

2 Theorie

2.1 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind molekulare Chaperone in der Zelle, die anderen Proteinen, ihren Klientenproteinen, bei der Entfaltung oder Faltung ihrer Sekundärstrukturen in zellulären Stresssituationen helfen. Sie besitzen keinerlei Informationen über die korrekte Faltung der Klienten, sondern unterstützen durch ihre Bindung die Proteine bei ihrem Faltungsprozess, indem sie Aggregationen oder fehlerhafte Interaktionen zu anderen Molekülen vermeiden. Sie sind essentiell für das Überleben des Organismus und spielen eine wichtige Rolle in der Zelle. So sind sie bei der Signaltransduktion, bei der Kontrolle des Zellzyklus, beim Stressmanagement und beim Transport von Proteinen involviert.⁷ Die Expression dieser Gene ist nicht nur stark hitzeinduzierbar, sondern kann auch auf andere Umwelteinflüsse, wie UV-Strahlung, Sauerstoffmangel, Anwesenheit von Ethanol oder Schwermetalle zurückgeführt werden.⁸

Die Hitzeschockproteine werden in fünf Familien (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und kleine Hsps) eingeteilt. Diese Familien unterscheiden sich einerseits in ihrer Molekülmasse, so haben z.B. die bekanntesten Hitzeschockproteine der Hsp90-Familie alle eine Masse von ca. 90 kDa und andererseits sind die Familien auf Grund ihres genetischen und biochemischen Hintergrunds eingeteilt. Das Hitzeschockprotein Hsp90 α der Hsp90-Familie hat in den letzten zehn Jahren große Bedeutung in der Krebstherapie bekommen. Auch bei anderen Krankheiten wie Malaria oder bakteriellen Erkrankungen werden Hitzeschockproteine als Target zur Bekämpfung der Krankheiten immer interessanter.⁹

⁷ Chen, B. et al. (2006)

⁸ Richter, K. et al. (2010)

⁹ Javid, B. et al. (2007)

2.1.1 Evolution der Hitzeschockproteine

Die Hsp90-Familie ist in einer Vielzahl von Organismen zu finden. Sie ist sehr konserviert und besitzt ein hohes evolutionäres Alter. Durch Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* wurde herausgefunden, dass 10 % aller zellulären Proteine direkt oder indirekt von den Proteinen der Hsp90-Familie abhängig sind. Es sind zum einen Proteine, die die Chaperonen zum Falten, Stabilisieren oder Aktivieren ihrerseits brauchen und zum anderen sind es Co-Chaperone, die die Hsp90-Proteine in ihren Funktionen unterstützen.¹⁰ Die Hsp90-Familie kann in fünf Unterfamilien eingeteilt werden, vier davon sind in Eukaryoten vorhanden, eine in den Prokaryoten. In Eukaryoten sind die Hsp90 Gene Bestandteil des Kern-Genoms, doch kommen die vier verschiedenen Isoformen des eukaryotischen Hsp90 in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor. Im Cytosol gibt es zwei Formen, das Hsp90 α (induzierbare Form) und das Hsp90 β (konstitutive Form). Sie sind zu 85 % identisch und sind durch eine Genduplikation vor rund 500 Millionen Jahren entstanden. Die beiden Proteine werden als Hsp90A-Unterfamilie zusammengefasst. Unter stressfreien Bedingungen macht Hsp90 1-2 % der Cytosolproteine aus, wohingegen sich durch Stress ihre Konzentration in der Zelle verdoppeln oder gar verdreifachen kann.¹¹ Es sind die am besten untersuchten Proteine der Hsp90-Familie.

Ein anderes Protein der Familie ist Grp94 (glucose-regulated protein), auch bekannt als Hsp90B, das im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist. Bis auf Pilze haben alle Eukaryoten dieses Protein der Hsp90-Familie. Grp94 unterstützt die Zelle bei Stress und hilft beim Abbau von falsch gefalteten Proteinen auf dem ER-assoziierten Abbauweg. Bekannte Grp94 abhängige Proteine sind unter anderem der IGF-2 (insulin-like growth factor), Immunoglobuline und andere Signaltransduktions vermittelnde PRRs (pattern recognition receptors).¹²

¹⁰ Zuehlke, A and Johnson, J. L. (2010)

¹¹ Chen, B. et al. (2006)

¹² Chen, B. et al. (2006)

Die dritte Unterfamilie bildet das Protein TRAP-1 (tumor necrosis factor receptor associated protein 1). Es beschützt das Mitochondrium vor oxidativem Stress. Dieses Hitzeschockprotein ähnelt am meisten dem bakteriellen Vertreter, der Hsp90-Familie, dem HtpG.¹³ Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass sie endosymbiontischen Ursprungs sind. Es scheint eher so, als ob sich das TRAP-1 früh von den anderen drei eukaryotischen Familien getrennt hat und somit dem HtpG sehr ähnlich ist. TRAP-1 hat als einziger Vertreter ein einzigartiges LxCxE Motiv, welches nicht in den anderen Mitgliedern der Hsp90-Familie vorkommt.

