-Struktur und dem Sequenzvergleich der Tpr-Domänen von Hop und PP5 wurde vermutet, dass für diese Interaktion nur wenige C-terminale Aminosäuren von Hsc/Hsp70 erforderlich sind. Diese Arbeitshypothese war Anlass für die Strukturanalyse von Tpr1S mit dem Peptid C70\_12 (12 C-terminalen Aminosäuren von Hsc70: GASSGPTIEEVD) und der Durchführung von Bindungsstudien zwischen Tpr1S und verschiedenen Fragmenten von Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 (vgl. Abbildung 5.1). Die ITC-Daten lieferten für die 25 kDa große C-terminale Hsp70-Domäne C70 eine Bindungskonstante von  $K_d = 15 \mu\text{M}$ . Die gleiche Affinität wird durch die 12 terminalen Aminosäuren der nahezu identischen C-Termini von Hsc70 und Hsp70 bei der Bindung an Tpr1S erreicht. Selbst eine Reduzierung der Peptidlänge auf die letzten sieben Aminosäuren von Hsp70 zeigt noch keinen signifikanten Verlust in der Bindungsaffinität an Tpr1S. Interessanter Weise waren genau diese sieben Aminosäuren des 12 Aminosäuren langen, kokristallisierten Peptids C70\_12 in der Kristallstruktur geordnet. Die Bindung von Hop an Hsc/Hsp70 kann somit vollständig durch die Interaktion der Tpr1S-Domäne mit den sieben C-terminalen Aminosäuren PTIEEVD von Hsc/Hsp70 beschrieben werden. Die Aminosäuren GSGSG, die offensichtlich keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindungsaffinitäten haben, sind sehr wahrscheinlich Teil einer flexiblen Verbindung zwischen dem extremen C-Terminus und einer kompakt gefalteten C-terminalen Domäne von Hsp70. Diese Annahme würde auch erklären, warum innerhalb der Komplexstruktur von Tpr1S mit C70\_12 nur die letzten acht der 12 kokristallisierten Peptidreste sichtbar sind. Die dominierende Bedeutung

der sieben C-terminalen Aminosäuren von Hsc/Hsp70 für die Bindung an Hop spiegelt sich auch in dem hohen Grad der Konservierung dieser Reste innerhalb der Hsc/Hsp70-Familie wider (vgl. Abbildung 5.2).

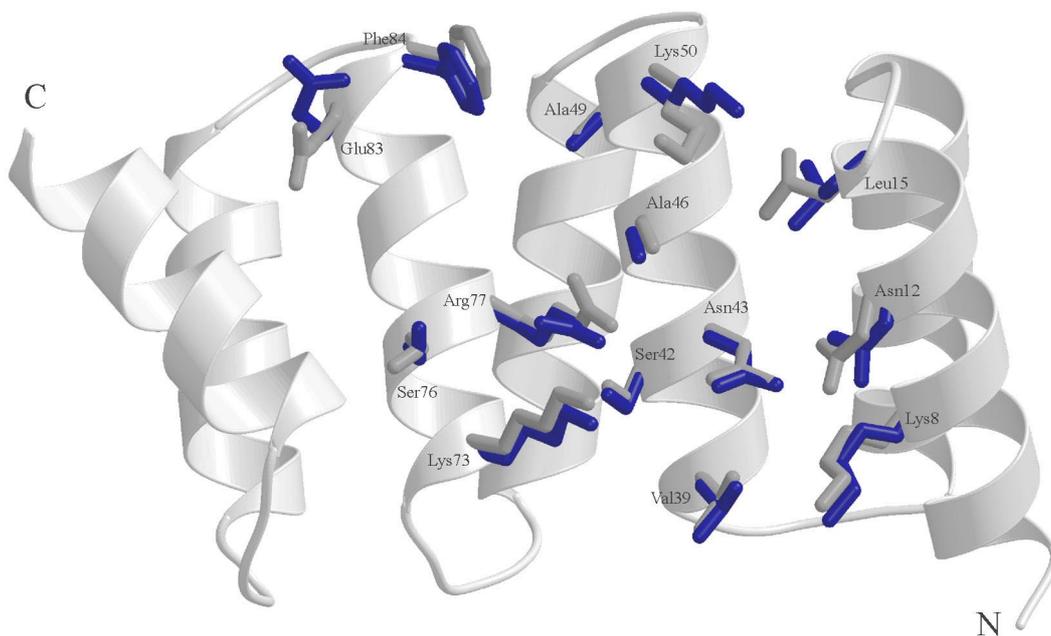


**Abbildung 5.1** Bindungskonstanten von C-terminalen Hsc/Hsp70- und Hsp90-Fragmenten an die Tpr1S-Domäne von Hop. Der Vergleich der  $K_d$ -Werte für C70 und C90 zeigt deutlich, dass die Tpr1S-Domäne spezifisch mit C70 interagiert. C70: aa382-aa641 von Hsp70. C90: aa625-aa732 von Hsp90.

Der Einfluss der Peptidanlagerung auf die Konformation der Tpr1S-Domäne kann anhand einer Überlagerung der peptidfreien Tpr-Domäne mit dem Tpr-Peptid-Komplex untersucht werden (vgl. Abbildung 5.3). Die Superposition der beiden Domänen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Standardabweichung der  $C_\alpha$ -Positionen ist  $0.6 \text{ \AA}$ ). Eine besonders hohe Strukturübereinstimmung findet sich für die konservierten Reste (Lys8, Asn12, Asn43, Lys73, Arg77) der zweifachen Carboxylat-Klammer. Sogar die Konformationen der langen Seitenketten von Lys8, Lys73 und Arg77 sind nahezu identisch. Kleinere Konformationsunterschiede finden sich für die Seitenketten Lys50 und Glu73, die hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Peptid ausbilden. Der Vergleich der Strukturen zeigt keine relevanten Konformationsänderung durch die Peptidbindung. Daher kann angenommen werden, dass die Tpr1S-Domäne ständig in einem bindungskompetenten Zustand vorliegt, der eine schnelle Peptidbindung ohne strukturelle Umlagerungen ermöglicht.



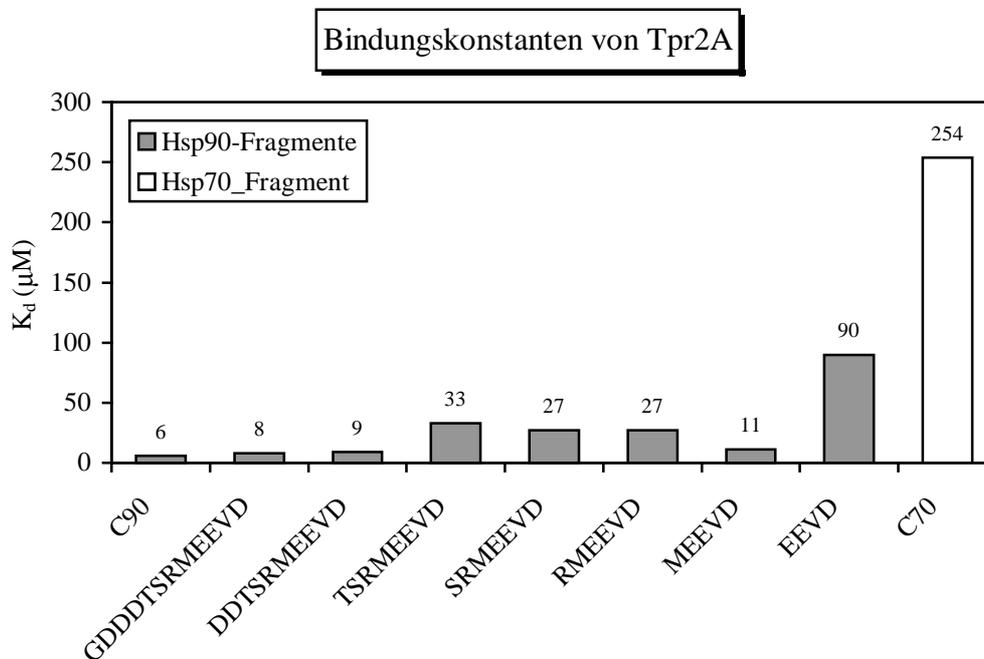
**Abbildung 5.2** Sequenzkonservierung innerhalb der C-Termini von Hsc/Hsp70. Für die Analyse wurden die zytosolischen Formen von 83 eukaryotischen Hsc/Hsp70 Proteinen verwendet. Die Konservierung der häufigsten Aminosäuren ist in Prozent angegeben. Der in der Komplexstruktur Tpr1S/C70\_12 geordnete Peptidbereich ist dunkel hervorgehoben.



**Abbildung 5.3** Superposition der  $C_{\alpha}$ -Reste der peptidfreien und der peptidgebundenen Tpr1S-Domäne. Die an der Peptidbindung beteiligten Seitenketten sind strukturiert dargestellt. Das Bändermodell der Komplexstruktur mit den dazugehörigen Seitenketten ist grau gezeichnet. Die Seitenketten der peptidfreien Tpr1S-Domäne sind dunkelblau hervorgehoben.

