

Kamil Synoradzki

**Badanie oddziaływań ludzkich białek Hsp90
z białkami substratowymi i pomocniczymi**

Promotor:

Dr hab. Paweł Bieganowski



Zakład Farmakologii Doświadczalnej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 2016

Składam serdeczne podziękowanie mojemu promotorowi dr hab. Pawłowi Bieganowskiemu za poświęcony czas, opiekę merytoryczną i cenne wskazówki. Dziękuję Pracownikom Zakładu Farmakologii Doświadczalnej za okazaną pomoc i życzliwość. Szczególne podziękowania składam Rodzicom i Siostrze za wiarę we mnie i olbrzymie wsparcie.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie finansowano ze środków:

Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu badawczego: Badanie oddziaływań specyficznych dla izoform ludzkiego białka Hsp90 z białkami substratowymi i pomocniczymi.(N N303 818640)

Funduszu statutowego IMDiK

Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy częściowo opublikowano w:

Synoradzki K, i P. Bieganowski, Middle domain of human Hsp90 isoforms differentially binds Aha1 in human cells and alters Hsp90 activity in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1853(2): p. 445-52.

Spis treści

Lista skrótów	6
1. Wstęp	8
1.2. Budowa strukturalna Hsp90	9
1.3. Cykl ATPazowy	11
1.4. Białka pomocnicze	13
1.5. Białka substratowe	16
1.6. Izoformy ludzkich cytoplazmatycznych Hsp90	17
1.7. Specyficzny inhibitor ATPazy Hsp90 - 17-AAG	20
2. Cel pracy	22
3. Materiały i metody	23
3.1. Opis przygotowania plazmidów	23
3.2. Eksperymenty z użyciem drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.2.1. Drożdże z ekspresją ludzkiego białka Aha1	28
3.2.2. Drożdże z delecją genów <i>HCHI</i> i <i>AHA1</i>	28
3.2.3. Metody pomiaru wzrostu drożdży	28
3.3. Hodowle komórkowe	29
3.3.2. Ocena wpływu Hsp90 na zawartość białek substratowych w komórkach HEK-293	30
3.3.3. Stabilność heterodimerów	30
3.3.4. Immunoprecypitacja	30
3.3.5. Immunodetekcja	31
3.3.6. Pomiar wzrostu komórek ludzkich HEK-293	31
3.3.7. Pomiar wzrostu komórek ludzkich w zależności od stężenia inhibitora - 17-AAG	32
3.4. Analiza statystyczna	32
4. Wyniki	33
4.1. Wpływ wymiany domen izoform Hsp90 na wzrost produkujących je komórek oraz wiązanie białek pomocniczych	33
4.2. Potrójny kompleks białek Hsp90/Aha1/p23	40
4.3. Analiza obszaru środkowej domeny Hsp90 α	41
4.4. Analiza mutacji we fragmencie środkowej domeny Hsp90	45
4.5. Wpływ zmian w dimeryzacji izoform Hsp90 na ich aktywność	48

4.6. Formowanie struktur heterodimerycznych między zmutowanymi formami Hsp90 β a ich endogennymi odpowiednikami	52
4.7. Zależność izoform Hsp90 od białka Aha1	53
4.8. Oddziaływanie izoform Hsp90 z białkami substratowymi.....	55
4.8.1. Udział Hsp90 w stabilizacji białek cIAP-1 i cIAP-2.....	55
4.8.2. Udział Hsp90 w translokacji kanału jonowego hERG	56
5. Dyskusja.....	59
5.1. Fragmenty środkowej domeny Hsp90 α , warunkujące wolny wzrost drożdży, w komórkach ludzkich odpowiadają za preferencyjne oddziaływanie z Aha1	59
5.2. Zależność izoform Hsp90 od stymulacji przez Aha1	65
5.3. Zmutowane formy Hsp90 odporne na 17-AAG nie tworzą in vivo stabilnych heterodimerów z natywnymi Hsp90.....	66
5.4. Preferencyjne oddziaływanie izoform Hsp90 względem białek-klientów	67
5.5. Mutacja punktowa zmieniająca stabilność dimerów Hsp90, nie mają wpływu na aktywność izoform Hsp90	68
5.6. Podsumowanie	68
6. Wnioski	70
7. Streszczenie.....	71
8. Abstract	73
9. Piśmiennictwo	75

Lista skrótów

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
17-AAG	17-(Allylamino)-17-demethoxy geldanamycin	17-Allylamino-17-demetoksy geldanamycyna
aa.	Amino acids	Aminokwasy
Aha1	Activator of Hsp90 ATPase protein 1	Aktywator ATPazy Hsp90 1
ARS	Autonomously replicating sequence	Sekwencja replikująca się autonomicznie
ATP	Adenosine tri-phosphate	Trifosforan adenozyiny
Cdc37	Cell division cycle 37	Białko pomocnicze dla Hsp90 o masie 44 kDa
Cdk4	Cyclin dependent kinase	Kinaza zależna od cyklin
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Transbłonowy regulator przewodnictwa
cIAP-1	Cellular inhibitor of apoptosis	Cytoplazmatyczne białko hamujące apoptozę
CKII	Casein kinase 2	Kinaza kazeinowa 2
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid	Dwuniciowy kwas rybonukleinowy
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Syntaza tlenku azotu
FKBP52	FK506 binding protein	Białko wiążące inhibitor FK506
Grp94	94-kDa Glucose-regulated protein	Analog białka Hsp90 z siateczki śródplazmatycznej
Hch1	High-copy Hsp90 suppressor	Drożdżowe białko pomocnicze homologiczne z ludzkim Aha1
HCT116	Human colorectal carcinoma cells	Ludzkie komórki nowotworu jelita grubego
HEK-293	Human embryonic kidney cells	Ludzkie embrionalne komórki nerki

HIF1 α	Hypoxia induced factor	Czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją
HOP	Hsp70-Hsp90 organizing protein	Białko pomocnicze łączące Hsp90 i Hsp70
HPT	Human proximal tubule cells	Ludzkie komórki kanalika proksymalnego
HSF1	Heat shock factor 1	Czynnik transkrypcyjny indukowany temperaturą
HSP	Heat shock proteins	Białka szoku cieplnego
HT29	Human colorectal adenocarcinoma	Ludzkie komórki gruczolaka jelita grubego
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins	Białka z rodziny inhibitora apoptozy
IP	Immunoprecipitation	Immunoprecypitacja
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacharyd
MHC	Major histocompatibility complex	Główny układ zgodności tkankowej
MMP-2	Matrix metalloproteinase 2	Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
MutL	DNA mismatch repair protein MutL	Bakteryjne białko naprawy DNA
p23	Hsp90 co-chaperone p23	Białko pomocnicze dla Hsp90 o masie 23 kDa
PBS	Phosphate buffer saline	Bufor fosforanowy
PCR	Polimerase chain reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PKR	Protein kinase R	Kinaza białkowa R
PP5	Protein phosphatase 5	Białkowa fosfataza 5
S.D.	Standard deviation	Odchylenie standardowe
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Dodecylosiarczan sodu
Trap1	Tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein	Mitochondrialny homolog białka Hsp90

1. Wstęp

Białka szoku cieplnego (*ang. Heat shock proteins*) nazywane również białkami opiekuńczymi pełnią kluczową rolę wobec innych białek w komórce. W warunkach fizjologicznych pomagają im utrzymywać odpowiednią konformację przestrzenną a podczas odpowiedzi komórki na stres chronią je przed denaturacją i degradacją. Do białek szoku cieplnego należy Hsp90. Jego obecność zaobserwowano w wielu organizmach, zarówno u prokariotów htpG (*Escherichia coli*) jak i u eukariotów: Hsp82 i Hsc82 (*Saccharomyces cerevisiae*), daf-21 (*Caenorhabditis elegans*), Hsp90 (*Mus musculus*, *Homo sapiens*) [1]. W komórce eukariotycznej Hsp90 jest niezbędne do jej funkcjonowania. Drożdże nie rosną, gdy zostaną pozbawione genów *HSP82* i *HSC82* kodujących Hsp90 [2].

Białka wobec których Hsp90 spełnia „aktywność opiekuńczą” nazywane są substratowymi lub klientami (*ang. clients*). Wśród nich znajdują się między innymi: receptory hormonów, czynniki transkrypcyjne, ligazy ubikwitynowe czy kinazy białkowe. Badania biochemiczne potwierdzają interakcję z około 200 białkami-klientami (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). Eksperymenty wykorzystujące technikę LUMIER (*ang. LUMinescence-based Mammalian IntERactome*) identyfikują ich około 400 [3]. Badania nad drożdżowymi Hsp90 dowodzą istnienia aż 627 potencjalnych białek substratowych Hsp90, co odzwierciedla oddziaływanie z 10% drożdżowego proteomu [4].

Zaburzenie prawidłowej aktywności białek-klientów Hsp90 związanych z procesami regulacyjnymi i sygnałowymi prowadzi do transformacji nowotworowej. Zahamowanie aktywności Hsp90 destabilizuje te białka a w konsekwencji wyłącza nieprawidłowo działające szlaki sygnałowe. Jednoczesne zablokowanie wielu z nich dzięki zahamowaniu aktywności Hsp90 sprawia, że białko to jest celem molekularnym dla terapii przeciwnowotworowych [5, 6].

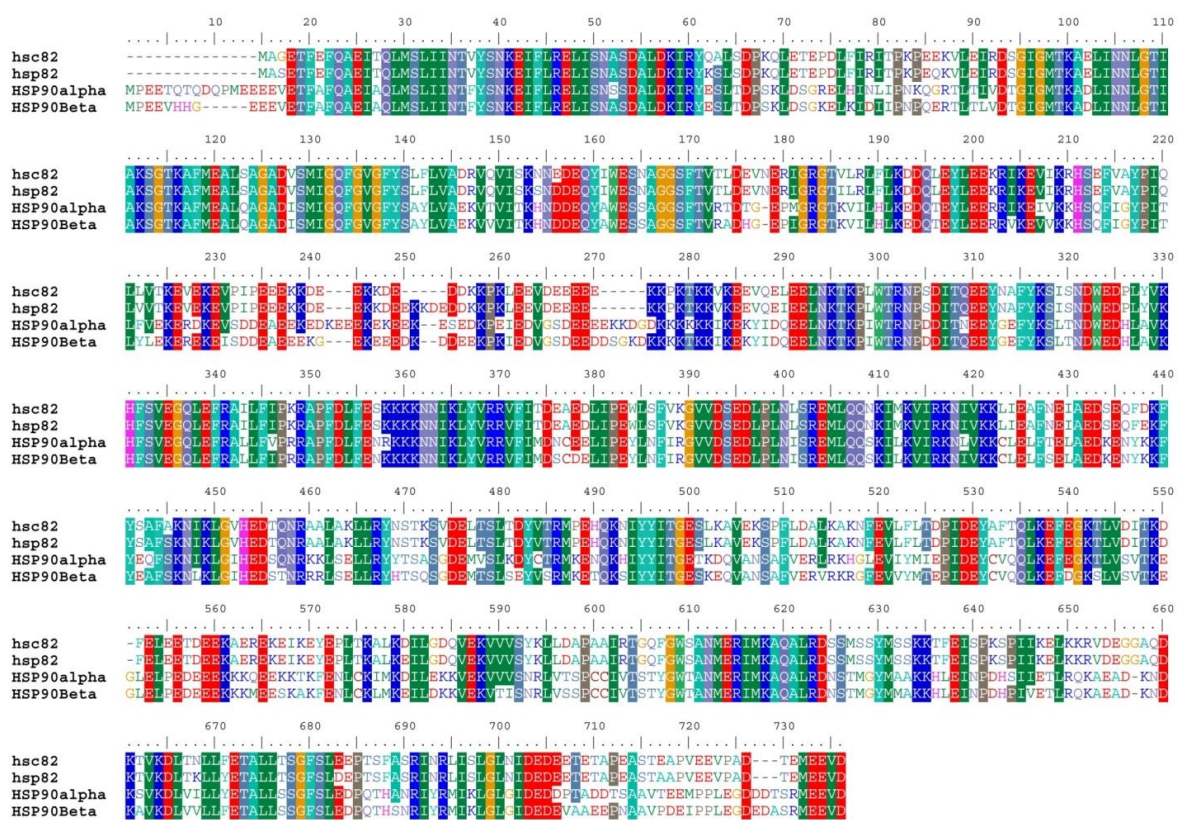
Większość organizmów eukariotycznych posiada jedną cytoplazmatyczną formę Hsp90. U większości kręgowców w cytoplazmie występują dwie izoformy Hsp90 α i β [1]. Wiele prac naukowych dotyczących tego białka pomija fakt istnienia izoform. Niektóre prace opisują jednak różnice między izoformami odnoszące się do ich budowy (różnice w sekwencji aminokwasowej), interakcji z białkami-klientami (znanych jest

kilka białek oddziałujących preferencyjnie wobec jednej izoformy), stabilności struktur dimerycznych (izoforma α tworzy stabilniejsze dimery w porównaniu do izoformy β) [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

1.2. Budowa strukturalna Hsp90

Sekwencja aminokwasowa ludzkich i drożdżowych Hsp90 jest identyczna w 60% (Ryc. 1), dlatego opisywane poniżej struktury przestrzenne tego białka obejmują podobne fragmenty sekwencji u tych dwóch gatunków.

Monomer Hsp90 można podzielić na trzy domeny. Znajdująca się na końcu aminowym domena N jest odpowiedzialna za hydrolizę ATP, środkowa domena to miejsce wiązania białek klientów, a położona na końcu karboksylowym domena C odpowiada za wiązanie monomerów w funkcjonalny dimer [14, 15].



Ryc. 1. Zestawienie sekwencji aminokwasowych drożdżowych Hsp90 (Hsc82, Hsp82) z sekwencjami ludzkich izoform Hsp90 α i Hsp90 β . Kolorami zaznaczono aminokwasy identyczne w porównywanych sekwencjach.

Domena N w drożdżowym Hsp90 obejmuje pierwsze 200 aminokwasów od końca aminowego. Cechą charakterystyczną tej domeny jest obecność kieszeni wiążącej, gdzie zachodzi hydroliza ATP, kluczowa dla aktywności Hsp90 [16, 17]. W dimerze Hsp90

każda z domen N wiąże po jednym nukleotydzie niezależnie od siebie [18]. Chociaż domena N posiada aminokwasy potrzebne do interakcji z nukleotydem to aktywność ATPazowa izolowanej domeny N jest niska co jest spowodowane brakiem argininy 380 pochodzącej z domeny środkowej [19, 20]. Arginina 380 nie jest resztą katalityczną, ale pełni funkcję stabilizującą konformację w monomerze Hsp90 podczas hydrolizy ATP [21].

Podobieństwo strukturalne miejsca wiążącego nukleotyd w domenie N Hsp90, pozwala zaklasyfikować to białko do rodziny ATPaz GHKL (**G**yrase, **H**sp90, **H**istidine **K**inase, **MutL**), do której oprócz Hsp90 należą: gyraza, kinazy histydynowe oraz MutL (*ang. DNA mismatch repair protein MutL*). ATPazy GHKL charakteryzuje obecność motywu Bergata, czyli podobnej konformacji przestrzennej w obrębie kieszeni wiążącej nukleotydy we wspomnianych białkach [22]. W obrębie motywu Bergata występuje fragment określany, jako „lid” (pokrywka) [22]. W drożdżowym Hsp90 obejmuje on aminokwasy 100-121 [16, 20]. Pokrywka oddziałuje z nukleotydem zamykając kieszeń wiążącą, co przyczynia się do hydrolizy nukleotydu [16, 23]. W Hsp90 pozbawionym „lid” nie dochodzi do hydrolizy ATP [24].

Fragment łączący N-domenę z domeną środkową określany jest jako „charged linker”. W drożdżowym Hsp90 obejmuje on aminokwasy od 211 do 272 [25]. Fragment ten nadaje odpowiednią elastyczność cząsteczce białka, potrzebną do ustawienia przestrzennego domeny N i domeny środkowej Hsp90 po związaniu ATP. „Charged linker” wykazuje niski stopień homologii, nie posiada ustalonej struktury przestrzennej i odznacza się sumarycznym ładunkiem ujemnym. Różne gatunki charakteryzuje odmienna długość tego fragmentu: *Saccharomyces cerevisiae* - 56, *Homo sapiens* - 63, *Plasmodium falciparum* - aż 95 reszt aminokwasowych. Wzrost długości tego odcinka u wspomnianych gatunków, zwiększa jego sumaryczny ładunek ujemny. Zmianę ładunku wywołują również modyfikacje potranslacyjne aminokwasów w tym rejonie. Naładowanie ujemne „linkera” jest istotne dla funkcjonowania Hsp90, bowiem drastyczne zmiany jego ładunku skutkują zahamowaniem hydrolizy ATP [26].

Środkowa domena Hsp90, nazywana domeną M (*ang. Middle domain*), u drożdży obejmuje aminokwasy 273–560. Do 525 aminokwasu obszar ten tworzą dwie struktury $\alpha\beta$ połączone α -helikalnym łącznikiem. Odcinek leżący poza resztą 525 pozostaje strukturalnie nieuporządkowany [23]. Domena M Hsp90 jest kluczowa dla hydrolizy ATP, zawiera bowiem „pętlę katalityczną” (aminokwasy 375-388), która przyjmuje γ -fosforan w trakcie hydrolizy nukleotydu przez Hsp90 [27]. Domena środkowa Hsp90

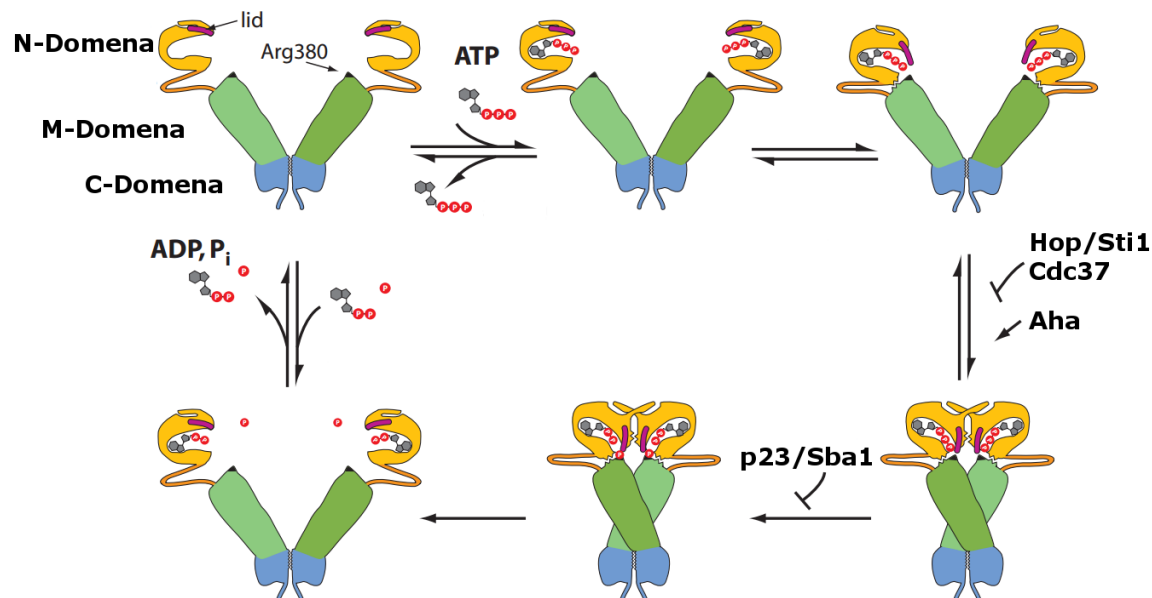
bierze udział w interakcji z białkami substratowymi [23]. Aminokwasy będące częścią tej domeny, w pozycji od 328 do 338 tworzą pętlę, która dzięki zmianie swojego położenia w przestrzeni może oddziaływać z białkami substratowymi [28].

Domena C Hsp90 zawiera sekwencje odpowiedzialne za dimeryzację monomerów Hsp90, które oddziałując ze sobą tworzą strukturę dimeryczną. Hsp90 pozbawione tych fragmentów nie wykazuje swojej aktywności opiekuńczej [30]. Istotną cechą domeny C jest obecność sekwencji aminokwasowej MEEVD umożliwiającej przyłączanie grupy białek pomocniczych (*ang. co-chaperones*), posiadających motyw TPR (*ang. Tetratricopeptide Repeat Domain*) [33, 34].

1.3. Cykl ATPazowy

Hsp90 wiążąc i hydrolizując ATP, działa podobnie jak inne białka opiekuńcze takie jak: Hsp70/DnaK czy Hsp60/GroEL [17, 35]. Dzięki tej hydrolizie, katalizowanej przez ATP-azę zlokalizowaną w domenie N, Hsp90 może funkcjonować jako „białko opiekuńcze” [17].

Molekularny mechanizm działania Hsp90 jest związany z powstawaniem tzw. „molekularnego zacisku” tworzonego przez oba monomery Hsp90 (Ryc. 2). W przypadku braku ATP homodimer Hsp90 pozostaje w konformacji otwartej, o kształcie litery V [15, 20,31].



Ryc. 2. Schemat przedstawiający etapy cyklu hydrolizy ATP przez Hsp90, na podstawie [15]. Kolorami zaznaczono domeny Hsp90, fragment „lid” oraz argininę w pozycji 380. Białka współopiekuńcze stymulują (*Aha*) lub hamują (*Hop/Sti1*, *Cdc37*, *p23/Sba1*) hydrolizę ATP.

Zaproponowany przez Wandingera i wsp. [15] model cyklu ATPazowego zakłada, że obydwie monomeryczne cząsteczki Hsp90 oddziałują ze sobą za pomocą domeny C, a domena środkowa i domena N pozostają oddalone od siebie. Po związaniu ATP, fragment domeny N zwany „lid” przykrywa kieszeń wiążącą nukleotydy. Inicjuje to uwolnienie ok. 27-aminokwasowego odcinka pochodzącego z domeny N, który oddziałuje z odpowiadającym mu fragmentem z drugiego monomeru Hsp90. W efekcie dochodzi do zbliżenia obydwu domen N a także domen środkowych, co powoduje skręcenie domen środkowych względem siebie i cały dimer Hsp90 przyjmuje „zamkniętą” konformację przestrzenną (molekularny zacisk) [15, 36]. W konformacji zamkniętej dimeru Hsp90 fragment „lid” pozwala na interakcję części środkowej domeny, tzw. pętli katalitycznej z miejscem wiązania nukleotydu. Pętlę katalityczną charakteryzuje duża swoboda konformacyjna pozwalająca na zmianę jej struktury przestrzennej, dzięki temu będąca w jej obszarze arginina 380 może oddziaływać z resztą γ -fosforanową ATP [23]. Rolą Arg 380 jest odpowiednia stabilizacja struktury Hsp90 podczas hydrolizy nukleotydu [21]. Po rozkładzie ATP zachodzącym w kieszeni wiążącej, oddziałujące ściśle między sobą domeny N i M oddysocjują. Fragment „lid” otwiera kieszeń wiążącą i następuje uwolnienie ADP i wolnego fosforanu. Dimer Hsp90 przyjmuje ponownie konformację otwartą [15, 31, 36].

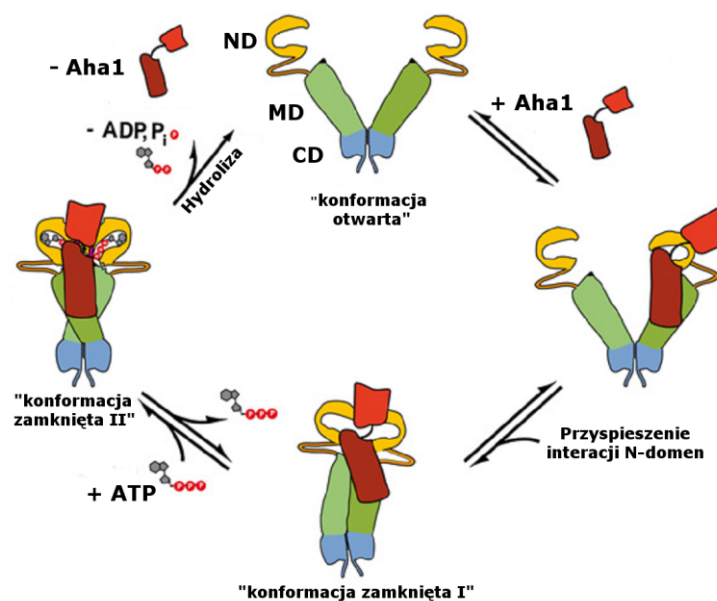
Ludzkie Hsp90 charakteryzuje zdecydowanie wolniejsza hydroliza ATP w porównaniu do białka drożdżowego. Hydroliza jednej cząsteczki ATP przez drożdżowe Hsp90 trwa jedną minutę. Ludzkie Hsp90 do hydrolizy nukleotydu wymaga 20 minut [17,37]. Po dodaniu substratu białkowego aktywność ATPazy Hsp90 wzrasta i w przypadku białka ludzkiego staje się porównywalna z jego drożdżowym homologiem [37]. Szybkość hydrolizy nukleotydu nie świadczy o „jakości” białka opiekuńczego. Ludzkie Hsp90 może z powodzeniem zastąpić drożdżowe, właściwość tę wykorzystano w niniejszej pracy. Tempo hydrolizy ATP może być modulowane przez interakcję z innymi białkami. Oddziaływanie z białkami współopiekuńczymi takimi jak: p23, Hop lub Cdc37 hamuje hydrolizę ATP w Hsp90 [36]. Interakcja z białkami substratowymi rozkład ATP [35]. Słabe właściwości aktywujące ATPazę Hsp90 do rozkładu nukleotydu, wykazują również białka: Rar1 (*ang. required for Mla12 resistance*), Tah1 (*ang. TPR-containing protein associated with Hsp90*), Cpr6/Cyp40(*ang. Cyclosporin-sensitive Proline Rotamase*) [35, 36]. Zdecydowanie silniejsza aktywacja hydrolizy ATP (w porównaniu do wspomnianych białek) jest związana z oddziaływaniem białka współopiekuńczego Aha1 (*ang. Activator of Hsp90 ATPase protein 1*) [35].

1.4. Białka pomocnicze

Aktywność Hsp90 regulują białka pomocnicze nazywanymi współopiekuńczymi lub koczaperonami. Ze względu na pełnione funkcje można je podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią białka wpływające na hydrolizę nukleotydu, na przykład hamujące (p23) lub stymulujące (Aha1) aktywność ATPazową w domenie N Hsp90 [15, 35]. Drugą grupę stanowią białka regulujące tworzenie kompleksów Hsp90 z określonymi grupami białek substratowych. Przykładem może być białko Cdc37 pośredniczące w oddziaływaniu Hsp90 z kinazami białkowymi lub białko GCUNC45 (*ang. general cell UNC45*), biorące udział w tworzeniu kompleksów Hsp90 z miozyną i receptorem progesteronu [10, 28].

Jednym z najmniejszych białek współopiekuńczych jest p23. Białka o homologicznej sekwencji znaleziono u drożdży (o nazwie Sba1), *Plasmodium*, myszy, człowieka oraz u roślin [38, 39]. Charakterystycznym efektem oddziaływania p23 z Hsp90 jest zahamowanie hydrolizy ATP [15]. Białko p23 wiążąc się do N-domeny białka opiekuńczego, stabilizuje konformację dimeru Hsp90 [37]. Rola p23 może polegać na „zarządzaniu” oddziaływaniem białek substratowych z Hsp90 poprzez zahamowanie cyklu ATPazowego. Gdy białko substratowe pozostaje w interakcji z Hsp90, dołączenie p23 spowalnia dysocjację takiego kompleksu, tym samym zostaje wydłużony czas interakcji białka substratowego z białkiem opiekuńczym [37].