Das Motiv sorgt für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Außerdem benötigt das *trap* Gen anders als die anderen Hitzeschockgene Stresskinasen für seine Transkription.¹⁴ Im Gegensatz zu den eukaryotischen Proteinen hat das HtpG keine essentielle Aufgabe bei nicht-Stressbedingungen in Bakterien. Eine Deletion des *htpG* auf dem *E. coli* Chromosom hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterienkultur. Erst mit einem Temperaturanstieg von 37 auf 40 °C wird es relevant für Bakterien.¹⁵ Die Aminosäuresequenz des HtpG aus *E. coli* ist zu 37 % identisch zu der des humanen Hsp90α. HtpG kommt aber nicht in Archaeabakterien vor, da ihnen das Gen komplett fehlt. Sie haben nur Gene für kleinere Hitzeschockproteine.

Die letzte Unterfamilie ist das Hsp90C, welches in den Chloroplasten von Pflanzen vorhanden ist. Alle vier eukaryotischen Hsp90-Unterfamilien hatten einen HtpG ähnlichen Vorfahren und es wird vermutet, dass sich die Unterfamilien Hsp90A und Hsp90C aus der ER-lokalisierten Unterfamilie Hsp90B entwickelt haben. TAIPALE ET AL. (2010) haben Organismen, die Hitzeschockproteine der Hsp90-Familie besitzen, in ihre Unterfamilie eingegliedert und in einen polygenetischen Baum zusammengefasst (Abb. 1)¹⁶. Die Länge der Äste symbolisiert die genetische Distanz zwischen den Organismen. Eine genetische Distanz von null bedeutet, dass die Proteine identisch sind. Wohingegen eine genetische Distanz von eins besagt, dass keine Verwandtschaft zwischen den zwei Proteinen besteht.

¹³ Chen, B. et al. (2006)

¹⁴ Taipale, M. et al. (2010)

¹⁵ Schulz, A. et al. (1997)

¹⁶ Taipale, M. et al. (2010)