## 5.1.2 Bindung von Hop an Hsp90

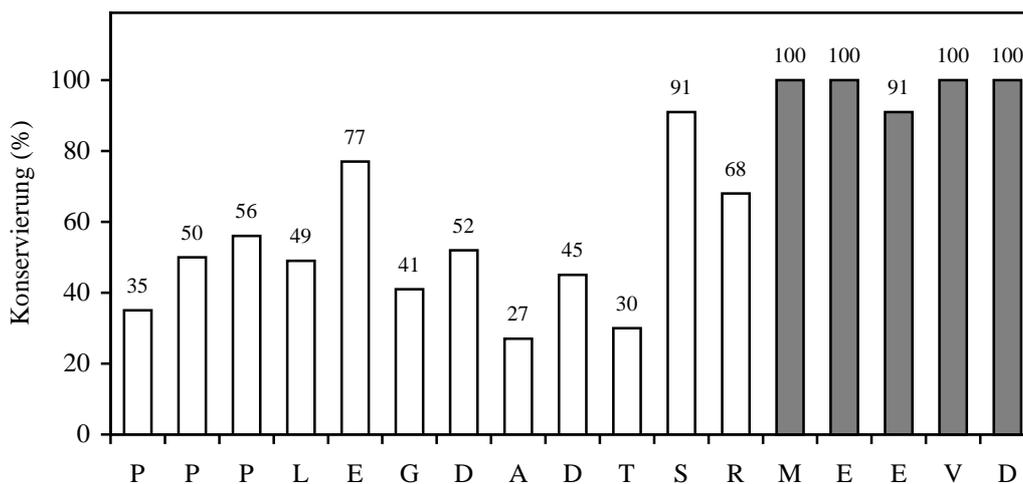
Hop bindet über die Tpr2-Domäne an die C-terminale Domäne von Hsp90 (Carrello *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1998). Die Bestimmung der Domänengrenzen mittels Proteaseverdau und die Kristallstruktur von Tpr2S zeigen, dass die Tpr2-Domäne von Hop (sechs Tpr-Motive) durch die Tpr-Domänen Tpr2A und Tpr2B (jeweils drei Tpr-Motive) aufgebaut wird. Analog zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Tpr1S und Hsp70 wurden auch für die beiden isolierten Domänen Tpr2A und Tpr2B Bindungsstudien an Hsc/Hsp70- bzw. Hsp90-Fragmenten mittels ITC-Messungen durchgeführt. Von den beiden Konstrukten zeigte jedoch nur Tpr2A eine spezifische Bindung mit physiologisch relevanten Affinitäten (vgl. Abbildungen 5.4 und 5.6).



**Abbildung 5.4** Bindungskonstanten von C-terminalen Hsp70- und Hsp90-Fragmenten an die Tpr2A-Domäne von Hop. Der Vergleich der  $K_d$ -Werte für C90 und C70 zeigt deutlich, dass die Tpr2A-Domäne spezifisch mit C90 interagiert. C70: aa382-aa641 von Hsp70. C90: aa625-aa732 von Hsp90.

Die 12 kDa große C-terminale Hsp90-Domäne C90 bindet mit einem  $K_d$ -Wert von 6  $\mu\text{M}$  an Tpr2A (vgl. Abbildung 5.4). Auch diese Interaktion kann durch wenige C-terminale Aminosäuren vollständig beschrieben werden, da bereits mit den letzten fünf Aminosäuren von Hsp90 (MEEVD) ein  $K_d$ -Wert von 11  $\mu\text{M}$  erreicht wird. Eine Verlängerung der Peptide führt zunächst zu einer signifikanten Abnahme der Bindungsaffinität, die ab einer Peptidlänge von 10 Aminosäuren wieder mit der Affinität von C90 an Tpr2A vergleichbar wird. Dieses Ver-

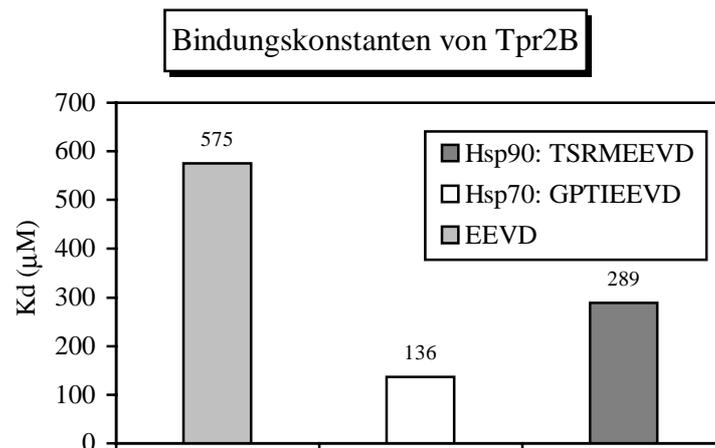
halten kann durch ein fehlendes Sekundärstrukturelement verursacht werden, für dessen Ausbildung eine bestimmte Peptidlänge erforderlich ist. Der Vergleich der  $K_d$ -Werte von C90 und dem Pentapeptid zeigt jedoch deutlich, dass die Bindung von C90 an Tpr2A durch die Interaktion der fünf C-terminalen Aminosäuren MEEVD mit Tpr2A dominiert wird. Dafür spricht auch die nahezu vollständige Konservierung dieser Positionen innerhalb der Hsp90-Familie (vgl. Abbildung 5.5).



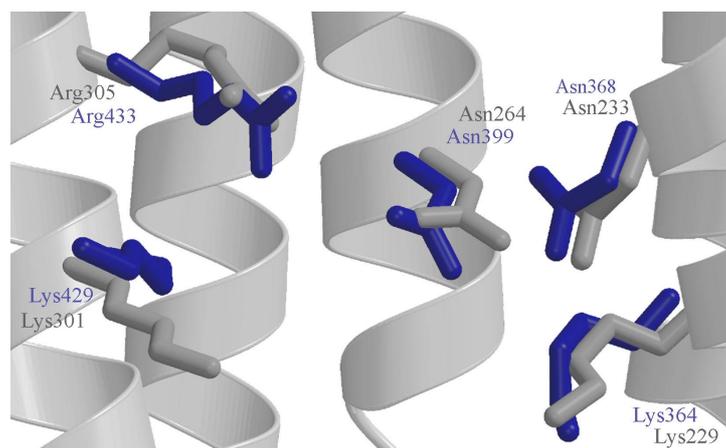
**Abbildung 5.5** Sequenzkonservierung innerhalb der C-Termini von Hsp90. Für die Analyse wurden die zytosolischen Formen von 138 eukaryotischen Hsp90 Proteinen verwendet. Die Konservierung der häufigsten Aminosäuren ist in Prozent angegeben. Die in der Komplexstruktur Tpr2A/C90\_5 geordneten Peptidpositionen sind hervorgehoben.

Im Gegensatz zu Tpr2A lieferte die Charakterisierung der Bindungskonstanten zwischen der isolierten Tpr2B-Domäne von Hop und den acht C-terminalen Aminosäuren von Hsp70 und Hsp90 für keines der beiden Peptide eine physiologisch relevante Affinität (vgl. Abbildung 5.6). Dies ist bemerkenswert, da auch innerhalb der Tpr2B-Domäne, analog zu den Tpr-Domänen Tpr1S, Tpr2A und PP5, alle nötigen Aminosäuren für den Aufbau der zweifachen Carboxylat-Klammer konserviert sind (vgl. Tabelle 4.6). Die konservierten Aminosäuren der Carboxylat-Klammer innerhalb von Tpr2B superpositionieren mit denen der peptidgebundenen Form der Tpr2A-Domäne mit einer Standardabweichung der  $C_\alpha$ -Atome von 0.83 Å (vgl. Abbildung 5.7). Warum trotz der hohen Ähnlichkeit zu Tpr2A keine signifikante Bindung von Tpr2B an das Hsp70- bzw. Hsp90-Peptid nachweisbar war, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Die hohe sequentielle und strukturelle Konservierung der potenziellen Carboxylat-Klammer sowie die konservierte Faltung von Tpr2B im Vergleich mit den Tpr-Domänen Tpr1S, Tpr2A und der Tpr-Domäne von PP5 legen trotz allem die Vermutung nahe, dass Tpr2B während der physiologisch relevanten Interaktion von Hop mit

Hsp70 und Hsp90 zumindest zeitweise eines der beiden Chaperone bindet. Zum Beispiel könnten gleichzeitig beide C-Termini eines Hsp90-Dimers bei der Interaktion mit Hop durch die Tpr2S-Domäne gebunden werden und somit eine definierte Orientierung zwischen Hop und Hsp90 erreicht werden. Dabei würde Tpr2A als hochaffiner und Tpr2B als niederaffiner Bindungspartner für die beiden C-Termini eines Hsp90-Dimers fungieren. In diesem Zusammenhang könnte auch die erwartete hohe Bewegungsfreiheit der Tpr2A- und Tpr2B-Domänen relativ zueinander von physiologischer Bedeutung sein.



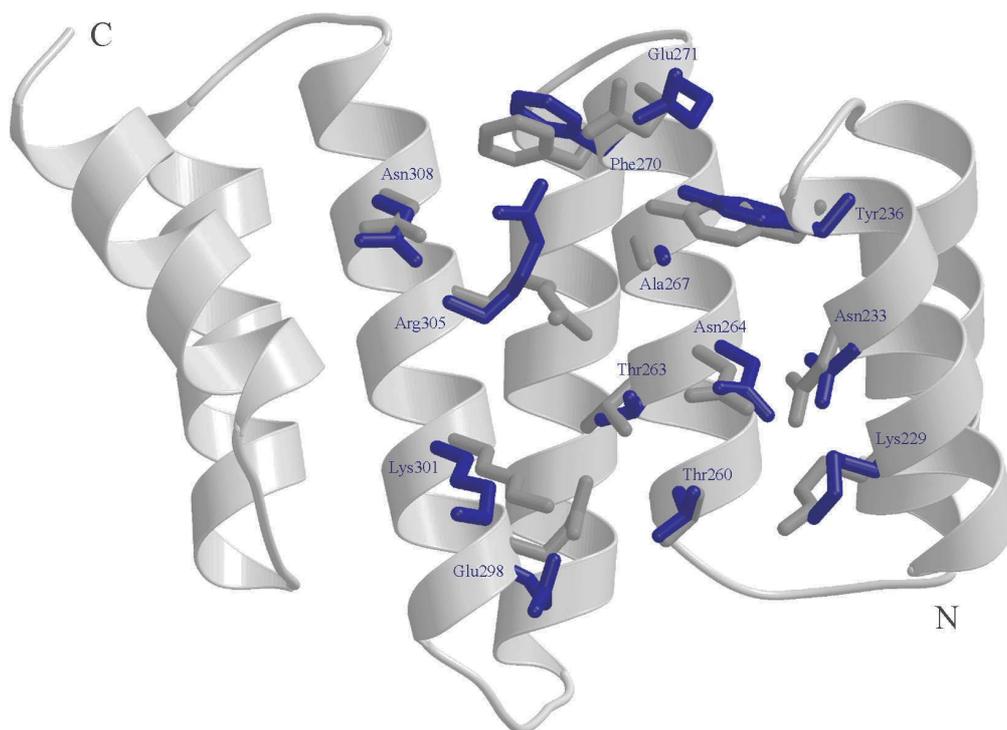
**Abbildung 5.6** Bindungskonstanten der Interaktion zwischen C-terminalen Hsp70- bzw. Hsp90-Peptiden und der Tpr2B-Domäne von Hop.