Białko pomocnicze Aha1 podobnie jak p23 wpływa na aktywność ATPazy w domenie N Hsp90. Cechą wyróżniającą Aha1 jest stymulowanie tej hydrolizy. Szybszy rozkład ATP w trakcie cyklu ATPazowego Hsp90 jest możliwy dzięki odpowiednim zmianom konformacyjnym dimeru Hsp90 wprowadzanym przez Aha1 (Ryc. 3).



Ryc. 3. Zmiany zachodzące w cyklu hydrolizy ATP przez Hsp90 wynikające z obecności białka Aha1, na podstawie [40]. Aha1 umożliwia "zbliżenie" przestrzenne domen N-końcowych Hsp90. Kolorami zaznaczono domeny Aha1 oraz Hsp90 (dodatkowo oznaczone symbolami: ND, MD, CD).

Aha1 oddziałując z dimerem Hsp90 zbliża do siebie jego domeny N. Związanie ATP wywołuje zmiany struktury przestrzennej, przyspieszając pojawienie się stanu konformacyjnego zamkniętego - odpowiedniego dla hydrolizy nukleotydu oraz zmianę usytuowania przestrzennego fragmentu Hsp90 obejmującego tzw. pętlę katalityczną (370-390 aa) [19, 40]. Zapoczątkowane przez Aha1 sprzężenie N domen Hsp90 pozwalające na ustabilizowanie dimeru Hsp90 oraz zbliżenie Arg 380 do miejsca wiążącego nukleotyd, skutkuje przyspieszeniem hydrolizy ATP [35, 40]. Struktura krystaliczna Hsp90 i Aha1 pozwala określić aminokwasy bezpośrednio zaangażowane w interakcję obydwu białek. Ze strony Aha1 są to pierwsze 153 aminokwasy od końca aminowego oraz ze strony Hsp90 aminokwasy: od 273 do 530, znajdujące się w obu odcinkach struktur $\alpha\beta$ jego środkowej domeny [19]. Badania wskazują również na rolę domeny N Hsp90 w oddziaływaniu z Aha1 [40]. Postuluje się istnienie asymetrycznej konformacji przestrzennej, gdzie pojedyncze białko Aha1 oddziałuje z N i M domeną Hsp90 należącą do tego samego monomeru Hsp90 lub do monomerów Hsp90 położonych naprzeciw siebie [40]. W warunkach *in vitro*, w nadmiarze białka Aha1 obserwowano, że oddziaływanie z Hsp90 może odbywać się w stosunku stechiometrycznym 1:1 [35, 40]. W badaniach *in vitro*, wykonywanych na oczyszczonych białkach obserwowano potrójne

kompleksy białkowe złożone z: Hsp90, Aha1 i Hop lub p23 [40], bądź kompleksy: Hsp90, Aha1 i p23 lub FKBP52 (*ang. FK506 binding protein*) [41].

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* posiadają białko Aha1, odpowiednik ludzkiego Aha1 i białko Hch1 (*ang. High-Copy Hsp90 suppressor*). Komórki drożdży pozbawione obydwu białek współopiekuńczych przeżywają, co pokazuje, że nie są one istotnymi składnikami systemu Hsp90 podczas warunków fizjologicznych. Dopiero w warunkach stresowych, ich ekspresja staje się kluczowa dla przeżycia [35].

Wiele spośród białek pomocniczych zawiera domeny TPR, umożliwiające oddziaływanie z Hsp90 [31, 42]. Przykładem takiego białka jest Hop posiadające dwie domeny TPR za pomocą których współoddziałuje z Hsp90 i Hsp70 [42, 43]. Domena TPR1 specyficznie rozpoznaje sekwencję peptydową na końcu karboksylowym Hsp70, a domena TPR2 sekwencje MEEVD na końcu karboksylowym Hsp90 [34]. Hop hamuje aktywność ATPazy Hsp90, zapobiegając dimeryzacji domeny N oraz domeny środkowej Hsp90 [15]. Taką aktywność wykazuje również białko Sti1, będące drożdżowym homologiem Hop [35,44]. Białko Hop może zostać usunięte z kompleksu z Hsp90 przez inne białka posiadające domeny TPR takie jak: immunofiliny lub PP5 (*ang. Protein phosphatase 5*) [45].

Białko pomocnicze Cdc37 (p50) pośredniczy w oddziaływaniu kinaz z Hsp90 [3, 28, 29]. Jego nadekspresja w komórkach linii: HCT116 (*ang. Human Colorectal Carcinoma cells*) i HT29 (*ang. Human colorectal adenocarcinoma*), prowadziła do zwiększonego wiązania kinazy Cdk4 (*ang. Cyclin-dependent kinase*) przez Hsp90 [29]. Mechanizm powstawania kompleksu białek Cdk4-Cdc37-Hsp90 zakłada początkowe oddziaływanie kinazy z dimerem Cdc37 a następnie z dimerem Hsp90. W wyniku dalszych rearanżacji uwolniona zostaje jedna cząsteczka Cdc37 i finalnie powstaje kompleks: Cdk4-Cdc37-(Hsp90)₂ (w stosunku 1: 1: 2) [28].

Doświadczenia biochemiczne z wykorzystaniem Hsp90β wskazują, że za oddziaływanie Cdc37 z Hsp90 odpowiada domena N (bez rejonu wiązania nukleotydu) oraz „charged linker” [46, 47, 48]. Cdc37 hamując aktywność ATPazy w domenie N Hsp90, oddziałuje z otwartą przestrzenią fragmentu „lid”, nie pozwalając na jego przestrzenną rearanżację ponad kieszeń wiążącą. Ulokowanie Cdc37 pomiędzy domenami N dimeru Hsp90 zapobiega utworzeniu konformacji zamkniętej Hsp90. Ponadto Cdc37 ustawiając w kieszeni wiążącej Hsp90 Arg 167 ze swojego łańcucha, uniemożliwia hydrolizę ATP [46].

Oprócz opisanych powyżej białek współopiekuńczych znanych jest jeszcze wiele innych. Spośród nich są takie, które wykazują aktywność enzymatyczną np. E3/E4 ligazy ubikwitynowej (białko CHIP), fosfatazy (białko PP5) czy izomerazy peptydyloprolinowej cis/trans (białka FKBP51, FKBP52) [31, 49].

1.5. Białka substratowe

Hsp90 jest kluczowe dla aktywacji i stabilności wielu białek regulatorowych oraz sygnałowych. Znanych jest ponad 200 białek podlegających opiekuńczej aktywności Hsp90, które są nazywane białkami substratowymi lub białkami-klientami. Białka te nie posiadają wspólnej sekwencji aminokwasowej, ani też nie pełnią podobnych funkcji w komórce. Ta niejednorodna grupa obejmuje m.in. kinazy, receptory hormonów sterydowych, czynniki transkrypcyjne i ligazy ubikwitynowe.

Spośród wymienionych białek najliczniejszą grupę substratów Hsp90 stanowią kinazy. Uważa się, że Hsp90 oddziałuje z ponad połową ludzkiego kinomu [3]. Przykładowo Hsp90 i Cdc37 oddziałują z kinazą Raf-1. Interakcja białek jest kluczowa dla dojrzewania Raf-1 a dysocjacja Hsp90 jest konieczna dla aktywacji kinazy [50]. Kinaza PKR (*ang. Protein kinase R*) wchodzi w interakcję z białkami Hsp90 i p23. Kompleks Hsp90-p23 odgrywa podwójną rolę względem PKR. Podczas fałdowania i dojrzewania kinazy PKR, kompleks ten stabilizuje oraz hamuje jej aktywność. Rozpad kompleksu wywołany dodaniem geldanamycyny bądź dsRNA – substratu dla PKR, prowadzi do aktywacji kinazy [51].

Przykładem białka substratowego dla Hsp90 są receptory hormonów sterydowych. Nad ich prawidłowym składaniem i aktywacją współdziała kilka białek opiekuńczych i pomocniczych. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że do aktywacji tych receptorów konieczne jest współdziałanie minimum pięciu z nich: Hsp90, Hsp70, Hsp40, p23 oraz p60 (Hop) [52]. Receptor oddziałuje z Hsp90 przez LBD (*ang. ligand-binding domain*). Hsp90 pomaga LBD utrzymywać odpowiednią konformację przestrzenną umożliwiającą związanie liganda, które skutkuje odłączeniem receptora od Hsp90 i przemieszczeniem do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję genów [53].

Do substratów Hsp90 należą również enzymy związane z metabolizmem glukozy, translacją i ekspresją białek [54, 55]. Enzymy metaboliczne lub kinazy działające w tym samym szlaku (metabolicznym lub sygnałowym) mogą być klientami Hsp90. Przykład stanowi oddziaływanie kinazy PKB/Akt i syntazy eNOS (*ang. endothelial nitric oxide synthase*). Oba będące białkami-klientami Hsp90 oddziałują ze środkową domeną Hsp90

jednocześnie, dzięki temu białko opiekuńcze umożliwia ich wzajemną interakcję (fosforylacja eNOS przez PKB/Akt) [23].

Wśród substratów Hsp90 licznie występują białka onkogenne. Inhibitory Hsp90 są pomocne w destabilizacji onkogennych kinaz (kinazy receptorowej Met i RET, zmutowanego B-Raf, chimerycznych NPM-ALK, czy BCR-ABL), receptorów (zmutowanego EGFR, receptora androgenowego), obniżenia aktywności produktów proto-onkogenów (KIT) czy obniżenia ekspresji czynników transkrypcyjnych (np. VEGF) [5]. Strategie terapeutyczne w leczeniu nowotworów, często mają na celu zablokowanie szlaku sygnałowego o kluczowym znaczeniu dla rozwoju i progresji nowotworu [6]. Zahamowanie aktywności Hsp90 skutkuje jednoczesnym zahamowaniem wielu ścieżek sygnałowych. Zastosowanie 17-AAG przeciw komórkom ludzkiego raka okrężnicy w warunkach *in vitro* skutkowało jednoczesnym zahamowaniem dwóch szlaków sygnałowych: Ras/Raf/MEK/ERK oraz szlaku PI3/PDK/Akt. Inhibicja Hsp90 hamowała fosforylację kinazy FLT3 a w konsekwencji fosforylację kilku białek zależnych w tym: kinazy MAPK, Akt, Stat5a [56, 57].

Nie opisano uniwersalnego mechanizmu wiązania białek substratowych do Hsp90. Zagadnienie jest skomplikowane z uwagi na fakt, że białka-klienci Hsp90 nie posiadają wspólnego fragmentu sekwencji aminokwasowej odpowiedzialnego za oddziaływanie z Hsp90. Blisko spokrewnione białka (o wysokiej homologii sekwencji) różnią się między sobą pod względem oddziaływania z Hsp90. Nie do końca poznana jest rola białek współopiekuńczych w regulacji interakcji Hsp90 z białkami substratowymi [3, 35]. Za obszar wiązania białek substratowych do Hsp90 przyjmuje się jego domenę środkową. Przykładowo białko Akt1 oddziałuje z aminokwasami 327–340 pochodzącymi ze środkowej domeny Hsp90 β . Interakcja między wspomnianymi białkami zapewnia stabilizację ufosforylowanej formie Akt1 [58]. Oprócz domeny środkowej, białka substratowe mogą oddziaływać również z innymi fragmentami Hsp90. Np. oddziaływanie kinazy Cdk4 z dimerem Hsp90 dotyczy środkowej domeny jednego monomeru Hsp90 i segmentu domeny N drugiego monomeru Hsp90 [28]. Oddziaływanie z domeną N oraz środkową domeną Hsp90 obserwowano także dla białka Tau [59, 60].

1.6. Izoformy ludzkich cytoplazmatycznych Hsp90

Większość organizmów eukariotycznych posiada jedną cytoplazmatyczną formę Hsp90 (np. *C. elegans* czy *D. melanogaster*). Wyjątkiem są kręgowce, ponieważ

w cytoplazmie ich komórek występują dwie izoformy Hsp90 nazywane α i β , które są kodowane przez dwa różne geny [61].

Izoformy Hsp90 u ssaków pojawiły się prawdopodobnie na skutek duplikacji genu u wspólnego przodka [62]. U człowieka gen *HSP90 α* zlokalizowano na dłuższym ramieniu chromosomu 14, a gen *HSP90 β* na krótszym ramieniu chromosomu 6 [63].

Analiza cDNA wykazała obecność w ludzkim genomie kilku kopii genów *HSP90 α i β* , co sugeruje możliwość występowania pseudogenów [64].

Transkrypcja genów szoku cieplnego zachodzi w odpowiedzi na wiele czynników stresujących i wymaga aktywacji HSF (*ang. Heat Shock Factor*). Czynnikiem szoku cieplnego HSF wiąże się do sekwencji DNA określanych mianem HSE (*ang. Heat Shock Elements*), obecnych zwykle w sekwencji promotorowej. Rejon promotora *HSP90 α* zawiera kilka sekwencji HSE. W obrębie genu *HSP90 β* sekwencje HSE zlokalizowane są dopiero we fragmencie jego pierwszego intronu [64].

Powszechnie przyjmowany jest pogląd o wyższej ekspresji Hsp90 α w porównaniu do Hsp90 β zainicjowanej warunkami stresu komórkowego [64, 65]. Wzajemny stosunek poziomu ekspresji obu izoform zależy od rodzaju tkanki, bądź linii komórkowej [66]. W warunkach fizjologicznych u większości komórek dominuje Hsp90 β , natomiast Hsp90 α przeważa w mózgu oraz oocytach, gdzie obniżenie jej ilości nie jest wyrównywane przez wzrost ilości Hsp90 β [67, 68]. Jednakową ekspresję obu izoform w warunkach fizjologicznych lub stresowych stwierdzono we komórkach HPT (*ang. Human Proximal Tubule cells*) [69].

Izoformy Hsp90 zwykle występują w postaci dimerycznej. Zarówno w układzie *in vitro* oraz *in vivo* tworzą homodimery ($\alpha\alpha$ lub $\beta\beta$) [30, 68, 70]. Homodimery $\alpha\alpha$ charakteryzuje wyższa stabilność niż dimery $\beta\beta$ [11]. W warunkach *in vitro* obserwowano także oligomery Hsp90. Powstawanie takich struktur było indukowane podwyższoną temperaturą (50°C) oraz dodatkiem odpowiednich modulatorów (oksyaniony metali przejściowych) [71]. Uznaje się, że struktury heterodimeryczne nie powstają. Eksperymenty z wykorzystaniem spektrometrii mas nie wykazały istnienia dimerów $\alpha\beta$ a immobilizowane Hsp90 β nie wiązało izoformy Hsp90 α [68, 72].

Każda z izoform Hsp90 posiada specyficzne funkcje w komórce, które nie mogą być pełnione przez drugą izoformę. Świadczą o tym wyniki eksperymentów przeprowadzonych na myszach z delecją genu kodującego α bądź β Hsp90. Delecja *HSP90 β* powodowała nieprawidłową budowę łożyska i w rezultacie obumieranie płodu

[73]. Myszy pozbawione aktywności genu *HSP90α* rozwijały się prawidłowo, jednak osobniki męskie były bezpłodne [9].

Dla każdej z izoform Hsp90 zidentyfikowano preferencyjnie z nią oddziałujące białka substratowe. Hsp90α uczestniczy w procesie prezentacji antygeny przez cząsteczki klasy MHC I, oraz towarzyszy w prawidłowej dyslokacji białka hERG (*ang. human ether-a-gogo-related gene*) na powierzchnię komórki [8, 74]. Aktywność Hsp90α zaobserwowano podczas apoptozy indukowanej nikotyną [75]. Jedynie izoforma Hsp90α występuje na zewnątrz komórki, gdzie uczestniczy w procesie gojenia ran [76]. Wyniki badań na liniach nowotworowych wskazują również, że zewnątrzkomórkowe Hsp90α i MMP-2 (*ang. Matrix Metalloproteinase 2*) mogą brać udział w procesie przerzutowania [77]. Hsp90α w porównaniu do Hsp90β oddziaływało silniej z czynnikami transkrypcyjnymi HSF1 oraz HIF1α (*ang. Hypoxia induced factor*) oraz z białkami-klientami ERBB2, KEAP1 i RHOBTB2 [13].

Izoforma Hsp90β oddziałuje preferencyjnie z białkiem substratowym cIAP-1 (*ang. Cellular Inhibitor of Apoptosis*) [7]. Hsp90β jest również zaangażowana w komórkową sygnalizację związaną z receptorem witaminy D [78]. Jej aktywność stwierdzono także w komórkach dendrytycznych i makrofagach podczas ich aktywacji wywołanej niemetylowanymi sekwencjami CpG lub LPS (*ang. Lipopolysaccharide*) [79]. Hsp90β oddziałuje preferencyjnie z białkami pomocniczymi GCUNC45 oraz Aarsd1 (*ang. Alanine-TRNA Synthetase Domain Containing 1*) [10, 80]. Silniejsze oddziaływanie Hsp90β niż Hsp90α obserwowano dla Ganetespibu (drobnocząsteczkowego inhibitora Hsp90) [13].

Porównanie obu izoform Hsp90 z białkami substratowymi i pomocniczymi podjęto w pracy Taheriana i wsp. [81]. Autorzy wskazują, że Hsp90α *Danio rerio* podczas szoku cieplnego charakteryzuje większe powinowactwo do kinaz c-Src i CKII, jednak zastosowany układ badawczy dalece odbiegał od naturalnego. Polegał on na wprowadzeniu Hsp90 pochodzącego z ryby *Danio rerio* do oocytów żaby *Xenopus laevis* oraz komórek mysich NIH 3T3. Nie określano też ekspresji endogennych Hsp90 [81].

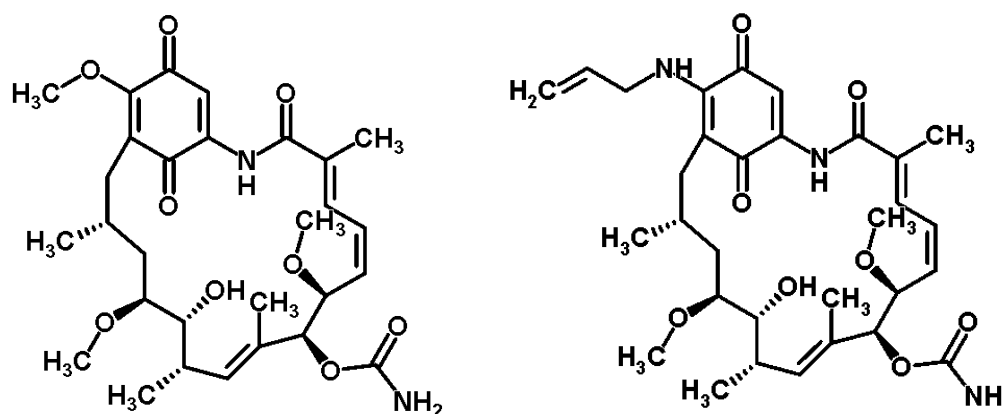
Izoformy Hsp90 oprócz preferencji oddziaływania może charakteryzować przeciwstawna aktywność. Dotyczy to min. regulacji endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS). Nadekspresja izoformy Hsp90α skutkuje zwiększoną dimeryzacją eNOS oraz jego fosforylacją w Ser 1177, co w efekcie powoduje wzrost syntezy tlenu azotu. Nadekspresja izoformy Hsp90β powoduje spadek dimeryzacji eNOS i fosforylację w Thr 495 skutkującą częściową inaktywacją syntazy i zmniejszoną produkcją tlenu azotu [11].

Odrębna aktywność izoform Hsp90 dotyczy również białka błonowego KCNQ4 (*ang. Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member*). Gdy opiekuńcza aktywność operowała się na Hsp90 α , białko KCNQ4 było degradowane. Obniżenie ekspresji tej izoformy i związana z tym większa aktywność Hsp90 β skutkowała wzrostem komórkowej puli KCNQ4. Ponadto nadekspresja Hsp90 β zapewniała prawidłową dyslokację KCNQ4 na powierzchnię komórki, pomimo mutacji w białku błonowym zaburzających ten proces [82].

1.7. Specyficzny inhibitor ATPazy Hsp90 - 17-AAG

Komórki nowotworowe zawierają białka onkogenne, które na skutek mutacji utraciły swoją pierwotną funkcję i w efekcie przyczyniają się do transformacji nowotworowej. Uważa się, że Hsp90 pomaga w stabilizacji tych zmutowanych onkogenów. Zwiększona aktywność białek onkogennych często dotyczy procesów przekazywania sygnałów wewnątrz komórki, których dysregulacja jest powszechna w wielu typach nowotworów [83, 84]. Białka-klienci Hsp90 są związane z przekazywaniem sygnałów. Zahamowanie jego aktywności przy zastosowaniu specyficznych inhibitorów prowadzi do degradacji tych białek, zaburzenia komórkowej sygnalizacji i w efekcie do śmierci komórek zmienionych nowotworowo [5, 6]. Inhibitory Hsp90 konkurując z ATP o miejsce wiązania hamują aktywność ATPazy Hsp90 a w konsekwencji zatrzymują aktywację białek substratowych [17, 31, 32].

Opisane powyżej własności posiada – geldanamycyna (Ryc. 4). Związek ten charakteryzuje specyficznie powinowactwo do Hsp90, oraz konkurencja z ATP o miejsce wiązania [32, 85]. Mimo aktywności przeciwnowotworowej, geldanamycyna posiada jednak pewne wady: słabą rozpuszczalność w wodzie, ograniczoną stabilność, hepatotoksyczność [86, 87, 88].



Ryc. 4. Wzory strukturalne inhibitorów geldanamycyny (po lewej) oraz 17-AAG (po prawej).

Niepożądane własności geldanamycyny spowodowały, iż podjęto próbę syntezy związków pochodnych. Związek 17-AAG (Ryc. 4), który wykorzystano w niniejszej pracy był testowany w badaniach klinicznych. Pomimo że osiągał on aktywność przeciwnowotworową, zaprzestano jego dalszego testowania [89, 90]. Prawdopodobnie wynikało to z trudności w produkcji związanych z rozpuszczalnością, zaobserwowanych skutków ubocznych oraz zbliżającym się okresem wygaśnięcia ochrony patentowej [87]. Pochodne geldanamycyny testowano w badaniach klinicznych, lecz bez wprowadzenia ich do leczenia [87, 91]. Zastosowanie nowych technik badawczych pozwoliło na opracowanie nowej klasy związków nazywanych inhibitorami Hsp90 drugiej generacji, część z nich jest obecnie testowana [6]. Poszukiwane są również związki mające na celu destabilizację interakcji poszczególnych białek z Hsp90 np. z Cdc37 [92], z białkami z rodziny IAP (*ang. Inhibitor of apoptosis*) [93, 94].

2. Cel pracy

Celem pracy było poszukiwanie różnic między izoformami Hsp90 α i β , w ich funkcjonowaniu i oddziaływaniu z białkami pomocniczymi oraz białkami-klientami.

Aby osiągnąć ten cel zrealizowano następujące zadania badawcze:

- sprawdzenie wpływu ekspresji ludzkich Hsp90 na wzrost drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK-293;
- zbadanie interakcji izoform Hsp90 z białkami pomocniczymi Aha1 i Cdc37 i p23;
- sprawdzenie, czy oddziaływanie z określoną izoformą Hsp90 wpływa na stabilność białek substratowych cIAP-1, cIAP-2, hERG;
- ustalenie, które fragmenty struktury Hsp90 są odpowiedzialne za różnice w funkcjonowaniu Hsp90 α i β dzięki wykorzystaniu białek hybrydowych składających się z fragmentów obu izoform Hsp90;
- sprawdzenie czy różnice w dimeryzacji Hsp90 α i β odpowiadają za różnice w funkcjonowaniu izoform.

Dane literaturowe pokazują, że aktywność obu izoform z większością białek jest identyczna. Istnienie specyficznych fenotypów delecji jednej izoformy dowodzi, że w niektórych typach komórek odgrywają one różną rolę. Funkcjonalność wobec wybranych białek oraz poziom ekspresji zależny od typu komórek, wskazuje na możliwe funkcje regulacyjne Hsp90 α i Hsp90 β [68, 11, 73, 9, 82]. Wobec powyższych danych podjęto próbę określenia różnic w aktywności cytoplazmatycznych izoform Hsp90 oraz ich oddziaływania z wybranymi białkami pomocniczymi.

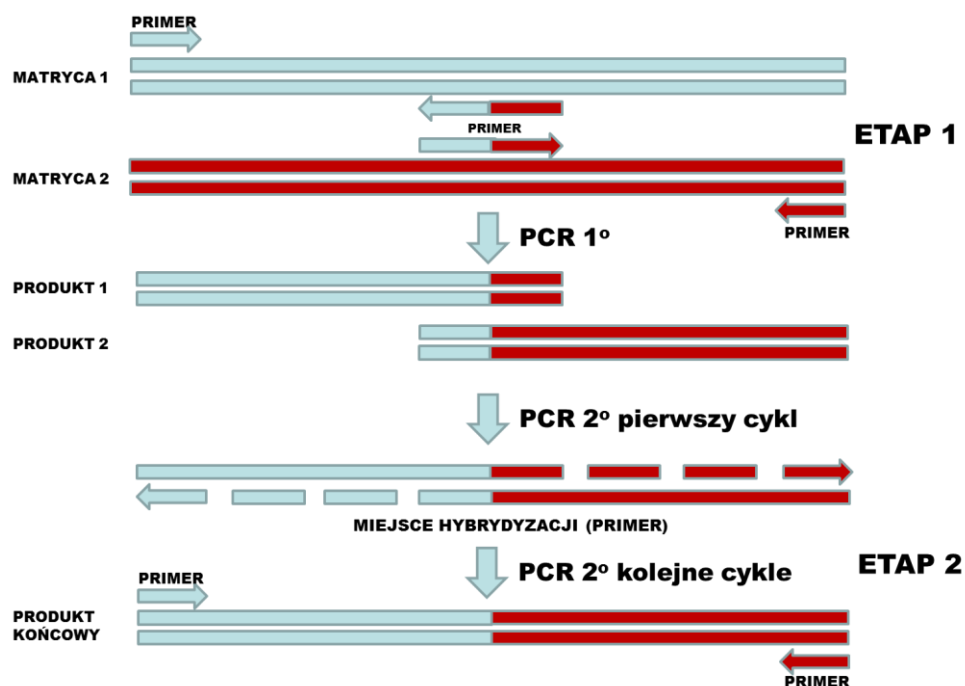
Dodatkowym argumentem przemawiającym za przeprowadzeniem badań nad Hsp90 jest brak dostatecznej charakterystyki wiązania białek substratowych w obrębie struktury Hsp90. Nieznane są przestrzenne struktury krystalograficzne ludzkiego Hsp90 oddziałującego z białkiem substratowym a dostępne dane sugerują, że miejsce wiązania tych białek jest zlokalizowane w środkowej domenie Hsp90. Wyniki te pochodzą z badań kilku mutacji punktowych zlokalizowanych w tej domenie [27].

Głębsze poznanie i zrozumienie oddziaływania Hsp90 z białkami substratowymi wydaje się tym bardziej zasadne, że w ostatnich latach prowadzone są w różnych ośrodkach na świecie intensywne badania nad wykorzystaniem inhibitorów Hsp90 jako leków w terapii przeciwnowotworowej.

