

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion des
Proteins ClpB aus *Thermus thermophilus***

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften**

des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

**angefertigt am
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
in Dortmund**

vorgelegt von

**Philipp Beinker
aus Münster/Westfalen**

Dortmund 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2000 bis Juli 2003 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Jochen Reinstein in der Abteilung Physikalische Biochemie von Herrn Prof. Dr. Roger Goody durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger Goody

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Dortmund, Juli 2003

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titel veröffentlicht:

The N-Terminus of ClpB from *Thermus thermophilus* is Not Essential for the Chaperone Activity. Philipp Beinker, Sandra Schlee, Yvonne Groemping, Ralf Seidel and Jochen Reinstein (2002). Journal of Biological Chemistry **277**, 47160-47168.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Poster bei wissenschaftlichen Tagungen präsentiert:

Studies on the Function of the Carboxy- and Amino-terminal Domains of ClpB from *Thermus thermophilus*. Philipp Beinker, Sandra Schlee, Ralf Seidel, Ilme Schlichting and Jochen Reinstein (2001). Begutachtung des SFB 394, Strukturelemente und molekulare Mechanismen von Proteinen bei Energieübertragung und Signalvermittlung, 9. Oktober 2001, Bochum.

The N-terminus of ClpB from *Thermus thermophilus* is not essential for the Chaperone Activity. Philipp Beinker, Sandra Schlee, Ralf Seidel, and Jochen Reinstein (2002). NATO/FEBS Advanced Study Institute, Summer School, Chemical Probes in Biology, 18. - 30. August 2002, Spetses, Griechenland.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Proteinbiosynthese | 1 |
| 1.2 Proteinfaltung | 1 |
| 1.3 Chaperone und Hitzeschockproteine | 2 |
| 1.3.1 Hsp60 | 4 |
| 1.3.2 Hsp70 | 6 |
| 1.3.3 Hsp100/Clp-Proteine | 9 |
| 1.4 Proteinaggregation | 13 |
| 1.4.1 Proteinaggregation in der Zelle | 13 |
| 1.4.2 Proteinaggregate und humanpathogene Erkrankungen | 14 |
| 1.4.3 Chaperone und Proteinaggregate | 15 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 16 |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Chemikalien | 19 |
| 2.2 Plasmide, Oligonukleotide und Mikroorganismen | 20 |
| 2.2.1 Plasmide und Oligonukleotide | 20 |
| 2.2.2 Mikroorganismen | 20 |
| 2.3 Molekularbiologische Methoden | 22 |
| 2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren | 22 |
| 2.3.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> | 22 |
| 2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA | 22 |
| 2.3.4 Restriktion von DNA | 22 |
| 2.3.5 Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen | 23 |
| 2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 23 |
| 2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten | 23 |
| 2.3.8 PCR für die ClpB-Mutagenese | 23 |
| 2.3.9 Colony-PCR | 24 |
| 2.3.10 DNA-Sequenzierungsprotokoll | 25 |
| 2.3.11 Herstellung elektrokompeter Zellen | 25 |
| 2.3.12 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen | 26 |
| 2.4 Proteinchemische Methoden | 27 |
| 2.4.1 Proteinexpression | 27 |
| 2.4.2 Proteinreinigung | 28 |