**Abbildung 5.7** Superposition der zweifachen Carboxylat-Klammer der Komplexstruktur von Tpr2A/C90\_5 (grau) mit den entsprechenden Seitenketten von Tpr2B (blau).

Den Vergleich der peptidfreien mit der peptidgebundenen Form von Tpr2A zeigt die Superposition in Abbildung 5.8. Die  $C_{\alpha}$ -Atome der beiden Domänen superpositionieren mit einer Standardabweichung von 0.89 Å. Die bei der Peptiderkennung beteiligten Reste zeigen sogar eine noch höhere Korrelation (Standardabweichungen der  $C_{\alpha}$ -Atome 0.80 Å). Bis auf Arg305 sind die Seitenkettenkonformationen dieser Reste nahezu identisch. Die Unterschiede für Arg305 dürfen jedoch nicht zu stark gewichtet werden, da in der peptidfreien Form die Seitenkette keine Interaktionen eingeht und dem Lösungsmittel zugewandt ist. Dadurch ist die Elektronendichte dieser Seitenkette nicht sehr stark konturiert, was zu relativ hohen Temperaturfaktoren der Seitenkette von Arg305 führt. Vielmehr scheint Arg305 alternierend verschiedene Seitenkettenkonformationen zu durchlaufen.

Der Vergleich der Strukturen zeigt keine relevanten Konformationsänderungen durch die Bindung von C90\_5. Daher kann angenommen werden, dass die Tpr2A-Domäne, analog zur Tpr1-Domäne von Hop, ständig in einem bindungskompetenten Zustand vorliegt, der eine schnelle und effiziente Peptiderkennung möglich macht.



**Abbildung 5.8** Superposition der peptidgebundenen Form von Tpr2A mit der peptidfreien Tpr2A-Domäne aus der Kristallstruktur von Tpr2S. Das Bändermodell der Komplexstruktur mit den wichtigen Resten der Peptiderkennung ist grau dargestellt. Reste der peptidfreien Tpr2A-Domäne sind blau gezeichnet.

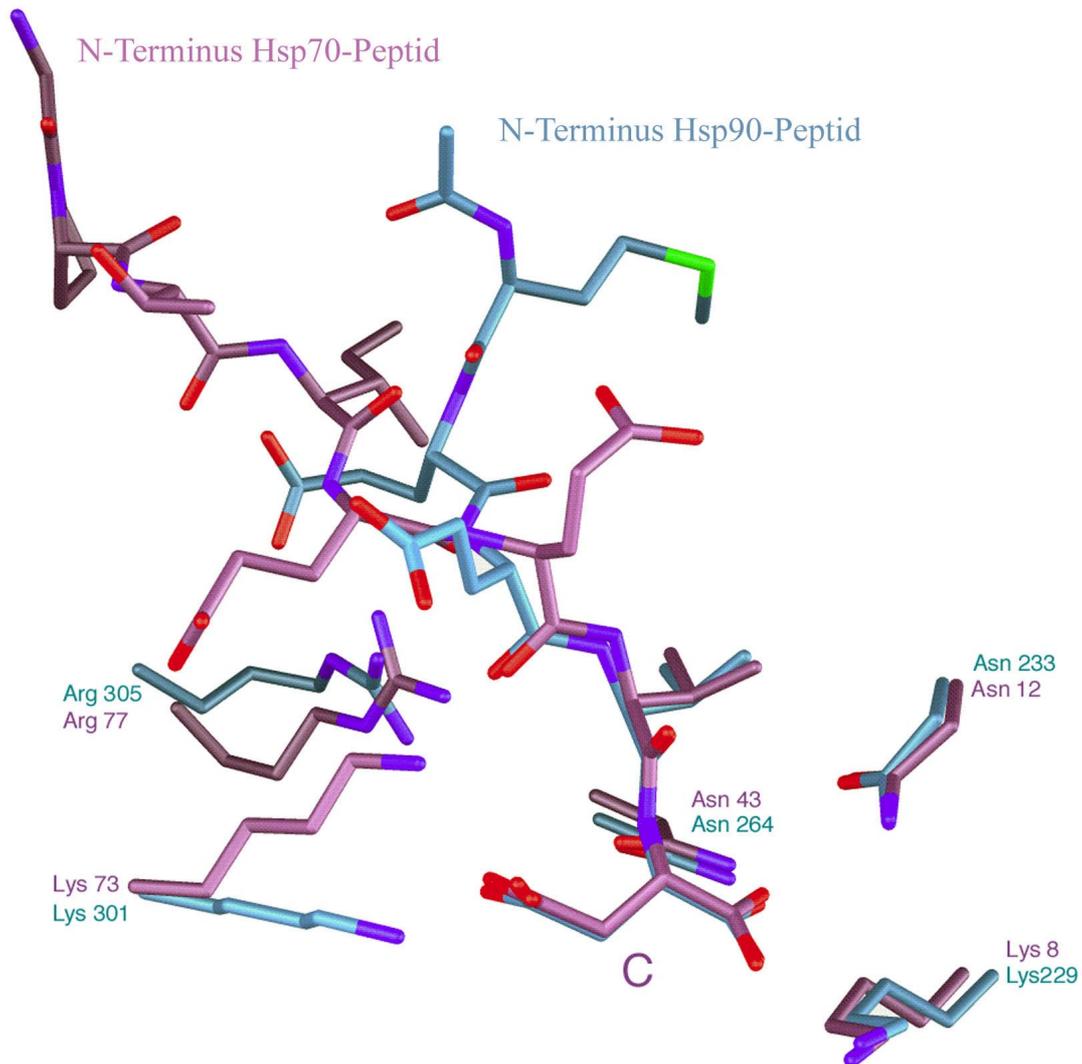
### 5.1.3 Vergleich der Interaktionen

Sowohl die Tpr1-Domäne von Hop, wie auch die Tpr2A-Domäne, binden die Peptide in einer linearen Form. Dies erlaubt die Ausbildung maximaler Kontaktflächen mit physiologisch relevanten Bindungsaffinitäten zwischen den Tpr-Domänen und den Peptiden. Die Peptiderkennung erfolgt in beiden Domänen nach dem gleichen Schema. Mittels der konservierten Carboxylat-Klammern werden die zwei C-terminalen Aminosäuren der EEVD-Motive auf der Domäne verankert. Die nötige Spezifität, um zwischen den C-Termini von Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 zu unterscheiden, wird durch hydrophobe Wechselwirkungen in Bereichen N-terminal zum EEVD-Motiv erzeugt. Trotz dieser Gemeinsamkeiten gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Bindungen von Tpr1S an C70\_12 und Tpr2A an C90\_5.

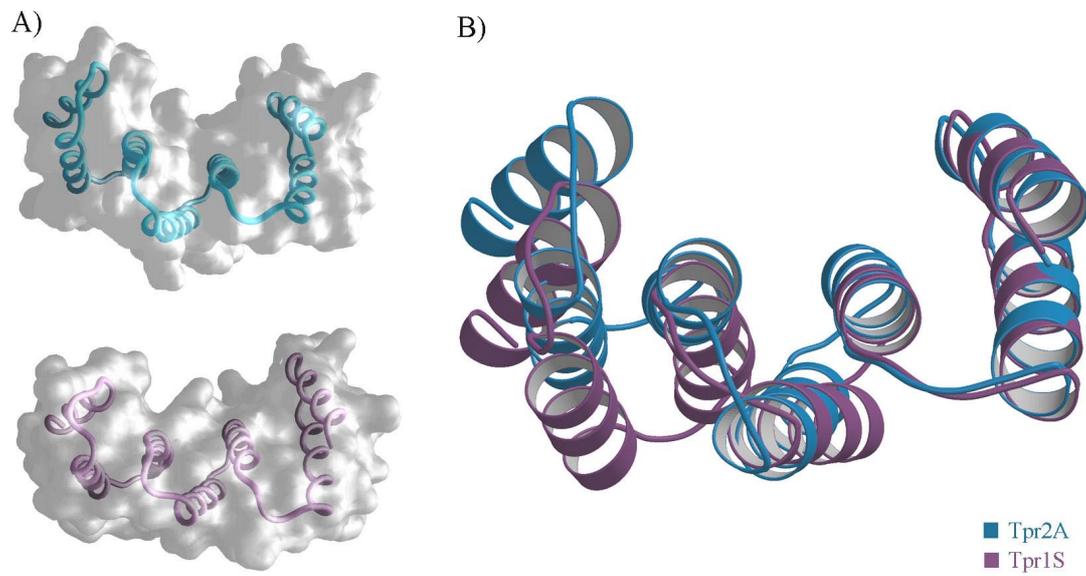
Die Interaktionen der Tpr-Domänen mit den EEVD-Motiven werden durch elektrostatische Wechselwirkungen der Carboxylat-Klammern dominiert. Dabei bildet Tpr2A, im Vergleich zu Tpr1, zusätzliche Bindungen mit dem EEVD-Motiv aus. Dies sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gln298 und der Seitenketten von Asp0 sowie Arg305, Asn308 und der Seitenkette von Glu-3 (vgl. Abbildungen 4.13 und 4.17). Diese weiteren Bindungen führen auch zu einer erhöhten Kontaktfläche zwischen Tpr2A und dem EEVD-Motiv von C90\_5. Die Kontaktfläche zwischen Tpr2A und EEVD beträgt  $750 \text{ \AA}^2$  und ist um ca.  $100 \text{ \AA}^2$  größer als die Kontaktfläche zwischen Tpr1S und dem EEVD-Motiv von C70\_12. Die zusätzlichen Interaktionen zwischen Tpr2A und dem EEVD-Motiv spiegeln sich auch in den Bindungskonstanten wider. Dabei zeigt Tpr2A mit einem  $K_d$ -Wert von  $90 \text{ \mu M}$  eine höhere Basisaffinität an EEVD als Tpr1S mit einem  $K_d$ -Wert von  $294 \text{ \mu M}$  (vgl. Abbildungen 5.1 und 5.4).