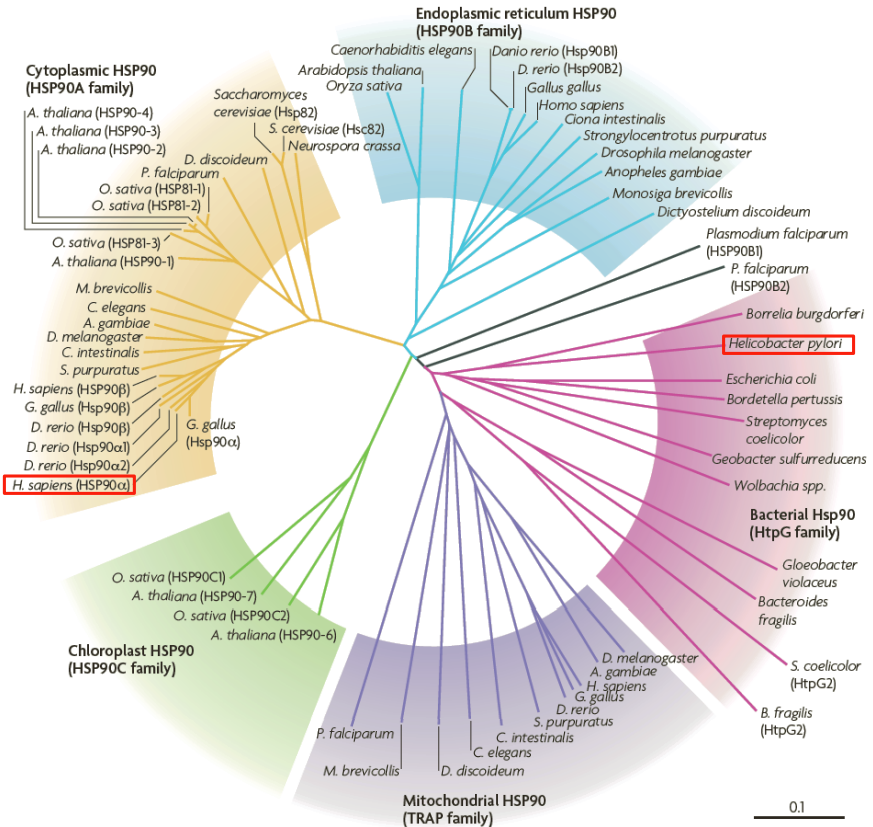


Abbildung 1: Polygenetischer Baum der Organismen, die Hitzeschokproteine der Hsp90-Familie besitzen. Die Hsp90-Familie besteht aus fünf Unterfamilien Hsp90A, Hsp90B, Hsp90C, TRAP und HtpG. Die Länge der Äste symbolisiert die genetische Distanz zwischen den Organismen. Die für die Arbeit relevanten Organismen *H. sapiens* und *H. pylori* wurden hervorgehoben. (abgeleitet von ¹⁷)

Die für die Masterarbeit relevanten Hitzeschokproteine aus den Organismen *H. sapiens* und *H. pylori* wurden nachträglich rot in der Abbildung umrandet. Die genetische Distanz ist sehr groß, ungefähr 0,6, da ihre Hsp90-

¹⁷ TAIPALE, M. ET AL. (2010)

Proteine aus zwei verschiedenen Unterfamilien stammen. Das Hitzeschockprotein von *H. pylori* gehört der bakteriellen HtpG-Unterfamilie und das Hsp90 α aus *H. sapiens* der Hsp90A-Unterfamilie an.

Während der Evolution hatten die Proteine der Hsp90-Familie in Eukaryoten einen bedeutenden Einfluss auf die Ausbildung von Phänotypen durch genetische Variationen. Die Chaperone mussten und müssen noch heute Proteine richtig falten, auch wenn es zu genetischen Veränderungen der DNA durch Stressoren kam/kommt. Außerdem unterstützen Hsp90-Proteine viele spezifische Signalüberträger und liegen somit an der Schnittstelle zu vielen Entwicklungswegen. Bei sehr großem Umweltstress werden selbst die Hitzeschockproteine inaktiv und es kann zu phänotypischen Veränderungen des Organismus kommen. Zuvor verborgene Genvarianten rücken dann mehr in den Vordergrund. Diese „benachteiligten“ Varianten kamen zuvor durch Hsp90 Pufferung nicht zum Vorschein. In *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* und *Danio rerio* wurden bei Ausschaltung von Hsp90-Proteinen, neue Phänotypen sichtbar, die auf genetischen Hintergrund zurückzuführen sind. In den sonst so komplexen Entwicklungsprozessen kann somit die evolutionäre Veränderung gefördert werden, wenn ein neuer Phänotyp von Vorteil ist.¹⁸

2.1.2 Genregulation und Genexpression der Hitzeschockproteine

Die Genregulation der Hitzeschockproteine ist in Eukaryoten und Prokaryoten unterschiedlich. In *E. coli* wird die Expression der Hitzeschock-gene durch zwei Sigmafaktoren, σ^{32} und σ^{24} reguliert. In Abbildung 2 wird die Regulation von Hitzeschockgenen durch den σ^{32} in *E. coli* in einem Model zusammengefasst. Sigmafaktoren sind bakterielle Proteine und für die Initiation der Transkription der DNA notwendig sind. Sie binden an die RNA-Polymerase. Die 32 kDa große RNA-Polymerase Untereinheit σ^{32} ist durch das Gen *rpoH* kodiert. Sie modifiziert die Promotor Erkennungsstelle der RNA-Polymerase und ermöglichen somit eine bessere Bindung an die DNA. 31 Hitzeschock-gene werden von Transkriptionsfaktor σ^{32} reguliert und Transkriptionsfaktor

¹⁸ Rutherford, S. and Lindquist, S. (1998)