| 2.4.2.1 Proteine ohne His-Tag | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.2.2 Proteine mit His-Tag | 29 |
| 2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 30 |
| 2.4.4 TCA-Fällung | 30 |
| 2.4.5 Bestimmung des Nukleotidgehalts von Lösungen | 30 |
| 2.4.6 Analytische Gelfiltrationen | 31 |
| 2.4.6.1 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von ClpB, ClpB Δ N, ClpB1-845, ClpB1-828 und ClpB Δ C | 31 |
| 2.4.6.2 Bestimmung des Oligomerisierungspotentials der AAA-Kassetten | 32 |
| 2.4.6.3 Untersuchung der Komplexe aus ClpB Δ N mit ClpBN und ClpB Δ L mit ClpB | 34 |
| 2.4.7 Single turnover ATPase-Messungen | 34 |
| 2.4.8 Kopelletierung von LDH mit ClpB | 34 |
| 2.5 Spektroskopische Methoden | 36 |
| 2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleotiden | 36 |
| 2.5.2 Bestimmung der Steady State ATPase-Aktivität | 36 |
| 2.5.3 Zircularer Dichroismus | 37 |
| 2.5.4 Fluoreszenzspektroskopie | 38 |
| 2.5.4.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Gleichgewichtstitration | 38 |
| 2.5.4.2 Bindung von FITC-Casein | 39 |
| 2.5.5 Lichtstreuungsmessungen | 39 |
| 2.6 Rückfaltungsassays | 40 |
| 2.6.1 α-Glucosidase | 40 |
| 2.6.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase | 40 |
| 2.6.3 Lactatdehydrogenase | 41 |
| 2.6.4 Luciferase | 42 |
| 2.7 Geräte | 43 |
| 3. Ergebnisse | 44 |
| 3.1 Etablierung neuer Substratproteine für das DnaK-ClpB- System aus <i>Thermus thermophilus</i> | 44 |
| 3.1.1 α-Glucosidase | 44 |
| 3.1.1.1 Stabilität der α -Glucosidase | 45 |
| 3.1.1.2 Rückfaltung von α -Glucosidase | 46 |
| 3.1.1.3 Optimierung des α -Glucosidaseassays | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (GPDH) | 50 |
| 3.1.2.1 Stabilität der GPDH | 50 |
| 3.1.2.2 Rückfaltung der GPDH | 51 |
| 3.1.2.3 Optimierung des GPDH-Assays | 52 |
| 3.1.3 Luciferase | 55 |
| 3.1.3.1 Luciferaserückfaltung | 55 |
| 3.1.4 Lactatdehydrogenase (LDH) | 57 |
| 3.1.4.1 Stabilität der LDH | 57 |
| 3.1.4.2 Rückfaltung der LDH | 58 |
| 3.1.4.3 Interaktionen von ClpB mit denaturierter LDH | 59 |
| 3.2 ATP-Verbrauch der Rückfaltung durch das DnaK-ClpB-System | 61 |
| 3.2.1 ATP-Verbrauch und Rückfaltung von α -Glucosidase | 61 |
| 3.2.2 ATP-Verbrauch und Rückfaltung von GPDH | 65 |
| 3.3 Funktion der N-terminalen Domäne von ClpB | 69 |
| 3.3.1 Stabilität der verwendeten Proteine | 69 |
| 3.3.2 Oligomerisierungsverhalten von ClpB und ClpB Δ N | 69 |
| 3.3.3 Nukleotidbindung von ClpB und ClpB Δ N | 72 |
| 3.3.4 ATPase-Aktivität von ClpB und ClpB Δ N | 72 |
| 3.3.5 Chaperonaktivität von ClpB und ClpB Δ N | 76 |
| 3.4 Funktion des C-Terminus von ClpB | 79 |
| 3.4.1 Stabilität der verwendeten Proteine | 79 |
| 3.4.2 Oligomerisierungsverhalten der C-terminal verkürzten Fragmente | 80 |
| 3.4.3 Nukleotidbindung der C-terminal verkürzten Fragmente | 81 |
| 3.4.4 ATPase-Aktivität der C-terminal verkürzten Fragmente | 82 |
| 3.4.5 Chaperonaktivität der C-terminal verkürzten Fragmente | 83 |
| 3.5 Struktur und Interaktion der AAA-Kassetten von ClpB | 87 |
| 3.5.1 Stabilität der verwendeten Proteine | 88 |
| 3.5.2 Charakterisierung der Linkerdomäne | 89 |
| 3.5.2.1 Effekt der Linkerdomäne auf die Oligomerisierung von ClpB | 89 |
| 3.5.2.2 ATPase-Aktivität und Chaperonaktivität von ClpB Δ L | 90 |