Die Überlagerung der fünf konservierten Reste der Carboxylat-Klammern von Tpr2A und Tpr1S ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Die Standardabweichung der superpositionierten  $C_\alpha$ -Atome der Carboxylat-Klammern beträgt  $0.75 \text{ \AA}$ . Im Vergleich dazu berechnet sich aus der Überlagerung der kompletten Domänen eine deutlich höhere Standardabweichung von  $1.8 \text{ \AA}$ . Die Carboxylat-Klammern zeigen somit nicht nur eine sequentielle, sondern auch eine hohe strukturelle Konservierung. Die Superposition der Carboxylat-Klammern führt auch zu einer Überlagerung der gebundenen Peptide. Die beiden C-terminalen Aminosäuren Asp0 und Val-1 der Peptide werden dabei nahezu perfekt aufeinander abgebildet. Die N-terminalen Peptidbereiche divergieren zunehmend vom C- zum N-Terminus der Peptide und interagieren mit unterschiedlichen Bereichen der entsprechenden Tpr-Domänen, wodurch Bindungsspezifität erreicht wird (vgl. Abbildungen 4.12, 4.13, 4.16 und 4.17). Das Peptid C90\_5 läuft nahezu parallel entlang der A-Helix des dritten Tpr-Motivs von Tpr2A, der Verlauf von C70\_12 hingegen zeigt eine wesentlich größere Horizontalkomponente (vgl. Abbildungen 5.9, 4.11 und 4.15). Die unterschiedlichen Peptidverläufe könnten auch im Zusammenhang mit den ver-

schieden starken Krümmungen der Tpr-Domänen stehen. Dabei besitzt Tpr2A eine wesentlich höhere Krümmung als Tpr1S (vgl. Abbildung 5.10). Die größere Domänenkrümmung von Tpr2A kann eine direkte Folge der sieben Aminosäuren langen Insertion zwischen dem zweiten und dritten Tpr-Motiv der Tpr2A-Domäne sein und wird nicht durch die Anlagerung des Peptids verursacht (vgl. Tabelle 4.6).



**Abbildung 5.9** Superposition der zweifachen Carboxylat-Klammern von Tpr1S/C70\_12 (lila) und Tpr2A/C90\_5 (hellblau). Die Reste der Carboxylat-Klammern und die N- bzw. C-Termini der Peptide sind markiert.



**Abbildung 5.10** Vergleich der Domänenkrümmungen von Tpr1S und Tpr2A. A) Oberflächen der peptidgebundenen Formen von Tpr1S und Tpr2A. B) Hauptkettenverlauf von Tpr1S und Tpr2A nach Superposition des ersten Tpr-Motivs der beiden Domänen.

## 5.2 Vergleich mit anderen Tpr-Proteinen

### 5.2.1 Strukturvergleich der Tpr-Domänen von Hop und PP5

Die Tpr-Domäne von PP5 (PP5\_Tpr) vermittelt die Interaktion der Phosphatase mit Hsp90 und besitzt somit die gleiche physiologische Funktion wie die Tpr2A-Domäne von Hop. Interessanter Weise zeigt der Strukturvergleich der Tpr-Domänen, sowie den konservierten Resten der Carboxylat-Klammern, die geringste Homologie zwischen Tpr2A und PP5\_Tpr (vgl. Tabelle 5.1). Der signifikante Strukturunterschied zwischen Tpr2A und PP5\_Tpr ist, wie im Fall von Tpr1S, die Folge einer größeren Domänenkrümmung von Tpr2A (vgl. Abbildung 5.10).

Der Strukturvergleich von PP5\_Tpr mit Tpr1S zeigt, besonders für die Reste der Carboxylat-Klammer, eine extrem hohe Korrelation (vgl. Tabelle 5.1). Dies erlaubt die Annahme, dass große Ähnlichkeiten zwischen den Peptiderkennungen von PP5\_Tpr und Tpr1S existieren. Demnach würde die Tpr-Domäne von PP5 ca. sieben C-terminale Aminosäuren von Hsp90 erkennen und binden.

**Tabelle 5.1** Standardabweichungen der  $C_{\alpha}$ -Atome (RMSD) von PP5\_Tpr nach Superposition mit den Tpr-Domänen: Tpr1S: aa4-105, Tpr2A: aa225-292 und aa300-353, Tpr2B: aa360-461, Tpr\_PP5: aa28-129.

	Serin/Threonin-Phosphatase 5		
	RMSD Tpr-Domäne (Å)	RMSD Carboxylat-Klammer (Å)	Sequenzidentität (%)
Tpr1S/C70_12	1.47	0.40	34.3
Tpr2A/C90_5	2.01	0.79	28.6
Tpr2B (Tpr2S)	1.35	0.71	33.3

### 5.2.2 Weitere Kochaperone mit Tpr-Motiven

Neben Hop und PP5 sind weitere Kochaperone bekannt, die über ihre Tpr-Domänen an Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 binden. Zu den Hsp90 bindenden Kochaperonen gehören die Immunophilinen CyP40, FKBP51, FKBP52, die mitochondrialen Importrezeptoren Tom34 und Tom70, sowie das Protein CNS1\_sc. Hsc/Hsp70 interagiert mit den Tpr-Proteinen Chip und Hip.

Mit Ausnahme von Hip (*engl.* Hsc70 interacting protein) zeigt der Sequenzvergleich der Tpr-Domänen dieser Kochaperone eine nahezu vollständige Konservierung der zweifachen Car-

boxylat-Klammern (vgl. Tabelle 5.2). Zusätzlich zeigt der Strukturvergleich zwischen den Tpr-Domänen von Hop und PP5 eine besonders hohe Korrelation der Seitenkettenkonformationen relevanter Reste, die für den Aufbau der Carboxylat-Klammern nötig sind. Dieser hohe Grad der Konservierung legt die Vermutung nahe, dass die Tpr-Domänen dieser Kochaperone, analog zur Tpr1- und Tpr2A-Domäne von Hop, die C-Termini von Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 erkennen und nach dem gleichen Muster binden. Wettbewerbsstudien von Hop, CyP40, FKBP51 und FKBP52 an die C-terminale Hsp90-Domäne zeigen, dass ein an Hsp90 gebundenes Kochaperon durch ein anderes Kochaperon von Hsp90 verdrängt werden kann und somit seitens Hsp90 sehr wahrscheinlich nur eine Tpr-Bindestelle existiert (Carrello *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1998; Ratajczak & Carrello, 1996; Owens-Grillo *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Hsc/Hsp70 mindestens zwei Tpr-Bindestellen besitzt. Neben der C-terminalen Tpr-Bindestelle bindet Hip mittels einer Tpr-Domäne (drei Tpr-Motive) an die N-terminale Domäne von Hsc/Hsp70 (Velten *et al.*, 2000; Irmer & Höhfeld, 1997). Wie erwartet besitzt die Tpr-Domäne von Hip nicht die konservierten Reste der Carboxylat-Klammer, sondern erkennt interne Sequenzbereiche der N-terminalen Hsc/Hsp70-Domäne, was einen alternativen Mechanismus der Proteinerkennung durch Tpr-Domänen darstellt.

Der Sequenzvergleich zeigt für die Tpr-Domänen der Kochaperone unterschiedlich lange Insertionen zwischen den Tpr-Motiven. Außer für Tpr2A finden sich diese Insertionen ausschließlich zwischen dem ersten und zweiten Tpr-Motiv. Da eine gleichzeitige Bindung der verschiedenen Kochaperone an Hsc/Hsp70 bzw. Hsp90 nicht möglich ist, könnten diese Insertionen für die Regulierung der einzelnen Interaktionen von Bedeutung sein.

### 5.2.3 Mögliche Hsc/Hsp70 oder Hsp90 bindende Proteine

Mit den konservierten Resten der Carboxylat-Klammer und den in Tabelle 5.2 markierten Resten des Tpr-Konsensus als Maske wurde die Proteindatenbank durchsucht (PatternFind: <http://www.ch.embnet.org>). Dabei konnten sieben weitere Tpr-Proteine identifiziert werden, die aufgrund ihrer Carboxylat-Klammern potenziell mit einem C-terminalen Aspartat interagieren könnten (vgl. Tabelle 5.2). Sehr wahrscheinlich sind zumindest einige dieser Proteine Kochaperone von Hsc/Hsp70 oder Hsp90 und binden das konservierte EEVD-Motiv der Chaperone. Über die Funktionen der identifizierten Proteine ist wenig bekannt.

**Tabelle 5.2** Sequenzvergleich von Tpr-Domänen, die Hsc/Hsp70 oder Hsp90 binden bzw. potenzielle Bindungspartner aufgrund ihrer konservierten Carboxylat-Klammern sind. Die Reste der konservierten Carboxylat-Klammern sowie zusätzliche Reste, die elektrostatische Wechselwirkungen mit dem EEVD-Motiv eingehen, sind blau markiert. Reste, die hauptsächlich hydrophobe Interaktionen mit dem Peptid ausbilden, sind rot hervorgehoben. Fett gedruckte Positionen gehören zum Tpr-Konsensus. Bis auf TOM70 und CNS1\_sc sind alle Sequenzen humanen Ursprungs. TOM70 ist aus *N. crassa*, CNS1\_sc aus *S. cerevisiae*. Weitere Erläuterungen im Text.