σ^{24} aktiviert die Expression von ungefähr zehn Genen.¹⁹ Unter normalen Bedingungen werden die Sigmafaktoren ständig sehr schwach synthetisiert. Bedingt durch ihre Instabilität sind pro Zelle nur 10-30 Moleküle vorhanden. Bei einem Temperaturanstieg von 37 auf 40 °C kommt es zu einem Anstieg der aktiven *rpoH* mRNA Menge und die Konzentration von σ^{32} nimmt um das 15-20fache zu. Der dramatische Anstieg des Sigmafaktors lässt sich durch zwei Phänomene erklären, eines auf dem post-transkriptionalen und das andere auf dem post-translationalen Level. Unter stressfreien Bedingungen gibt es einen translationalen Silencer innerhalb des monocistronischen Transkripts, der die Bindung des Ribosoms an die mRNA verhindert. Eine andere Region auf der mRNA führt dazu, dass die mRNA Sekundärstrukturen ausbilden. Beim Hitzeschock entfaltet sich die mRNA einerseits durch die erhöhte Temperatur, andererseits wird sie durch Interaktion mit der RNA Helicase stabilisiert und die intakte mRNA kann abgelesen werden. Der zweite Grund für die erhöhte Konzentration des σ^{32} in der Zelle ist, dass das Protein bei Temperaturerhöhung eine erhöhte Halbwertszeit von vier Minuten statt 40 Sekunden bekommt. Dies kommt durch die Stabilitätshilfe des Chaperon DnaK zustande.²⁰

σ^{32} bindet an die RNA-Polymerase und ist somit der Aktivator der Hitzeschockgenexpression. Es handelt sich bei diesem Vorgang um eine positive Regulation. Die RNA-Polymerase transkribiert viele hitzeinduzierte Gene, die für Chaperone, Proteasen und DNA-Reparaturenzyme kodiert sind. Darunter auch die Chaperon HtpG.²¹ Für das HtpG besitzen die Bakterien null bis zwei Gene und wie fast alle prokaryotischen Gene besitzt es nur ein Exon. Die HtpG-Proteine sind je nach Bakterium 588 - 681 AS lang und sind somit die kürzesten Hitzeschockproteine der Hsp90-Familie. Sie haben ein Molekulargewicht zwischen 66,7 - 78,0 kDa, sind sehr variabel und besitzen keine für sie kennzeichnende Sequenz.²²

Wenn sich die extremen Umweltbedingungen wieder gelegt haben, sorgen negative Regulatoren (DnaK, DnaJ, GrpE) dafür, dass sich σ^{32} von der

¹⁹ Taipale, M. et al. (2010)

²⁰ Schumann, W. (1996)

²¹ Taipale, M. et al. (2010)

²² Chen, B. et al. (2006)

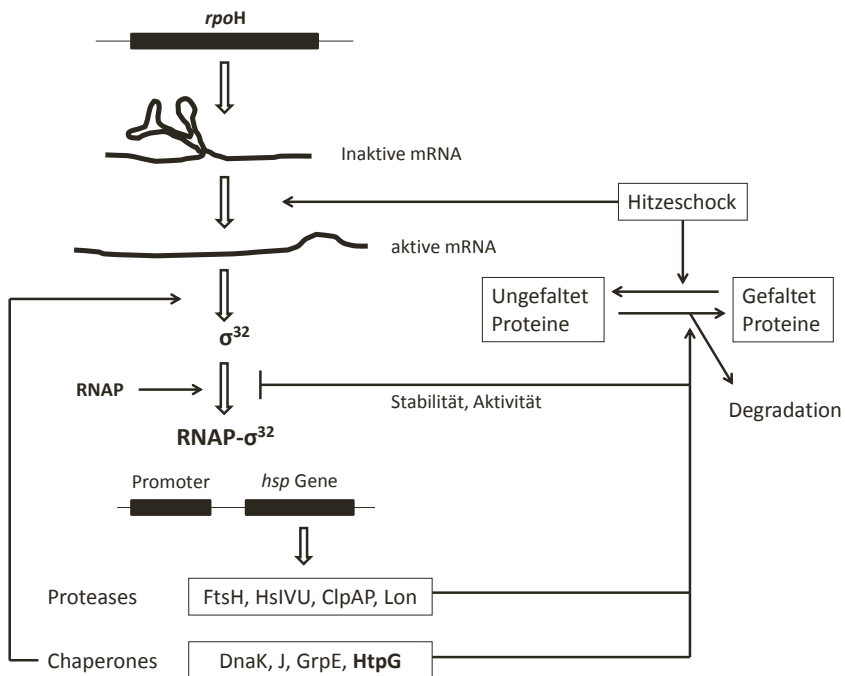


Abbildung 2: Modell der Regulation von Hitzeschockgenen durch den Sigmafaktor 32 in *E. coli*