| | |
|--|------------|
| 3.5.3 Position der Linkerdomäne und Charakterisierung der AAA-Kassetten | 92 |
| 3.5.3.1 Oligomerisierung der ClpB-Fragmente | 92 |
| 3.5.3.2 ATPase-Aktivität der ClpB-Fragmente | 94 |
| 3.5.4 Interaktionen der AAA-Kassetten von ClpB | 96 |
| 3.5.4.1 Komplexbildung der AAA-Kassetten | 96 |
| 3.5.4.2 ATPase-Aktivität des Komplexes | 97 |
| 3.5.4.3 Chaperonaktivität des Komplexes | 99 |
| 4. Diskussion | 103 |
| 4.1 Optimierung der Chaperonkonzentrationen | 103 |
| 4.2 Substraterkennung und Rückfaltungsausbeuten des Chaperonsystems | 105 |
| 4.3 Funktion des C-Terminus von ClpB | 108 |
| 4.4. Effizienz des DnaK-ClpB-Systems | 110 |
| 4.5 Funktion des N-Terminus von ClpB | 112 |
| 4.6 Position und Funktion der Linkerdomäne | 115 |
| 4.7 Funktionen und Interaktionen der AAA-Kassetten | 117 |
| 4.7.1 Funktionen der AAA-Kassetten | 117 |
| 4.7.2 Interaktionen der AAA-Kassetten | 118 |
| 4.8 Ausblick | 121 |
| 5. Zusammenfassung | 123 |
| 6. Abkürzungen | 125 |
| 7. Literaturverzeichnis | 127 |
| 8. Anhang | 138 |
| 8.1 Auswertung von Gleichgewichtstitrationen | 138 |
| 8.1.1 Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenztitrationen | 138 |
| 8.1.2 Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Verdrängungstitrationen | 140 |
| 8.2 Sequenzvergleich | 141 |
| 8.3 Sekundärstrukturvorhersage | 142 |
| 8.4 Lebenslauf | 145 |

1. Einleitung

1.1 Proteinbiosynthese

In allen Organismen wird die genetische Information in der DNA gespeichert und in die Aminosäuresequenzen von Proteinen übersetzt. Der Informationsfluss wird durch die Prozesse Transkription und Translation vermittelt. Die DNA dient als Matrize für die Transkription eines komplementären RNA Moleküls (mRNA), welches durch das Ribosom und Adaptormoleküle (tRNAs) in die Aminosäuresequenz des Proteins translatiert wird. Die Biosynthese von Proteinen ist ein energetisch aufwendiger Prozess. Bei der Transkription werden aufgrund der Tripletstruktur des genetischen Codes sechs energiereiche Phosphatbindungen pro Codon hydrolysiert, und für die Aktivierung und Kopplung jeder Aminosäure an tRNA Moleküle werden zwei weitere energiereiche Phosphatbindungen benötigt. Bei der anschließenden Verknüpfung der Aminosäuren durch das Ribosom werden von den Elongationsfaktoren G und Tu erneut zwei weitere energiereiche Phosphatbindungen in Form von GTP Molekülen verbraucht. Für die Qualitätskontrolle und um mögliche Fehler bei der Biosynthese zu verhindern, wird zusätzliche Energie benötigt. Bei einem typischen Protein werden somit mindestens 10 ATP Moleküle für jeden Aminosäurerest verbraucht. Die Proteinbiosynthese ist deshalb für die Zelle ein energetisch sehr aufwendiger Prozess und es gibt in allen Zellen Mechanismen, die die korrekte Synthese und Faltung der Proteine kontrollieren und optimieren.

1.2 Proteinfaltung

Das grundlegende Prinzip der Proteinfaltung besagt, dass die gesamte Information für die Tertiärstruktur eines Proteins in seiner Aminosäuresequenz enthalten ist. Für kleinere Proteine konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie nach einer Denaturierung spontan die korrekte Struktur einnehmen können und dafür nicht auf die Unterstützung durch andere Proteine angewiesen sind (Anfinsen et al., 1961; Anfinsen, 1973). Komplexere Proteine, die aus mehreren Domänen bestehen und ein hohes Molekulargewicht besitzen, können sich *in vitro* jedoch nur eingeschränkt zurückfalten und neigen zu irreversibler Inaktivierung. Die Zeitdauer für eine erfolgreiche Rückfaltung dieser Proteine ist groß und die biochemischen Bedingungen für die optimale Rückfaltung unterscheiden sich von den zellulären Bedingungen. Zudem variieren sie stark von Protein zu Protein (Jaenicke, 1987; Herbst et al., 1997; Herbst et al., 1998).