	HELIX 1A	HELIX 1B	HELIX 2A	HELIX 2B
Tpr1	4 VNEL <b>KEKGN</b> KALSVGNIDDA <b>LQCYSEAI</b> KLDPHN-----			
CHIP	26 AQEL <b>KEQGN</b> RRLFVGRKYPE <b>AAACYGR</b> VITRNPLV-----			
Tpr2A	225 ALKE <b>KELGN</b> DAYKKKDFD <b>TAL</b> KHYDK <b>AKEL</b> DPIN-----			
PP5	28 AEEL <b>KTQAN</b> DYFKAKDYENA <b>IKFYSQA</b> IELNPSN-----			
FKBP51	268 AAIV <b>KEKGT</b> VYFKGGKYM <b>QAVIQY</b> GKIVSWLEMEYGLSEKE-SKASESFLLA <b>AFNLAM</b> CYLKLR <b>REYTKA</b> VECCDKALGL---DSAN----			
FKBP52	270 STIV <b>KERGT</b> VYFKEGKY <b>QALLQY</b> KKIVSWLEYESSFSNEE-AQKAQALRLASH <b>LNLAM</b> CHLKLQAFSA <b>AIESC</b> NKALEL---DSNN----			
CyP40	223 TEDL <b>KNIGN</b> TFFKSNWEMA <b>IKKYAE</b> VLRYVDSSKAVIETADRAKLQ <b>PIALS</b> CVL <b>NI</b> GACKLKMSNWQ <b>GAID</b> SCLEALEL---DPSN----			
TOM34	193 ARVL <b>KEEGN</b> ELVKKGNH <b>KKAIE</b> KYSE <b>LLCS</b> NLE-----			
TOM70	136 AAKL <b>KELGN</b> KAYGSKDFNK <b>AIDL</b> YSK <b>AI</b> ICKPDP-----			
CNS1_sc	83 AEN <b>FKQGN</b> ELYKAKRFK <b>DARE</b> LYSKGLAVECEDK <b>SIN</b> -----			
Tpr2B	360 ALEE <b>KNKGN</b> ECFQKGDY <b>PQAM</b> KHY <b>TEAI</b> KRNPKD-----			
TTC1	116 STRL <b>KEEGN</b> EQFKKGDY <b>TEAES</b> YSRA <b>LEMC</b> PCSFQKER-----			
TTC2	246 LKAK <b>KEDGN</b> KAFKEGNY <b>KLAV</b> EY <b>TEAL</b> GIDPNNIKTN-----			
TTC3	231 GELM <b>KMGNE</b> EFKSKERFD <b>IAI</b> YY <b>TRAI</b> EYRPN-----			
TTC4	79 AKTY <b>KDEGN</b> DYFKKDY <b>KKAVI</b> SY <b>TEGL</b> KKK <b>CAD</b> PDLN-----			
IRSP	225 FKAL <b>KEEGN</b> QC <b>VND</b> KNYK <b>DAL</b> SKYSE <b>CL</b> KINNKE-----			
SGT	89 AERL <b>KTEGN</b> EQMKVEN <b>FEAAV</b> H <b>YFGK</b> AI <b>ELN</b> PAN-----			
KIAA0719	114 AQA <b>AKNKG</b> NKYFKAGKY <b>EQAI</b> Q <b>CY</b> TE <b>AI</b> SLC <b>PT</b> EKNVDL-----			
	HELIX 3A	HELIX 3B	HELIX C	
Tpr1	72 <b>GK</b> YSR <b>KAAAL</b> <b>EF</b> LNRFEE <b>AKRTY</b> EE <b>GL</b> KHEAN <b>PQ</b> LKEGLQ <b>NME</b> AR <b>LAER</b> KFM 125			
CHIP	94 <b>VKA</b> HFFL <b>GC</b> Q <b>LEM</b> ESY <b>DEAI</b> AN <b>LQ</b> RA <b>YSL</b> AKEQRL <b>NFG</b> DD <b>IP</b> SALR <b>IAK</b> KKRW 147			
Tpr2A	300 <b>AKAYAR</b> I <b>GN</b> SYF <b>KEE</b> KYK <b>DAI</b> H <b>FY</b> N <b>KS</b> LA <b>EH</b> RT <b>PD</b> VL <b>KKC</b> Q <b>QAE</b> KIL <b>KEQ</b> ER <b>LA</b> 353			
PP5	96 <b>IKGYRR</b> AAS <b>NM</b> L <b>GK</b> FRA <b>AL</b> RD <b>YET</b> VV <b>VK</b> VP <b>HD</b> KD <b>AKM</b> KY <b>QEC</b> NKI <b>VKQ</b> KAF <b>E</b> 149			
FKBP51	351 <b>EKGLYR</b> RG <b>E</b> AQL <b>MNE</b> F <b>ESA</b> K <b>GD</b> FE <b>KV</b> LE <b>VN</b> PQ <b>NKA</b> AR <b>LQ</b> IS <b>MC</b> Q <b>KK</b> A <b>KE</b> HNER 404			
FKBP52	353 <b>EKGLFR</b> RG <b>E</b> AHL <b>AVN</b> DF <b>EL</b> AR <b>AD</b> F <b>QK</b> VL <b>Q</b> LY <b>PNN</b> KA <b>AKT</b> QL <b>AV</b> C <b>QR</b> IR <b>RQ</b> LAR 406			
CYP40	307 <b>TKALYR</b> RA <b>Q</b> GW <b>GL</b> KEY <b>DQAL</b> AD <b>LKKA</b> Q <b>GI</b> AP <b>ED</b> K <b>AI</b> Q <b>AE</b> LL <b>KV</b> K <b>Q</b> K <b>IKA</b> Q <b>KD</b> K 400			
TOM34	261 <b>VKAFYR</b> RA <b>QA</b> H <b>KAL</b> KDY <b>KS</b> SF <b>AD</b> IS <b>NLL</b> Q <b>IE</b> PR <b>NG</b> PA <b>QK</b> L <b>RQ</b> EV <b>KQ</b> N <b>LH</b> ----- 309			
TOM70	203 <b>VKALNR</b> RA <b>NAY</b> D <b>QL</b> S <b>RYR</b> HA <b>LLD</b> FT <b>AS</b> CI <b>ID</b> GF <b>RNE</b> Q <b>SAQ</b> AV <b>ER</b> LL <b>KK</b> FA <b>EN</b> KA 256			
CNS1_sc	155 <b>VKCYR</b> TS <b>KAF</b> F <b>QL</b> N <b>KLE</b> E <b>AK</b> SA <b>AT</b> F <b>AN</b> QR <b>ID</b> PEN <b>KS</b> IL <b>NML</b> S <b>VID</b> R <b>KE</b> Q <b>EL</b> KA 208			
Tpr2B	428 <b>IKGYTR</b> KAA <b>AL</b> E <b>AM</b> KDY <b>TKA</b> MD <b>VY</b> Q <b>KAL</b> DL <b>DS</b> SC <b>KEA</b> AD <b>G</b> Y <b>QRC</b> MA <b>QY</b> NR <b>HDS</b> 481			
TTC1	189 <b>IRAILR</b> RA <b>EL</b> EY <b>E</b> TK <b>LDE</b> A <b>LED</b> Y <b>KS</b> I <b>LE</b> K <b>DPS</b> I <b>HQ</b> ARE <b>AC</b> M <b>RL</b> PK <b>QI</b> E <b>ERN</b> ER 242			
TTC2	318 <b>IKAYLR</b> RA <b>Q</b> CY <b>MD</b> TE <b>QYEE</b> A <b>VRD</b> Y <b>EK</b> VY <b>Q</b> TE <b>KT</b> KE <b>HQ</b> LL <b>KNA</b> Q <b>LE</b> L <b>KK</b> SK <b>R</b> KD 371			
TTC3	299 <b>PKGHYR</b> YCD <b>AL</b> S <b>ML</b> GEY <b>DWAL</b> Q <b>ANI</b> KA <b>Q</b> KL <b>CK</b> ND <b>PE</b> GI <b>KDL</b> I <b>Q</b> H <b>V</b> L <b>KQ</b> Q <b>IED</b> 352			
TTC4	151 <b>LKAIIR</b> GAL <b>CH</b> LE <b>L</b> I <b>H</b> FA <b>E</b> AV <b>NW</b> C <b>DE</b> GL <b>Q</b> IDA <b>KE</b> KL <b>L</b> EM <b>RA</b> K <b>AD</b> KL <b>KRI</b> E <b>QR</b> D 204			
IRSP	293 <b>VKAFYR</b> RA <b>L</b> A <b>HK</b> GL <b>K</b> NY <b>QK</b> SL <b>ID</b> L <b>NK</b> V <b>ILL</b> D <b>PS</b> I <b>E</b> AK <b>ME</b> LE <b>E</b> V <b>TR</b> LL <b>NL</b> K <b>D</b> KT 346			
SGT	159 <b>SKAYGR</b> ML <b>L</b> S <b>SN</b> K <b>H</b> VE <b>AVAY</b> Y <b>K</b> AL <b>EL</b> DP <b>DN</b> ET <b>YK</b> SN <b>LK</b> IA <b>EL</b> KL <b>RE</b> AP <b>S</b> P 212			
KIAA0719	187 <b>VKALFR</b> RA <b>K</b> A <b>HE</b> KL <b>DN</b> KE <b>C</b> LE <b>D</b> V <b>TAV</b> C <b>I</b> EG <b>FQ</b> N <b>Q</b> S <b>ML</b> L <b>AD</b> K <b>V</b> L <b>K</b> L <b>G</b> KE <b>K</b> A 240			

## 5.2.4 Funktion des Tpr-Motivs von Tom20

Tom20 ist ein genereller Importrezeptor für mitochondriale Proteine und besitzt ein Tpr-Motiv (aa70 - aa103), das eine wichtige Funktion bei der Erkennung mitochondrialer Importsequenzen einnimmt. Erst kürzlich wurde die NMR-Struktur eines proteaseresistenten Rezeptorfragments (aa51 - aa145) im Komplex mit einer 13 Aminosäuren langen Importsequenz verfügbar (Abe *et al.*, 2000; PDB-Code 1OM2). Die Struktur zeigt deutlich, dass das Tpr-Motiv bei der Peptiderkennung beteiligt ist, diese jedoch nicht ausschließlich durch das Tpr-Motiv erfolgt (vgl. Abbildung 5.11 A). Die Importsequenz bindet hauptsächlich über hydrophobe Interaktionen in eine Furche, die durch das Tpr-Motiv (Helices A1 und A2) und die Helices A3 und A4 des Rezeptors aufgebaut wird. Der Strukturvergleich der Bindedomäne von Tom20 mit den Tpr1- und Tpr2A-Domänen von Hop zeigt bis auf die Tpr-Motive keine Homologie. Das Tpr-Motiv des Tom20-Rezeptors kann gut mit den drei Tpr-Motiven von Tpr1S überlagert werden (vgl. Abbildung 5.11 B). Die ersten 29 Aminosäuren des Tpr-Konsensus superpositionieren mit Standardabweichungen von 0.73 Å, 0.80 Å und 0.85 Å. Die C-terminalen Reste des Tpr-Konsensus von Tom20 divergieren im Vergleich zu den entsprechenden Resten der Tpr-Motive von Tpr1S aufgrund der unterschiedlichen Faltung der beiden Domänen. Die Peptiderkennung von Tom20 und Tpr1S bzw. Tpr2A ist völlig verschieden und besitzt keine weiteren Gemeinsamkeiten. Die Struktur von Tom20 zeigt jedoch eine weitere Variante einer Tpr-vermittelten Protein-Protein-Wechselwirkung.

