

热休克蛋白 90 的 N 端与 ATP 类似物的晶体结构揭示其功能调控 *

李 健 孙丽华 徐春艳 郁 峰 周 欢 唐 琳 何建华 **

(中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201204)

摘要 分子伴侣热休克蛋白 90(Hsp90)对于许多涉及细胞周期调控、信号转导以及细胞生长调控蛋白质的折叠、成熟及稳定是必需的. Hsp90 的 N 端结构高度保守, 包含一个 ATP 结合口袋并具有 ATP 酶活性, Hsp90 的功能依赖于 ATP 与 Hsp90 结合后诱导的构象重排及之后的 ATP 水解. 为了深入研究 ATP 与 Hsp90 结合后 N 端的结构及其功能状态, 使用悬滴法共结晶了 Hsp90 的 N 端与 ATP 类似物 AMPPNP 及 ATP γ S 的复合物, 并利用分子置换法对其结构进行了解析. 两个复合物晶体结构都捕获到了核苷酸的电子密度, 尤其是 γ -磷酸的电子密度, 从而观察到 γ -磷酸与蛋白质之间的相互作用. ATP γ S 中 γ -磷酸的捕获证实了之前报道的结构中没有捕获到 γ -磷酸是其处于无序状态而非被水解. 单体状态下的人源 Hsp90^N-AMPPNP 与处于二聚体化的酵母 Hsp90-AMPPNP 结构对比可见 S1 和 ATP lid 的位置有明显区别, 结构分析表明, E18-K100 和 N40-D127 之间形成的氢键相互作用, 在一定程度上阻碍了 S1 和 ATP lid 的摆动, 很可能阻止了二聚体的形成.

关键词 Hsp90^N, AMPPNP, ATP γ S, γ -磷酸, 相互作用, 调控

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00611

热休克蛋白 90(Hsp90)是细胞中重要而丰富的蛋白质, 在真核细胞中表达量可达总蛋白质含量的 1%, 当细胞受到外界压力刺激时, 其表达水平会进一步提高^[1]. Hsp90 的主要功能是作为分子伴侣, 负责帮助多种底物蛋白正确折叠, 100 多种底物蛋白的成熟及稳定需要 Hsp90 发挥作用, 其底物蛋白多与细胞生长及扩增相关^[2-3]. 在细胞质中, 人源 Hsp90 主要包括 2 个异构体: Hsp90 α 和 Hsp90 β , 它们分别由不同的基因编码, 具有高度的序列同源性. 2 个异构体具有不同的功能, Hsp90 β 在许多组织中是组成型的表达, 而 Hsp90 α 是各种细胞在应激条件下诱导型表达^[4-5].

Hsp90 包括 3 个高度保守的结构域, C 端主要负责同源二聚体的形成; M 端含有大量疏水表面, 与底物蛋白质的结合及其折叠相关; N 端含有一个 ATP 结合口袋, 具有 ATP 酶活性, 扭曲的 β -sheet 在一侧, 一簇 α 螺旋在另外一侧, ATP 结合口袋将其分开, 其中 H4 和 H5 被称为 ATP lid^[6-8]. Hsp90 功能的实现依赖于 ATP 与 Hsp90 的结合及

N 端对 ATP 的水解, ATP 与 Hsp90 结合后引发 Hsp90 的构象变化, 这些构象变化导致 Hsp90 表面疏水性的改变, 使底物蛋白质与 Hsp90 亲和力增加并与 Hsp90 结合, 然后 ATP lid 发生翻转, 关闭核苷酸结合口袋, N 端与 M 端相对运动并形成 N 端的二聚体化, 同时水解中心形成, 在此过程中 Hsp90 帮助底物蛋白质正确折叠. ATP 水解为 ADP 后, γ -磷酸释放, Hsp90 转变为更紧密的构象, 折叠成熟的底物蛋白质与 Hsp90 的亲和力下降, 从分子伴侣释放, Hsp90 完成功能的执行. Hsp90 与腺苷结合的不同构象可以调节 Hsp90 与底物蛋白质以及共同分子伴侣的亲和力, 控制着整个分子伴侣复合体功能执行的进程^[9-12].

* 国家重点基础研究发展计划 (973)(2011CB911102)和中国科学院上海应用物理研究所(O95501C061)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-33933186, E-mail: hejh@sinap.ac.cn

收稿日期: 2011-12-25, 接受日期: 2012-02-27

部分 Hsp90 的抑制剂可以结合到 ATP 结合口袋, 竞争性抑制 ATP 与 Hsp90 结合, 从而抑制底物蛋白与 Hsp90 结合, 使底物蛋白处于非正常折叠状态而降解. 通过降解 Hsp90 底物蛋白的方式抑制肿瘤细胞的生长, 使 Hsp90 成为癌症治疗的重要靶点^[13-16]. 格尔德霉素(Geldanamycin, GA)为苯醌安莎霉素类化合物, 是第一个被研究的 Hsp90 抑制剂^[17], 作为抗肿瘤先导化合物, 其衍生物如 17-AAG 和 17-DMAG 已作为抗癌药物进入临床试验^[18].