3. Materiały i metody

3.1. Opis przygotowania plazmidów

Hybrydowe formy genów *HSP90* stworzono przy pomocy dwustopniowej reakcji PCR, łącząc w jedną całość odrębne fragmenty sekwencji nukleotydowych pochodzące z ludzkich izoform *HSP90* α i β (Ryc. 5). Matrycami w tych reakcjach były opisane wcześniej plazmidy z genami ludzkich *HSP90* α i β , które posiadały mutacje dające oporność na 17-AAG i dołączoną do końca aminowego metkę FLAG [95]. W pierwszym etapie namnażano fragmenty izoform, do których za pomocą starterów dobudowywano krótkie nukleotydowe sekwencje, odpowiadające za późniejszą wzajemną hybryzację. W drugim etapie matryce stanowiły produkty poprzedniej reakcji PCR. Polimeraza wykorzystywała miejsce hybrydyzacji górnej i dolnej nici DNA jako primera, dobudowując sekwencje komplementarne. W wyniku tej reakcji otrzymano produkt składający się z fragmentów obu izoform Hsp90 (Ryc. 6).



Ryc. 5. Schemat dwustopniowej reakcji PCR prowadzącej do otrzymywania hybrydowych genów *Hsp90*.

Startery wykorzystane w konstrukcji plazmidów do transfekcji komórek linii HEK-293 zostały zamieszczone w tabelach (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3):

Tabela 1. Sekwencje nukleotydowe „starterów zewnętrznych”.

Starter	Sekwencja (5'→3')
β p423TDH3 F	TAAACACACATAAAACAAACAACTAGTATGCCTGAGGAAGTGCACCATGG
β p423TDH3 R	GATATCGAATTCCTGCAGCCCTCAGTCTACTTCTTCCATGCGAGA
α p423TDH3 F	TAAACACACATAAAACAAACAACTAGTATGGAGGAAACCCAGACCCAAGAC
α p423TDH3 R	GATATCGAATTCCTGCAGCCCTCAGTCTACTTCTTCCATGCGTGAT
α/β pcDNA3.1 F	ACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCATGGACTACAAAGACGATGAC
α/β pcDNA3.1 R	AGCGGGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGTTAGTCTACTTCTTCCATGCG

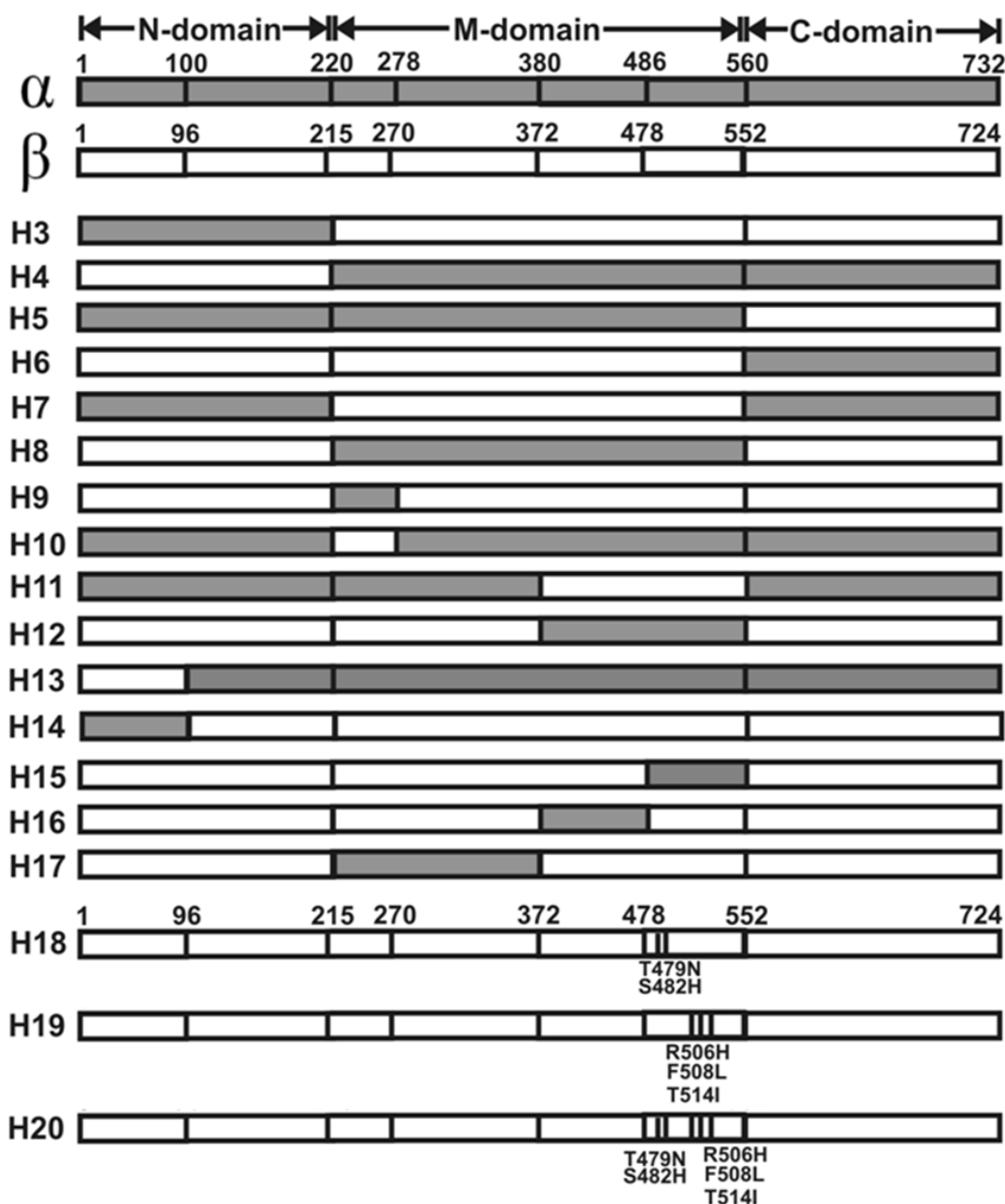
Tabela 2. Sekwencje starterów wykorzystanych do konstrukcji hybrydowych genów HSP90.

Starter	Sekwencja (5'→3')
α100β96 F	GAATTGGAATGACCAAGGCTGATCTCATAAATAATTTGGGAAC
α100β96 R	GTTCCCAAATTATTTATGAGATCAGCCTTGGTCATTCCAATTC
β96α100 F	ATTGGCATGACCAAAGCTGACTTGATCAATAACCTTGG
β96α100 R	CCAAGGTTATTGATCAAGTCAGCTTTGGTCATGCCAAT
α220β215 F	GAAGAAACATTCTCAGTTTATTGGATATCCCATCACCC
α220β215 R	GGGTGATGGGATATCCAATAAACTGAGAATGTTTCTTC
β215α220 F	GAAGAAGCATTCTCAGTTTATTGGATATCCCATTACTCTT
β215α220 R	AAGAGTAATGGGATATCCAATAAACTGAGAATGCTTCTTC
α278β270 F	GTACATCGATCAAGAAGAGCTCAACAAGACCAAGCCTATTTGG
α278β270 R	CCAAATAGGCTTGGTCTTGTTGAGCTCTTCTTGATCGATGTAC
β270α278 F	GAAATACATTGATCAGGAAGAACTAAACAAAACAAAGCCCATCTGG
β270α278 R	CCAGATGGGCTTTGTTTTGTTTAGTTCTTCCTGATCAATGTATTTTC
α380β372 F	CTGTGAGGAGCTAATCCCTGAGTATCTCAATTTTATCCGTGGTG
α380β372 R	CACCACGGATAAAAATTGAGATACTCAGGGATTAGCTCCTCACAG
β372α380 F	GGACAGCTGTGATGAGTTGATACCTGAATATCTGAACTTCATTAGAGGGGT
β372α380 R	ACCCCTCTAATGAAGTTCAGATATTCAGGTATCAACTCATCACAGCTGTCC
α560β552 F	GGCCTGGAACCTCCAGAGGATGAGGAGGAGAAGAAG
α560β552 R	CTTCTTCTCCTCCTCATCCTCTGGAAGTTCAGGCC
β552α560 F	GGTCTCAGTTACCAAGGAGGGTCTGGAACCTCCAGAGGATGAAGAAG
β552α560 R	CTTCTTCATCCTCTGGAAGTTCAGACCCTCCTTGGTAACTGAGACC
β478α486 F	CAGAGTATGTTTCTCGCATGAAGGAGAACCAGAAACA
β478α486 R	TGTTTCTGGTTCTCCTTCATGCGAGAAACATACTCTG
α486β478 F	CAAGGACTACTGCACCAGAATGAAGGAGACACAGAAGTC
α486β478 R	GACTTCTGTGTCTCCTTCATTCTGGTGCAGTAGTCCTTG

Tabela 3. Sekwencje starterów wykorzystanych do wprowadzenia mutacji do genów *HSP90*.

Starter	Sekwencja (5'→3')
βM621A F	CCATGGGCTATATGGCGGCCAAAAAGCACC
βM621A R	GGTGCTTTTTGGCCGCATATAGCCCATGG
αA629M F	CTCAACAATGGGTTACATGATG
αA629M R	CATCATGTAACCCATTGTTGAG
β T479N;S482H F	TCTCGCATGAAGGAGAATCAGAAGCACATCTATTACATCACTG
βT479N;S482H R	CAGTGATGTAATAGATGTGCTTCTGATTCTCCTTCATGCGAGA
β R506H;F508L;T514I F	GCGAGTGC GGAAACATGGCTTAGAGGTGGTATATATGATCGAGCCC ATTGACGAG
β R506H;F508L;T514I R	CTCGTCAATGGGCTCGATCATATATAACCACCTCTAAGCCATGTTTCC GCACTCGC

Gotowy gen kodujący hybrydowe Hsp90 wklonowano do wektora wykorzystując polimerazę z faga T4 [96]. Do ekspresji w układzie drożdżowym geny wklonowano do plazmidu p423TDH3, który posiada silny konstytutywny promotor genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i marker selekcyjny *HIS3*. Do ekspresji w liniach komórkowych geny *HSP90* wklonowano do plazmidu pcDNA3.1(+) z promotorem wirusa CMV, plazmid ten dodatkowo posiadał geny oporności na antybiotyki: ampicylinę oraz genetycynę (G418). Geny kodujące cIAP-1 oraz hERG umieszczono w plazmidzie pcDNA3-hygro z promotorem CMV, plazmid ten dodatkowo posiadał geny oporności na ampicylinę oraz hygromycynę.



Ryc. 6. Schemat przedstawiający budowę ludzkich Hsp90 z zaznaczonym podziałem na domeny N, M i C, hybrydowych genów Hsp90 (H3 do H17) oraz mutantów Hsp90 (H18 do H20), które po wklonowaniu do wektora używano w niniejszej pracy. Fragmenty pochodzące z Hsp90 α zaznaczono kolorem szarym a fragmenty z Hsp90 β kolorem białym. Liczby oznaczają pozycje reszt aminokwasowych.

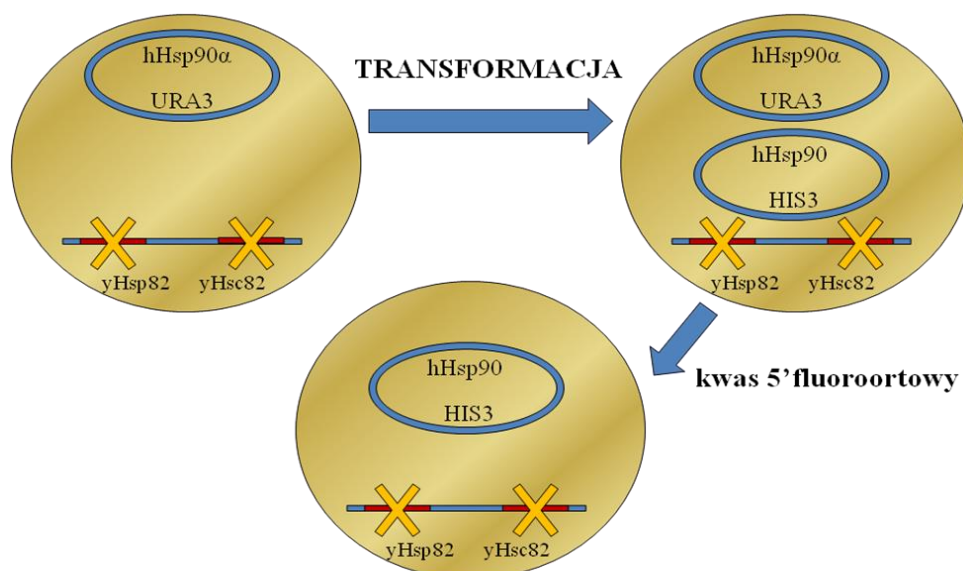
Plazmid kodujący hERG udostępnił dr Alvin Shrier z Zakładu Fizjologii Uniwersytetu McGill w Kanadzie. Plazmidy zawierające geny: *CIAP-1-MYC* oraz *CIAP-2-MYC*, *AHA1-FLAG*, oraz geny izoform i hybryd Hsp90 przeznaczone do ekspresji w drożdżach zostały skonstruowane przez dr hab. Pawła Bieganowskiego. Opis

konstrukcji plazmidów niosących geny: *HSP90 α* oraz *HSP90 β* - oba bez mutacji oporności na inhibitor, *HSP90 α* z mutacją i bez metki FLAG opublikowano przez Żurawska A. i wsp. [95].

3.2. Eksperymenty z użyciem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Używany szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* - SEY6211 (MATa leu2-3,112 ; his3- Δ 200; trp1- Δ 901; ura3-52; ade2-101; suc2- Δ 9) miał usunięte własne geny Hsp90 (nazywane *HSP82* i *HSC82*), które zastąpiono genami oporności na neomycynę, dlatego za aktywność opiekuńczą niezbędną dla przeżycia komórek odpowiadał plazmid z ludzkim *HSP90 α* i markerem *URA3* (gen warunkujący zdolność do wzrostu na podłożu bez uracylu) [95]. Plazmid ten był następnie zastępowany przez plazmidy pRS423 (marker *HIS3* i miejsce inicjacji replikacji 2 μ) lub pRS414 (marker *TRP1* i miejsce inicjacji replikacji *ARS ang. autonomously replicating sequence*) zawierające hybrydowe lub zmutowane geny *HSP90* pod kontrolą promotora *TDH3*.

Komórki szczepu drożdży będące w fazie logarytmicznego wzrostu transformowano opisanymi powyżej plazmidami wykorzystując metodę z użyciem mieszaniny: nośnikowego DNA, chlorku litu i PEG3000 [97]. Po transformacji drożdże selekcionowano na podłożu bez histydyny lub bez tryptofanu i hodowano w 30°C, następnie selekcionowano na podłożu z 0,1% kwasem 5-fluoroortowym. Drożdże, które pozostały tworząc kolonie na podłożu z kwasem 5-fluoroortowym utraciły plazmid z markerem *URA3* i genem Hsp90 α a jedynym źródłem aktywności Hsp90 były wprowadzone geny na plazmidzie z markerem selekcyjnym *HIS3* lub *TRP1* (geny warunkujące zdolność do wzrostu odpowiednio na podłożu: bez histydyny lub bez tryptofanu) w efekcie otrzymano szereg szczepów drożdży różniących się tylko produkowaną formą Hsp90 (Ryc. 7).



Ryc. 7. Schemat zamiany plazmidów w komórkach drożdży.

3.2.1. Drożdże z ekspresją ludzkiego białka Aha1

Szczepki drożdży z delecją genów: *HSC82* i *HSP82*, u których aktywne były jedynie ludzkie Hsp90 α lub β transformowano plazmidami kodującymi ludzkie białko Aha1, bądź pustym wektorem. Obydwa wprowadzone plazmidy posiadały marker selekcyjny *LEU2* (gen warunkujący zdolność do wzrostu na podłożu bez leucyny). Po transformacji drożdże selekcjonowano na podłożu bez leucyny w 30°C.

3.2.2. Drożdże z delecją genów *HCHI* i *AHA1*

Szczepki drożdży z delecją genów *AHA1* lub *HCHI* skonstruował dr hab. Paweł Bieganowski [98].

3.2.3. Metody pomiaru wzrostu drożdży

3.2.3.1. Płytkowy test rozcieńczeń

W celu oceny szybkości wzrostu drożdży na powierzchnię pożywki zestalonej agarem nakrapiano serię rozcieńczeń poszczególnych szczepów będących w fazie logarytmicznego wzrostu i hodowano w 30°C lub 37°C.

3.2.3.2. Hodowla z wytrząsaniem

Komórkami drożdży będącymi w fazie logarytmicznego wzrostu zaszczepiano podłoże płynne YPD (ang. *Yeast Peptone Dextrose*, wzbogacone o adeninę i uracyl w stężeniu 100 mg/l), osiągając gęstość hodowli $OD_{600}=0,1$. Drożdże hodowano w 30°C, dokonując spektrofotometrycznego pomiaru zmętnienia hodowli przy długości fali

$\lambda=600$. Czas podziału (*ang. Doubling time*) obliczano na podstawie modelu Gompertz-a wg. poniższego wzoru:

$$T2 = \frac{\Delta t}{\log_2\left(\frac{\Delta N}{N_0} + 1\right)}$$

gdzie: Δt – oznacza czas pomiędzy pomiarami

N_0 – początkową liczbę komórek

ΔN – różnica między zmierzoną liczbą komórek a N_0 , po upływie czasu Δt

3.2.3.3. Hodowla płytkowa z wytrząsaniem

Drożdże będące w fazie logarytmicznego wzrostu posiano na podłoże płynne YPD (wzbogacone o adeninę i uracyl w stężeniu 100 mg/l) i hodowano w 30°C z wytrząsaniem. Pomiaru zmętnienia hodowli dokonywano przy pomocy czytnika mikroplitek Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd). Obliczenia czasu podwojenia dokonywano w oparciu o krzywą wzrostu przy pomocy programu Doubling Time Online Calculator (<http://www.doubling-time.com/compute.php>).

3.3. Hodowle komórkowe

Linie komórkową ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK-293 hodowano w pożywce IMDM (*ang. Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) z dodatkiem 10% surowicy FBS (*ang. Fetal bovine serum*) (Cytogen) oraz 1% zestawem antybiotyków penicylina-streptomycyna (Cytogen). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

3.3.1. Transfekcja ludzkich komórek HEK-293

Komórki HEK-293 transfekowano z użyciem zestawów Lipofectamine LTX (Life Technologies), GeneCellin (BioCellChallenge) lub K2 (Biointex) według instrukcji producenta. Po transfekcji plazmidami zawierającymi sekwencje izoform lub hybryd Hsp90 z mutacjami warunkującymi oporność na inhibitor dalszą hodowlę prowadzono w medium z dodatkiem 1µM 17-AAG. W ten sposób selekcionowano komórki, które utrzymały ekspresję wprowadzonych genów *HSP90* a tym samym nabyły oporność na ten związek.

Komórki HEK-293 transfekowane dzikim typem izoform Hsp90 hodowano w medium bez 17-AAG i lizowano po 48 godzinach.

Po transfekcji plazmidami kodującym białka cIAP-1-MYC, cIAP-2-MYC, hERG, Aha1-FLAG komórki hodowano w medium z dodatkiem 17-AAG przez okres 24 lub 48 godzin i lizowano.

3.3.2. Ocena wpływu Hsp90 na zawartość białek substratowych w komórkach HEK-293

Po 24 godzinach od transfekcji plazmidami zawierającymi geny *CIAP-1* lub *CIAP-2* komórki lizowano w buforze o składzie identycznym z buforem do immunoprecypitacji. Lizaty zawieszano w buforze Laemmliego (4% SDS, 10% glicerol, 60 mM Tris pH 6,8, 0,1% błękit bromofenolowy) z dodatkiem β -merkaptoetanolu, następnie gotowano w 95°C przez 5 min.

Komórki po transfekcji plazmidem kodującym hERG lizowano w buforze RIPA (*ang. Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (150 mM NaCl, 1,0% Triton X-100, 0,5% dezoksycholan sodu, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0), zawieszano w buforze Laemmliego z dodatkiem β -merkaptoetanolu i gotowano w 70°C przez 10 min. Białko w lizatach oznaczano z użyciem Pierce BCA Protein Assay Kit 23225, zgodnie z instrukcją producenta.

3.3.3. Stabilność heterodimerów

Komórki z ekspresją Hsp90 β po selekcji na oporność na 17-AAG, hodowano w czystym medium bez dodatkowych czynników selekcyjnych oraz w mediach wzbogaconych o: 1 μ M 17-AAG lub 0,8 μ g/ml G418. Po 48 godzinach przeprowadzano immunoprecypitację.

3.3.4. Immunoprecypitacja

Do immunoprecypitacji (IP, *ang. Immunoprecipitation*) używano komórki po selekcji na oporność na 17-AAG, ekspresjonujące: Hsp90 α , Hsp90 β lub formy hybrydowe Hsp90. Do izolacji immunokompleksów używano kulek agarozowych ze związanym kowalencyjnie przeciwciałem wiążącym metkę FLAG (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma), ponieważ ekspresjonowane białka posiadały dodaną metkę FLAG na końcu aminowym.

Komórki lizowano w buforze o składzie: 25 mM Tris pH 7,6, 1 mM ATP, 0,5% Triton X-100 (lub 0,5% Tween-20). Frakcję nierozpuszczalną oddzielano przez wirowanie przy 13 400 x g w czasie 15 min. w 4 °C. Supernatant podzielono na dwie części. Pierwszą część gotowano w 95°C przez 5 min. w obecności buforu Laemmliego z β -merkaptoetanolem. Drugą część supernatantu inkubowano w 4°C z mieszaniem przez

2 godziny z kulkami agarozowymi opłaszczonymi przeciwciałami. Niezwiązane białka odplukiwano 20mM Tris pH 7,6 o temp 4°C. Związane białka eluowano przez dodanie 1% SDS-u lub 2 krotnie stężonego buforu Laemmliego bez β -merkaptetanolu.

Skład kompleksów Hsp90 i związanych z nim białek wyizolowanych w trakcie IP był dalej analizowany za pomocą techniki Western blot.

3.3.5. Immunodetekcja

Lizaty bądź eluaty IP rozdzielano w warunkach denaturujących na nieciąglym 4%/10% (4%/8% w przypadku hERG) żelu poliakrylamidowym, następnie przy pomocy elektrotransferu próbki przenoszono na błonę nitrocelulozową. Nitrocelulozę z rozdzielonymi białkami blokowano w buforze PBS zawierającym 5% odtłuszczone mleko i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi.

Używano następujących przeciwciał pierwszorzędowych:

- FLAG (Sigma-Aldrich, F3165)
- Aha1 (Abcam, ab56721)
- Cdc37 (Abcam, ab109419)
- p23 (Abcam, ab92503)
- Aktyna (MP Biomedicals, 691001)
- Myc-Tag (Cell Signaling, 71D10)
- hK_v11.1(HERG) (Alomone labs, APC-062)
- Hsp90 β (Abcam, ab119833)
- Hsp70 (Santa Cruz, sc-32239)
- Hsp90 (Santa Cruz, sc-7947)

Po inkubacji usuwano niezwiązane przeciwciała przy pomocy PBS a związane przeciwciała pierwszorzędowe wykrywano odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową. Detekcję przeprowadzano metodą chemiluminescencyjną przy użyciu roztworu zawierającego 100 mM Tris pH 8,7, 250 mM luminol, 90 mM kwas kumarynowy. Wizualizację wyniku przeprowadzano z wykorzystaniem błony światłoczułej.

3.3.6. Pomiar wzrostu komórek ludzkich HEK-293

Po selekcji na 17-AAG komórki posiano na płytkę 96 dołkową, po $2 \cdot 10^3$ komórek na dołek. Pomiaru żywotności komórek dokonywano przy pomocy Cell Counting Kit – 8 (Sigma) według instrukcji producenta, z inkubacją 3 godziną i pomiarem absorbancji przy długości fali $\lambda=450$ nm przy wykorzystaniu czytnika mikroplatek (Epoch, BioTek).

Na podstawie ilości żywych komórek ze stabilną ekspresją hybryd Hsp90 mierzonej co 24 godziny, obliczono czas podziału (*ang. Doubling time*). Komórki kontrolne (bez ekspresji wprowadzanych genów izoform, bądź hybryd *HSP90*) hodowano w medium bez 17-AAG.

3.3.7. Pomiar wzrostu komórek ludzkich w zależności od stężenia inhibitora - 17-AAG

Po selekcji na 17-AAG komórki posiano po 10^3 komórek na dołek i dodano wybrane stężenia 17-AAG. Krzywą przeżywalności sporządzono na podstawie liczby żywych komórek do 96 godz. inkubacji z inhibitorem. Komórki kontrolne (bez ekspresji wprowadzanych genów izoform bądź hybryd *HSP90*) hodowano w medium zawierającym 17-AAG.

3.4. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczną obliczano w oparciu o test Dunnett'a, poprzedzony jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA). Gdzie zaznaczono stosowano test t dla obserwacji niesparowanych. Wynik uznawano za istotny statystycznie, gdy $p < 0,05$.

4. Wyniki

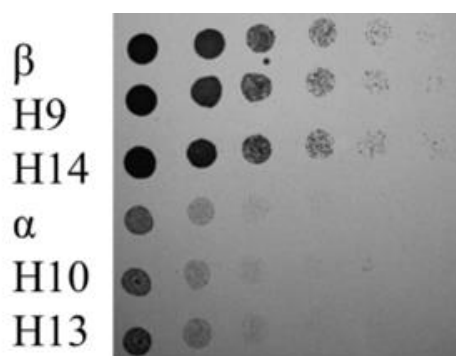
W przeprowadzonych badaniach poszukiwano różnic w funkcjonowaniu izoform Hsp90 α i β oraz ich w oddziaływaniu z wybranymi białkami pomocniczymi i klientami. W pierwszej części badań sprawdzono działanie izoform Hsp90 α i β oraz skonstruowanych form hybrydowych, w których fragmenty sekwencji aminokwasowej zostały wymienione między izoformami. W eksperymentach przeprowadzonych z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz komórek HEK-293, zbadano wzrost komórek oraz z linii komórkowych stabilnie ekspresjonujących wprowadzone formy Hsp90 oraz izolowano białka oddziałujące z Hsp90.

W części drugiej oceniono ekspresję wybranych białek substratowych takich jak: cIAP-1, cIAP-2, hERG w komórkach produkujących formy hybrydowe Hsp90.