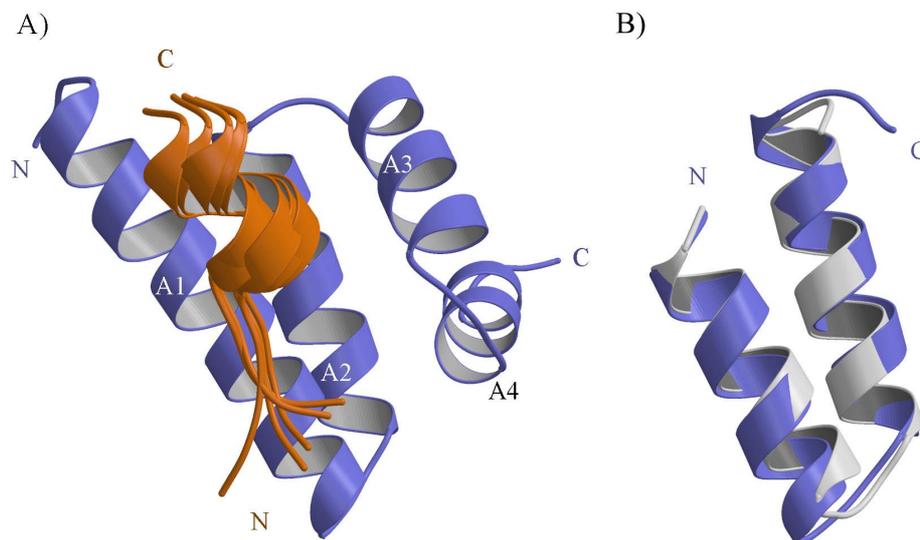


Abbildung 5.11 Erkennung einer mitochondrialen Importsequenz durch Tom20. Die N- und C-Termini sind markiert. A) Bändermodell der Bindedomäne des Rezeptors (blau) und dem gebundenen Peptid (orange). B) Überlagerung des Tpr-Motivs von Tom20 (blau) mit dem ersten Tpr-Motiv der Tpr1-Domäne von Hop (grau).

## 5.3 Vergleich mit anderen peptidbindenden Domänen

### 5.3.1 PDZ-Domänen

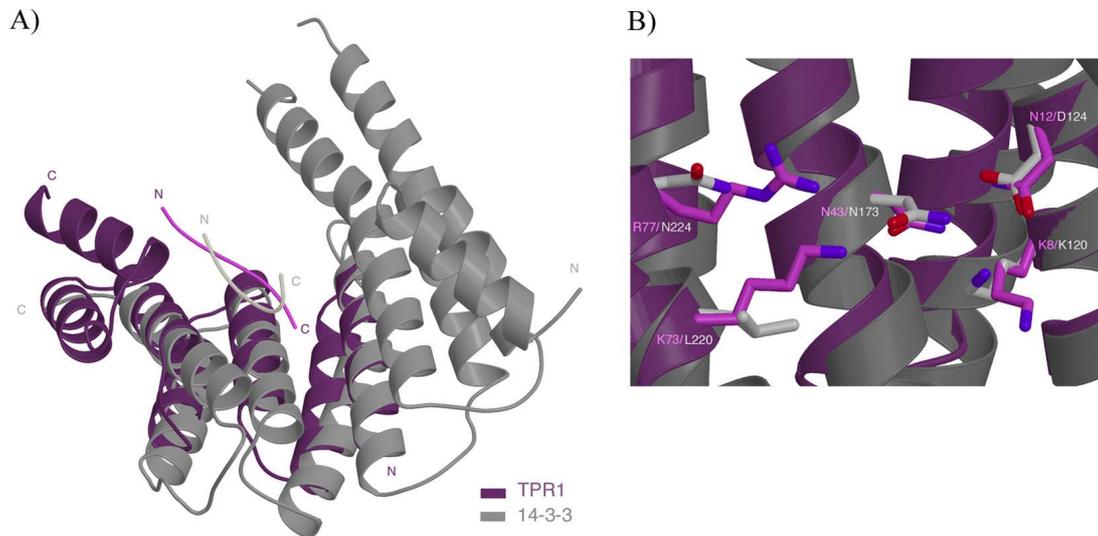
Eine weitere Klasse von Protein-Domänen, die kurze C-terminale Reste mit frei zugänglichen Carboxylat-Gruppen erkennen und binden, sind PDZ-Domänen (Doyle *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1995). PDZ-Domänen zeigen keine sequentielle und strukturelle Homologie mit Tpr-Domänen. Die strukturelle Basis der Peptiderkennung von PDZ-Domänen lieferte die Kristallstrukturanalyse eines Peptid-Domänen-Komplexes (Doyle *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu Tpr-Domänen, die ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut sind, bilden PDZ-Domänen  $\alpha$ - $\beta$ -Sandwich-Strukturen aus. Da die Funktion der PDZ-Domänen vergleichbar mit der Funktion der Tpr-Domänen von Hop ist, wurden Strukturvergleiche der Domänen-Peptid-Komplexe angefertigt. Außer der direkten Beteiligung der Carboxylat-Reste der Peptide bei der Interaktion mit den Domänen konnten keine weiteren signifikanten Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Vielmehr zeigten die beiden Domänen eine völlig andere Faltung und unterschiedliche Muster der Peptiderkennung.

### 5.3.2 14-3-3-Domänen

Die Familie der 14-3-3-Proteine gehört zu der Klasse der Phosphoserin (pS) bindenden Proteine, die eine zentrale Rolle bei verschiedenen Signaltransduktionen spielen (Muslin *et al.*, 1996). 14-3-3-Proteine erkennen und binden die internen Sequenzmotive RSXpSXP und RXYFXpSXP (Yaffe *et al.*, 1997). Die spezifische Interaktion mit phosphorylierten Sequenzen bestimmter Proteine ist der erste Schritt zur Ausbildung signalkompetenter Komplexe als Antwort auf eine Aktivierung durch Kinasen (Songyang, 1999).

14-3-3-Proteine bilden Homo- bzw. Heterodimere und besitzen neun  $\alpha$ -Helices pro Monomer. Die Überlagerung eines Peptid-Komplexes von 14-3-3 (Yaffe *et al.*, 1997; PDB-Code 14PS) und Tpr1S zeigt eine unerwartet hohe strukturelle Übereinstimmung funktionell wichtiger Aminosäuren der Peptiderkennung.

Fünf der sieben Helices von Tpr1S superpositionieren mit den C-terminalen Helices von 14-3-3 mit einer Standardabweichung der  $C_{\alpha}$ -Atome von 2.5 Å (vgl. Abbildung 5.12 A). Diese Überlagerung der Domänen führt auch zu einer Superposition der gebundenen Peptide. Die  $C_{\alpha}$ -Positionen der konservierten zweifachen Carboxylat-Klammer von Tpr1S sind nahezu identisch mit funktionell wichtigen Resten der Peptiderkennung von 14-3-3 (vgl. Abbildung 5.12 B). Vier dieser Reste von 14-3-3 bilden alle elektrostatischen Interaktionen mit dem gebundenen Peptid aus. Offensichtlich erfolgen die Peptidbindungen der Tpr1S- und 14-3-3-Domänen nach dem gleichen architektonischen Prinzip.



**Abbildung 5.12** Überlagerung der Protein-Peptid-Komplexe von Tpr1S (lila) und 14-3-3 (grau). A) Bändermodelle der superpositionierten Domänen. Die N- und C-Termini der Domänen und Peptide sind gekennzeichnet. B) Die Reste der zweifachen Carboxylat-Klammer von Tpr1S superpositionieren gut mit funktionell wichtigen Resten von 14-3-3.

Die Überlagerung der beiden Domänen zeigt deutlich, dass für die N-terminalen fünf Helices von 14-3-3 kein strukturelles Äquivalent in Tpr1S existiert. Interessanter Weise interagiert dieser Bereich von 14-3-3 ausschließlich mit der Phosphatgruppe des phosphorylierten Serins, bildet jedoch keine Bindungen mit den verbleibenden Peptidresten aus. Umgekehrt existiert für die beiden C-terminalen Helices von Tpr1S kein strukturelles Äquivalent in 14-3-3. Dies erlaubt die Interpretation, dass die Molekülbereiche außerhalb des gemeinsamen Kerns für eine spezialisierte und somit spezifische Peptidinteraktion mitverantwortlich sind.

## 6 Literaturverzeichnis

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. und Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.

Agashe, R.V. und Hartl, F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Cell & Devel. Biol.* 11, 15-25.

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.

Blundell, T.L. und Johnson, L.N. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London.

Bose, S., Weikl, T., Bugl, H. und Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90 associated proteins. *Science* 274, 1715-1717.

Bränden, C.I. und Jones, T.A. (1990). Between Objectivity and Subjectivity. *Nature* 343, 687-698.

Brinker, A. (1998, 1999). Persönliche Mitteilungen.

Brünger, A.T. (1992). Free R Value: A novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature* 355, 472-475.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. und Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* 54, 905-921.

Buchner, J. (1999). Hsp90 & co. – a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* 24, 136-141.

Buerger, M.J. (1977). *Kristallographie*. de Gruyter, New York.

Carrello, A., Ingle, E., Minchin, R.F., Tsai, S. und Ratajczak, T. (1999). The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.* 274, 2682-2689.

CCP4: Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite. Programs for protein crystallography. *Acta Cryst D* 50, 760-763.

Chen, S. und Smith, D.F. (1998). Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 273, 35194-35200.

- Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R.A., Honore, B. und Smith, D.F. (1996). Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins Hsp90 and Hsp70. *Mol. Endocrinol.* 10, 682-693.
- Chen, S., Sullivan, W.P., Toft, D.O. und Smith, D.F. (1998). Differential interactions of p23 and the Tpr-containing proteins Hop, CyP40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaperones* 3, 118-129.
- Cowtan, K.D. und Main, P. (1993). Improvement of Macromolecular Electron-Density Maps by the Simultaneous Application of Real and Reciprocal Space Constrains. *Acta Cryst. D* 50, 760-763.
- Das, A.K., Cohen, P.W. und Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17, 1192-1199.
- Demand, J., Luders, J. und Höhfeld, J. (1998). The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell Biol.* 18, 2023-2028.
- Dodson, E., Kleywegt, G.J. und Wilson, K. (1996). Report of a Workshop on the Use of Statistical Validators in Protein X-Ray Crystallography. *Acta Cryst. D* 52, 228-234.
- Dolinski, K.J., Cardenas, M.E. und Heitman, J. (1998). CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell Biol.* 18, 7344-7352.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. und MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptid-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076.
- Drenth, J. (1994). Principles of Protein X-ray Crystallography. Springer-Verlag, New York.
- Ducruix, A. und Grige, R. (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford.
- Ellis, R.J. (1999). Molecular chaperones: pathways and networks. *Curr. Biol.* 9, 137-139.
- Engh, R.A. und Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein Structure Refinement, *Acta Cryst. A* 47, 392-400.
- Esnouf, R.M. (1999). Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Cryst. D* 55, 938-940.
- Feldman, D.E. und Frydman, J. (2000). Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 10, 26-33.