AMPPNP 和 ATP γ S 是 ATP 的类似物, AMPPNP 没有水解活性, 在 ATP 中连接 β -磷酸和 γ -磷酸的氧原子被氮原子所取代, 因而不能被水解; ATP γ S 中连接 β -磷酸和 γ -磷酸的氧原子被硫原子所取代, 与 AMPPNP 不同的是它可以被水解, 只是水解速度非常慢. 在 X-射线晶体学中, 这两个核苷酸常用来确定 ATP 与蛋白质结合的复合物结构. 为了深入研究人源 Hsp90 的 N 端与 ATP 的相互作用及其调控机制, 我们解析了人源 Hsp90 的 N 端与 AMPPNP 和 ATP γ S 复合物的晶体结构. Obermann 等^[19]和 Prodromou 等^[6]分别报道过人源和酵母 Hsp90-ATP γ S 的晶体结构, 但是都没有捕捉到 γ -磷酸的电子密度, 对此他们分别给出了不同的解释. Obermann 推测可能是 γ -磷酸处于无序状态或者在结晶过程中已经被水解所致^[19]; Prodromou 则认为原因是 γ -磷酸处于无序状态而不是被水解^[6], 我们的晶体结构证实了 Prodromou 的观点. Ali 等^[20]解析了酵母 Hsp90-AMPPNP 复合物处于水解状态的晶体结构, 此时 Hsp90 的 N 端形成二聚体, 我们解析的人源 Hsp90^N-AMPPNP 结构中, 复合物处于单体状态, 并未形成二聚体, 两者在结构上有明显差别. 处于单体状态的人源 Hsp90^N-AMPPNP 结构中, E18-K100 和 N40-D127 形成的氢键相互作用在一定程度上阻碍了 S1 和 ATP lid 的摆动, 并很可能因此对 N 端的二聚体化产生了一定的影响, 从而在 Hsp90 功能执行过程中起到一定的调控作用.

1 材料与方法

1.1 Hsp90^N 的表达纯化

将 Hsp90 的 N 端结构域(氨基酸 9~236) Hsp90^N, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达. 细菌在 37℃ 扩大培养, 振荡转速为 250 r/min, 在 A_{600} 为 0.6~0.8 时, 加入 0.2 mmol/L IPTG, 30℃ 诱导表

达, 200 r/min 振荡, 5 h 后收菌(6 000 r/min, 4℃, 10 min). 细菌用缓冲液 A(20 mmol/L Tris pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10% 甘油)重悬, 使用细胞压力破碎仪破菌. 细菌破碎后离心(15 000 r/min, 4℃, 30 min), 取上清, 上样于缓冲液 A 平衡过的 5 ml HisTrap HP 亲和柱(GE Healthcare 公司), 用缓冲液 A 冲洗 5 个柱体积后用缓冲液 B (20 mmol/L Tris pH 7.5, 100 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10%甘油)洗脱. 收集洗脱的蛋白质后用 10 ku 的超滤管(Millipore)进行浓缩, 然后用分子筛(120 ml HiLoad Superdex75 16/60 column, GE Healthcare 公司)进一步纯化, 分子筛用缓冲液 C (20 mmol/L Tris pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 10%甘油)平衡. 收集洗脱峰处的蛋白质并浓缩至 20 g/L, 蛋白质的纯度用 12% SDS-PAGE 进行检测.

用动态光散射(dynamic light scattering, DLS, Malvern 公司)检测 Hsp90^N 及 Hsp90^N-AMPPNP 复合物的粒径和单分散度, 检测温度设定为 25℃, 蛋白质浓度为 1 g/L; 检测 Hsp90^N-AMPPNP 样品时, Hsp90^N 与 AMPPNP 的摩尔比为 1:5, 采用 2 μ l 的样品池.

1.2 Hsp90^N-核苷酸复合物结晶

AMPPNP 和 ATP γ S 溶解于去离子水中, 加入到蛋白质溶液后的终浓度为 5 mmol/L, 浓度约为蛋白质浓度的 5 倍. 共结晶前在 Hsp90^N-核苷酸混合物中加入 5 mmol/L MgCl₂, 冰上孵育 1 h 后进行共结晶. 1 μ l 的 Hsp90^N-核苷酸混合物加 1 μ l 的池液, 在 4℃ 恒温室中采用悬滴法进行共结晶实验.