4.1. Wpływ wymiany domen izoform Hsp90 na wzrost produkujących je komórek oraz wiązanie białek pomocniczych

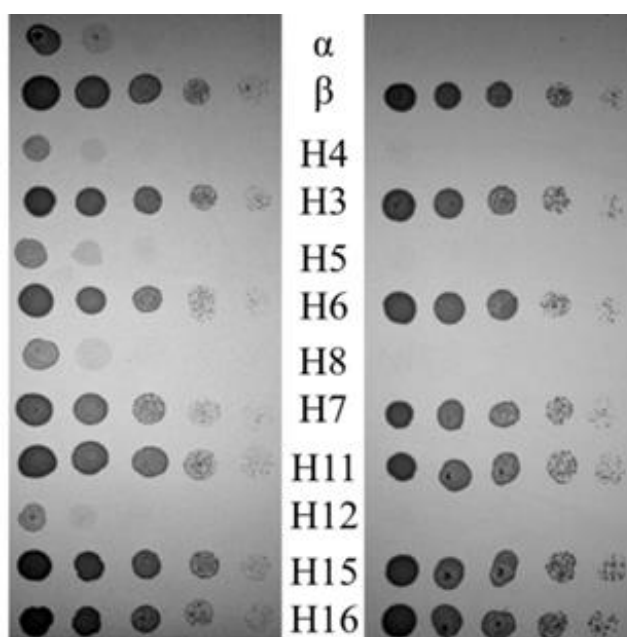
Wektory niosące geny ludzkich cytoplazmatycznych izoform Hsp90 zostały wprowadzone do drożdży, których własne Hsp90 były nieaktywne (delecja genów: *HSP82* i *HSC82*). Sekwencja aminokwasowa ludzkich cytoplazmatycznych izoform Hsp90 α i β charakteryzuje się wysokim podobieństwem sięgającym 85%. W jej zakresie istnieją obszary o mniejszym podobieństwie między izoformami. Należą do nich pierwsze 100 aminokwasów od końca aminowego oraz fragment nazywany „charged linker” obejmujący aminokwasy 220-278 w Hsp90 α i aminokwasy 215-270 w Hsp90 β .

Sprawdzano, czy szybkość wzrostu drożdży zależy od ekspresji izoform lub hybryd Hsp90 z wymienionymi odcinkami aminokwasowymi „charged linkera” (hybrydy H9 i H10) oraz pierwszych stu aminokwasów (H13, H14). Komórki drożdży po transformacji i selekcji posiano w serii rozcieńczeń na podłoże stałe i hodowano w 30°C. Drożdże po transformacji zachowały żywotność bez względu na typ ludzkiego Hsp90, którym były transformowane, ale tempo ich wzrostu było różne. Drożdże z ekspresją Hsp90 α rosły wolniej niż drożdże z ekspresją Hsp90 β . Nie zaobserwowano różnic w porównaniu do komórek kontrolnych z ekspresją izoformy α dla hybryd H10 i H13 lub komórek kontrolnych z ekspresją β Hsp90 dla hybryd H9 i H14 (Ryc. 8). Można przyjąć, że różnice w sekwencji wymienianych fragmentów nie mają istotnego wpływu na aktywność ludzkich Hsp90.



Ryc. 8. Porównanie wzrostu drożdży z ekspresją ludzkich izoform i form hybrydowych Hsp90. Czterokrotne rozcieńczenia wyjściowej hodowli nakrapiano na podłoże YPD i hodowano w temperaturze 30°C.

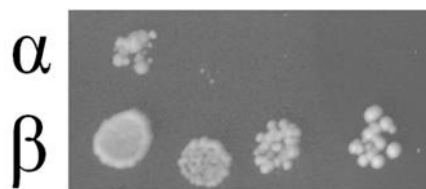
Wymieniono dłuższe fragmenty sekwencji izoform Hsp90 obejmujące całe domeny. W hodowli prowadzonej w temperaturze 30°C drożdże z ekspresją Hsp90 α rosły wolniej niż drożdże z ekspresją Hsp90 β , podobnie jak w powyższym eksperymencie. Wolnym wzrostem cechowały się również wszystkie szczepy drożdży, których hybrydowe Hsp90 posiadały w swej strukturze fragment pochodzący ze środkowej domeny izoformy Hsp90 α (Ryc. 9). W 37°C wzrost wolno rosnących szczepów został zahamowany. Porównanie wzrostu drożdży z ekspresją hybryd: H11, H12, H15 i H16 wykazało, że za fenotyp wolnego wzrostu odpowiada połowa domeny środkowej położona bliżej końca karboksylowego Hsp90.



Ryc. 9. Porównanie wzrostu drożdży z ekspresją ludzkich izoform i form hybrydowych Hsp90. Rozcieńczenia wyjściowej hodowli drożdży nakrapiano na podłoże i hodowano na podłożu YPD, w temperaturze 30°C (po lewej) oraz 37°C (po prawej).

Sprawdzano, czy na fenotyp wzrostu drożdży wpływa rodzaj miejsca inicjacji replikacji (ORI, ang. *origin of replication*) w plazmidzie a tym samym ilość kopii plazmidu w komórce. W drożdżach mogą funkcjonować dwa typy wektorów. Pierwszy to wektory replikatywne YR (ang. *Yeasts Replicative*) posiadające sekwencję ARS (ang. *autonomously replicating sequence*) będącą sekwencją inicjacji replikacji z chromosomu drożdży. Wektory te charakteryzuje ekspresją białka heterologicznego na poziomie bliskim białkom natywnym. Drugi typ to wektory episomalne YE (ang. *Yeasts Episomal*) nazywane 2 μ i posiadające sekwencję inicjacji replikacji pochodzącą z występującego naturalnie u drożdży plazmidu 2 μ . Wektory te charakteryzuje wysoka ekspresją białka heterologicznego skutkująca jego dużą ilością w komórce.

Przeklonowano geny izoform Hsp90 do nowego plazmidu z markerem selekcyjnym *TRP1*. Plazmid ten posiadał chromosomalną sekwencję centromerową ARS (zastosowane poprzednio wektory z markerem *HIS3* były wektorami episomalnymi). Komórki drożdży po transformacji wektorem replikatywnym i selekcji, posiano na podłoże stałe (YPD) i obserwowano wzrost kolonii. Zamiana typu wektora, nie wpłynęła na zmianę fenotypu wzrostu drożdży z ekspresją ludzkich izoform Hsp90. Podobnie jak poprzednio drożdże z ekspresją ludzkiej izoformy α charakteryzował wolniejszy wzrost w porównaniu do drożdży z ekspresją ludzkiej izoformy β (Ryc. 10). Obserwacja ta pozwala wykluczyć wpływ typu zastosowanego wektora na otrzymane wyniki.



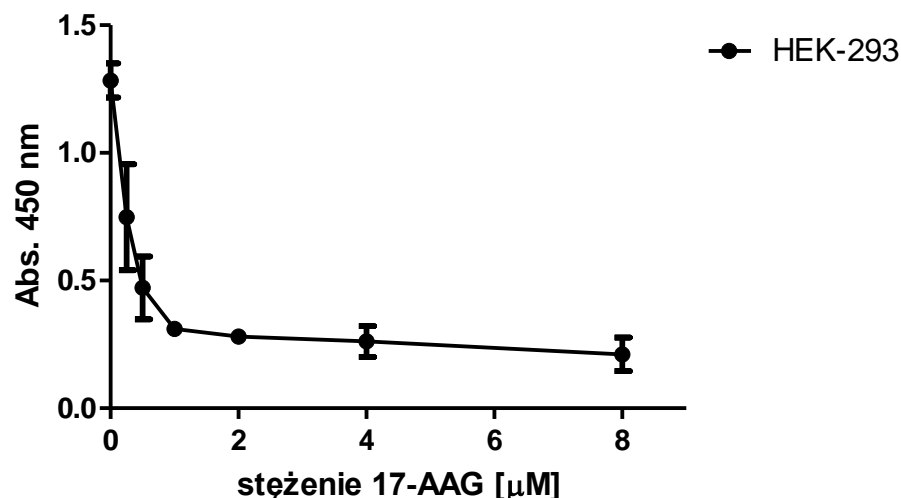
Ryc. 10. Porównanie wzrostu drożdży transformowanych plazmidami centromerowymi z genami *HSP90* α i β . Czterokrotne rozcieńczenia wyjściowej hodowli nakrapiano na podłoże YPD i hodowano w temperaturze 30°C.

Duża ilość i wysoka stabilność Hsp90 w komórce sprawia, że zastosowanie do badań nad Hsp90 standardowych metod wyciszania ekspresji białek, takich jak siRNA lub antysensowne oligonukleotydy, jest trudne. Ponadto, duże podobieństwo Hsp90 α i Hsp90 β dodatkowo utrudnia znalezienie sekwencji efektywnie eliminujących tylko jedną izoformę. W przedstawionych poniżej badaniach wybrano alternatywną metodę, polegającą na wykorzystaniu zmutowanych białek Hsp90 opornych na inhibitor aktywności ATPazowej Hsp90 - 17-AAG. Użycie inhibitora pozwala na zahamowanie

aktywności endogennych Hsp90, przy jednoczesnym utrzymaniu aktywności wprowadzonych izoform lub form hybrydowych Hsp90. Takie działanie umożliwia obserwację wyników aktywności tylko jednej z izoform Hsp90 lub aktywności jedynie wprowadzonych form hybrydowych Hsp90. Mutacja warunkująca oporność dotyczyła substytucji aminokwasów I128T w przypadku izoformy α oraz odpowiednio I123T dla izoformy β . Mutacje te zostały wcześniej opisane i scharakteryzowane [95].

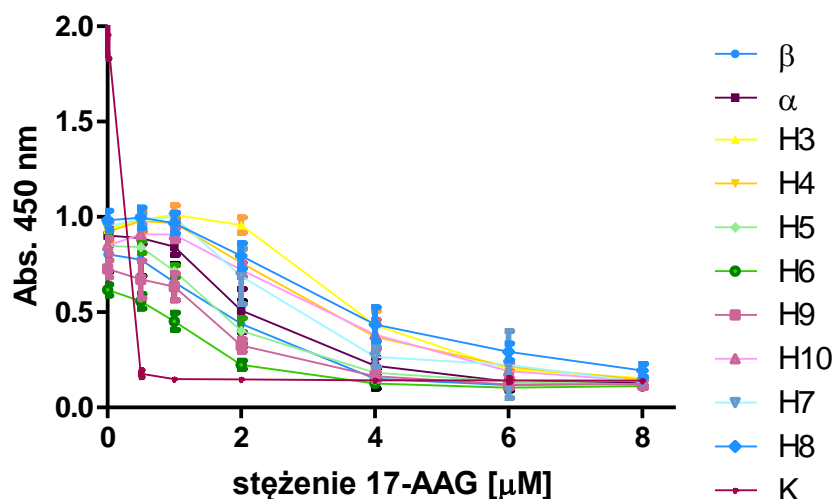
Plazmidy zawierające geny kodujące odporne na inhibitor Hsp90 wprowadzono do komórek linii HEK-293. Po transfekcji komórki selekcjonowano w medium zawierającym 17-AAG w stężeniu 1 μ M, czterokrotnie przekraczającym stężenie powodujące śmierć komórek tej linii. Dalsza hodowla komórek (po selekcji) również przebiegała w obecności inhibitora, pozwalając na podtrzymywanie ekspresji wprowadzonych genów *HSP90*.

W przypadku wszystkich badanych hybryd Hsp90, udało się otrzymać linie komórkowe stabilnie rosnące w obecności inhibitora Hsp90 (17-AAG). Krzywa przeżywalności komórek HEK-293 w różnych stężeniach 17-AAG pokazuje, że po 24 godzinach inkubacji ze inhibitorem stężenie 0,25 μ M 17-AAG powoduje obumieranie nietransfekowanych komórek (Ryc. 11).



Ryc. 11. Krzywa przeżywalności komórek HEK-293 dzikiego typu – nietransformowanych dodatkowo żadnym plazmidem, po 24 godzinach inkubacji w wybranych stężeniach 17-AAG. Punkty stanowią średnią \pm S.D. z 3 powtórzeń.

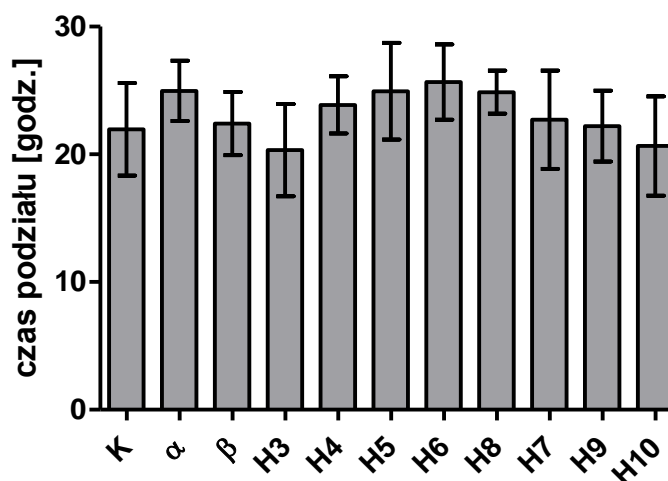
Aby sprawdzić, czy stosowane w selekcji komórek stężenie inhibitora nie daje zbyt niskiej lub zbyt wysokiej presji selekcyjnej, wyznaczono krzywą przeżywalności w przedziale stężeń od 0 do 8 μ M 17-AAG (Ryc. 12). Hodowla w 1 μ M 17-AAG, utrzymywała stabilną ekspresję białek bez istotnego spadku proliferacji komórek. Przy wyższych stężeniach inhibitora efekt zahamowania wzrostu jest lepiej widoczny.



Ryc. 12. Krzywa przeżywalności komórek HEK-293 transfekowanych izoformami i hybridami Hsp90, po 96 godzinach inkubacji w wybranych stężeniach 17-AAG. Oznaczenia α i β odpowiadają linii komórkowej z ekspresją odpowiednio Hsp90 α lub Hsp90 β . Linie z ekspresją hybrid oznaczono symbolami od H3 do H10. K oznacza komórki nietransfekowane. Punkty stanowią średnią \pm S.D. z 4 powtórzeń.

Sprawdzano czy wyselekcjonowane komórki HEK-293 ze stabilną ekspresją wprowadzonych izoform i hybrid Hsp90 będzie różniło tempo wzrostu, podobnie jak miało to miejsce u drożdży, dlatego wyznaczono odpowiadające im czasy podziału. Pomiar ilości żywych komórek dokonywano w oparciu o kolorymetryczny test CCK-8 i oznaczano w odstępach 24 godzin. Tempo proliferacji nie różniło się znacznie między komórkami, w których aktywne były różne formy Hsp90. Obserwowano tendencję do wolniejszych podziałów komórek z ekspresją izoformy α w porównaniu do komórek z ekspresją izoformy β , jednak różnice te były nieistotne statystycznie (Ryc. 13). Nie zaobserwowano także istotności statystycznej między czasem podziału dla komórek z ekspresją hybrid Hsp90 a komórek kontrolnych w których funkcjonowały endogenne Hsp90.

Wprowadzone formy Hsp90 pozostawały aktywne, skoro komórki z ich ekspresją zachowały żywotność i zdolność do proliferacji porównywalną z komórkami nietransfekowanymi. Powyższe obserwacje dowodzą, że do prawidłowego funkcjonowania komórek HEK-293 wystarcza aktywność jednej izoformy, bądź hybridy Hsp90.

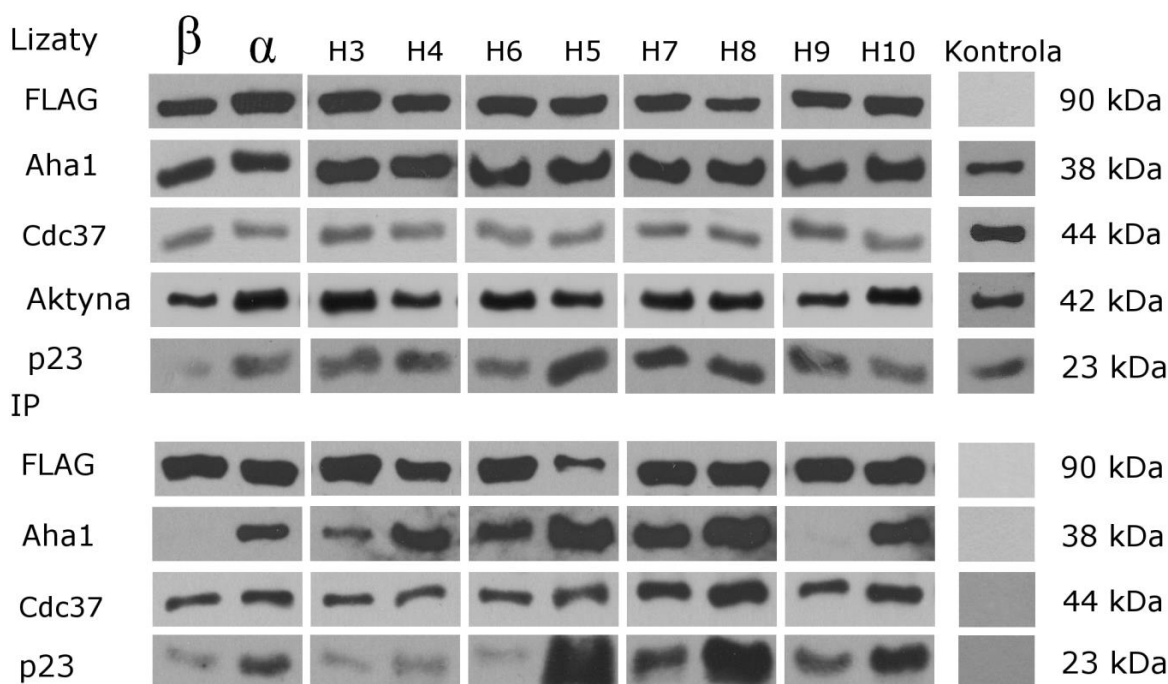


Ryc. 13. Czas podziału dla komórek linii HEK-293 transfekowanych izoformami oraz hybridami Hsp90 oznaczonymi od H3 do H10. K oznacza komórki nietransfekowane. Wyniki zaprezentowano jako średnią \pm S.D. z 4 powtórzeń, w kontroli z 3 powtórzeń.

W dalszej kolejności w komórkach o stabilnej ekspresji izoform lub hybrid Hsp90, sprawdzano poziom ekspresji białek pomocniczych takich jak: p23, Aha1, Cdc37. Geny kodujące izoformy lub hybrydy Hsp90 oprócz mutacji warunkującej oporność na inhibitor posiadały dodatkową sekwencję kodującą krótki peptydowy znacznik (tag) FLAG dołączony w przypadku każdej z form Hsp90 do końca aminowego. Ten dodatkowy fragment umożliwiał izolację form Hsp90 powstałych na drodze ekspresji wprowadzonych genów oraz umożliwiał ich prawidłową immunodetekcję. Zdecydowano się na opisane powyżej rozwiązanie, ponieważ dostępne przeciwciała rozpoznające Hsp90 nie rozróżniają zadowalająco izoform α i β , zwykle silniej wiążą się z Hsp90 β . Próbę kontrolną w przeprowadzonym eksperymencie stanowiły komórki HEK-293 bez ekspresji opornych na inhibitor, tagowanych białek Hsp90.

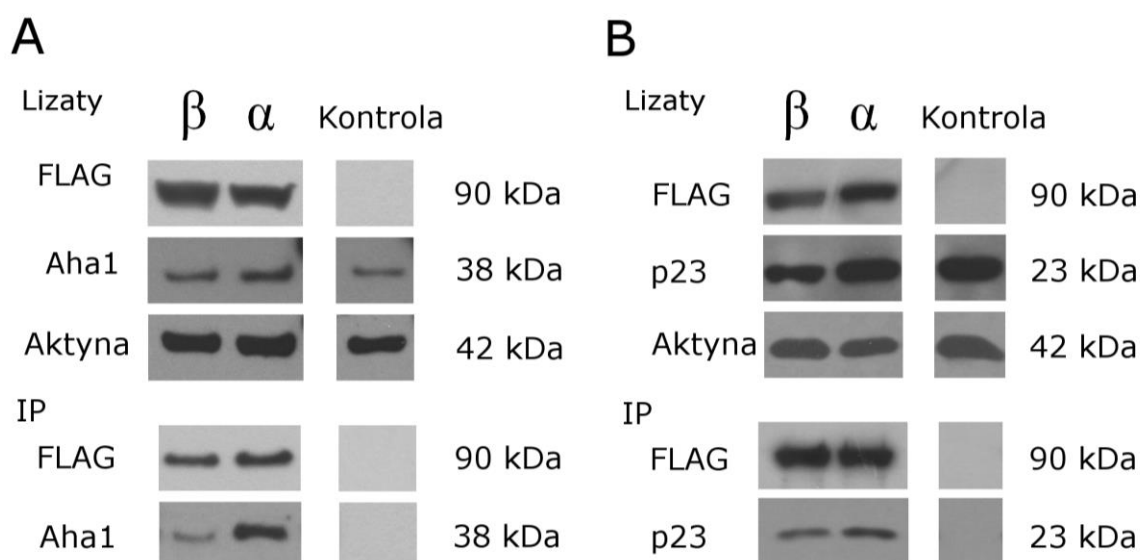
Analiza kompleksów białek oddziałujących z nadekspresjowanymi Hsp90 pokazała, że izoformę Hsp90 α z mutacją warunkującą oporność na 17-AAG charakteryzowało zwiększone powinowactwo do Aha1 w porównaniu do izoformy Hsp90 β z tą samą mutacją (Ryc. 14). Analiza hybrid Hsp90, w których poszczególne domeny Hsp90 α zostały wymienione na odpowiadające im domeny Hsp90 β wykazała, że obecność w sekwencji badanego Hsp90 domeny M pochodzącej z izoformy α wiąże się z silniejszym oddziaływaniem z Aha1. Identyczną zależność zaobserwowano dla białka pomocniczego p23, które oddziaływało silniej z białkami hybridowymi zawierającymi środkową domenę izoformy Hsp90 α . Sprawdzano także interakcję dla białka

pomocniczego Cdc37, dla którego nie zaobserwowano preferencji oddziaływania wobec żadnej z izoform, lub form hybrydowych.



Ryc. 14. Analiza Western blot lizatów oraz immunoprecypitatów (IP) z komórek transfekowanych *Hsp90 α* , *Hsp90 β* i hybrydowymi *Hsp90* (H3-H10). Immunoprecypitację przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała wiążącego metkę FLAG, dodaną do końca aminowego ekspresjonowanych białek. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Wyniki pokazują ilość wskazanych białek w nieoczyszczonych lizatach przed IP (górny panel) oraz w kompleksach po IP (dolny panel). Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

Informacje literaturowe sugerowały, że zwiększone oddziaływanie białka Aha1 z *Hsp90*, może wynikać z obecności mutacji warunkującej oporność na inhibitor 17-AAG [95]. Porównano wiązanie białek pomocniczych Aha1 i p23 do obu izoform *Hsp90*, w komórkach HEK-293 poddanych przejściowej transfekcji dzikimi allelami *Hsp90* α i β (bez mutacji oporności na inhibitor) z dodaną metką FLAG. Wyniki immunoprecypitacji z użyciem przeciwciała specyficznego dla peptydu FLAG świadczą, że białka Aha1 i p23 tworzą bardziej stabilny kompleks z *Hsp90 α* niż z *Hsp90 β* (Ryc. 15), przy czym różnica ta jest lepiej widoczna dla białka Aha1. Dowodzi to, że silniejsze oddziaływanie obydwu białek z *Hsp90 α* nie jest uwarunkowane mutacją w domenie N *Hsp90*.



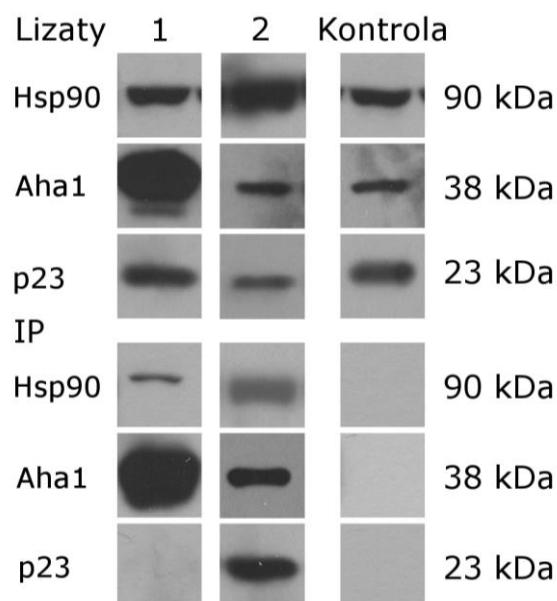
Ryc. 15. Analiza Western blot lizatów oraz immunoprecypitatów (IP) z komórek transfekowanych plazmidami FLAG-Hsp90 α i FLAG-Hsp90 β , bez mutacji warunkującej oporność na inhibitor. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Wyniki pokazują ilość wskazanych białek w lizatach przed IP (górny panel), oraz w oczyszczonych kompleksach po IP (dolny panel). Zaprezentowano wyniki dwóch eksperymentów przebiegające w tych samych warunkach. Panel A prezentuje ilość oczyszczonego białka Aha1, panel B ilość oczyszczonego białka p23. Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

4.2. Potrójny kompleks białek Hsp90/Aha1/p23

Obserwacja zwiększonego wiązania p23 do Hsp90 α lub do form hybrydowych zawierających fragment środkowej domeny izoformy α powtórzyła się zarówno dla Hsp90 α posiadającego mutację oporności na inhibitor i dla natywnej wersji białka (Ryc. 14, Ryc. 15). Opierając się na powyższych wynikach sprawdzono, czy wspomniane białka mogą współtworzyć potrójny kompleks złożony z p23, Aha1 oraz Hsp90. Przeprowadzono izolację białek: Hsp90 α lub Aha1 z komórek ekspresjonujących dwie wersje Hsp90 α : z dodanym FLAG lub bez FLAG-a. Komórki z ekspresją Hsp90 α pozbawionego metki peptydowej transfekowano dodatkowo plazmidem kodującym Aha1-FLAG. Oba typy Hsp90 α produkowanego przez komórki zawierały mutację oporności na inhibitor, dlatego hodowlę prowadzono w medium zawierającym 17-AAG. Wspomniane białka oczyszczano wykorzystując przeciwciała anty-FLAG skierowane przeciw:

- Aha1 z metką FLAG (Ryc. 16, Kolumna 1).
- Hsp90 α z metką FLAG (Ryc. 16, Kolumna 2).

Identyczny eksperyment przeprowadzono na komórkach kontrolnych (nadekspresja Hsp90 α opornego na inhibitor, bez FLAG-a), dodatkowo transfekowanych pustym wektorem (Ryc. 16, Kolumna 3).



Ryc. 16. Analiza Western blot immunoprecypitatów kompleksu białek: Hsp90-Aha1-p23. Izolacja immunokompleksów wykonana została z lizatów komórek z ekspresją Hsp90 α (kolumny 1, 2, Kontrola) oraz dodatkowo transfekowanych plazmidem zawierającym Aha1-FLAG (kolumna 1) lub pustym wektorem (Kontrola) Wyniki pokazują ilość wskazanych białek w lizatach przed IP (górny panel), oraz w oczyszczonych kompleksach po IP (dolny panel).

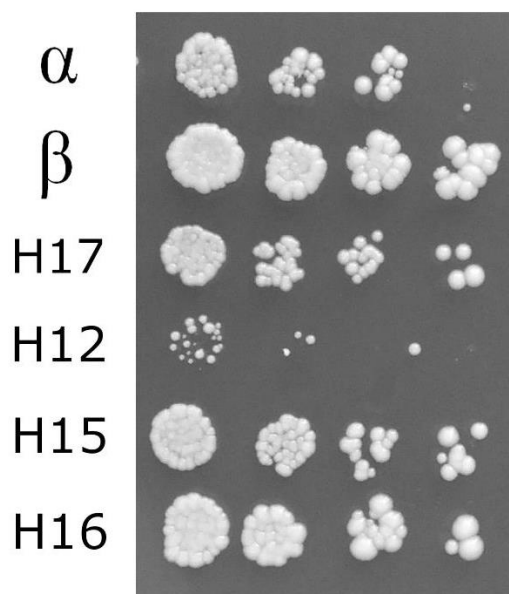
Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano, że izolacja Hsp90 pociągała za sobą obecność obydwu białek współlopiekuńczych: Aha1 i p23. Obserwacja ta była identyczna jak w eksperymencie wykonanym poprzednio (Ryc. 14). Gdy przeciwciała skierowane było przeciw metce peptydowej dołączonej do Aha1 w kompleksie stwierdzono jedynie obecność Hsp90 i Aha1. Jeżeli dochodzi do powstawania potrójnego układu Hsp90-Aha1-p23 to jest on przejściowy i wysoce niestabilny.