RNA-Polymerase löst, die Stabilität des Sigmafaktors aufgehoben und die Translation von *rpoH* herunter reguliert wird.²³ Die Initiation der Synthese von eukaryotischen Hsp90 erfolgt durch spezifische Transkriptionsfaktoren. Diese werden durch Zellstress und insbesondere durch erhöhte Temperaturen aktiviert. In Vertebraten gibt es 4 - 16 Gene für alle vier eukaryotischen Hitzeschockproteine der Hsp90-Familie. Sie werden durch den Transkriptionsfaktor HSF1 (heat shock factor protein 1) kontrolliert und induziert. Unter normalen Bedingungen ist HSF1 ein Klient von Hsp90 und wird durch Hsp90 und Hsp70 als Monomer in einer inaktiven Form gehalten. Durch Umweltstressoren löst sich HSF1 von den Hsps ab, da die Hsp90-Proteine jetzt die degradierten Proteine wieder in ihre Sekundärstrukturen falten müssen und nicht mehr

²³ Schumann, W. (1996)

HSF1 binden können. Somit wird HSF1 aktiv und in den Zellkern transportiert, wo es trimerisiert und phosphoryliert wird. HSF1 bindet an cis-ähnliche DNA Sequenzelemente (HSEs) des Hsp-Promoters und die Expression von Hsp90 wird durch die Anwesenheit von HSF1 verdoppelt. Somit hat Hsp90 unter anderem auch einen Einfluss auf seine eigene Expression. Es gibt noch mehrere Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Hsp90 beeinflussen; zum Beispiel STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), der synergetisch mit HSF1 interagiert, wohingegen STAT3 und HSF1 konträr in ihrer Aktivität sind.²⁴ Die synthetisierten Proteine der Hsp90A-Unterfamilie sind 756 - 785 AA lang und haben ein Molekulargewicht von 84 - 90,0 kDa. Bei den eukaryotischen Hsp90 kann es noch zu post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung oder S-Nitrosylierung kommen. Dadurch wird seine Funktionalität als Chaperon in Bezug auf die Klientenbindung oder seine ATPase-Aktivität beeinflusst.

2.1.3 Aufbau der Hitzeschockproteine

Der Aufbau von Hsp90 bzw. HtpG ist in allen untersuchten Organismen von Bakterien bis Säugetieren sehr konserviert, da bei Zellstress die Aggregation und Denaturierung von Proteinen im Cytosol verhindert werden soll. Zwischen dem human Hsp90 α und dem HtpG aus *E. coli* herrscht 50 % Sequenzähnlichkeit.²⁵ Sie sind ATP-abhängig und ihre ATPase gehört zur ATP-bindenden GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL) Proteinsuperfamilie. Die ATP-Aktivität ist essentiell damit das Protein richtig in der Zelle funktioniert. Die Hsp90-Proteine sind Homodimere und jedes Monomer besitzt drei Domänen: Die N-terminale ATP-Bindedomäne NTD (25 kDa), die mittlere Domäne MD (55 kDa), an die die Zielproteine des Chaperons binden und die C-terminale Dimerisationsdomäne CTD (10 kDa) (s. Abb. 3b). Wichtige Bereiche in den Domänen sind zum einen das Element in der NTD, das Nukleotiddeckel (lid) genannt wird und zum anderen die katalytische Schleife (loop) in der MD. Sie sind beim Reaktionszyklus des Hsp90 beteiligt (s. 2.1.4).

²⁴ Taipale, M. et al. (2010)

²⁵ Krukenberg, K. A. et al. (2011)

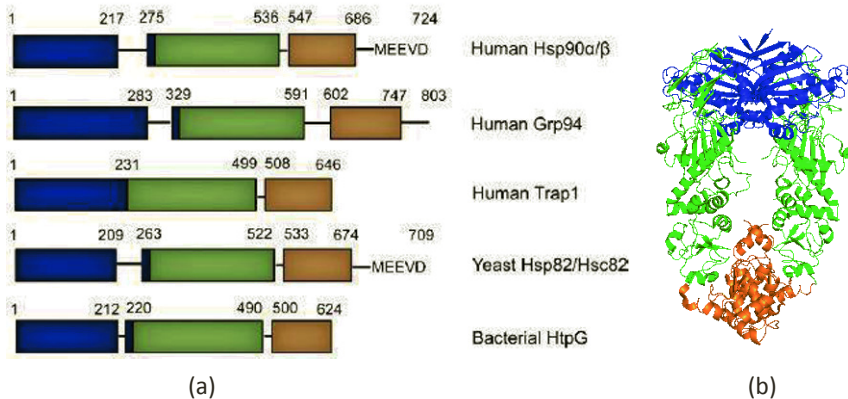


Abbildung 3: (a) Struktureller Aufbau von Hsp90 Homologe unterschiedlicher Organismen. Die drei Domänen wurden farblich dargestellt; die N-terminale ATP-Bindedomäne in blau, die mittlere Domäne in grün und die C-terminale Dimerisationsdomäne in braun. Horizontal ist die Aminosäureposition aufgetragen.²⁶ (b) Kristallstruktur des Hsp90 Homodimers aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die drei Domänen sind in den gleichen Farben wie in (a) dargestellt. (RCSB Protein Data Bank , PDB ID: 2cg9).