Hsp90^N-AMPPNP 的结晶条件是 100 mmol/L C₂H₆ASNAO₂ pH 6.5, 25% (w/v) PEG 2000 MME, 200 mmol/L MgCl₂; Hsp90^N-ATP γ S 的结晶条件是 100 mmol/L Tris pH 8.5, 20% PEG 4000, 200 mmol/L MgCl₂.

1.3 晶体衍射数据收集及结构解析

收集晶体衍射数据时, 采用结晶池液加 20% 的甘油作为防冻剂, 晶体用尼龙绳捞好并置于液氮保存. 所有的衍射数据都在上海同步辐射装置(SSRF)生物大分子线站(BL17U1)收集, 收集数据时的温度是 100K, 使用 ADSC Q315r CCD 探测器. 收集的衍射数据用 HKL-2000^[21]软件包进行初步处理, 采用 PHENIX^[22]进行相位解析和结构修正, 用 Cool^[23]进行调图. 核苷酸与蛋白质的相互作用使用 LIGPLOT 作图^[24].

2 结果与讨论

2.1 Hsp90^N-核苷酸复合物的结晶及结构解析

结晶板在 4° 恒温室放置 3~5 天后晶体长出 (图 1)。两种晶体衍射数据收集策略如下: Hsp90^N-AMPPNP, 1°/ 张, 每张曝光时间 0.8 s, 收集 360 张; Hsp90^N-ATP γ S, 1°/ 张, 每张曝光时间 1.0 s, 收集 360 张; 收集数据时晶体和探测器之间的距离都是 150 mm。Hsp90^N-AMPPNP 复合物晶体的分辨率为 1.50 Å (表 1), 空间群为 P1, 晶胞参数 $a=43.27$ Å, $b=55.97$ Å, $c=60.54$ Å; $\alpha=93.39^\circ$, $\beta=95.82^\circ$, $\gamma=112.49^\circ$ 。每个不对称单位有 2 个分子, 马修斯系数(Matthews coefficient)为 $2.66 \text{ Å}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$, 溶剂含量为 53.8%^[25]。Hsp90^N-ATP γ S 复合物晶体的分辨率为 1.50 Å (表 1), 空间群为 P1, 晶胞参数 $a=$

43.24 Å, $b=55.94$ Å, $c=60.55$ Å; $\alpha=93.61^\circ$, $\beta=95.60^\circ$, $\gamma=112.61^\circ$ 。每个不对称单位有 2 个分子, 马修斯系数(Matthews coefficient)为 $2.43 \text{ Å}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$, 溶剂含量为 49.4%^[25]。

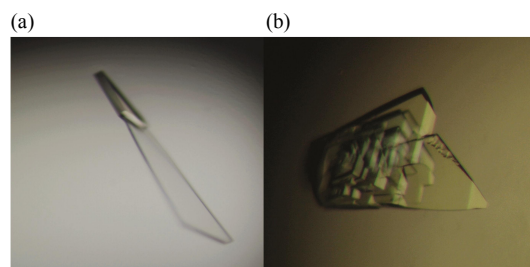


Fig. 1 Crystals of Hsp90^N-AMPPNP (a) and Hsp90^N-ATP γ S (b)

The dimensions of crystals are about 0.6 mm $\times$ 0.2 mm $\times$ 0.04 mm (a) and 0.3 mm $\times$ 0.2 mm $\times$ 0.04 mm (b), respectively.

Table 1 Statistics for data processing and model refinement of human Hsp90^N-nucleotide complexes

	Hsp90 ^N -AMPPNP	Hsp90 ^N -ATP γ S
Space group	P1	P1
Wavelength/Å	0.97946	0.97915
a, b, c (Å)	43.27, 55.97, 60.54	43.24, 55.94, 60.55
α, β, γ (°)	93.39, 95.82, 112.49	93.61, 95.60, 112.61
Total reflections	303383	287764
Unique reflections	79738	78308
Resolution/Å	41.24~1.50 (1.53~1.50)	41.27~1.50 (1.53~1.50)
$R_{\text{merge}}/\%$	6.8 (44.9)	5.3 (26.8)
$I/\sigma(I)$	15.6 (4.1)	69.5 (10.9)
Completeness/%	96.0 (94.8)	94.8 (94.0)
Redundancy	3.8 (3.9)	3.7 (3.7)
Reflections in working set	79738	78308
Reflections in test set	3239	1845
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1982/0.2166	0.2183/0.2482
Protein	3242	3328
Water	432	456
Mean temperature factor/ Å^2	21.0	18.3
Bond lengths/Å	0.007	0.006
Bond angles/(°)	1.24	1.18

*Values in parentheses are for the last shell.