4.3. Analiza obszaru środkowej domeny Hsp90 α

Podział środkowej domeny Hsp90 i wymiana krótszych odcinków sekwencji między izoformami, miały na celu skonstruowanie hybryd Hsp90 pomocnych w precyzyjnym określeniu rejonu preferencyjnego oddziaływania Aha1 z Hsp90 α . Podobnie jak w poprzednich eksperymentach formy hybrydowe Hsp90 testowano

w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* oraz ludzkiej linii komórkowej HEK-293.

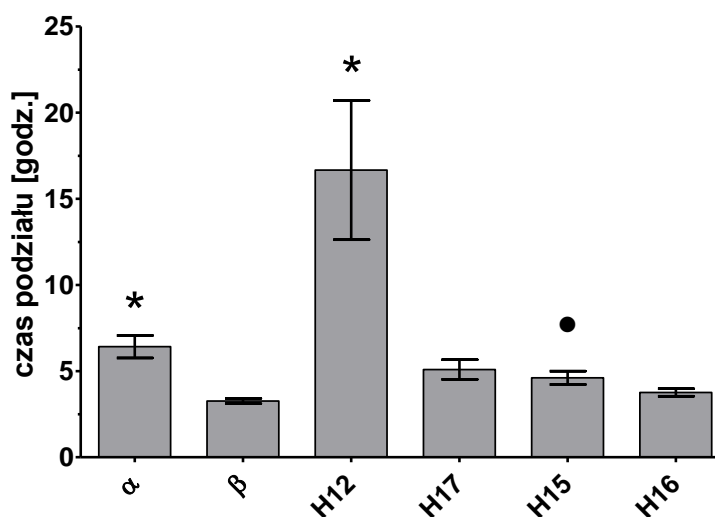
Obserwowano wpływ ekspresji wariantów Hsp90 na wzrost drożdży na podłożu stałym (Ryc. 17) oraz w hodowli płynnej (Ryc. 18).



Ryc. 17. Porównanie wzrostu drożdży z ekspresją hybrydowych Hsp90 z wymienionymi fragmentami środkowej domeny. Czterokrotne rozcieńczenia wyjściowej hodowli nakrapiano na podłoże YPD i hodowano w temperaturze 30°C.

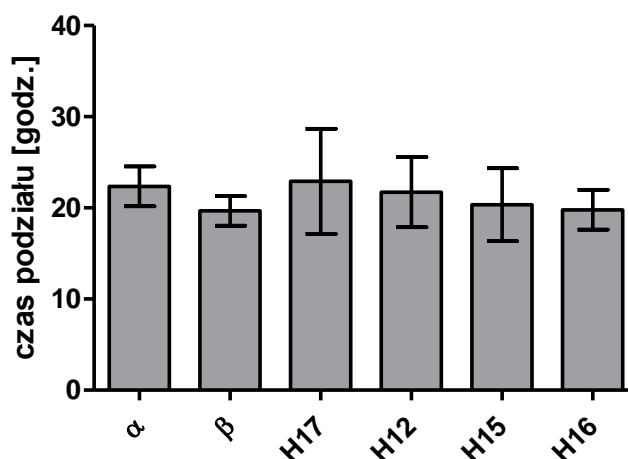
Na podstawie obserwacji wzrostu kolonii stwierdzono, że wolniejszy wzrost charakteryzował drożdże ekspresjonujące hybrydę H12 w porównaniu do pozostałych testowanych szczepów. Wzrost tych drożdży był wolniejszy niż szczepu z aktywną izoformą Hsp90 α . Drożdże z ekspresją hybryd: H15 do H17 rosły szybciej niż drożdże z ekspresją Hsp90 α i nieco wolniej niż drożdże z ekspresją Hsp90 β . Wymiana odcinka aminokwasowego od 220 do 380 dla Hsp90 α w hybrydzie H17, podobnie jak wymiana krótkich fragmentów w hybrydach H15 i H16, nie spowodowała tak wyraźnego spowolnienia wzrostu, jak u drożdży z ekspresją H12 (wymiana fragmentu obejmującego aminokwasy 380 do 560 dla Hsp90 α). Wyznaczone wartości czasu podziału uzupełniały obserwacje makroskopowe. W hodowli płynnej najwyższa wartość czasu podziału, a tym samym najwolniejszy wzrost dotyczył drożdży z ekspresją H12 (Ryc. 18). Różnica między czasem podziału szczepu z ekspresją Hsp90 β a szczepu z aktywnym H12 była istotna statystycznie. Nie zaobserwowano istotności statystycznej między czasem podziału drożdży z ekspresją Hsp90 β a hybrydami H15 do H17. Widoczny jest natomiast trend dłuższego czasu potrzebnego do proliferacji drożdży z ekspresją tych hybryd, wobec drożdży z ekspresją Hsp90 β .

Na przyjętym poziomie istotności wyznaczenie czasu podziału pozwoliło na zaobserwowanie istotnie statystycznej różnicy dla pary szczepów H15 i H16 niezaobserwowanej wcześniej w hodowli płytkowej. Drożdże szczepu H15 zawierające 74 aminokwasowy odcinek pochodzący z izoformy α charakteryzował niewiele dłuższy czas podziału w porównaniu do drożdży z ekspresją hybrydy H16 posiadających w sekwencji analogiczny odcinek należący do izoformy β .



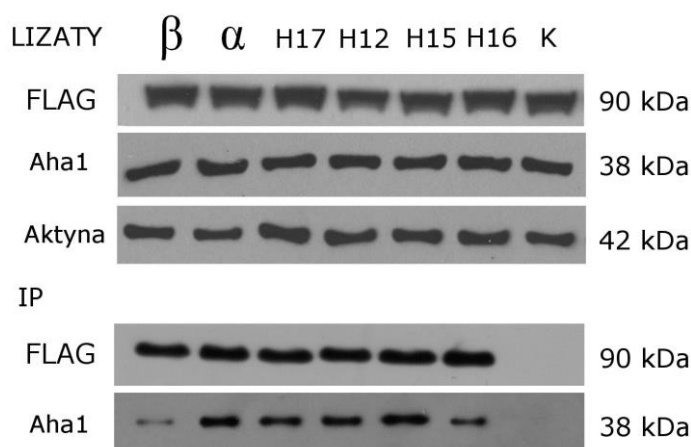
Ryc. 18. Czas podziału dla drożdży transformowanych izoformami oraz hybrydami ludzkich białek Hsp90 oznaczonymi: H7, H8, H12, H15-H17. Drożdże hodowano w 30°C na podłożu YPD. Wyniki przedstawiono, jako średnią \pm S.D. z 3-12 powtórzeń, * $p < 0,05$ vs. β (test Dunnetta); ● $p = 0,015$ vs. H16 (test t-Studenta).

Hybrydy z fragmentami środkowej domeny testowano również w komórkach HEK-293. Wyznaczono czas podziału linii komórkowej HEK-293 z ekspresją poszczególnych hybryd (Ryc. 19). Nie zaobserwowano różnic, które były by istotne statystycznie. Wymiana odcinków środkowej domeny Hsp90 i ekspresja powstałych hybryd Hsp90 nie wpływała na zmianę w tempie proliferacji komórek.



Ryc. 19. Czas podziału dla komórek linii HEK-293 transfekowanych izoformami oraz hybridami Hsp90 oznaczonymi: H12, H15-H17. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm S.D. z 4 powtórzeń.

Geny wariantów HSP90 wprowadzone do komórek HEK-293 posiadały mutację warunkującą oporność na inhibitor 17-AAG. Po selekcji w medium z inhibitorem, w komórkach stabilnie ekspresjonujących izoformy i hybrydy Hsp90 z wymienionymi odcinkami środkowej domeny, sprawdzano poziom ekspresji białka Aha1. Izolacja kompleksów białek oddziałujących z tymi formami Hsp90 odbywała się dzięki dołączonemu do nich znacznikowi FLAG.



Ryc. 20. Analiza Western blot lizatów oraz immunoprecypitatów (IP) z komórek transfekowanych Hsp90 α , Hsp90 β i hybridowymi Hsp90 (oznaczone H12, H15, H16, H17). Immunoprecypitację przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała wiążącego metkę FLAG dodaną do końca aminowego ekspresjonowanych białek. Kontrolę (oznaczoną jako K) stanowiły komórki nietransfekowane. Wyniki pokazują ilość wskazanych białek w lizatach przed IP (górny panel), oraz w oczyszczonych kompleksach po IP (dolny panel). Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

Zaobserwowano zbliżony poziom ekspresji wprowadzonych form Hsp90 oraz Aha1 w lizatach komórkowych (Ryc. 20). Analiza wyników immunoprecypitacji wykazała, że hybrydy: H12, H17, H15 oddziałują z Aha1 ze zbliżonym powinowactwem porównywalnym do oddziaływania Aha1 z Hsp90 α . Interakcja Aha1 z hybrydą H16 w porównaniu do powyższych była nieco słabsza. Wymiana dowolnego fragmentu ze środkowej domeny Hsp90 β na odpowiadający mu fragment z Hsp90 α prowadzi do zwiększenia interakcji z białkiem pomocniczym Aha1.

4.4. Analiza mutacji we fragmencie środkowej domeny Hsp90

Drożdże z ekspresją H15 charakteryzował spowolniony wzrost w porównaniu do drożdży z ekspresją H16. Izolacja białek oddziałujących z wprowadzonymi Hsp90 wykazała w przypadku H15 stabilne i silne oddziaływanie z Aha1. Hybryda H15 w swojej sekwencji aminokwasowej może zawierać aminokwasy istotne dla tej interakcji. Spośród 74 aminokwasowego fragmentu wymienionego między hybrydami H15 i H16, dokładnie 11 aminokwasów różni obydwie sekwencje (Ryc. 21).

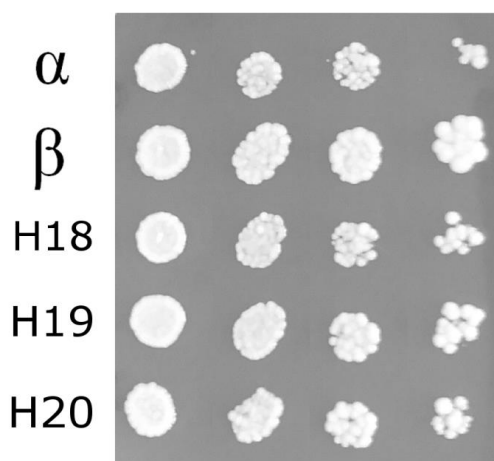
l.p. aminokwasu	480	490	500	510	520	530	540	550							
H15	ENQKH	IYYITGET	TKDQVANS	AFVERLR	RKHGLE	VIYMI	TEPIDE	YCVQQL	KEFEG	KTLVSV	TKEGLE	LPEDEE	EEKKK		
H16	ETQKS	IYYITGES	KEQVANS	AFVERV	RKRGE	EVVY	MI	TEPIDE	YCVQQL	KEFDG	KS	LVSV	TKEGLE	LPEDEE	EEKKK

Ryc. 21. Porównanie sekwencji aminokwasowej fragmentu odróżniającego hybrydy H15 od H16.

Liczba porządkowa aminokwasu oznacza numerację względem sekwencji Hsp90 α . Na żółto zaznaczono różnice w sekwencji aminokwasowej.

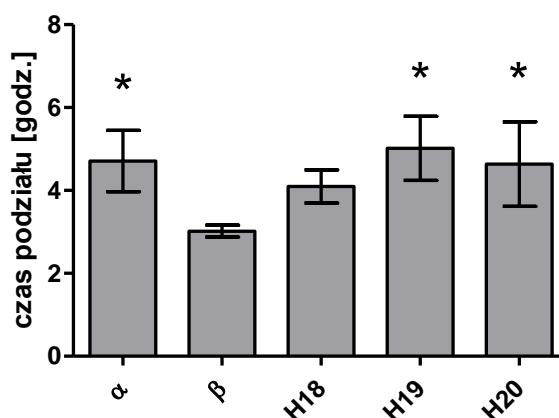
Zamieniono pięć aminokwasów różniących H15 i H16 w odcinku obejmującym aminokwasy od 478 do 552 dla Hsp90 β , tworząc zmutowane wersje Hsp90. Powstałe Hsp90 charakteryzowała pełna zgodność sekwencji z Hsp90 β z wyjątkiem wymienionych aminokwasów – należących do izoformy α . Mutant H18 posiadał wymienione T479N oraz S482H. Mutant H19 zawierał 3 mutacje: R506H, F508L, T514I. Mutant H20 w swojej sekwencji posiadał zamienione wszystkie 5 wspomnianych wyżej aminokwasów.

Zmutowane Hsp90 sprawdzano w drożdżach celem określenia wpływu ich aktywności na wzrost komórek. Wprowadzenie mutacji w sekwencji aminokwasowej ludzkiej Hsp90 β , skutkowało niewielkim spowolnieniem wzrostu w porównaniu do komórek z ekspresją tej izoformy bez mutacji (Ryc. 22).



Ryc. 22. Porównanie wzrostu drożdży z ekspresją ludzkich Hsp90 posiadających mutacje we fragmencie środkowej domeny tego białka. Czterokrotne rozcieńczenia wyjściowej hodowli nakrapiano na podłoże YPD i hodowano w temperaturze 30°C.

Dokonano również pomiarów czasu podziału szczepów drożdży z ekspresją izoform ludzkich Hsp90, oraz zmutowanych form Hsp90 β w hodowli płynnej (Ryc. 23).

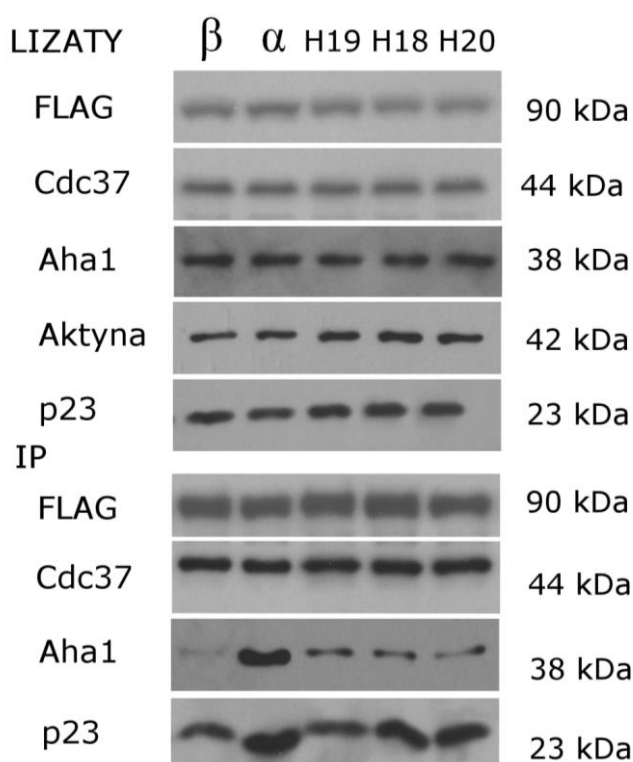


Ryc. 23. Czas podziału dla drożdży transformowanych izoformami oraz zmutowanymi formami ludzkich białek Hsp90 (H18-H20). Drożdże hodowano w 30°C, na podłożu YPD. Wyniki przedstawiono, jako średnią \pm S.D. z 4 powtórzeń, * $p < 0,05$ vs β .

Zaobserwowano, że wprowadzenie opisanych powyżej mutacji do izoformy β skutkowało istotnym wydłużeniem czasu podziału komórek w porównaniu do czasu podziału drożdży z ekspresją Hsp90 β . Istotności statystycznej nie zaobserwowano dla drożdży z ekspresją H18, jednak widoczna jest tendencja wolniejszego wzrostu szczepów H18 do H20 względem drożdży z ekspresją Hsp90 β . Mutacje w sekwencji Hsp90 β obniżają aktywność białka, co skutkuje wolniejszym tempem podziału komórek. Na

podstawie powyższych danych można przypuszczać, że zmutowane białko, zachowuje aktywność podobną do aktywności Hsp90 α .

Zmutowane formy Hsp90 przetestowane w drożdżach, po dodaniu mutacji warunkującej oporność na inhibitor 17-AAG, sprawdzono w komórkach linii HEK-293. Po selekcji i uzyskaniu stabilnych linii komórkowych z ekspresją wprowadzonych Hsp90 wykonano izolację białek oddziałujących z Hsp90. W oczyszczonych immunokompleksach badano obecność białek współopiekuńczych: Cdc37, Aha1 i p23 (Ryc. 24).



Ryc. 24. Analiza Western blot lizatów oraz immunoprecypitatów (IP) z komórek transfekowanych Hsp90 α , Hsp90 β i zmutowanymi formami Hsp90 (H19-H20). Immunoprecypitację przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała wiążącego metkę FLAG dodaną do końca aminowego ekspresjonowanych białek. Wyniki pokazują ilość wskazanych białek w lizatach przed IP (górny panel), oraz w oczyszczonych kompleksach po IP (dolny panel Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel).

Analiza Western blot wykazała, że wprowadzenie mutacji do Hsp90 zwiększało powinowactwo do Aha1, nie dorównując Hsp90 α . Różnice w oddziaływaniu z p23, między zmutowanymi Hsp90 a Hsp90 α były bardzo subtelne. Celem dokładnego porównania różnic w oddziaływaniu zmutowanych form Hsp90 z tymi białkami pomocniczymi należałoby wybrać bardziej dokładną metodę badawczą niż Western blot.

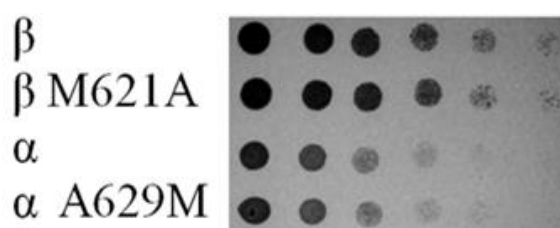
Obecność opisywanych mutacji we fragmencie środkowej domeny Hsp90 β nie miała znaczenia dla oddziaływania z Cdc37.

Sekwencja hybryd H18 do H20 w większości stanowiła Hsp90 β . Zamiana aminokwasów różniących izoformy Hsp90, nie spowodowała pełnego „przekształcenia” zmutowanych form tych białek w izoformę Hsp90 α . Aktywność zmutowanych Hsp90 doprowadziła do spowolnienia wzrostu w komórkach drożdżowych. Białka H18-H20 charakteryzowało również stabilne oddziaływanie z Aha1, chociaż na podstawie otrzymanych sygnałów można je ocenić jako słabsze niż oddziaływanie Aha1 z Hsp90 α .

4.5. Wpływ zmian w dimeryzacji izoform Hsp90 na ich aktywność

Hsp90 działa w komórce jako dimer. Powszechnie przyjmuje się, że izoforma α tworzy stabilniejsze dimery w przeciwieństwie do izoformy β . Przez wprowadzanie opisanych w literaturze mutacji do Hsp90 [12], starano się odwrócić wspomnianą zdolność tworzenia struktur dimerycznych. Zamiana M621A w izoformie Hsp90 β miała na celu zwiększenie stabilności dimerów tworzonych przez tę izoformę. Wprowadzenie mutacji A629M w izoformie Hsp90 α miało prowadzić do obniżenia jej zdolności do dimeryzacji.

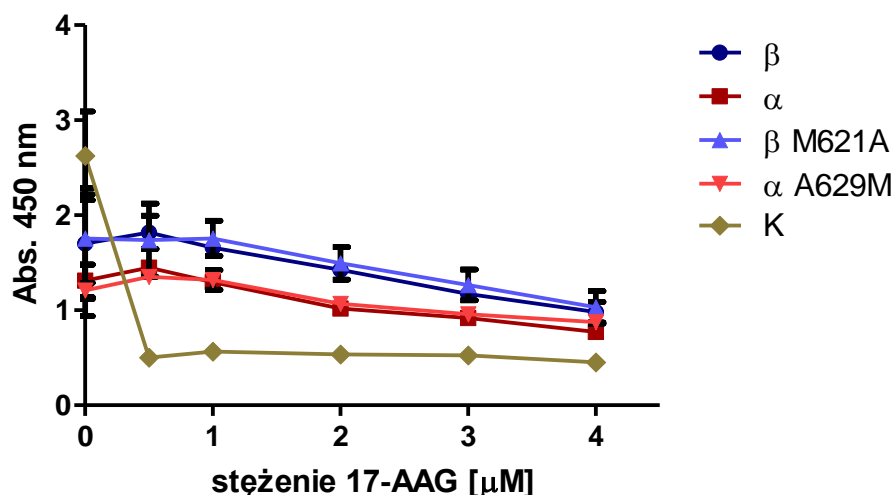
Ekspresja izoform Hsp90 w drożdżach wiązała się z określonym fenotypem wzrostu. Sprawdzano czy zmiana w dimeryzacji a tym samym i aktywności Hsp90 będzie wpływała na wzrost drożdży. Obserwacja hodowli na podłożu stałym świadczy, że aktywność zmutowanych formy białek nie zmienia szybkości wzrostu ekspresjonujących je drożdży, w porównaniu do drożdży kontrolnych z ekspresją izoform Hsp90 (Ryc. 25).



Ryc. 25. Porównanie wzrostu drożdży transformowanych plazmidami kodującymi zmutowane formy białka Hsp90. Czterokrotne rozcieńczenia wyjściowej hodowli drożdży nakrapiano na podłoże YPD i hodowano w temperaturze 30°C.

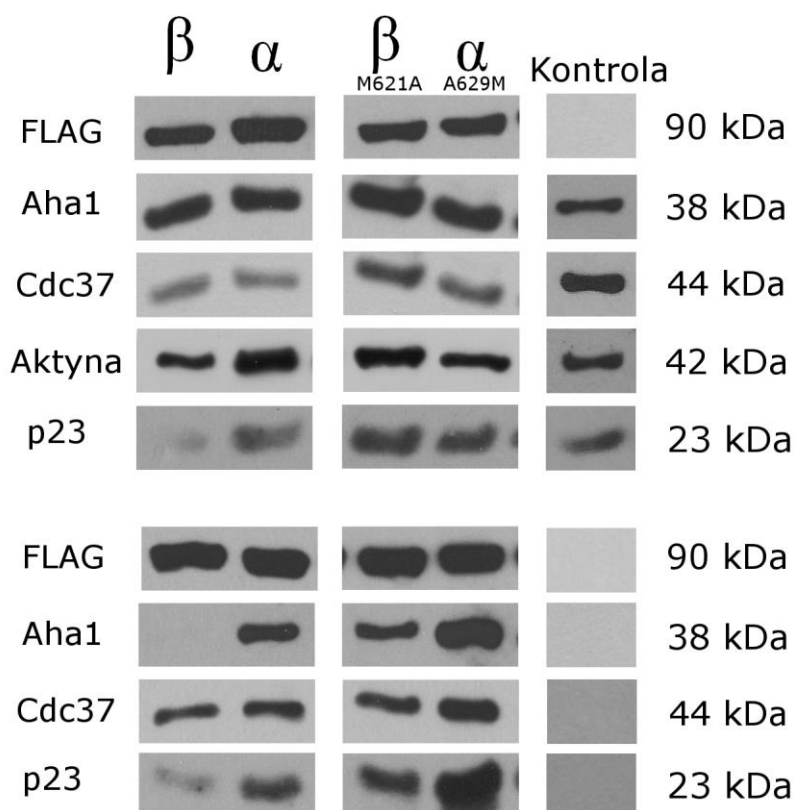
Warianty Hsp90 posiadające mutacje wpływające na stabilność tworzonych przez to białko struktur dimerycznych badano także w komórkach HEK-293. Sprawdzono jak hodowla w zwiększających się stężeniach inhibitora będzie wpływała na przeżywalność

komórek z ekspresją hybryd o zmienionej dimeryzacji. Na podstawie otrzymanej krzywej przeżywalności (Ryc. 26) można wnioskować, że zmiana stabilności dimerów nie wpłynęła na wrażliwość komórek na 17-AAG. Spadek przeżywalności komórek z aktywnymi zmutowanymi izoformami pokrywał się ze spadkiem przeżywalności komórek z ekspresją ich odpowiedników, nieposiadających zaburzeń struktur dimerycznych.



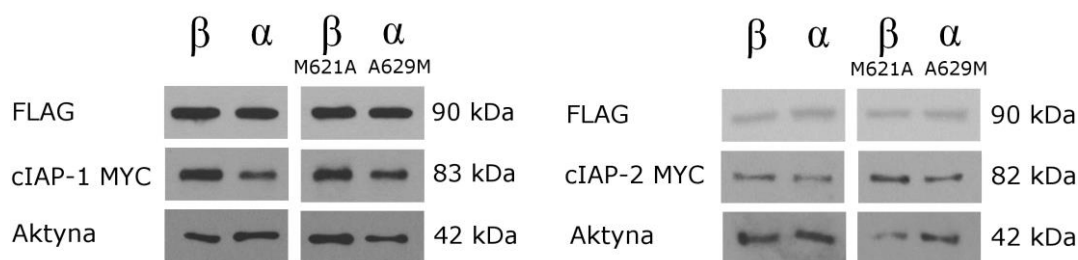
Ryc. 26. Krzywa przeżywalności komórek HEK-293 transfekowanych izoformami i mutantami Hsp90, po 96 godzinach inkubacji w wybranych stężeniach 17-AAG. Oznaczenia α i β odpowiadają linii komórkowej z ekspresją odpowiednio Hsp90 α lub Hsp90 β . Oznaczenia α A629M i β M621A odpowiadają linii komórkowej z ekspresją zmutowanych form Hsp90 zawierających mutację zmieniającą stabilność dimerów. K oznacza komórki kontrolne, które nie produkowały dodatkowych białek Hsp90. Punkty stanowią średnią \pm S.D. z 3 powtórzeń.

Analiza interakcji białek współopiekuńczych izolowanych metodą immunoprecypitacji z komórek transfekowanych izoformami i mutantami Hsp90 wykazała zbliżony profil oddziaływań z białkami pomocniczymi (Ryc. 27). Nie stwierdzono preferencji interakcji białka Cdc37 wobec którejkolwiek z izoform. Zwiększone oddziaływanie białek: Aha1 oraz p23 dotyczyło Hsp90 α , i zostało zachowane pomimo osłabienia zdolności do tworzenia dimerów przez tę izoformę.