Wie auch in Abbildung 3a ersichtlich wird, sind die drei Domänen der Hsp90 Homologen in unterschiedlichen Organismen sehr konserviert und ähnlich groß. Horizontal sind die Aminosäurepositionen aufgetragen und die Domänen sind farblich unterschiedlich dargestellt (NTD blau, MD grün, CTD braun). Die Verbindungsstücke zwischen den Domänen sind die variablen Bereiche, in denen es zu großen strukturellen Unterschieden zwischen den Organismen kommen kann. Zum Beispiel ist zwischen dem NTD und der MD bei den Eukaryoten eine Linkerregion, die überwiegend geladene Aminosäuren enthält und hydrophil ist. Sie ist ca. 60 Aminosäuren lang. Im Gegensatz dazu liegt bei der prokaryotischen Form des Hsp90 nur ein kleiner Abschnitt von acht Aminosäuren zwischen den beiden Domänen.²⁷ Bei der eukaryotischen cytosolischen Form des Hsp90 befinden sich dort Bindestellen für Co-Chape-

²⁶ Krukenberg, K. A. et al. (2011)

²⁷ Tsutsumia, S. et al. (2012)

rone und Klientenproteine. Es ist von einer Reihe von Co-Chaperonen abhängig, die auch an die anderen Domänen des Proteins binden können. Sie regulieren die ATPase Aktivität, stabilisieren die Konformation oder dirigieren Hsp90 α in die richtige Position für eine erfolgreiche Klientenbindung. Das bakterielle HtpG besitzt keine solcher Co-Chaperone.²⁸

2.1.4 Funktion der Hitzeschockproteine

Hsp90-Proteine interagieren mit ihren Klienten in einem dynamischen ATP abhängigen Zyklus, damit sie gefaltet, transportiert oder zu einem Multiproteinkomplex zusammen geführt werden. Sie sind sehr flexible und dynamische Moleküle. Die Proteine der Hsp90-Familie unterliegen alle einer ähnlichen Konformationsänderung und ATPase Aktivität. Während des Reaktionszyklus durchlaufen die Hsp90-Proteine vier verschiedene Konformationsstadien. Die Konformationsänderungen und die Nukleotidbindung sind nicht wie zuvor angenommen voneinander abhängig, sondern geschehen eher zufällig durch Temperaturschwankungen.²⁹ Co-Chaperone und Substrate regulieren diese eventuell mit. Die ATP-Aktivität ist beim humanen Hsp90 α sehr langsam, es werden drei ATP pro Stunde umgesetzt.³⁰ Es ist eine präzise ATPase Aktivität erforderlich, damit das Chaperon richtig funktionieren kann. Mutanten mit einer veränderten ATPase Aktivität zeigen keine Chaperonaktivität.³¹ RATZKE ET AL. fanden 2012 heraus, dass die ATP Bindung und Freilassung sehr viel schneller vonstattengeht, als die ATP Hydrolyse. Bis es zur Hydrolyse kommt, bindet und löst sich das Nukleotid von dem Hsp90 α mehrere Male. Die eigentliche Hydrolyse verläuft dann schnell und ADP wird frei gelassen. Zwischen den ATP Bindungs- und Hydrolysezuständen ist die freie Energiebarriere sehr groß und schwer überwindbar. Dies erklärt die schwache ATPase Aktivität des Hsp90 α .

In der geöffneten Form ist das Monodimer über die CTD dimerisiert und bildet eine V-förmige Gestalt. Ein typischer Chaperon-Zyklus ist in Abbildung

²⁸ Hartl, F. U. et al. (2011)

²⁹ Ratzke, C. et al. (2012)

³⁰ McLaughlin, S. et al. (2004)

³¹ Krukenberg, K. A. et al. (2011)

Protein-Microarrays für die Wirkstoffentwicklung
Herstellung und Charakterisierung eines bakteriellen
Hitzeschockproteins

Schax, E.

2015, XVI, 90 S. 25 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-08802-6