Hsp90^N-AMPPNP 和 Hsp90^N-ATP γ S 的复合物晶体结构均采用分子置换法进行结构解析, 以人源 Hsp90^N (PDB 号: 1YET) 为模板, 解析结构并修正 (表 1) 后提交 PDB (Protein Data Bank) 数据库, PDB 号分别为 3T1K 和 3T2K。图 2 显示复合物晶体结

构中核苷酸的电子密度图, 其中 AMPPNP 的电子密度较为完整, 而 ATP γ S 中 γ -磷酸的电子密度有部分缺失。两个复合物晶体结构显示其主链走向相似, AMPPNP 和 ATP γ S 的位置大致相同 (图 3a)。在 Hsp90^N-AMPPNP 结构中, γ -磷酸与 G132 和

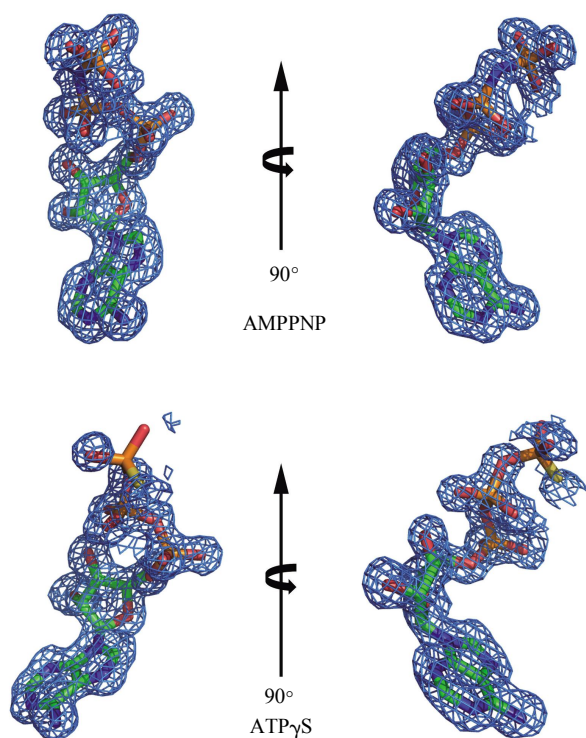


Fig. 2 Electron density maps ($2F_o - F_c$) of the two bound nucleotides

The maps were contoured at a level of 1.0σ .

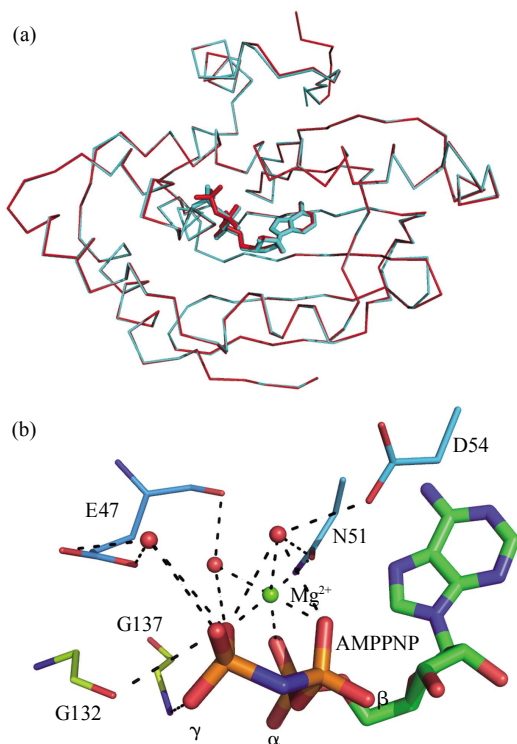


Fig. 3 Crystal structures of Hsp90^N-AMPPNP and Hsp90^N-ATP γ S complexes

(a) Ribbon superimposition of the two crystal structures of Hsp90^N-AMPPNP (cyan) and Hsp90^N-ATP γ S (red) complexes shown with different colors. (b) Interactions of γ -phosphate with magnesium ion and residues of Hsp90^N.

G137 的主链形成直接的氢键, 与 E47、N51 和 D54 通过水形成间接的氢键, 镁离子稳定了 AMPPNP 和 Hsp90^N 之间的相互作用 (图 3b), Hsp90^N-ATP γ S 复合物结构中 γ -磷酸与 Hsp90^N 之间的作用与此相似 (图 4).

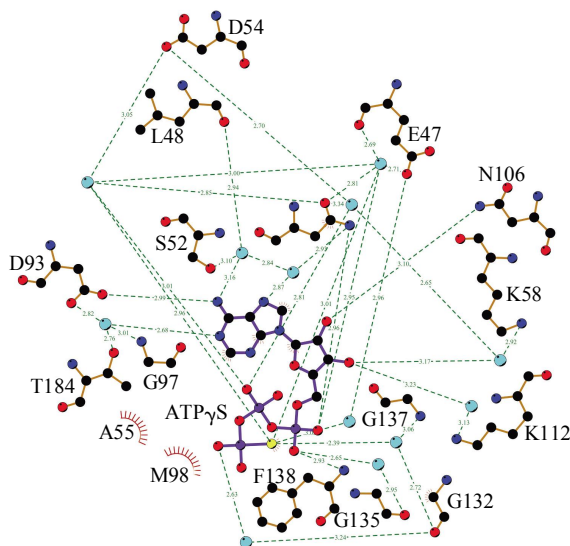


Fig. 4 Schematic diagrams of interactions between Hsp90^N and ATP γ S

HBs are shown as green dashed lines. Spiked residues form hydrophobic interactions with nucleotides. Water molecules are shown as cyan spheres. Carbon, nitrogen, and oxygen atoms of residues as well as nucleotide are shown in black, blue, and red, respectively.