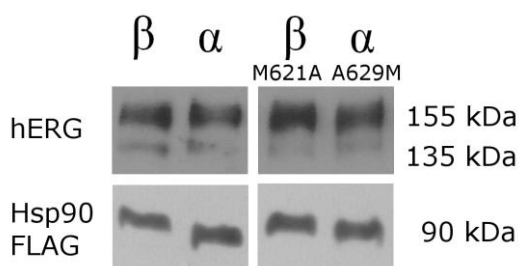
Ryc. 27. Analiza Western blot punktowych mutantów izoform Hsp90 β i α z mutacją wpływającą na stabilność dimerów (oznaczonych odpowiednio β M621A, α A629M). Powyższy eksperyment wykonywany był równocześnie z eksperymentem przedstawionym na Rycinie 14, dlatego próby: Hsp90 α , Hsp90 β oraz kontrola pochodzi z Ryciny 14. Wyniki pokazują ilość wskazanych białek w lizatach przed IP (górny panel), oraz w oczyszczonych kompleksach po IP (dolny panel). Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

Białko substratowe cIAP-1, z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) charakteryzuje preferencyjna interakcja z Hsp90 β niż z Hsp90 α . Izoforma Hsp90 β stabilizuje to białko zapobiegając jego degradacji. Sprawdzano, jaki wpływ będzie miała zmiana w dimeryzacji izoform Hsp90 na wspomnianą interakcję. Dodatkowo przetestowano białko cIAP-2, homologiczne do cIAP-1. Analiza Western blot wskazuje, że zmniejszenie stabilności form dimerycznych izoformy β nie wpływa na obniżoną stabilizację białek substratowych. Białka cIAP-1 oraz cIAP-2 wykazywały większą stabilność wobec aktywności Hsp90 β . Wprowadzenie mutacji punktowej zwiększającej dimeryzację nie zmieniało tej zależności (Ryc. 28).



Ryc. 28. Analiza Western blot punktowych mutantów izoform Hsp90 β i α, posiadających mutację wpływającą na stabilność dimerów (oznaczono odpowiednio βM621A oraz αA629M) z dodatkową nadekspresją białka cIAP-1 (po lewej) lub cIAP-2 (po prawej). Powyższy eksperyment wykonywany był równocześnie z eksperymentem przedstawionym na Rycinie 34 i 35, dlatego próby: Hsp90α i Hsp90β pochodzą z Ryciny 34 i odpowiednio Ryciny 35.

Sprawdzono również wpływ mutacji zmieniających stabilność dimerów Hsp90 na glikozylację hERG (Ryc. 29). Białko to opisano jako oddziałujące preferencyjnie z Hsp90α, podczas jego przemieszczenia z ER na powierzchnię komórki. Nieaktywna forma tego białka ma masę 135 kDa i jest glikozylowana częściowo. Aktywne i w pełni glikozylowane hERG posiada masę 155 kDa [8]. Do komórek stabilnie ekspresjonujących izoformy i zmutowane wersje Hsp90 wprowadzono plazmid z genem kodującym hERG. Analiza Western blot lizatów z tych komórek wykazała, że zmiana stabilności struktur dimerycznych, nie wpływa na glikozylację hERG, która w przypadku aktywności opiekuńczej obu izoform i niezależnie od mutacji zmieniającej stabilność dimerów pozostawała na tym samym poziomie.



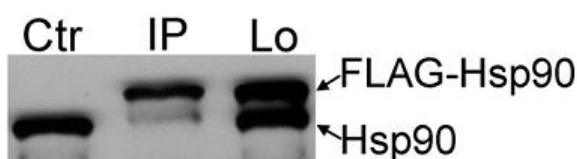
Ryc. 29. Analiza Western blot punktowych mutantów izoform Hsp90 β i α posiadających mutację wpływającą na stabilność dimerów (oznaczono odpowiednio βM621A oraz αA629M) z dodatkową nadekspresją hERG. Dla każdej z prób nałożono jednakową ilość białka na żel.

4.6. Formowanie struktur heterodimerycznych między zmutowanymi formami Hsp90 β a ich endogennymi odpowiednikami

W komórkach HEK-293 po transfekcji i selekcji w medium z inhibitorem aktywność opiekuńcza Hsp90 pochodziła z ekspresji wprowadzonych genów. Nie wyciszono przy tym ekspresji genów izoform *HSP90* znajdujących się na chromosomie. Nie ulega wątpliwości, że białka natywne również były syntetyzowane jednak ich aktywność ulegała zahamowaniu z powodu wrażliwości na inhibitor.

Sprawdzono czy w tych komórkach dochodziło do powstawania heterodimerów złożonych z natywnych Hsp90 i Hsp90 z mutacjami punktowymi dającymi oporność na 17-AAG. Dostępne komercyjnie przeciwciało rozpoznające Hsp90 α nie rozpoznawało tego białka, gdy dołączono do niego sekwencję peptydowa FLAG, dlatego zdecydowano się na wykorzystanie w eksperymentach przeciwciała rozpoznającego Hsp90 β .

Do badania wybrano linię komórkową z ekspresją Hsp90 β opornego na 17-AAG, z metką FLAG. Następnie za pomocą immunoprecypitacji wyizolowano białka oddziałujące z Hsp90 β FLAG. Zaobserwowano, że w komórkach powstają heterodimery składające się z białka posiadającego mutację oporności na inhibitor i z białka natywnego. Endogenne Hsp90 jest syntetyzowane mimo dodatku inhibitora. Potwierdza to obecność dolnego prążka w ścieżce oznaczonej Lo (Ryc. 30). O powstawaniu heterodimerów świadczy występowanie dwóch prążków w ścieżce IP (Ryc. 30). Widoczny silniejszy sygnał pochodzący od białka z peptydową metką w porównaniu do białka natywnego może świadczyć, że udział cząsteczek typu Hsp90 β FLAG/Hsp90 β w ogólnej populacji dimerów w komórce jest niewielki. Obserwowane struktury heterodimeryczne nie powinny być aktywne – ze względu na dodatek inhibitora.



Ryc. 30. Immunoprecypitacja heterodimerów Hsp90 powstałych z białek wprowadzonych i oraz pochodzących z fizjologicznej ekspresji. Ctr oznacza lizat z komórek nietransfekowanych. IP odpowiada eluatomu z wyizolowanych immunokompleksów. Lo oznacza lizat z transfekowanych komórek. W eksperymencie używano przeciwciała anty-Hsp90 β .

Sprawdzono również czy dodatek czynnika selekcyjnego lub jego brak będzie miał wpływ na stabilność opisanych powyżej struktur heterodimerycznych. W tym celu

komórki transfekowane plazmidem kodującym odporne na inhibitor Hsp90 β hodowano w podłożu wzbogaconym o 17-AAG, G418 lub bez dodatku czynnika selekcyjnego. W plazmidzie niosącym Hsp90 β znajdował się dodatkowo gen warunkujący oporność na genetycyne (G418), dlatego hodowla w medium z dodatkiem tylko tego czynnika selekcyjnego pozwalała zachować ekspresję heterologicznego białka bez zahamowania jego aktywności.



Ryc. 31. Analiza Western blot lizatów oraz eluatów po immunoprecypitacji heterodimerów Hsp90 zależnie od medium hodowlanego. Komórki ze stabilną ekspresją Hsp90 β hodowano w pożywce zawierającej 17-AAG, G418 oraz w czystym medium bez dodatku czynnika selekcyjnego. W eksperymencie używano przeciwciała anti-Hsp90 β .

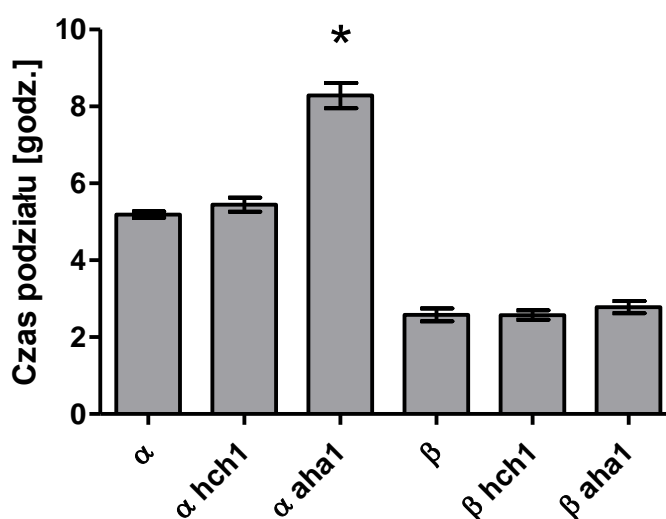
W każdym przypadku w lizatach komórkowych oraz po immunoprecypitacji zaobserwowano obecność dimerów: Hsp90 β FLAG/Hsp90 β (Ryc. 31). Podobnie jak poprzednio współudział tych form w komórkowym zbiorze dimerów Hsp90 stanowi mniejszość, o czym świadczy stosunek ich sygnałów uzyskanych na kliszy. Dodatek czynnika selekcyjnego 17-AAG bądź G418 lub jego brak, nie wpływał na stabilność heterodimerów.

4.7. Zależność izoform Hsp90 od białka Aha1

Komórki drożdży z ekspresją izoformy Hsp90 α charakteryzował wolniejszy wzrost w porównaniu do komórek z ekspresją izoformy β . Analiza immunokompleksów z linii HEK-293 z ekspresją Hsp90 α wykazała stabilne oddziaływanie tej izoformy z białkiem pomocniczym Aha1.

Sprawdzono, jaki wpływ na wzrost drożdży *S. cerevisiae* ma oddziaływanie obu białek. W komórkach drożdżowych funkcjonują dwa homologi dla ludzkiego Aha1, nazywane Aha1 oraz Hch1. Sprawdzano czy pozbawienie drożdży białek Aha1 lub Hch1 przy jednoczesnej nadekspresji ludzkich izoform Hsp90 będzie wpływało na tempo podziałów komórkowych. W tym celu porównano wzrost szczepów produkujących ludzkie izoformy Hsp90 i dodatkowo pozbawionych genów *AHA1* lub *HCH1*. Kontrolę stanowiły komórki posiadające ekspresję izoform Hsp90 i aktywne oba białka: Aha1 oraz

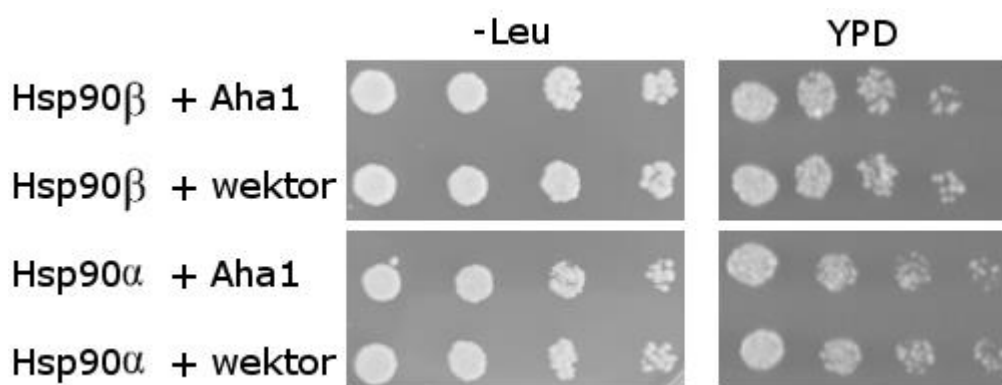
Hch1. Na podstawie wzrostu badanych drożdży wyznaczono ich czasy podziału (Ryc. 32).



Ryc. 32. Czas podziału drożdży z ekspresją ludzkich izoform Hsp90 i delecją genów HCH1 oraz AHA1. Podpisy pod kolumnami oznaczają kolejno ekspresję danej izoformy α bądź β , delecję genu dla białka pomocniczego (AHA1 bądź HCH1). Wyniki przedstawiono, jako średnią \pm S.D. z 4 powtórzeń. Zaznaczono istotną statystycznie różnicę, $p < 0,05$ vs. α (test Dunnetta).

W przypadku ekspresji Hsp90 β , brak Hch1 lub Aha1 nie wpływał na tempo wzrostu drożdży. Ekspresja ludzkiej izoformy Hsp90 α i delecja AHA1 (pozostaje aktywne Hch1) istotnie wydłużała czas podziału drożdży, w porównaniu do komórek kontrolnych (ekspresja Hsp90 α , aktywne drożdżowe Aha1 i Hch1). Obecność Hch1 nie wystarcza dla prawidłowej aktywności opiekuńczej Hsp90 α . Izoforma ta do optymalnej aktywności wymaga stymulacji przez białko Aha1.

Sprawdzano, czy zwiększona ilość białka Aha1 w komórce spowoduje przyspieszenie tempa wzrostu drożdży. W tym celu komórki drożdży z ekspresją ludzkich izoform Hsp90 dodatkowo transformowano plazmidem z markerem selekcyjnym LEU2, niosącym gen ludzkiego Aha1. Rozcieńczenia wyjściowej hodowli nakrapiano na podłoże stałe i dalszą hodowlę prowadzono w temperaturze 30°C. Wzrost kolonii obserwowano na dwóch typach medium: pełnym YPD oraz selekcyjnym (bez leucyny) (Ryc. 33). Kontrolę stanowiły komórki z ekspresją ludzkich izoform Hsp90, transformowane pustym wektorem.



Ryc. 33. Porównanie wzrostu drożdży z ekspresją izoform ludzkich Hsp90 α/β , drożdży po dodatkowej transformacji plazmidami niosącym gen ludzkiego białka Aha1 lub po transformacji pustym wektorem. Czterokrotne rozcieńczenia wyjściowej hodowli drożdży nakrapiano na podłoże selekcyjne bez leucyny (-Leu) lub pełne (YPD) i hodowano w temperaturze 30°C.

Nadekspresja białka pomocniczego Aha1 nie wpływała na wyraźną zmianę fenotypu wzrostu w komórkach z ekspresją izoform Hsp90. Drożdże z ekspresją ludzkich izoform Hsp90 α lub Hsp90 β oraz dodatkową ekspresją ludzkiego Aha1 charakteryzował wzrost zbliżony do komórek kontrolnych.

4.8. Oddziaływanie izoform Hsp90 z białkami substratowymi

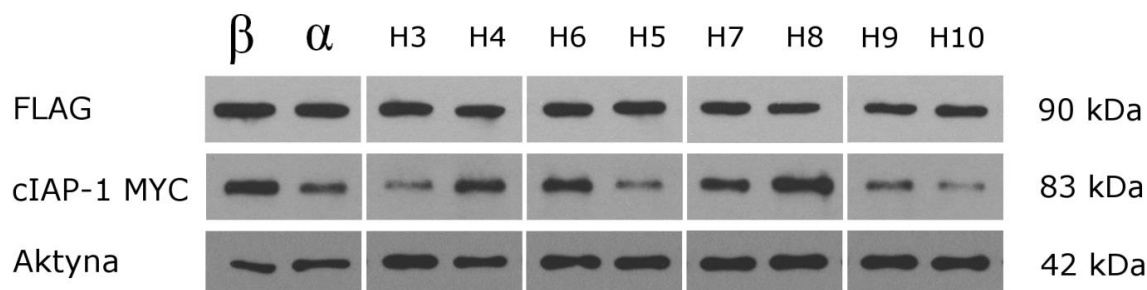
Niewiele spośród białek-klientów Hsp90 wykazuje preferencyjną interakcję z jedną izoformą. Posługując się modelem komórkowym, gdzie aktywna jest jedna z izoform lub tylko forma hybrydowa Hsp90 postanowiono sprawdzić oddziaływania preferencyjne wybranych klientów Hsp90.

4.8.1. Udział Hsp90 w stabilizacji białek cIAP-1 i cIAP-2

Z doniesień literaturowych wynika, że obniżenie ekspresji Hsp90 β skutkuje zwiększoną degradacją cIAP-1. Izoforma β Hsp90 chroni cIAP-1 (obdarzone aktywnością ligazy ubikwitynowej) przed autoubikwitynacją i degradacją. Sprawdzone jak ekspresja hybrydowych Hsp90 wpływa na ilość cIAP-1 oraz cIAP-2 w komórkach linii HEK-293. Argumentem do badań interakcji Hsp90 z cIAP-2 jest wysoki stopień homologii z cIAP-1 wynoszący 75% podobieństwa sekwencji aminokwasowej.

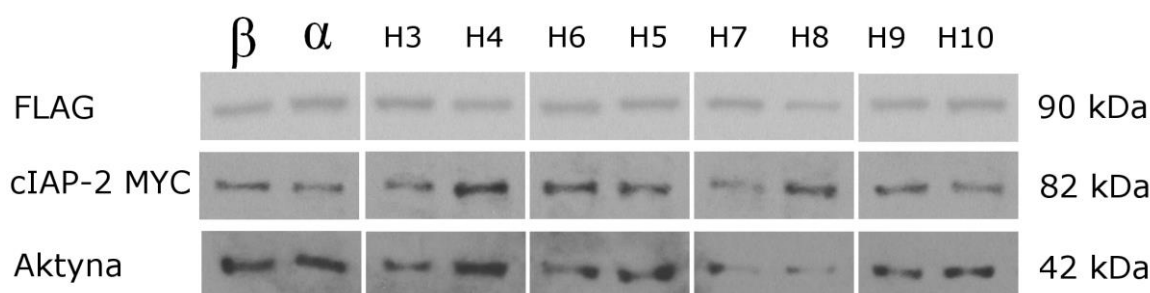
Do komórek stabilnie ekspresjonujących izoformy lub hybrydy Hsp90, wprowadzono plazmidy pozwalające na dodatkową ekspresję białek cIAP-1 lub cIAP-2. Analiza Western blot lizatów otrzymanych z tych komórek wykazała, że ekspresja

izoformy Hsp90 β a także hybryd Hsp90 zawierających domenę N z izoformy β , występuje ze zwiększoną ilością białka cIAP-1 (Ryc. 34). Otrzymany wynik sugeruje, że domena N Hsp90 β może odgrywać istotną rolę w oddziaływaniu z cIAP-1 skutkującą zwiększoną stabilizacją tego białka.



Ryc. 34. Analiza Western blot lizatów komórek produkujących izoformy i hybrydy Hsp90 oraz dodatkowo białko cIAP-1-MYC. Izoformy Hsp90 oznaczono odpowiednio α i β , hybrydowe białka oznaczono od H3 do H10. Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

Ekspresja wariantów Hsp90 zawierających domenę N z Hsp90 β , skutkuje zwiększeniem ilości nadekspresjowanego cIAP-2 w badanych komórkach (Ryc. 35). Oddziaływanie z domeną N pochodzącą z izoformy β ochrania przed destabilizacją a w konsekwencji degradacją oba białka cIAP.

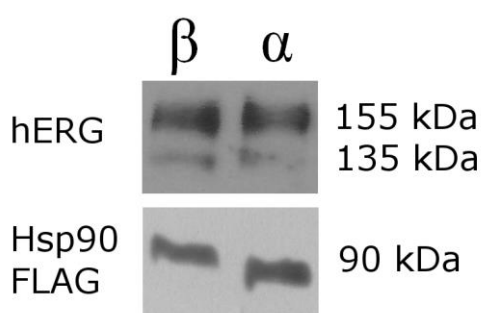


Ryc. 35. Analiza Western blot lizatów komórek produkujących izoformy i hybrydy Hsp90 oraz dodatkowo białko cIAP-2 MYC. Izoformy Hsp90 oznaczono odpowiednio α i β , formy hybrydowe oznaczono od H3 do H10. Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

4.8.2. Udział Hsp90 w translokacji kanału jonowego hERG

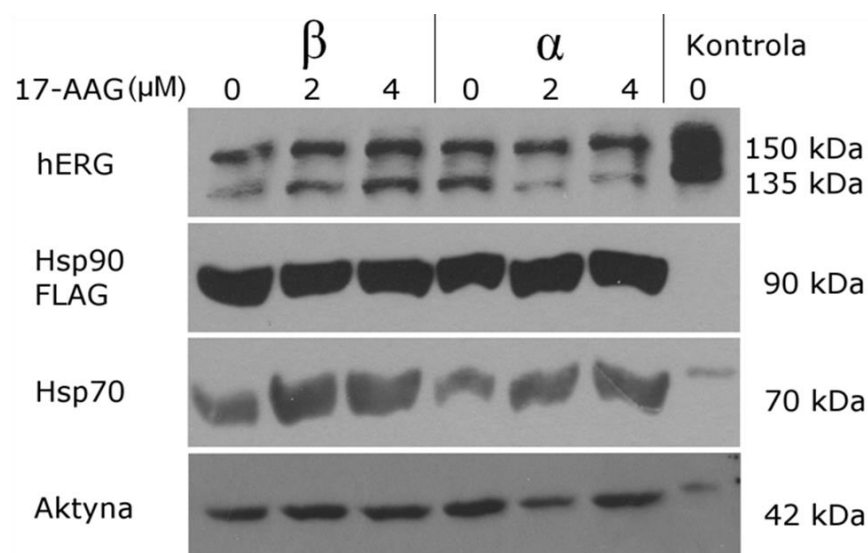
Dostępne dane literaturowe wskazywały na wybiórczą interakcję białka hERG z izoformą Hsp90 α podczas translokacji hERG z retikulum endoplazmatycznego na powierzchnię komórki [8]. W celu oceny interakcji hERG z Hsp90 wykorzystano używany model nadekspresji jednej bądź drugiej izoformy Hsp90 w komórkach HEK-293. Komórki ze stabilną ekspresją Hsp90 α i β , które naturalnie nie posiadają

kanału jonowego hERG, poddano przejściowej transfekcji plazmidem niosącym gen kodujący to białko. W lizatach komórkowych sprawdzano ekspresję hERG za pomocą Western blot i porównywano jego ilość w komórkach z ekspresją ludzkich Hsp90 α lub β (Ryc. 36). Białko hERG istnieje w komórce w postaci dwóch form: aktywnej w pełni glikozylowanej oraz nieaktywnej, glikozylowanej częściowo – posiada jedynie rdzeń składający się z pięciu reszt cukrowych. Obie formy białka były rozpoznawane przez przeciwciała używane w Western blot. Widoczne dwa prążki świadczyły o obecności formy glikozylowanej częściowo (135kDa) oraz glikozylowanej całkowicie (150 kDa). Nie zaobserwowano specyficzności hERG wobec którejkolwiek z izoform, ponieważ inhibicja Hsp90 α bądź β nie wpływała na zmianę jego glikozylacji.



Ryc. 36. Analiza Western blot lizatów z komórek produkujących izoformy Hsp90 oraz białko hERG. Izoformy Hsp90 oznaczono odpowiednio α i β . Dla każdej z prób nałożono jednakową ilość białka na żel.

Wobec braku ewentualnych różnic w ilości form hERG w komórkach ekspresjonujących izoformy Hsp90 postanowiono wywołać stres komórkowy dodając 17-AAG do medium hodowlanego, w stężeniach wywołujących częściową inhibicję zmutowanych wersji Hsp90. Efekty analizowano za pomocą Western blot (Ryc. 37). Dodatek inhibitora w stężeniu 2 i 4 μ M powodował wzrost ekspresji Hsp70 w porównaniu do komórek kontrolnych, hodowanych bez 17-AAG. Stres komórkowy skutkował zatrzymaniem glikozylacji hERG, gdy rolę białka opiekuńczego pełniła izoforma Hsp90 β . W tych komórkach stan niedoboru Hsp90 α (wobec aktywności izoformy β) powodował, że białko hERG nie dojrzywało prawidłowo, co w następstwie spowodowało gromadzenie się formy częściowo-glikozylowanej o masie 135 kDa.



Ryc. 37. Analiza Western blot lizatów z komórek ekspresjonujących izoformy Hsp90 oraz białko hERG, hodowanych w medium ze zwiększającymi się stężeniami 17-AAG. Kontrolę reprezentują komórki ze stabilną ekspresją białka hERG, hodowane w medium bez dodatku inhibitora. Aktyna obrazuje ilość białka nałożoną na żel.

Spadek ilości częściowo glikozylowanego białka hERG w miarę wzrostu stężenia inhibitora obserwowano w przypadku komórek z aktywną izoformą Hsp90 α . Dodatek inhibitora spowodował zmniejszenie frakcji hERG związanej z retikulum endoplazmatycznym. Różnica w oddziaływaniu izoform z hERG została uwidoczniła dopiero po indukcji szoku komórkowego. Jedynie izoforma α zapewniała „dojrzewanie” białka-klienta mimo zwiększonego stężenia inhibitora.

5. Dyskusja

Literatura dotycząca Hsp90 informuje o ponad 200 białkach-klientach Hsp90. Spośród tej grupy zidentyfikowano niewiele białek oddziałujących preferencyjnie z jedną z izoform Hsp90 a przeprowadzone eksperymenty dotyczące takiej interakcji nie uwzględniały jak dotąd strukturalnych różnic między Hsp90 α i β .

Badania nad specyficznością oddziaływania izoform Hsp90 z innymi białkami są problematyczne ze względu na dużą ilość i wysoką stabilność Hsp90 w komórce. Zastosowanie metod wyciszenia ekspresji takich jak antysensowne oligonukleotydy czy siRNA jest utrudnione ze względu na wysoką homologię sekwencji między izoformami α i β Hsp90. Mimo wyciszenia ekspresji jednej z izoform, w komórce nadal może pozostawać pewna ilość już funkcjonującego białka. Duża homologia sekwencji między izoformami sprawia, że siRNA mające specyficznie wyciszać ekspresję jednej izoformy może wpływać również na ekspresję drugiej.

Innym problemem jest nierówny poziom ekspresji obu izoform Hsp90. Wyciszenie izoformy o wyższej ekspresji może wpływać na białko-klienta dlatego, że maleje całkowita ilość Hsp90 w komórce. Wyciszenie izoformy o niższej ekspresji może nie wywoływać takiego efektu.

W niniejszej pracy podjęto próbę zidentyfikowania różnic między izoformami Hsp90 α i β dotyczących tempa wzrostu produkujących je komórek. Sprawdzone oddziaływanie Hsp90 z białkami pomocniczymi i białkami-klientami. Stworzone formy hybrydowe Hsp90, posiadające w swej strukturze fragmenty pochodzące z obu izoform pozwoliły zidentyfikować obszar sekwencji aminokwasowej Hsp90 mogącej odróżniać Hsp90 α od Hsp90 β . Ekspresja białek hybrydowych Hsp90 w komórkach drożdży oraz ludzkiej linii HEK-293 umożliwiła obserwację skutków aktywności danej izoformy lub białka hybrydowego.

5.1. Fragmenty środkowej domeny Hsp90 α , warunkujące wolny wzrost drożdży, w komórkach ludzkich odpowiadają za preferencyjne oddziaływanie z Aha1

Ekspresja ludzkich izoform Hsp90 w drożdżach jest użytecznym modelem do badania różnic między tymi białkami. Ludzkie Hsp90 z powodzeniem zastępują

drożdżowe. Wyniki niniejszej pracy świadczą, że drożdże z ekspresją izoformy Hsp90 α rosną wolniej niż drożdże z ekspresją Hsp90 β , co pokrywa się z wynikami prac Scrogginsa i wsp. [99]. Dodatkowo, w niniejszej pracy wykazano, że wolny wzrost drożdży związany jest z ekspresją Hsp90 posiadających środkową domenę izoformy α . Ten obszar sekwencji Hsp90 obejmuje 340 aminokwasów. Sprawdzono, czy mniejszy fragment w obrębie środkowej domeny jest odpowiedzialny za obserwowany efekt. W tym celu środkową domenę Hsp90 podzielono na krótsze odcinki, które następnie wymieniono między izoformami tworząc formy hybrydowe. Skonstruowano także zmutowane formy białek, w których wymieniono między izoformami 2 do 5 aminokwasów.