- Freeman, B.C., Toft, D.O. und Morimoto, R.I. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin CyP-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* 274, 1718-1720.
- Giacovazzo, C. (Editor) (1992). *Fundamentals of Crystallography*. Oxford University Press, Oxford.
- Goebel, M. und Yanagida, M. (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem. Sci.* 16, 173-177.
- Grenert, J.P., Johnson, B.D. und Toft, D.O. (1999). The importance of ATP binding and hydrolysis by Hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J. Biol. Chem.* 274, 17525-17533.
- Guex, N. und Peitsch, M.C. (1997). Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Harker, D. und Kasper, J.S. (1948). Phases of Fourier Coefficients Directly from Crystal Diffraction Data. *Acta Cryst.* 1, 70-75.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hartson, S.D. und Matts, R.L. (1994). Association of Hsp90 with cellular Src-family kinases in a cell-free system correlates with altered kinase structure and function. *Biochemistry* 33, 8912-8920.
- Hartson, S.D., Ottinger, E.A., Huang, W., Barany, G., Burn, P. und Matts, R.L. (1998). Modular folding and evidence for phosphorylation-induced stabilization of an Hsp90-dependent kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 8475-8482.
- Hendrickson, W.A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* 254, 51-58.
- Honore, B., Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Vandekerck-Hove, J. und Celis, J.E. (1992). Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the Tpr motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein Sti1. *J. Biol. Chem.* 267, 8485-8491.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltmolekülmethode - Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannter Molekülstruktur. *Acta Cryst.* 10, 750-751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Cryst. A* 19, 353-356.
- Irmer, H. und Höfeld, J. (1997). Characterization of functional domains of the eukaryotic cochaperone Hip. *J. Biol. Chem.* 272, 2230-2235.
- Jack, A. und Levitt, M. (1978). Refinement of large structures by simultaneous minimization of energy and R factor. *Acta Cryst. A* 34, 931-935.

- Jancarik, J. und Kim, S.K. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* 24, 409-411.
- Johnson, J., Corbisier, R., Stensgard, B. und Toft, D. (1996). The involvement of p23, hsp90, and immunophilins in the assembly of progesterone receptor complexes. *J. Steroid Biochem. Mol Biol.* 56, 31-37.
- Johnson, J.L. und Craig, E.A. (1997). Protein folding in vivo: unravelling complex pathways. *Cell* 90, 201-204.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. und Kjeldgaard, M. (1991). Improved Methods For Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Cryst. A* 47, 110-119.
- Kabsch, W. (1988). Evaluation of Single-Crystal-Xray Diffraction Data from a Position-Sensitive Detector. *J. Appl. Cryst.* 21, 916-924.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26, 795-800.
- Karle, J. und Hauptmann, H. (1950). The Phases and Magnitudes of Structure Factors. *Acta Cryst.* 3, 181-187.
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N. und Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378, 85-88.
- Kleywegt, G.J. und Brünger, A.T. (1996). Checking Your Imagination: Applications of the Free R Value. *Structure* 4, 897-904.
- Konnert, J.H. und Hendrickson, W.A. (1980). A restrained-parameter thermal factor refinement procedure. *Acta Cryst. A* 36, 344-349.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S. und Hieter, P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to Tpr or not to Tpr? *Trends Biochem. Sci.* 20, 257-259.
- Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993). Procheck. A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- Lassle, M., Blatch, G.L., Kundra, V., Takatori, T. und Zetter, B.R. (1997). Stress-inducible, murine protein Sti1. Charakterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 1876-1884.

- Luzzati, V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst. A* 5, 802-810.
- Mann, M. (1990). Electrospray: Its Potential and Limitations as an Ionization Method for Biomolecules. *Organic Mass Spectrometry* 25, 575-587.
- Marsh, J.A., Kalton, H.M. und Gaber, R.F. (1998). Cns1 is an essential protein associated with the Hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40 - dependent functions in *cpr7delta* cells. *Mol. Cell Biol.* 18, 7353-7359.
- Maruya, M., Sameshima, M., Nemoto, T. und Yahara, I. (1999). Monomer arrangement in Hsp90 dimer as determined by decoration with N- and C-terminal region specific antibodies. *J. Mol. Biol.* 285, 903-907.
- Massa, W. (1994). Kristallstrukturbestimmung. Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart.
- Matthews, B.W. (1968). Solvent Content in Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- McPherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals. John Wiley & Sons, New York.
- McPherson, A. (1990). Current Approaches to Macromolecular Crystallization. *Eur. J. Biochem.* 189, 1-23.
- McRee, D.E. (1993). Practical Protein Crystallography. Academic Press, London.
- Merritt, E.A. (1999). Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement. *Acta Cryst. D* 55, 1109-1117.
- Merritt, E.A. und Bacon, D.J. (1997). Raster3D: Photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzym.* 276, 505-524.
- Morishima, Y., Kanelakis, K.C., Silverstein, A.M., Dittmar, K.D., Estrada, L. und Pratt, W.B. (2000). The Hsp organizer Hop enhances the rate of but is not essential for Glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system. *J. Biol. Chem.* 275, 6894-6900.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. und Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889-897.
- Nathan, D.F., Vos, M.H. und Lindquist, S. (1997). In-vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94, 12949-12956.
- Navazza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst. A* 50, 157-163.
- Netzer, W.J. und Hartl, F.U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 23, 68-73.

- Nicholls, A., Bharadwaj, R. und Honig, B. (1993). Grasp - Graphical Representation and Analysis of Surface Properties. *Biophys. J.* 64, A166.
- Obermann, W.M.J., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P. und Hartl, F.U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell. Biol.* 143, 901-910.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzym.* 276 A, 307-326.
- Owens-Grillo, J.K., Hoffmann, K., Hutchison K.A., Yem, W., Deibel, M.R., Handschumacher, R.E und Pratt, W.B. (1995). The Cyclosporin A-binding immunophilin CyP40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on Hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 20479-20480.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4, 2411-2423.
- Pahl, A., Brune, K. und Bang, H. (1997). Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms. *Cell Stress & Chaperones* 2, 78-86.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* 17, 4829-4836.
- Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A. und Dougherty, W.G. (1994). Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant Virus Proteinase. *Anal. Biochem.* 216, 413-417.
- Parsell, D.A. und Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
- Patterson, A.L. (1934). A Fourier Series Method for the Determination of Components of Interatomic Distances in Crystals. *Phys. Rev.* 46, 372-376.
- Patterson, A.L. (1935). A Direct Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Z. Kris.* 90, 517-542.
- Perrakis, A., Sixma, T.K., Wilson K.S. und Lamzin V.S. (1997). wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models. *Acta Cryst. D* 53, 448-455.
- Polayes, D.A., Goldstein, A., Ward, G. und Huges, A.J. (1996). TEV Protease, Recombinant: A Site-Specific Protease for Efficient Cleavage of Affinity Tags from Expressed Proteins. *Focus* 18, 50.

- Prapapanich, V., Chen, S. und Smith, D.F. (1998). Mutations of Hip's carboxy-terminal region inhibits a translational stage of progesterone receptor assembly. *Mol. Cell Biol.* 18, 944-952.
- Pratt, W.B. und Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306-360.
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1997B). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90, 65-75.
- Prodromou, C., Roe, S.M., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1997A). A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat. Struct. Biol.* 4, 477-482).
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (Tpr)-domain co-chaperones. *EMBO J.* 18, 754-762.
- Ramachandran, G.N. und Sasisekharan, V. (1968). Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Prot. Chem.* 23, 282-438.
- Ramakrishnan, V. und Biou, V. (1997). Treatment of multiwavelength anomalous diffraction data as a special case of multiple isomorphous replacement. *Meth. Enzym.* 276 A, 538-557.
- Ratajczak, T. und Carrello, A. (1996). Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping its Hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for Hsp90 binding. *J. Biol. Chem.* 271, 2961-2965.
- Rossmann, M.G. (1972). *The Molecular Replacement Method*. Gordon und Breach, New York.
- Rossmann, M.G. und Blow, D.M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst. A* 15, 24-31.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Scheibel, T., Weikl, T. und Buchner, J. (1998). Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP-dependence. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95, 1495-1499.
- Sheldrick, G.M. und Schneider, T.R. (1997). SHELXL: High-resolution refinement. *Meth. Enzym.* 276, 319-343.
- Sigler, P.B., Xu, Z., Rye, H.S., Burston, S.G., Wayne, A.F. und Horwich, A.L. (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 581-608.

- Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M. und Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in Cdc23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* 60, 307-317.
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M. und 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.* 272, 16224-16230.
- Silverstein, A.M., Grammatikakis, N., Cochran, B.H., Chinkers, M. und Pratt, W.B. (1998). p50(Cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on Hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J. Biol. Chem.* 273, 20090-20095.
- Smith, D.F. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes and an Hsp70-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 7, 1418-1429.
- Smith, D.F. (2000). Chaperones in progesterone receptor complexes. *Cell & Devel. Biol.* 11, 45-52.
- Smith, D.F., Whitesell, L. und Katsanis, E. (1998). Molecular Chaperones: Biology and Prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol. Reviews* Vol. 50/4, 493-513.
- Songyang, Z. (1999). Recognition and regulation of primary-sequence motifs by signaling modular domains. *Prog. Biophys. & Mol. Biol.* 71, 359-372.
- Stancato, L.F., Chow, Y.H., Hutchison, K.A., Perdew, G.H., Jove, R. und Pratt, W.B. (1993). Raf exists in a native heterocomplex with Hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 268, 21711-21716.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U. und Pavletich, N.P. (1997). Crystal Structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Stepanova, L., Leng, X., Parker, S.B. und Harper, J.W. (1996). Mammalian p50<sup>Cdc37</sup> is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.* 10, 1491-1502.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- van den Berg, B., Ellis, R.J., Dobson, C.M. (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* 18, 6927-6933.