2.2 Hsp90^N-ATP γ S 的结构中 γ -磷酸的捕获揭示其柔性

Obermann 等曾经报道过人源 Hsp90^N-ATP γ S 的晶体结构 (1BYQ), 但是在其解析的结构中并没有发现 γ -磷酸的电子密度, 因此他推测可能是 γ -磷酸处于无序状态或者在结晶过程中已经被水解所致^[17]. Prodromou 等报道的酵母 Hsp90^N-ATP γ S 的晶体结构也没有看到 γ -磷酸, 他认为原因是 γ -磷酸处于无序状态而不是被水解^[4], 而我们解析的人源 Hsp90^N-ATP γ S 复合物晶体结构 (3T2K) 成功捕获到了 γ -磷酸的局部电子密度. 基于人源与酵母 Hsp90 中关键氨基酸序列的高度保守性及相同的作用机制^[20, 26], 我们的结果支持了 Prodromou 的结论, 即确认了 γ -磷酸具有柔性. 我们之所以能捕获到 γ -磷酸的电子密度, 可以从以下两方面找到答案. a. Obermann 和 Prodromou 的复合物晶体中, 晶体的空间群都是 P2₁, 每个不对称单位有一个分

子, 而我们解析的晶体结构空间群是 P1, 每个不对称单位有 2 个分子, Hsp90^N-核苷酸复合物以更加紧密的方式堆积, 结构更加紧凑. b. Mg²⁺ 在核苷酸与 Hsp90 结合时起着固定作用, 所以结晶前我们在蛋白质溶液中加入 5 mmol/L 的 Mg²⁺, 并孵育 1 h. 使蛋白质、核苷酸及 Mg²⁺ 形成稳定的相互作用, 然后再加入沉淀剂使之结晶, 从而成功捕获到了 γ -磷酸的密度, 验证了 Prodromou 的结果和推测, 加深了对 Hsp90^N 水解活性的理解.

分析 2 个人源 Hsp90^N-ATP γ S 的晶体结构 -3T2K 和 1BYQ 可以看出(图 5a), 2 个结构的主链走向大致相同, 除了 γ -磷酸外, 核苷酸在 2 个结构中的

位置相互重叠(图 5b). 但是 60~75 位氨基酸主链的走向明显不同, 3T2K 结构中主链的折叠更加紧密, 而 1BYQ 结构中这 16 个氨基酸的折叠比较松散(图 5a 红圈). 从 2 个结构的飘带图也可以看出, 3T2K 在这个位置是一个 α 螺旋, 而在 1BYQ 中则形成一个 loop 区. 分析该位置的氨基酸之间以及它们与其他氨基酸的相互作用, 我们看到在 3T2K 中 R60-Y61、E62-K69、K69-N155、S72-R182 和 G73-R182 这 5 对氨基酸之间相互作用(图 5c), 把这段区域拉向氨基酸的内部, 使其结构更紧凑. 而在 1BYQ 中这几对氨基酸之间都没有相互作用, 从而使这段区域以松散的 loop 形式存在.