Wymiana fragmentu obejmującego aminokwasy 372-552 z izoformy Hsp90 β na odpowiadający mu fragment z izoformy Hsp90 α w hybrydzie H12, skutkuje wyraźnym spowolnieniem wzrostu. Ta hybrydowa forma białka jest funkcjonalna, lecz w swoim działaniu pozostaje bardzo nieefektywna. Ekspresjonujące ją komórki proliferują znacznie wolniej niż wolno rosnące drożdże z ekspresją izoformy Hsp90 α . Brak danych strukturalnych powoduje, że można jedynie stawiać hipotezy tłumaczące rezultat aktywności tej hybrydy. Wyraźne spowolnienie wzrostu drożdży z ekspresją H12 może wynikać z obniżenia aktywności ATPazy. Wolniejszy rozkład nukleotydu może być uwarunkowany zmianą położenia argininy (Arg 400) spowodowaną różnicami w strukturze przestrzennej wymienionego fragmentu między Hsp90 α i Hsp90 β .

Ekspresja hybryd zawierających fragmenty aminokwasów 380-486 w H16 oraz 486-560 w H15 (oba fragmenty z Hsp90 α), spowalnia tempo wzrostu drożdży, lecz nie w takim stopniu jak ekspresja H12. Prawdopodobnie tak małe fragmenty struktury pochodzącej z Hsp90 α łatwiej dopasowują się do otaczających je struktur Hsp90 β .

Zamiana kilku aminokwasów różniących izoformy Hsp90 w hybrydach H18 do H20 (obszar sekwencji Hsp90 β obejmujący reszty aminokwasowe 478-552) jest wystarczająca do zmiany tempa wzrostu drożdży. Ekspresja tych hybryd w drożdżach prowadzi do spowolnienia tempa wzrostu w porównaniu ze wzrostem drożdży z ekspresją Hsp90 β . Szczegółowe dane strukturalne dotyczące ludzkich Hsp90 nie są dostępne, stąd nie można w tej chwili określić, dlaczego tak niewielkie zmiany wpływają na aktywność izoform Hsp90.

Porównując czas podziału drożdży z ekspresją Hsp90 β z czasem podziału drożdży z ekspresją hybryd H12, H15, H16 i H17 można wnioskować, że wymiana dowolnego fragmentu środkowej domeny Hsp90 między izoformami wpływa na wydłużenie czasu

podziału drożdży. Jednie wymiana aminokwasów w regionie „charged linkera” (hybrydy H9 i H10) nie zmieniała tempa wzrostu. W przypadku drożdżowego Hsp90 delecja obejmująca większość tego obszaru nie wywoływała istotnego defektu aktywności, stąd nie zaobserwowano efektu wymiany tego fragmentu między ludzkimi izoformami [25].

Różnice w tempie wzrostu hybryd z wymienionymi całymimi domenami (hybrydy H3 do H8) lub fragmentami środkowej domeny (hybrydy: H12, H15-H17) są dostrzegalne, gdy ich ekspresja zachodzi w *S. cerevisiae*. Ekspresja tych samych białek hybrydowych w komórkach ludzkich HEK-293 nie skutkuje zmianą tempa wzrostu. Prawdopodobnie wynika to z wydajniejszego oddziaływania ludzkich Hsp90 z ludzkimi białkami pomocniczymi, skutkującego utrzymaniem pełnej aktywności hybryd. W komórkach drożdżowych ludzkie Hsp90 znajdują się w otoczeniu drożdżowych białek współopiekuńczych, z którymi nie są w stanie oddziaływać wystarczająco efektywnie.

Domena N oraz domena środkowa są zaangażowane w interakcję z Aha1 [40, 100]. Dostępne w literaturze wyniki pokazują, że ATPaza w Hsp90 α jest stymulowana przez Aha1 silniej niż ATPaza w Hsp90 β [101]. Wyznaczona na podstawie tej aktywności stała dysocjacji Aha1 jest 3,5 raza niższa dla Hsp90 α w porównaniu do Hsp90 β . Należy jednak podkreślić, że stałe wiązania były wyznaczone na podstawie hydrolizy ATP i są obarczone błędem wynikającym z różnicy w aktywności ATPazy obu izoform. Izolowane Hsp90 β hydrolizuje ATP szybciej niż Hsp90 α , dlatego prawdziwa wartość stałej dysocjacji dla Hsp90 α może być nawet siedem razy niższa [101].

Wyniki niniejszej pracy świadczą, że Aha1 oddziałuje stabilniej z izoformą α oraz z hybrydami posiadającymi w swej strukturze środkową domenę z Hsp90 α . Zmiany wprowadzone w sekwencji środkowej domeny Hsp90 zmieniają interakcję z Aha1. Zastąpienie jej fragmentu (aminokwasów 270-552) w Hsp90 β na odpowiadający fragment z Hsp90 α zwiększa oddziaływanie z Aha1. Wymiana „połowy” środkowej domeny z Hsp90 α w hybrydach H12 lub H17, bądź jej krótszych fragmentów w hybrydach H15 lub H16 wystarcza, aby zwiększyć powinowactwo hybrydowych Hsp90 do Aha1, w porównaniu do oddziaływania z Hsp90 β .

Interesujące jest, że zamiana Gln 454 na Thr 446 w hybrydzie H15 nie wpływa na oddziaływanie z Aha1, chociaż ten aminokwas w strukturze drożdżowego Hsp90 (Gln 434) został określony jako oddziałujący bezpośrednio z Aha1 [19]. Być może w oddziaływaniu ludzkich Hsp90 z Aha1 dużą rolę odgrywają aminokwasy pochodzące z izoformy α i znajdujące się za miejscem wstawienia wymienionej subdomeny. Nie są znane struktury krystaliczne ludzkich izoform Hsp90, dlatego nie jesteśmy w stanie

wskazać dokładnie, które z nich oddziałują bezpośrednio z Aha1. W hybrydach H18 do H20 wymieniono między izoformami 5 różniących je aminokwasów. Zamiana 2 aminokwasów między izoformami w obrębie fragmentu 478 do 552 z Hsp90 β , wystarcza do niewielkiego wzmocnienia interakcji z Aha1. Z literatury wynika, wspomniany fragment w drożdżowym Hsp90 jest istotny dla oddziaływania z Aha1, ponieważ wprowadzenie mutacji w jego obrębie wpływa na interakcję z Aha1 [27].

Podobnie jak dla białka Aha1 zaobserwowano, że wiązanie p23 do Hsp90 α jest silniejsze niż do Hsp90 β . Na podstawie analizy Western blot stwierdzono, że stabilniejsze oddziaływanie p23 dotyczy hybryd posiadających obszar sekwencji aminokwasowej odpowiadający również za zwiększoną interakcję z Aha1. Powyższa obserwacja jest interesująca, ponieważ obydwie białka charakteryzuje przeciwstawny wpływ na ATPazę w domenie N Hsp90 (p23 hamuje, a Aha1 przyspiesza hydrolizę ATP).

Preferencyjne oddziaływanie Aha1 i p23 względem Hsp90 α można by wytłumaczyć powstawaniem potrójnego kompleksu p23-Aha1-Hsp90 α . Białko Aha1 może oddziaływać z Hsp90 asymetrycznie, oddziaływanie to dotyczy domeny N i domeny środkowej Hsp90. Tym samym jedna domena N pozostaje „wolna” i jest gotowa do interakcji z p23 [40]. Dane literaturowe sugerują, że p23 może wiązać się do jednego monomeru Hsp90 [102]. Powstawanie potrójnego kompleksu jest teoretycznie możliwe, ale dane eksperymentalne na temat jego istnienia jednak są sprzeczne. Potrójny kompleks białek złożony z p23/Sba1, Hsp90 i Aha1 badano w warunkach *in vitro* sprawdzając hydrolizę ATP. Miareczkowanie p23 wykazało obniżenie hydrolizy tego nukleotydu pomimo wysokich stężeń Aha1 [40]. Przytoczone informacje pozostają w sprzeczności z wynikami innych prac *in vitro*, gdzie autorzy wykorzystując filtrację żelową wykluczyli możliwość istnienia tego potrójnego kompleksu [103]. Większy stopień złożoności środowiska wewnątrzkomórkowego oraz większa liczba białek mogących wpływać na dynamikę oddziaływania z Hsp90 w komórce sprawia, że eksperymenty *in vitro* nie odwzorowują w pełni środowiska wewnątrzkomórkowego. W warunkach *in vivo*, w linii komórkowej HeLa z nadekspresją Aha1, po immunoprecypitacji zidentyfikowano potrójny układ Hsp90-Aha1-p23 [41]. Należy jednak zauważyć, że był on widoczny tylko dzięki użyciu molibdenianu sodu jako sztucznego stabilizatora.

W przedstawionej pracy sprawdzono, czy uda się potwierdzić istnienie oddziaływania Hsp90 α -Aha1-p23 *in vivo*. Podjęto próbę wyizolowania takiego kompleksu białek przez immunoprecypitację Hsp90 α bądź Aha1, jednak nie udało się

potwierdzić jego istnienia. Być może układ Hsp90-Aha1-p23 stanowi jedynie „strukturę przejściową” pojawiającą się w trakcie wymiany białek pomocniczych podczas cyklu hydrolizy ATP. W ten sposób białka: p23, Aha1 i Hsp90 mogłyby oddziaływać jednocześnie ze sobą tylko przez krótki okres czasu. Bardziej prawdopodobne jest jednak, że Aha1 i p23 wiążą się do Hsp90 niezależnie. Powyższe przypuszczenia mogą być uzasadnione również tym, że ilość cząsteczek Hsp90 w komórce jest około 10 do 20 razy większa niż ilość cząsteczek p23 i Aha1, więc *in vivo* białka te nie muszą konkurować o wiązanie do Hsp90 [104, 105].

Białka pomocnicze p23 i Aha1 wiążą się do Hsp90 w konformacji „zamkniętej”, gdy domeny N pozostają w kontakcie a ATP jest związane w centrum katalitycznym ATPazy. Aha1 i p23 mogłyby wiązać się niezależnie do Hsp90, o ile znajduje się ono w konformacji ułatwiającej takie wiązanie. Być może domena środkowa izoformy α stabilizuje Hsp90 w konformacji zamkniętej, co powodowałoby wzrost powinowactwa Aha1 i p23 do tej izoformy. Różnice w powinowactwie izoform Hsp90 do Aha1 i p23 wpływają na szybkość hydrolizy ATP i przez to mogą regulować aktywność opiekuńczą Hsp90. Może to być szczególnie istotne podczas warunków stresowych, w których następuje indukcja ekspresji Hsp90 α . Stwierdzono, że ekspresja Aha1 jest regulowana przez inne białka, co stwarza dodatkową możliwość niezależnej regulacji aktywności obu izoform przez zmiany w ilości Aha1 [35,106].

Na funkcjonowanie wprowadzanych form Hsp90 i oddziaływanie z białkami pomocniczymi Aha1 i p23 nie bez znaczenia pozostaje wpływ modyfikacji potranslacyjnych. Modyfikacje te odbywają się zarówno w komórkach drożdży i w komórkach ludzkich. Należy jednak zauważyć, że drożdżowe białka Hsc82 i Hsp82 powstały w wyniku duplikacji genu niezależnie od duplikacji, która stworzyła parę ludzkich białek Hsp90. W obydwu przypadkach mechanizm modyfikacji potranslacyjnych Hsp90 ewoluował niezależnie. Jest bardzo mało prawdopodobne, że drożdże rozwinęły zdolność jak w komórkach ludzkich do identycznych modyfikacji aminokwasów w izoformach α i β Hsp90. Różnice w funkcjonowaniu ludzkich Hsp90 w drożdżach łatwiej wyjaśnić odmienną budową przestrzenną środkowej domeny Hsp90 α i β , wynikającą z różnic w sekwencji aminokwasowej między izoformami tego białka.

Hsp90 podlega modyfikacjom takim jak: fosforylacja, acetylacja, S-nitrozylacja, SUMOilacja czy ubikwitynacja [107, 108]. Niektóre spośród nich wpływają na oddziaływanie Hsp90 z Aha1. Przykładowo fosforylacja tyrozyny w pozycji 38, a także SUMOilacja Lys 191 zwiększa oddziaływanie Hsp90 α z Aha1. Przeciwny efekt

powoduje acetylacja Lys 294 (również spadek oddziaływania tej izoformy z klientami) [108, 109, 99]. Wpływ tych modyfikacji nie był badany dla izoformy β . Wspomniane aminokwasy są konserwowane ewolucyjnie stąd podobne modyfikacje mogą dotyczyć także Hsp90 β . Ekspresja kinaz Met i v-src prowadzi do wzrostu SUMOilacji Hsp90 α (w efekcie zwiększone oddziaływanie z Aha1) [108]. Analogicznie do powyższej obserwacji specyficzna regulacja jednej z izoform Hsp90 przez modyfikacje potranslacyjne może być powiązana z oddziaływaniem z białkami pomocniczymi lub preferencyjnym oddziaływaniem z białkami-klientami.

Modyfikacje potranslacyjne wpływają na oddziaływanie Hsp90 z p23. Wspomniana fosforylacja tyrozyny w pozycji 38 w Hsp90 α powoduje stabilizację oddziaływania z p23 a acetylacja reszt aminokwasowych lizyny w Hsp90 α w pozycjach: 100, 292, 327, 478, 546, 558 destabilizuje to oddziaływanie [109,110].

Znanymi modyfikacjami potranslacyjnymi odróżniającymi izoformy jest fosforylacja: Thr5 oraz Thr7 w izoformie α [107]. Zmiany te nie mogą występować w izoformie Hsp90 β , ponieważ w tych samych pozycjach swojej sekwencji Hsp90 β posiada inne aminokwasy. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykluczają, aby modyfikacje treoniny w pozycji 5 lub 7 odróżniały między sobą izoformy, ponieważ drożdże z ekspresją wariantów Hsp90 posiadających wymienione odcinki pierwszych 100 aminokwasów (szczyepy oznaczone H13 i H14), nie wykazywały zmiany szybkości wzrostu w porównaniu do drożdży z ekspresją odpowiednio Hsp90 α lub Hsp90 β .

Fragment sekwencji środkowej domeny obejmujący aminokwasy od 278 do 540 w Hsp90 α , oraz odpowiadający mu fragment przynależący do izoformy β , zawiera kilka reszt aminokwasowych, które nie są konserwatywne, przez co mogą być potencjalnym celem modyfikacji potranslacyjnych specyficznych dla jednej z izoform. Nie wiadomo, czy modyfikacje któregośkolwiek z wymienionych między izoformami aminokwasów odpowiadają za różnice strukturalne oraz za zmianę powinowactwa danej izoformy względem Aha1. Wyniki niniejszej pracy pokazują, że zamiana Ser482His w hybrydzie H18, wpływa na zwiększenie oddziaływania z Aha1, jednak współistnieje ona razem z substytucją Thr479Asn. Aby jednoznacznie aminokwasy, które przez modyfikacje potranslacyjne mogłyby rozróżniać izoformy między sobą – należałoby przetestować pojedyncze mutanty. Seryna w pozycji 482 pozostaje interesującym celem mutagenyzy.

5.2. Zależność izoform Hsp90 od stymulacji przez Aha1

Mutacja nadająca oporność na 17-AAG w domenie N Hsp90 (substytucja Ile128Thr w izoformie Hsp90 α oraz Ile123Thr w Hsp90 β) jednocześnie zwiększa powinowactwo zmutowanych Hsp90 względem Aha1 [95]. Silniejsze oddziaływanie zmutowanych form Hsp90 z Aha1 dotyczy obu izoform, dlatego preferencyjne oddziaływanie Aha1 z Hsp90 α (związane z jego środkową domeną) nie jest rezultatem mutacji oporności. Białko pomocnicze Cdc37 oddziałujące z domeną N Hsp90 [46], wykazywało zbliżone powinowactwo do badanych zmutowanych form Hsp90 α lub β . Wynik eksperymentu, w którym zbadano dzikie warianty izoform Hsp90 nieposiadające mutacji w domenie N, potwierdzają preferencyjne oddziaływanie białka Aha1 z Hsp90 α , niezależnie od obecności mutacji oporności na 17-AAG.

Ludzkiemu Aha1 w drożdżach odpowiadają dwa homologiczne białka nazywane: Aha1 oraz Hch1. Drożdżowe Aha1 charakteryzuje sekwencja aminokwasowa (350 aa.) zbliżonej długości do ludzkiego odpowiednika (338 aa.). Podobieństwo sekwencji między ludzkim a drożdżowym Aha1 wynosi 28%. Białko Hch1 swoją długością i podobieństwem aminokwasowym odpowiada jedynie domenie aminowej drożdżowego Aha1 i posiada jedynie 10% homologii do ludzkiego Aha1 [99]. Delecja *AHA1* bądź *HCH1* nie wpływa na wzrost drożdży w temperaturze 30°C. Pozbawienie drożdży wspomnianych białek odgrywa znaczenie dopiero przy podniesieniu temperatury lub zmianie źródła węgla z glukozy na glicerol [35]. Drożdżowe Hsp90 do aktywności nie potrzebują białek współopiekuńczych w warunkach sprzyjających wzrostowi. Współdziałanie drożdżowych Hsp90 z Aha1 lub Hch1 okazuje się istotne dopiero po wystąpieniu warunków stresowych. Delecja genów *AHA1* bądź *HCH1* w drożdżach z ekspresją ludzkiego Hsp90 β nie miała wpływu na wzrost. Izoforma Hsp90 β do swojej aktywności w warunkach fizjologicznych nie potrzebuje tych białek pomocniczych. W tych samych warunkach Hsp90 α do pełnej aktywności wymagało stymulacji przez białko Aha1. U drożdży na każde białko Aha1 lub Hch1 przypada co najmniej 12 dimerów Hsp90 (biorąc pod uwagę: Hsc82 i Hsp82) [104]. Jeżeli podobny stosunek ekspresji występuje w komórkach ludzkich, wówczas Hsp90 musi konkurować o dostępność białek współopiekuńczych. Eksperymenty wykonane na modelu drożdżowym sugerują, że aktywność opiekuńcza Hsp90 α jest bardziej zależna od Aha1 niż aktywność Hsp90 β . Dlatego większe powinowactwo Hsp90 α względem Aha1 obserwowane w komórkach ludzkich może wynikać z przystosowania, które pozwala

wydajnie funkcjonować tej izoformie, gdy ilość Aha1 w komórce pozostaje ograniczona. Pomimo homologii między białkami Aha1 i Hch1 uważa się, że oddziałują one z Hsp90 w inny sposób [111]. Brak wpływu delecji *HCHI* na aktywność ludzkich izoform Hsp90 wynika prawdopodobnie z tego, że interakcja specyficznego dla drożdży białka Hch1 z ludzkimi Hsp90 nie występuje.

5.3. Zmutowane formy Hsp90 odporne na 17-AAG nie tworzą *in vivo* stabilnych heterodimerów z natywnymi Hsp90.

Używane i opisane w niniejszej pracy allele *HSP90* posiadają mutację w domenie N, nadającą oporność na inhibitor Hsp90 będący pochodną geldanamycyny (17-AAG). Hodowla komórek w medium zawierającym inhibitor umożliwiała selekcję populacji komórek, które wykazują ekspresję wprowadzonych form Hsp90 na wysokim poziomie odpowiadającym ekspresji endogennych Hsp90 [95]. Inhibitor inaktywuje dimery tworzone przez endogenne Hsp90, wobec czego funkcjonalne i aktywne w komórce pozostają jedynie dimery białek pochodzące z ekspresji wprowadzonych genów. Wyniki immunoprecypitacji pokazują, że z małą wydajnością powstają również heterodimery utworzone z białek natywnych oraz wprowadzonych form Hsp90. Powstaje pytanie, czy taki heterodimer może być aktywny pomimo obecności inhibitora i czy może wpływać na wyniki eksperymentów przeprowadzonych na komórkach HEK-293. Hsp90 zbudowane z monomerów, z których jeden posiada mutację uniemożliwiającą wiązanie ATP pozostaje nieaktywne nawet, gdy drugi z monomerów nie ma mutacji [112]. Nieaktywne są również heterodimery powstałe z Hsp90 β oraz Hsp90 β pozbawionego domeny N. Dodanie białka Aha1 do opisywanych heterodimerów nie skutkowało przyspieszeniem hydrolizy nukleotydu [101]. Wspomniane powyżej wyniki z literatury sugerują, że nieaktywne są również heterodimery, w których jedno miejsce wiązania ATP jest zablokowane przez inhibitor. Niewielkie zanieczyszczenie izolowanej przez immunoprecypitację populacji kompleksów Hsp90 takimi heterodimerami nie ma większego wpływu na obserwowane wyniki. Dodatkowo należy zaznaczyć, że ewentualna domieszka heterodimerów powinna powodować zmniejszenie obserwowanych różnic w ilości wiązanych Aha1 i p23 lub w aktywności opiekuńczej, ponieważ wszystkie heterodimery mają wspólną cząsteczkę natywnego Hsp90.

Choć dimeryzacja Hsp90 wynika ze współoddziaływania między domenami C monomerów, to zmiany w domenach N dotyczące wiązania ATP i powstawania konformacji zamkniętej również mają wpływ na stabilność dimerów [113]. W strukturze

dimerycznej, gdy jeden z monomerów wiąże inhibitor, rearanżacje przestrzenne wymagane do prawidłowej aktywności opiekuńczej Hsp90 mogą być utrudnione lub zablokowane, ponieważ podjednostki w dimerze współdziałają w procesie hydrolizy ATP [114].

5.4. Preferencyjne oddziaływanie izoform Hsp90 względem białek-klientów

Białko cIAP-1 jest klientem Hsp90 β [7]. Interakcja z izoformą Hsp90 β stabilizuje jego strukturę i pomaga w prawidłowej translokacji cIAP-1 z jądra komórkowego do cytoplazmy. Zgodnie z obecnym w literaturze przekonaniem o środkowej domenie Hsp90 jako miejscu interakcji z białkami-klientami [23, 27], spodziewano się podobnej obserwacji dla cIAP-1. Jednak jego wyższy poziom ekspresji zaobserwowano, gdy w komórkach aktywna była Hsp90 β lub forma hybrydowa Hsp90 zawierająca domenę N z izoformy Hsp90 β .

Preferencyjne oddziaływanie z izoformą Hsp90 β oraz hybrydami posiadającymi domenę N z Hsp90 β zaobserwowano również dla cIAP-2. Jest to homologiczne do cIAP-1 białko, które nie było dotychczas badane pod względem powinowactwa do izoform Hsp90. Powinowactwo do domeny N Hsp90 dotyczy również białka Surwiwiny, należącego podobnie jak cIAP-1 i cIAP-2 do grupy białek IAP – inhibitorów apoptozy [93, 97]. Uważa się, że głównym miejscem wiązania białka-klienta do Hsp90 jest domena środkowa, ale analiza strukturalna kompleksu Hsp90-Cdc37-Cdk4 sugeruje, że domena N Hsp90 bierze udział w oddziaływaniu z kinazą Cdk4 [28]. Podobnie jest w przypadku interakcji Hsp90 z białkiem Tau [59]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy świadczą, że oddziaływanie cIAP-1 z Hsp90 angażuje domenę N Hsp90. Ta preferencyjna interakcja cIAP-1 i cIAP-2 z izoformą Hsp90 β może wynikać z niewielkich różnic w sekwencji aminokwasowej domen N Hsp90 α i β . Zwiększona ekspresja Hsp90 β występująca podczas procesów związanych z hamowaniem apoptozy była obserwowana [79], stąd preferencyjna interakcja białek cIAP – inhibitorów apoptozy z Hsp90 β może mieć głębsze znaczenie. Aby określić rolę tej izoformy w procesie programowanej śmierci komórki potrzebne są dalsze badania.

Białko hERG jest kanałem jonowym zakotwiczonym w błonie komórkowej. Prawidłowa translokacja na powierzchnię komórki wiąże się z pełną glikozylacją hERG (forma niedojrzała, w trakcie transportu z retikulum endoplazmatycznego, jest glikozylowana tylko częściowo). Dane literaturowe pokazują, że opisany proces

translokacji hERG na powierzchnię komórki jest zależny od izoformy Hsp90 α i że oba białka fizycznie oddziałują ze sobą [8]. Prawidłową translokację hERG na powierzchnię komórki zapewnia ponadto współdziałanie Hsp90 z Hsp70. Obydwa białka opiekuńcze oddziałują bezpośrednio z niefunkcjonalną formą hERG (*ang. core-glycosylated*) obecną w retikulum endoplazmatycznym [115].

W doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy różnicę w ilości hERG wynikającą z oddziaływania z izoformami Hsp90 zaobserwowano dopiero po indukcji szoku komórkowego wywołanego przez zwiększające się stężenia inhibitora Hsp90 (17-AAG). Wiadomo, że geldanamycyna przez hamowanie aktywności Hsp90 zapobiega pełnej glikozylacji hERG i zwiększa jego degradację w proteasomie [115]. Zmniejszenie frakcji częściowo glikozyłowanej zaobserwowano w lizatach komórek, w których aktywne pozostawało Hsp90 α . Izofорма ta bierze udział w dojrzewaniu hERG, ale prawdopodobnie jej nadmiar w komórce blokuje pełną glikozylację białka-klienta. Dodanie inhibitora może powodować „uwolnienie” hERG i jego ekspresję na powierzchni komórki. Podobnie jak w przypadku zmutowanej wersji białka CFTR, które jest zatrzymywane wewnątrz komórki a jego transport na powierzchnię błony komórkowej można przywrócić przez zmniejszenie komórkowej puli Aha1 [116].

5.5. Mutacja punktowe zmieniające stabilności dimerów Hsp90, nie mają wpływu na aktywność izoform Hsp90

Hsp90 działa w komórce jako homodimer stabilizowany głównie przez wiązanie domen C. Substytucja aminokwasów w domenie C, odpowiednio A629M w Hsp90 α oraz M621A w Hsp90 β wpływa na stabilność form dimerycznych Hsp90 [12]. Przedstawione wyniki świadczą, że te mutacje nie mają wpływu na wzrost drożdży, nie zmieniają także preferencji oddziaływania izoform Hsp90 z białkami pomocniczymi Aha1 czy p23. Opisane w literaturze mutacje wpływające na dimeryzację były badane wyłącznie przy użyciu techniki dwuhybrydowej na izolowanych domenach C. Możliwe, że brak efektów tych mutacji na aktywność Hsp90 jest spowodowany brakiem ich wpływu na dimeryzację Hsp90 o pełnej długości *in vivo*.

5.6. Podsumowanie

W pracy po raz pierwszy zademonstrowano preferencyjne oddziaływanie białek pomocniczych Aha1 i p23 z izoformą Hsp90 α . W oddziaływaniu między wspomnianymi białkami pomocniczymi z Hsp90 α pośredniczy środkowa domena białka opiekuńczego.

Środkowe domeny Hsp90 α i β pomimo dużego podobieństwa stanowią funkcjonalną całość. Wymiana między izoformami dowolnego, nawet krótkiego fragmentu z domeny środkowej zmienia funkcjonowanie powstałej hybrydy.

Aktywność Hsp90 α bardziej niż Hsp90 β , wydaje się być bardziej zależna od stymulacji przez Aha1. Drożdżowe białka pomocnicze Hch1 i Aha1 z uwagi na niski stopień homologii nie są w stanie aktywować w pełni ludzkiej izoformy Hsp90 α , stąd drożdże z ekspresją tej izoformy charakteryzuje wolny wzrost.

Środkowa domena Hsp90 jest identyfikowana, jako obszar wiązania białek substratowych. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pokazują, że w interakcji tej może pośredniczyć także domena N Hsp90. Ten fragment białka należący do Hsp90 β warunkuje specyficzną interakcję z białkami cIAP-1 i cIAP-2 - dla którego po raz pierwszy zaobserwowano wybiórcze oddziaływanie z Hsp90 β .