- Velten, M., Villoutreix, B.O. und Ladjimi, M.M. (2000). Quaternary structure of the Hsc70 cochaperone Hip. *Biochemistry* 39, 307-315.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A. und Thornton, J.M. (1995). Ligplot - a Program to Generate Schematic Diagrams of Protein Ligand Interactions. *Prot. Eng.* 8, 127-134.
- Wang, B.C. (1985). Resolution of Phase Ambiguity in Macromolecular Crystallography. *In: Wyckoff et al.*, 1985.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. und Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-137.
- Woolfson, M.M. (1970). X-Ray Crystallography. Cambridge University Press, London.
- Wyckoff, H., Hirs, C.H.W. und Timasheff, S.N. (Editoren)(1985). Diffraction Methods for Biological Macromolecules. *Meth. Enzym.* 115.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J. und Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.
- Young, J.C., Obermann, W.M.J. und Hartl, F.U. (1998). Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.* 273, 18007-18010.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenz von Hop

SWISS-PROT Eintrag: P31948

Sequenz: 543 Aminosäuren

Molekulargewicht: 62639 Da

1	11	21	31	41
MEQVNELKEK	GNKALSVGNI	DDALQCYSEA	IKLDPHNHVL	YSNRSAAAYAK
51	61	71	81	91
KGDYQKAYED	GCKTVDLKPD	WGKGYSRCAA	ALEFLNRFEE	AKRTYEGLK
101	111	121	131	141
HEANNPQLKE	GLQNMEARLA	ERKFMNPFNM	PNLYQKLESD	PRTRTLSDP
151	161	171	181	191
TYRELIEQLR	NKPSDLGTKL	QDPRIMTTLS	VLLGVDLGSM	DEEEIATPP
201	211	221	231	241
PPPPPKKETK	PEPMEEDLPE	NKKQALKEKE	LGNDAYKKKD	FDTALKHYDK
251	261	271	281	291
AKELDPTNMT	YITNQAAVYF	EKGDYNKCRE	LCEKAIEVGR	ENREDYRQIA
301	311	321	331	341
KAYARIGNSY	FKEEKYKDAI	HFYNKSLAEH	RTPDVLKKCQ	QAEKILKEQE
351	361	371	381	391
RLAYINPDLA	LEEKNKGNEC	FQKGDYPQAM	KHYTEAIKRN	PKDAKLYSNR
401	411	421	431	441
AACYTKLLEF	QLALKDCEEC	IQLEPTFIKG	YTRKAAALEA	MKDYTEKAMDV
451	461	471	481	491
YQKALDLSS	CKEAADGYQR	CMMAQYNRHD	SPEDVKRRAM	ADPEVQQIMS
501	511	521	531	541
DPAMRLILEQ	MQKDPQALSE	HLKNPVIAQK	IQKLMDVGLI	AIR

## 7.2 Abkürzungen

$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
(v/v)	Volumenanteil in Prozent
(w/v)	Masse pro Volumen in Prozent
Å	Angström (= 0.1 nm)
aa	<i>engl.</i> amino acid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>engl.</i> base pairs
C70_12	12 C-terminale Aminosäuren von Hsc70
C90_5	5 C-terminale Aminosäuren von Hsp90
ca.	circa
CCT	<i>engl.</i> chaperonin-containing TCP-1
Cdc	<i>engl.</i> cell division cycle
Chip	<i>engl.</i> carboxyl terminus Hsc70-interacting protein
CyP	<i>engl.</i> cyclophilin
Da	Dalton
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron, Hamburg
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble
FKBP	<i>engl.</i> FK-506 binding protein
FOM	<i>engl.</i> figure of merit
FPLC	<i>engl.</i> fast performance liquid chromatography
g	Gramm
GA	Geldanamycin
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
Hip	<i>engl.</i> Hsc70 interacting protein
Hop	<i>engl.</i> heatshock organizing protein (auch p60)
Hsp	<i>engl.</i> heat shock protein
IMAC	<i>engl.</i> immobilized metall affinity chromatography

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITC	<i>engl.</i> isothermal titration calorimetry
k	Kilo ( $10^3$ )
$K_d$	thermodynamische Bindungskonstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
m	milli ( $10^{-3}$ )
MAD	<i>engl.</i> multiple anomalous dispersion
MES	Morpholinoethansulfonat
MIR	<i>engl.</i> multiple isomorphous replacement
MR	<i>engl.</i> molecular replacement
$M_w$	Molekulargewicht
n	nano ( $10^{-9}$ )
NMR	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
NSLS	National Synchrotron Light Source, Brookhaven
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>engl.</i> Protein Data Base
PDZ	<i>engl.</i> Protein domain Z
PEG	Polyethylenglykol
PEG MME	Polyethylenglykol Monomethylether
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP5	Serin/Threonin-Phosphatase 5
RMSD	<i>engl.</i> root mean square deviation
SDS	Natriumdodecylsulfonat
SGT	<i>engl.</i> small glutamine-rich Tpr protein
T	Temperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>engl.</i> Tobacco Etch Virus
Tom	<i>engl.</i> translocases of the outer mitochondrial membrane
Tpr	<i>engl.</i> tetratricopeptide repeat
TriC	<i>engl.</i> TCP-1 ring complex

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der wichtigsten Chaperonsysteme . . . . .	6
2.2	Domänenstruktur von Hsp90 . . . . .	7
2.3	Faltung und Regulierung des Progesteronrezeptors durch das Hsp90-System . . .	9
2.4	Aufbau von Hop . . . . .	11
2.5	Schematische Darstellung einiger Tpr-Proteine . . . . .	12
3.1	Flussdiagramm einer Röntgenstrukturanalyse . . . . .	26
3.2	Schematische Darstellung der Dampfdiffusionsmethode . . . . .	30
4.1	Identifizierung des proteaseresistenten Fragments Tpr2B . . . . .	33
4.2	Proteaseresistente Fragmente von Hop . . . . .	34
4.3	SDS-Gel aller isolierten Proteine . . . . .	35
4.4	Massenspektren von Tpr2A . . . . .	36
4.5	Kristalle der Tpr1L-Domäne . . . . .	40
4.6	Bändermodell der Kristallstruktur von Tpr1L . . . . .	42
4.7	Oberflächendarstellung von Tpr1L . . . . .	43
4.8	Schematische Abbildung des Kristallkontaktes von Tpr1L . . . . .	44
4.9	Beugungsbild von Tpr1S . . . . .	47
4.10	Elektronendichte und Schwingungsellipsoide von Tpr1S (aa27 – aa29) . . . . .	49
4.11	Bändermodell der Komplexstruktur von Tpr1S/C70_12 . . . . .	53
4.12	Oberflächendarstellung von Tpr1S/C70_12 . . . . .	54
4.13	Schematische Darstellung der Domänen-Peptid-Interaktion von Tpr1S/C70_12 .	55
4.14	Anomales Streuverhalten von Nickel und Selen . . . . .	59
4.15	Bändermodell der Komplexstruktur von Tpr2A/C90_5 . . . . .	62
4.16	Oberflächendarstellung von Tpr2A/C90_5 . . . . .	63
4.17	Schematische Darstellung der Domänen-Peptid-Interaktion von Tpr2A/C90_5 .	64
4.18	Ramachandranplot von Tpr2S . . . . .	69
4.19	Bändermodell und Oberflächendarstellung von Tpr2S . . . . .	70

5.1	Bindungskonstanten der Tpr1S-Domäne . . . . .	72
5.2	C-terminale Sequenzkonservierung der Hsp70-Familie . . . . .	73
5.3	Superposition der peptidfreien und peptidgebundenen Tpr1S-Domäne . . . . .	73
5.4	Bindungskonstanten der Tpr2A-Domäne . . . . .	74
5.5	C-terminale Sequenzkonservierung der Hsp90-Familie . . . . .	75
5.6	Bindungskonstanten der Tpr2B-Domäne . . . . .	76
5.7	Superposition von Tpr2A/C90_5 und Tpr2B . . . . .	76
5.8	Superposition der peptidfreien und peptidgebundenen Tpr2A-Domäne . . . . .	77
5.9	Superposition der Carboxylat-Klammern von Tpr1S und Tpr2A . . . . .	79
5.10	Vergleich der Domänen-Krümmungen von Tpr1S und Tpr2A . . . . .	80
5.11	Bändermodell des Rezeptor-Peptid-Komplexes von Tom20 . . . . .	84
5.12	Überlagerung der Peptid-Domänen-Komplexe von Tpr1S und 14-3-3 . . . . .	86

## 7.4 Tabellenverzeichnis

2.1	Partnerproteine von Hsp90 . . . . .	8
2.2	Tpr-Konsensus . . . . .	12
3.1	Liste der genutzten Strahlungsquellen . . . . .	31
4.1	Molekulargewichte der verwendeten Proteine . . . . .	36
4.2	Ergebnisse der Kristallisationsansätze . . . . .	37
4.3	Kristallisationsbedingungen der Domänen-Peptid-Komplexe . . . . .	39
4.4	Strukturlösung von Tpr1L: Ergebnisse der Pattersonsuche . . . . .	41
4.5	Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung von Tpr1L . . . . .	41
4.6	Sequenzvergleich der Tpr-Domänen von Hop und PP5 . . . . .	45
4.7	Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung von Tpr1S . . . . .	48
4.8	Statistiken der Datensammlung von Tpr1S / C70_12 . . . . .	50
4.9	Statistiken der Strukturverfeinerung von Tpr1S / C70_12 . . . . .	51
4.10	Statistiken der Datensammlung an Tpr2A / C90_5 . . . . .	57
4.11	Statistiken der MAD-Datensammlung und MAD-Phasierung an Tpr2A / C90_5 . . . . .	60
4.12	Statistiken der Strukturverfeinerung von Tpr2A / C90_5 . . . . .	61
4.13	Statistiken der Datensammlung und MAD-Phasierung an Tpr2S . . . . .	66

---

4.14	Strukturlösung von Tpr2S: Ergebnisse der Pattersonsuche . . . . .	67
4.15	Statistiken der Strukturverfeinerung von Tpr2S . . . . .	68
5.1	Standardabweichungen nach Superposition der Tpr-Domänen von Hop und PP5	81
5.2	Sequenzvergleich verschiedener Tpr-Domänen . . . . .	83