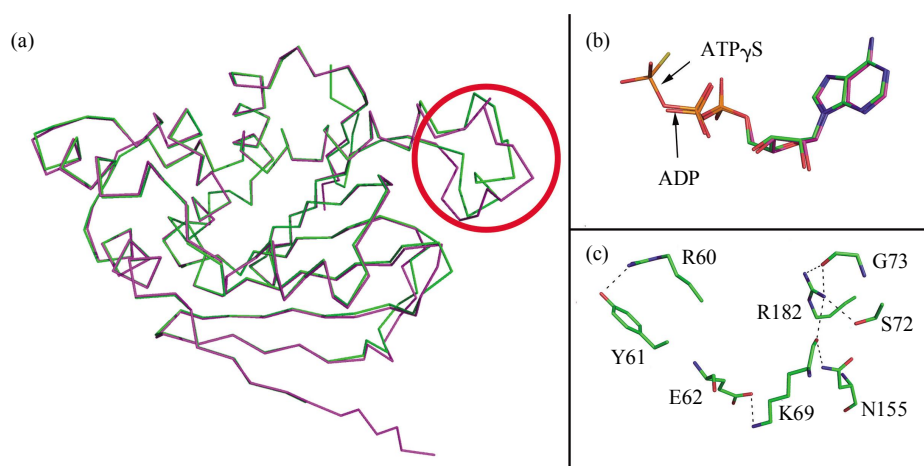


Fig. 5 Comparison of the crystal structures of 3T2K with 1BYQ

(a) Ribbon superimposition of the two crystal structures of 3T2K (green) and 1BYQ (magenta) shown with different colors. (b) The two nucleotides extracted from complexes shown in (a). (c) Interactions of R60-Y61, E62-K69, K69-N155, S72-R182 and G73-R182 in 3T2K. Carbon, nitrogen, and oxygen atoms of residues are shown in green, blue, and red, respectively.

2.3 E18-K100 和 N40-D127 相互作用阻碍了 Hsp90^N-AMPPNP 中 S1 和 ATP lid 的摆动

人源与酵母的 Hsp90 序列具有很高同源性, 而且关键氨基酸的序列高度保守, 已有研究表明两者具有相同的作用机制^[20, 26]. Ali 等^[20]报道的酵母 Hsp90-AMPPNP 结构中, 复合物结构处于水解状态, 此时 N 端形成二聚体. 比较 2CG9(酵母 Hsp90-AMPPNP)和 3T1K(人源 Hsp90^N-AMPPNP)的结构可以看出, 两个结构大部分区域叠合在一起(图 6a), 腺苷的位置也基本一致(图 6b). 与 3T1K 的结构相比, 2CG9 的结构主要有三处不同: a. S1 向外偏转大约 90°; b. H1 向外偏转大约 30°; c. ATP lid 翻转大约 180°. 分析这三处构象不同可以看出, H1 向外偏转是由 S1 摆动所致, 从构象 3T1K 转变为 2CG9 主要是 S1 和 ATP lid 的摆动,

而 S1 和 ATP lid 向外摆动促进了 N 端的二聚体化及随后的 ATP 水解中心形成, 使 2CG9 结构中 Hsp90^N 处于二聚的水解状态.

分子筛和动态光散射的结果均显示, AMPPNP 与 Hsp90^N 结合后 Hsp90^N-AMPPNP 的聚合状态没有发生改变, 依然以单体的形式存在. 图 7a 可以看出, AMPPNP 未与 Hsp90^N 结合时, 蛋白质的洗脱峰是 64.59 ml; 图 7b 显示, AMPPNP 与蛋白质结合后, 复合物洗脱峰为 64.29 ml, 洗脱峰的位置没有发生明显的变化, 即复合物依然以单体形式存在. 用动态光散射检测两种不同状态下的粒径也得到了同样的结论, 未结合 AMPPNP 时 Hsp90^N 的粒径是 3.08 nm(图 7c); AMPPNP 与 Hsp90^N 结合后, 峰形单一对称, 粒径是 3.22 nm(图 7d), 没有二聚的趋势. 由此可以看出 AMPPNP 与 Hsp90^N 结合后

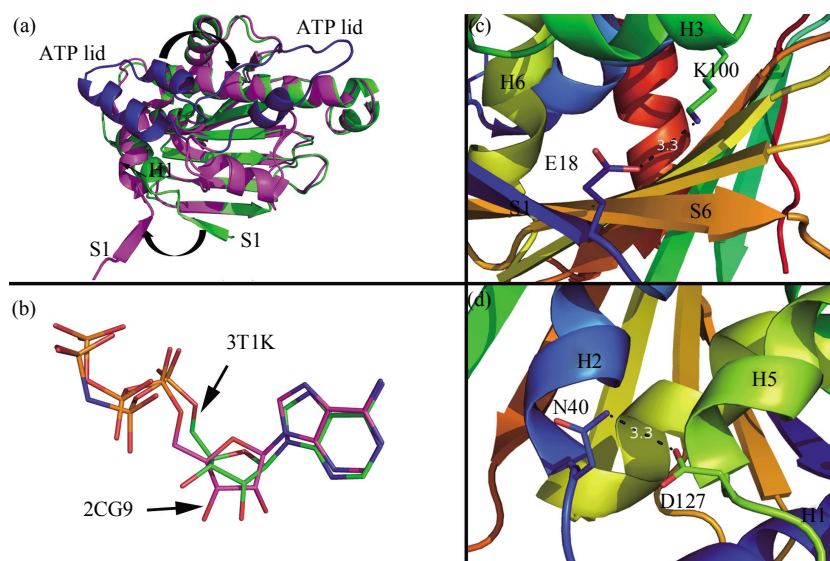


Fig. 6 Comparison of the crystal structures of 3T1K with 2CG9

(a) Superimposition of the two crystal structures of 3T1K (green) and 2CG9 (magenta) shown with different colors, the ATP lid was shown with blue. (b) The two nucleotides extracted from complexes shown in (a). (c) Residue E18 forms direct HB with K100. (d) Residue N40 forms direct HB with D127.