Interakcja wspomnianych białek pomocniczych i substratowych z izoformami Hsp90 dowodzi, że za różnice między izoformami Hsp90 odpowiadają struktury zlokalizowane w różnych obszarach tego białka. Preferencyjne oddziaływanie izoform Hsp90 z danym białkiem (pomocniczym lub współopiekuńczym) może również wynikać z jego unikalnych cech strukturalnych.

6. Wnioski

- Zmutowane formy Hsp90, odporne na inhibitory mogą być zastosowane w badaniach funkcjonalnych Hsp90 jako wygodna alternatywa dla stosowanych technik wyciszania transkrypcji i ekspresji białka.
- Ludzkie Hsp90 odróżnia preferencyjne oddziaływanie z białkami Aha1 i p23 z Hsp90 α , wynikające z różnic między sekwencjami aminokwasowymi środkowej domeny izoform Hsp90.
- Aktywność Hsp90 α jest bardziej zależna od oddziaływania z Aha1 niż aktywność Hsp90 β .
- Pomimo dużej homologii środkowych domen izoform Hsp90, każda z nich stanowi funkcjonalną całość, której fragmenty nie mogą być zastąpione przez odpowiadające im fragmenty drugiej izoformy.
- Nie tylko domena środkowa, lecz także domena N Hsp90 może uczestniczyć w interakcji z białkami substratowymi.

7. Streszczenie

Białka szoku cieplnego 90 (Hsp90) należą do klasy białek opiekuńczych. Białka te odgrywają istotną rolę w komórce w warunkach fizjologicznych i związanych ze stresem. Hsp90 jest zaangażowane w wiele różnych procesów komórkowych w trakcie których oddziałuje z ponad 200 białkami nazywanymi klientami. Hsp90 zapewnia prawidłową aktywność i stabilizację tym białkom.

Aktywność opiekuńcza Hsp90 zależy od hydrolizy ATP – zachodzącej w jego domenie N i podlega regulacji przez białka zwane koczaperonami (pomocniczymi). Większość zwierząt (z wyjątkiem kręgowców) posiada jedną cytoplazmatyczną formę Hsp90. W cytozolu ludzkich komórek współwystępują dwie izoformy Hsp90 nazywane α i β , które są kodowane przez różne geny, lecz posiadają bardzo podobną sekwencję aminokwasową. Wiele prac naukowych nie rozróżnia istnienia izoform Hsp90 traktując je jako jedno białko, bądź badając tylko jedną z izoform. Niewiele wiadomo o roli poszczególnych izoform oraz różnicach strukturalnych między nimi. Zidentyfikowano zaledwie kilka białek klientów oraz białek pomocniczych oddziałujących preferencyjnie z jedną z izoform Hsp90.

Celem podjętej pracy było poszukiwanie różnic między ludzkimi cytoplazmatycznymi izoformami Hsp90. Starano się określić, które fragmenty ludzkiego Hsp90 mogą być odpowiedzialne za preferencyjną interakcję Hsp90 α lub Hsp90 β z białkami pomocniczymi i białkami-klientami.

Stabilność i wysoki poziom ekspresji Hsp90 w komórce utrudnia badania nad specyficznymi funkcjami izoform Hsp90 α i β *in vivo*. Wykorzystanie technik: siRNA lub antysensownych oligonukleotydów i związane z tym zaprojektowanie sekwencji wyciszających tylko jedną izoformę jest utrudnione z uwagi na wysoką homologię sekwencji między izoformami Hsp90.

W niniejszej pracy posłużono się genami *HSP90* z mutacją nadającą oporność na inhibitor ATPazy w Hsp90. Zastosowanie tego inhibitora pozwoliło zahamować aktywność endogennego Hsp90 przy zachowaniu ekspresji genów *HSP90* z wprowadzanych plazmidów jako jedyne źródła tego białka w komórce.

Hsp90 składa się z 3 domen: N-końcowej, środkowej oraz C-końcowej. Aby określić, które obszary sekwencji Hsp90 odpowiadają za różnice między izoformami,

skonstruowano geny hybrydowe, w których fragmenty izoformy α zostały wymienione na odpowiadające im fragmenty izoformy β . Białka hybrydowe oraz izoformy badano w ludzkiej linii komórkowej oraz w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*.

Skonstruowano szczep drożdży, w którym ludzkie izoformy lub formy hybrydowe zastępowały endogenne Hsp90. Drożdże z ekspresją Hsp90 α lub hybryd posiadających w swej strukturze fragmenty pochodzące ze środkowej domeny tej izoformy rosły wolniej niż drożdże z ekspresją Hsp90 β lub hybryd zawierających fragmenty środkowej domeny z Hsp90 β . W przeciwieństwie do drożdży, ludzkie komórki linii HEK-293 z ekspresją izoform Hsp90 i białek hybrydowych, dzieliły się w jednakowym tempie.

Immunoprecypitacja kompleksów białek oddziałujących z Hsp90 wykazała preferencyjne wiązanie p23 oraz Aha1 z izoformą Hsp90 α i hybrydami posiadającymi w swej strukturze środkową domenę tej izoformy. Te same fragmenty środkowej domeny Hsp90 α warunkujące wysokie powinowactwo wiązania z Aha1 były odpowiedzialne za wolny wzrost drożdży.

Oddziaływanie między izoformami Hsp90 a Aha1 sprawdzano w drożdżach pozbawionych genów *AHA1* oraz *HCHI* (oba geny są homologiczne do ludzkiego *AHA1*). Drożdże z ekspresją Hsp90 β były niewrażliwe na brak *AHA1* i *HCHI*, podczas gdy spowolnienie tempa wzrostu dotyczyło drożdży z ekspresją Hsp90 α , pozbawionych genu *AHA1*.

Powszechnie przyjmuje się, że środkowa domena Hsp90 odpowiada za oddziaływanie z białkami-klientami. Wyniki niniejszej pracy pokazują, że w oddziaływaniu tym może mieć znaczenie również N-końcowa domena Hsp90. Analiza Western blot wykazała, że aktywność opiekuńcza Hsp90 wobec białek cIAP, uwarunkowana jest obecnością N-końcowej domeny pochodzącej z Hsp90 β .

Preferencyjne interakcje białek pomocniczych i klientów z daną izoformą Hsp90 zależą od różnych obszarów tego białka. Oddziaływanie charakterystyczne dla Hsp90 α z p23 oraz Aha1, jest związane z jej środkową domeną, podczas gdy N-końcowa domena z Hsp90 β jest decydująca w oddziaływaniu z białkami cIAP.

8. Abstract

The heat shock protein 90 (Hsp90) belongs to a class of proteins called chaperones. These proteins play in a cell an important role and act under physiological and stress conditions. Hsp90 is involved in various cellular processes where it interacts with over 200 proteins called clients. Hsp90 is essential to maturation, activity or stability of clients.

Chaperoning activity of Hsp90 depends on ATP hydrolysis in N-domain Hsp90 and is regulated by proteins called co-chaperones. Most animals (with the exception of vertebrates) possess one cytoplasmic Hsp90. In the cytosol of human cells there are two isoforms of Hsp90 named α and β , which are encoded by distinct genes, but they have a very similar amino acids sequence. Many scientific papers do not distinguish the existence of Hsp90 isoforms, treating them like one protein or do research on only one of them. Very little is known about a particular role of each isoform and structural differences among them. Only a few clients and co-chaperones, interacting preferentially with one isoform of the human cytosolic Hsp90, were identified.

The aim of this research was to look for differences between human cytosolic isoforms of Hsp90. The research focused on finding the fragments of Hsp90 that may be responsible for preferential interactions of Hsp90 α or Hsp90 β with co-chaperones and clients.

Stability and high expression of Hsp90 proteins hinder the studies of specific functions of Hsp90 α and β *in vivo*. The use of techniques such as siRNA or anti-sense oligonucleotides to silence one of Hsp90 isoforms is difficult because of the high sequence homology between Hsp90 isoforms.

In the presented work, *HSP90* genes with mutations that confer resistance to Hsp90 ATPase inhibitor were used. This inhibitor allowed to inactivate endogenous Hsp90, leaving expressed *HSP90* genes from the transfected plasmids as a sole source of this protein in the cells.

Hsp90 is composed of three domains: N-terminal domain, middle domain and C-terminal domain. To identify the fragments responsible for the differences between Hsp90 isoforms, hybrid Hsp90 genes were constructed, in which the fragments of the

Hsp90 α were replaced by the corresponding fragments of Hsp90 β . These hybrids and isoforms were studied in human and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.

Yeast strains were constructed with their endogenous Hsp90 replaced by human Hsp90 isoforms or hybrid. Yeasts expressing the human Hsp90 α , or hybrid containing the middle domain of this isoform, grew much slower than the yeasts expressing the human Hsp90 β or hybrid containing the middle domain of Hsp90 β . In contrast to yeasts, human cells HEK-293 that expressed any of Hsp90 isoforms or hybrid proteins proliferated at similar rates.

The results of co-immunoprecipitation revealed preferential binding of p23 and Aha1 proteins to Hsp90 α and hybrids that contained the middle domain of this isoform. The fragments of the middle domain of Hsp90 α responsible for high affinity binding of Aha1 and slow growth in yeasts were the same.

Interaction between Hsp90 isoforms and Aha1 was checked in yeasts with deletion of *AHA1* and *HCHI* genes (both being homologs of the human *AHA1* gene). The yeasts that expressed Hsp90 β were insensitive to deletion of *AHA1* or *HCHI*, whereas growth rate was decreased in the strains expressed Hsp90 α with *AHA1* gene deletion.

It is believed that the middle domain of Hsp90 is responsible for the interaction with client proteins. The results presented in this work show that this interaction could also be mediated by the N-terminal domain of Hsp90. Western blotting revealed that effective chaperoning of cIAP proteins with Hsp90 was determined by the N-domain of Hsp90 β .

Preferential interaction of co-chaperones and client proteins with a particular Hsp90 isoform depends on different fragments of this protein. Preferential interaction of Hsp90 α with p23 and Aha1 is mediated by the M-domain of this isoform, whereas the N-terminal domain of Hsp90 β is crucial for chaperoning of cIAP clients.

9. Piśmiennictwo

1. Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organism, *BMC Genomics*. 2006 Jun 17;7:156.
2. Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(9): 3919–3930.
3. Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, Lindquist S. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*, 2012. 150(5): p. 987-1001.
4. Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, Boone C, Emili A, Houry WA. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell*, 2005. 120(5): 715-27.
5. Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci*, 2007. 32(3): 517-30.
6. Schwartz H, Scroggins B, Zuehlke A, Kijima T, Beebe K, Mishra A, Neckers L, Prince T. Combined HSP90 and kinase inhibitor therapy: Insights from The Cancer Genome Atlas, *Cell Stress Chaperones*. 2015 Sep; 20(5): 729–741.
7. Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Bouchot A, Cartier J, Jacquelin A, Ducoroy P, Cathelin S, Decolgne N, Chiosis G, Dubrez-Daloz L, Solary E, Garrido C. Interaction of heat-shock protein 90[beta] isoform (HSP90[beta]) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ*, 2008. 15(5): 859-866.
8. Peterson LB, Eskew JD, Vielhauer GA, Blagg BS. The hERG channel is dependent upon the Hsp90alpha isoform for maturation and trafficking. *Mol Pharm*, 2012. 9(6): 1841-6.
9. Grad I, Cederroth CR, Walicki J, Grey C, Barluenga S, Winssinger N, De Massy B, Nef S, Picard D. The molecular chaperone Hsp90alpha is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. *PLoS One*, 2010. 5(12): e15770.
10. Chadli A, Felts SJ, Toft DO. GCUNC45 is the first Hsp90 co-chaperone to show alpha/beta isoform specificity. *J Biol Chem*, 2008. 283(15): 9509-12.
11. Cortes-González C, Barrera-Chimal J, Ibarra-Sánchez M, Gilbert M, Gamba G, Zentella A, Flores ME, Bobadilla NA. Opposite effect of Hsp90alpha and Hsp90beta on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells. *Cell Physiol Biochem*, 2010. 26(4-5): 657-68.

12. Kobayakawa T, Yamada S, Mizuno A, Nemoto TK. Substitution of only two residues of human Hsp90alpha causes impeded dimerization of Hsp90beta. *Cell Stress Chaperones*, 2008. 13(1): 97-104.
13. Prince TL, Kijima T, Tatokoro M, Lee S, Tsutsumi S, Yim K, Rivas C, Alarcon S, Schwartz H, Khamit-Kush K, Scroggins BT, Beebe K, Trepel JB, Neckers L. Client Proteins and Small Molecule Inhibitors Display Distinct Binding Preferences for Constitutive and Stress-Induced HSP90 Isoforms and Their Conformationally Restricted Mutants. *PLoS One*, 2015. 10(10): e0141786.
14. Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*, 2006. 75: 271-94.
15. Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 2008. 283(27): 18473-7.
16. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997. 90(1): 65-75.
17. Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J*, 1998. 17(16): 4829-36.
18. Richter K, Muschler P, Hainzl O, Buchner J. Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J Biol Chem*, 2001. 276(36): 33689-96.
19. Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe SM, Vaughan CK, Vlasic I, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J*, 2004. 23(3): 511-9.
20. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J*, 2000. 19(16): 4383-92.
21. Cunningham CN, Southworth DR, Krukenberg KA, Agard DA. The conserved arginine 380 of Hsp90 is not a catalytic residue, but stabilizes the closed conformation required for ATP hydrolysis. *Protein Sci*. 2012 Aug;21(8):1162-71.
22. Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci*, 2000. 25(1): 24-8.
23. Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell*, 2003. 11(3): 647-58.
24. Richter K, Moser S, Hagn F, Friedrich R, Hainzl O, Heller M, Schlee S, Kessler H, Reinstein J, Buchner J. Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase activity, *J Biol Chem*. 2006 Apr 21;281(16):11301-11.

25. Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K. The Charged Linker Region Is an Important Regulator of Hsp90 Function, *J Biol Chem*. 2009 Aug 21;284(34):22559-67.
26. Tsutsumi S, Mollapour M, Prodromou Ch, Lee CT, Panaretou B, Yoshida S, Mayer MP, Neckers LM. Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(8): 2937-42.
27. Hawle P, Siepmann M, Harst A, Siderius M, Reusch HP, Obermann WM., The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(22): 8385-95.
28. Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F, Good VM, Ali MM, Prodromou C, Robinson CV, Saibil HR, Pearl LH. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol Cell*, 2006. 23(5): 697-707.
29. Smith JR, de Billy E, Hobbs S, Powers M, Prodromou C, Pearl L, Clarke PA, Workman P. Restricting direct interaction of CDC37 with HSP90 does not compromise chaperoning of client proteins. *Oncogene*, 2015. 34(1): 15-26.
30. Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(2): 1459-64.
31. Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW. Hsp90-from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 363(2): 241-6.
32. Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 1999. 42(2): 260-6.
33. Young JC, Obermann WM, Hartl FU. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem*, 1998. 273(29): 18007-10.
34. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, 2000. 101(2): 199-210.
35. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C. Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell*, 2002. 10(6): 1307-18.
36. Prodromou C. The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(3): 614-23.
37. McLaughlin SH, Smith HW, Jackson SE. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J Mol Biol*, 2002. 315(4): 787-98.
38. Zhang Z, Sullivan W, Felts SJ, Prasad BD, Toft DO, Krishna P. Characterization of plant p23-like proteins for their co-chaperone activities. *Cell Stress Chaperones*, 2010. 15(5): 703-15.

39. Garcia-Ranea JA, Mirey G, Camonis J, Valencia A. p23 and HSP20/alpha-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Lett*, 2002. 529(2-3): 162-7.
40. Retzlaff M, Hagn F, Mitschke L, Hessling M, Gugel F, Kessler H, Richter K, Buchner J. Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Mol Cell*, 2010. 37(3): 344-54.
41. Sun L, Prince T, Manjarrez JR, Scroggins BT, Matts RL. Characterization of the interaction of Aha1 with components of the Hsp90 chaperone machine and client proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(6): 1092-101.
42. Travers SA, Fares MA. Functional coevolutionary networks of the Hsp70-Hop-Hsp90 system revealed through computational analyses. *Mol Biol Evol*, 2007. 24(4): 1032-44.
43. Southworth DR, Agard DA. Client-loading conformation of the Hsp90 molecular chaperone revealed in the cryo-EM structure of the human Hsp90:Hop complex. *Mol Cell*, 2011. 42(6): 771-81.
44. Richter K, Muschler P, Hainzl O, Reinstein J, Buchner J. Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle. *J Biol Chem*, 2003. 278(12): 10328-33.
45. Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J*, 1999. 18(3): 754-62.
46. Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell*, 2004. 116(1): 87-98.
47. Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C. Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J Biol Chem*, 2002. 277(23): 20151-9.
48. Zhang W, Hirshberg M, McLaughlin SH, Lazar GA, Grossmann JG, Nielsen PR, Sobott F, Robinson CV, Jackson SE, Laue ED. Biochemical and structural studies of the interaction of Cdc37 with Hsp90. *J Mol Biol*, 2004. 340(4): 891-907.
49. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones., *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1823(3):624-35.
50. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 14): 2809-16.
51. Donze O, Abbas-Terki T, Picard D. The Hsp90 chaperone complex is both a facilitator and a repressor of the dsRNA-dependent kinase PKR. *EMBO J*, 2001. 20(14): 3771-80.
52. Cheung J, Smith DF. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol*, 2000. 14(7): 939-46.

53. Picard D. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab*, 2006. 17(6):229-35.
54. Falsone SF, Gesslbauer B, Tirk F, Piccinini AM, Kungl AJ. A proteomic snapshot of the human heat shock protein 90 interactome. *FEBS Lett*, 2005. 579(28): 6350-4.
55. Falsone SF, Gesslbauer B, Rek A, Kungl AJ. A proteomic approach towards the Hsp90-dependent ubiquitinated proteome. *Proteomics*, 2007. 7(14): 2375-83.
56. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res*, 2001. 61(10): 4003-9.
57. Minami Y, Kiyoi H, Yamamoto Y, Yamamoto K, Ueda R, Saito H, Naoe T. Selective apoptosis of tandemly duplicated FLT3-transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors. *Leukemia*, 2002. 16(8): 1535-40.
58. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(20): 10832-7.
59. Karagöz GE, Duarte AM, Akoury E, Ippel H, Biernat J, Morán Luengo T, Radli M, Didenko T, Nordhues BA, Veprintsev DB, Dickey CA, Mandelkow E, Zweckstetter M, Boelens R, Madl T1, Rüdiger SG. Hsp90-Tau complex reveals molecular basis for specificity in chaperone action. *Cell*, 2014. 156(5): 963-74.
60. Karagoz GE, Rudiger SG. Hsp90 interaction with clients. *Trends Biochem Sci*, 2015. 40(2): 117-25.
61. Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*. 2005 Dec;86(6):627-37.
62. Gupta RS. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol*, 1995. 12(6): 1063-73.
63. Hickey E, Brandon SE, Smale G, Lloyd D, Weber LA. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(6): 2615-26.
64. Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*, 2004. 562(1-3): 11-5.
65. Krone PH, Sass JB. HSP 90 alpha and HSP 90 beta genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 204(2): 746-52.
66. McDowell CL, Sutton RB, Obermann WM. Expression of Hsp90 chaperone [corrected] proteins in human tumor tissue. *Int J Biol Macromol*, 2009. 45(3): 310-4.
67. Metchat A, Akerfelt M, Bierkamp C, Delsinne V, Sistonen L, Alexandre H, Christians ES. Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression. *J Biol Chem*, 2009. 284(14): 9521-8.

68. Garnier C, Lafitte D, Jorgensen TJ, Jensen ON, Briand C, Peyrot V. Phosphorylation and oligomerization states of native pig brain HSP90 studied by mass spectrometry. *Eur J Biochem*, 2001. 268(8): 2402-7.
69. Somji S, Ann Sens M, Garrett SH, Gurel V, Todd JH, Sens DA. Expression of hsp 90 in the human kidney and in proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 2002. 133(2-3): 241-54.
70. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K, Yahara I. Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J Biol Chem*, 1991. 266(16): 10099-103.
71. Chadli A, Ladjimi MM, Baulieu EE, Catelli MG. Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone Hsp90. Inhibition by ATP and geldanamycin and activation by transition metal oxyanions. *J Biol Chem*, 1999. 274(7): 4133-9.
72. Tsaytler PA, Krijgsveld J, Goerdal SS, Rüdiger S, Egmond MR. Novel Hsp90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell Stress Chaperones*, 2009. 14(6): 629-38.
73. Voss AK, Gruss TT. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 2000. 127(1): 1-11.
74. Kunisawa J, Shastri N. Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway. *Immunity*, 2006. 24(5): 523-34.
75. Wu YP, Kita K, Suzuki N. Involvement of human heat shock protein 90 alpha in nicotine-induced apoptosis. *Int J Cancer*, 2002. 100(1): 37-42.
76. Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng CF, Bright AM, Chinn C, Chen M, Woodley DT. Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J*, 2007. 26(5): 1221-33.
77. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, Ilag LL, Jay DG. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(6): 507-14.
78. Angelo G, Lamon-Fava S, Sonna LA, Lindauer ML, Wood RJ. Heat shock protein 90beta: a novel mediator of vitamin D action. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 367(3): 578-83.
79. Kuo CC, Liang CM, Lai CY, Liang SM. Involvement of heat shock protein (Hsp)90 beta but not Hsp90 alpha in antiapoptotic effect of CpG-B oligodeoxynucleotide. *J Immunol*, 2007. 178(10): 6100-8.
80. Echeverría PC, Briand PA, Picard D. A remodeled Hsp90 molecular chaperone ensemble with the novel co-chaperone Aarsd1 is required for muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. 2016 Mar 31;36(8):1310-21.

81. Taherian A, Krone PH, Ovsenek N. a comparison of Hsp90alpha and Hsp90beta interactions with cochaperones and substrates. *Biochem Cell Biol*, 2008. 86(1): 37-45.
82. Gao Y, Yechikov S, Vazquez AE, Chen D, Nie L. Distinct roles of molecular chaperones HSP90alpha and HSP90beta in the biogenesis of KCNQ4 channels. *PLoS One*, 2013. 8(2): e57282.
83. Chiosis G, Huezio H, Rosen N, Mimnaugh E, Whitesell L, Neckers L. 17AAG: low target binding affinity and potent cell activity--finding an explanation. *Mol Cancer Ther*, 2003. 2(2): 123-9.
84. Isaacs JS, Xu W, Neckers L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2003. 3(3): 213-7.
85. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(18): 8324-8.
86. Blagg BS, Kerr TD. Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Med Res Rev*, 2006. 26(3): 310-38.
87. Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2014. 9(1): 1-20.
88. Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995. 36(4): 305-15.
89. Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N, D'Andrea G, Dickler M, Moynahan ME, Sugarman S, Ma W, Patil S, Norton L, Hannah AL, Hudis C. HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(15): 5132-9.
90. Ronnen EA1, Kondagunta GV, Ishill N, Sweeney SM, Deluca JK, Schwartz L, Bacik J, Motzer RJ. A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*, 2006. 24(6): 543-6.
91. Hollingshead M, Alley M, Burger AM, Borgel S, Pacula-Cox C, Fiebig HH, Sausville EA. In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. 56(2): 115-25.
92. Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan CG, Sun D. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(1): 162-70.
93. Altieri DC, Plescia J, Saltz W. Compounds that inhibit HSP90 protein-protein interactions with IAP proteins, US7342093 B2, Marzec 11, 2008.

94. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, Meli M, Dohi T, Fortugno P, Nefedova Y, Gabrilovich DI, Colombo G, Altieri DC. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell*, 2005. 7(5): 457-68.
95. Zurawska A, Urbanski J, Matuliene J, Baraniak J, Klejman MP, Filipek S, Matulis D, Bieganowski P. Mutations that increase both Hsp90 ATPase activity in vitro and Hsp90 drug resistance in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1803(5): 575-83.
96. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*, 2007. 4(3): 251-6.
97. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(24): 13791-6.
98. Synoradzki K, Bieganowski P. Middle domain of human Hsp90 isoforms differentially binds Aha1 in human cells and alters Hsp90 activity in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1853(2): 445-52.
99. Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L. An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell*, 2007. 25(1): 151-9.
100. Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J Biol Chem*, 2003. 278(19): 17228-35.
101. Richter K, Soroka J, Skalniak L, Leskovar A, Hessling M, Reinstein J, Buchner J. Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *J Biol Chem*, 2008. 283(26): 17757-65.
102. McLaughlin SH, Sobott F, Yao ZP, Zhang W, Nielsen PR, Grossmann JG, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE. The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *J Mol Biol*, 2006. 356(3): 746-58.
103. Harst A, Lin H, Obermann WM. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem J*, 2005. 387(Pt 3): 789-96.
104. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 2003. 425(6959): 737-41.
105. Finka A, Goloubinoff P. Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. *Cell Stress Chaperones*, 2013. 18(5):591-605.
106. Okayama S, Kopelovich L, Balmus G, Weiss RS, Herbert BS, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. p53 protein regulates Hsp90 ATPase activity and thereby Wnt signaling by modulating Aha1 expression. *J Biol Chem*, 2014. 289(10): 6513-25.
107. Mollapour M, Neckers L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(3): 648-55.

108. Mollapour M, Bourboulia D, Beebe K, Woodford MR, Polier S, Hoang A, Chelluri R, Li Y, Guo A, Lee MJ, Fotooh-Abadi E, Khan S, Prince T, Miyajima N, Yoshida S, Tsutsumi S, Xu W, Panaretou B, Stetler-Stevenson WG, Bratslavsky G, Trepel JB, Prodromou C, Neckers L. Asymmetric Hsp90 N domain SUMOylation recruits Aha1 and ATP-competitive inhibitors. *Mol Cell*, 2014. 53(2): 317-29.
109. Mollapour M, Tsutsumi S, Donnelly AC, Beebe K, Tokita MJ, Lee MJ, Lee S, Morra G, Bourboulia D, Scroggins BT, Colombo G, Blagg BS, Panaretou B, Stetler-Stevenson WG, Trepel JB, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH, Neckers L. Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function. *Mol Cell*, 2010. 37(3): 333-43.
110. Yang Y, Rao R, Shen J, Tang Y, Fiskus W, Nechtman J, Atadja P, Bhalla K. Role of Acetylation and Extracellular Location of Heat Shock Protein 90A in Tumor Cell Invasion, *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4833-42
111. Armstrong H, Wolmarans A, Mercier R, Mai B, LaPointe P. The co-chaperone Hch1 regulates Hsp90 function differently than its homologue Aha1 and confers sensitivity to yeast to the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922. *PLoS One*, 2012. 7(11): 49322.
112. Mishra P, Bolon DN. Designed Hsp90 heterodimers reveal an asymmetric ATPase-driven mechanism in vivo. *Mol Cell*, 2014. 53(2): 344-50.
113. Ratzke C, Mickler M, Hellenkamp B, Buchner J, Hugel T. Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010. 107(37): 16101-6.
114. Flynn JM, Mishra DN, Bolon DN. Mechanistic Asymmetry in Hsp90 Dimers. *J Mol Biol*, 2015. 427(18): 2904-11.
115. Ficker E, Dennis AT, Wang L, Brown AM. Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ Res*, 2003. 92(12): 87-100.
116. Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, Gurkan C, Kellner W, Matteson J, Plutner H, Riordan JR, Kelly JW, Yates JR, Balch WE. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, 2006. 127(4): 803-15.