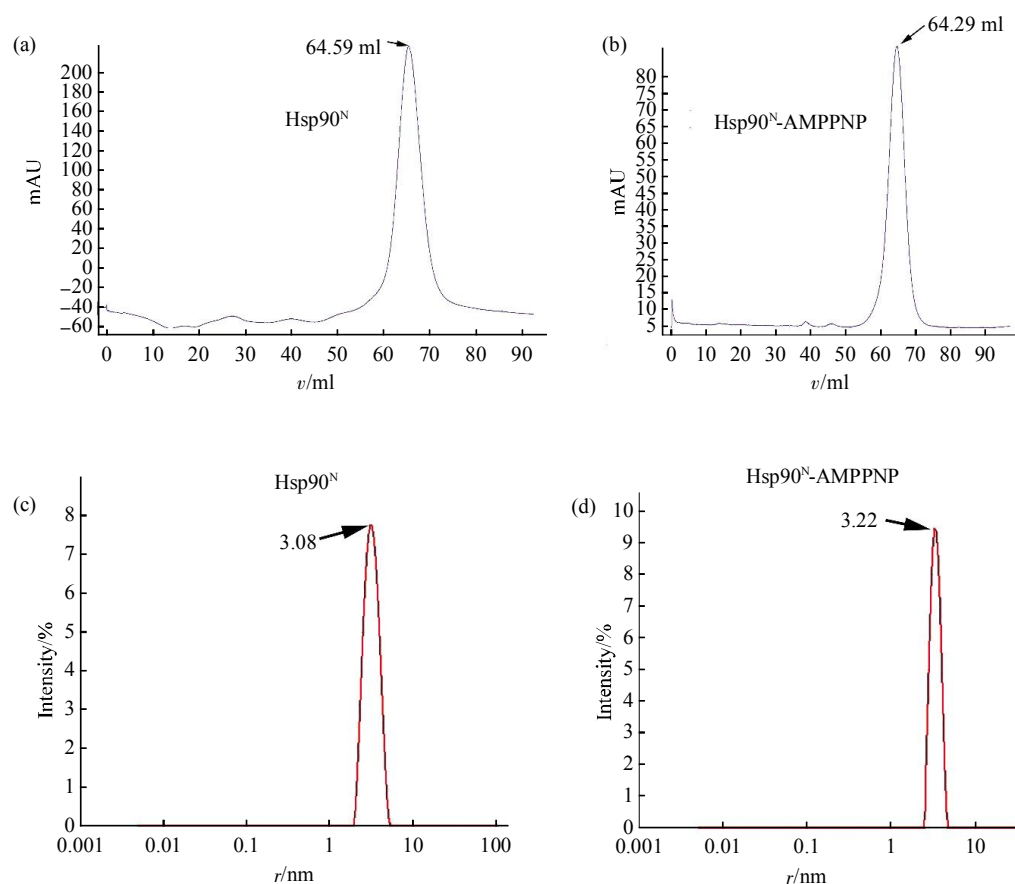


Fig. 7 Analysis of aggregate states of Hsp90^N and Hsp90^N-AMPPNP

(a) The elution peak of Hsp90^N. (b) The elution peak of Hsp90^N-AMPPNP. (c) The hydrodynamic radius of Hsp90^N. (d) The hydrodynamic radius of Hsp90^N-AMPPNP.

粒径没有发生明显变化, 复合物没有形成二聚体, 与分子筛的结果相一致。

分子筛和动态光散射的结果说明, AMPPNP 与 Hsp90^N 结合后复合物仍以单体形式存在, 并不会立刻形成二聚体。复合物形成二聚体需要 S1 和 ATP lid 的摆动, 结构分析表明, 3T1K 结构中两对氨基酸之间形成的氢键相互作用很可能对 S1 和 ATP lid 的自由摆动形成了一定的阻碍作用。图 6c 显示, S1 中的 E18 与 H3 中的 K100 形成氢键相互作用, 图 6d 显示 ATP lid 中的 N40 与 H2 中的 D127 形成氢键相互作用。E18-K100 和 N40-D127 这两对氨基酸形成的氢键相互作用很可能在一定程度上影响了形成二聚体所需要的 S1 和 ATP lid 的摆动, 从而阻碍了 N 端二聚体的形成。Hsp90 的主要功能是帮助底物正确折叠, 其功能的实现依赖于 ATP 与 Hsp90^N 的结合及其引发的构象变化。E18-K100 和 N40-D127 这两对氨基酸形成的氢键作用可能对 N 端的二聚体化产生一定的影响, 从而在 Hsp90 功能执行过程中起到一定的调控作用。

参 考 文 献

- [1] Welch W J, Feramisco J R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem*, 1982, **257**(24): 14949-14959
- [2] Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59**(10): 1640-1648
- [3] McClellan A J, Xia Y, Deutschbauer A M, *et al.* Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*, 2007, **131**(1): 121-135
- [4] Sreedhar A S, Kalmar E, Csermely P, *et al.* Hsp90 isoforms: Function, expression and clinical importance. *FEBS Lett*, 2004, **562**(1): 11-15
- [5] Pearl L H, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: An open and shut case for treatment. *Biochem J*, 2008, **410**(3): 439-453
- [6] Prodromou C, Roe S M, O'Brien R, *et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997, **90**(1): 65-75
- [7] Stebbins C E, Russo A A, Schneider C, *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 1997, **89**(2): 239-250
- [8] Roe S M, Prodromou C, O'Brien R, *et al.* Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 1999, **42**(2): 260-266
- [9] Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, *et al.* Nucleotides and two functional states of hsp90. *J Biol Chem*, 1997, **272**(12): 8007-8012
- [10] Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, *et al.* ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J Biol Chem*, 1993, **268**(3): 1901-1907
- [11] Shiau A K, Harris S F, Southworth D R, *et al.* Structural Analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell*, 2006, **127**(2): 329-340
- [12] Meyer P, Prodromou C, Hu B, *et al.* 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): 647-658
- [13] Byrd C A, Bornmann W, Erdjument-Bromage H, *et al.* Heat shock protein 90 mediates macrophage activation by Taxol and bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(10): 5645-5650
- [14] Vega V L, De Maio A. Geldanamycin treatment ameliorates the response to LPS in murine macrophages by decreasing CD14 surface expression. *Mol Biol Cell*, 2003, **14**(2): 764-773
- [15] Yun T J, Harning E K, Giza K, *et al.* EC144, a Synthetic Inhibitor of Heat Shock Protein 90, blocks innate and adaptive immune responses in models of inflammation and autoimmunity. *J Immunol*, 2011, **186**(1): 563-575
- [16] Goetz M P, Toft D O, Ames M M, *et al.* The Hsp90 chaperone complexes as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol*, 2003, **14**(8): 1169-1176
- [17] Supko J G, Hickman R L, Grever M R, *et al.* Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995, **36**(4): 305-315
- [18] Sydor J R, Normant E, Pien C S, *et al.* Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(46): 17408-17413
- [19] Obermann W M, Sondermann H, Russo A A, *et al.* *In vivo* function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol*, 1998, **143**(4): 901-910
- [20] Ali M M, Roe S M, Vaughan C K, *et al.* Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 2006, **440**(7087): 1013-1017
- [21] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, **276**: 307-326
- [22] Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(2): 213-221
- [23] Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60** (12): 2126-2132
- [24] Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng*, 1996, **8**(2): 127-134
- [25] Matthews B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, **33**(2): 491-497
- [26] McLaughlin S H, Ventouras L A, Lobbezoo B, *et al.* Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform. *J Mol Biol*, 2004, **344**(3): 813-826

Crystal Structures of N-terminal Domain of Human Hsp90 With ATP Analogues Reveal The Functional Regulation of Hsp90*

LI Jian, SUN Li-Hua, XU Chun-Yan, YU Feng, ZHOU Huan, TANG Lin, HE Jian-Hua**

(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201204, China)

Abstract Heat shock protein 90 (Hsp90) is essential for folding, maturation and stabilization of many important proteins, which are involved in cell cycle regulation, signal transduction, and cell growth regulation. The highly conserved N-terminal domain contains an ATP binding cleft and thus is responsible for the catalytic activity of Hsp90. In order to further study the function and structure of Hsp90, the N-terminal of the human Hsp90 was cocrystallized with AMPPNP and ATP γ S. The cocrystallization experiments were carried out at 277K using the hanging drop vapor-diffusion method, X-ray diffraction data were collected on beamline 17U at the SSRF and the structures were solved by molecular replacement. The densities of the two nucleotides were captured and the interactions between Hsp90^N and nucleotides were clearly described. We confirmed that the γ -phosphate of ATP γ S was not hydrolyzed by Hsp90^N. The position of S1 and ATP lid in human Hsp90^N-AMPPNP differs significantly from that of the structure of yeast Hsp90-AMPPNP. By analyzing the structure of human Hsp90^N-AMPPNP, we found that the interactions of E18-K100 and N40-D127 block the moving of S1 and ATP lid, and then prevent the dimerization of Hsp90^N. This reflects the complexity and coordination of Hsp90 on the regulation of the function.

Key words Hsp90, crystal structure, AMPPNP, ATP γ S, γ -phosphate, interactions, regulation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00611

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2011CB911102) and Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences (O95501C061).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-33933186, E-mail: hejh@sinap.ac.cn

Received: December 25, 2011 Accepted: February 27, 2012