Die intrazelluläre Proteinfaltung unterscheidet sich daher fundamental von den *in vitro* Bedingungen (Ellis und Hartl, 1999). In der Zelle herrschen für alle Proteine dieselben physikalisch-chemischen Bedingungen und im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten, die

von einem entfalteten, vollständigen Protein ausgehen, erfolgt die Proteinbiosynthese am Ribosom linear vom N-Terminus zum C-Terminus. Die Faltungsgeschwindigkeit von Proteinen in Prokaryonten ist in der Regel höher als die Syntheserate am Ribosom, die bis zu 15 Aminosäuren pro Sekunde betragen kann (Netzer und Hartl, 1998). Daher beginnt die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen unmittelbar nachdem der N-Terminus synthetisiert wurde d.h. Synthese und Faltung sind gekoppelt. Dies führt zu der Situation, dass die ersten N-terminalen Aminosäuren bereits Sekundärstrukturen ausbilden, obwohl die C-terminalen Aminosäuren noch nicht synthetisiert wurden (Frydman und Hartl, 1996). In vielen Proteinen ist die Faltung jedoch ein kooperativer Prozess, der die Sequenzinformation einer vollständigen Domäne für die korrekte Strukturfindung benötigt. Zusätzlich kann es durch das lineare Syntheseprinzip zu nicht produktiven Wechselwirkungen kommen, die die korrekte Faltung erschweren. Hydrophobe Bereiche, die sich ansonsten im Innern des Proteins befinden können in frühen Stadien der Proteinfaltung noch exponiert sein, miteinander interagieren und zur Aggregation führen. Die hohe Proteinkonzentration innerhalb der Zelle (> 300 mg/ml) begünstigt zusätzlich eine mögliche Aggregation von Proteinen, da die Aggregation im Gegensatz zur Proteinfaltung konzentrationsabhängig ist (Zimmerman und Trach, 1991; van den Berg et al., 1999). Es ist daher nicht überraschend, dass es in jeder Zelle eine Proteinmaschinerie gibt, die die korrekte Faltung und Entstehung funktioneller Proteinkomplexe unterstützt. So ist die Proteinbiosynthese ein sehr effizienter Prozess, mehr als 95 % der Polypeptidketten eines Proteins erreichen ihre native Konformation (Copeland et al., 1986).

1.3 Chaperone und Hitzeschockproteine

Als „molekulare Chaperone“ bezeichnet man eine Gruppe von Proteinen, die an der korrekten Faltung anderer Proteine beteiligt sind. Chaperone gehören zu den am stärksten konservierten Proteinen und wurden in allen bisher untersuchten Organismen gefunden. Der hohe Grad der Konservierung und die universelle Verbreitung deuten auf die essentielle Bedeutung der Chaperone für die Zelle hin. Viele Chaperone werden unter Hitzeschockbedingungen verstärkt exprimiert, was zu ihrer Identifizierung und zu ihrer Bezeichnung als Hitzeschockproteine (Hsp) führte (Pelham, 1986). Zur weiteren Klassifizierung wurden sie anhand ihres apparenten Molekulargewichts (kDa) in Klassen eingeteilt z.B. Hsp60, Hsp70. Da Chaperone jedoch auch konstitutiv exprimiert werden und für normales Wachstum und einen normalen Stoffwechsel in der Zelle wichtig sind, ist diese Bezeichnung missverständlich (Georgopoulos und Welch, 1993). Konstitutiv exprimierte Chaperone werden auch als heat shock cognates (hsc) bezeichnet. Chaperone werden von den Faltungskatalysatoren abgegrenzt. Diese Proteine, wie z.B. Peptidyl-Prolylisomerasen und Proteindisulfidomerasen beschleunigen einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt

während der Proteinfaltung, Chaperone hingegen erhöhen die Ausbeute der Faltung (Freedman et al., 1995; Schmid, 2001).

Trotz der großen Unterschiede zwischen den einzelnen Chaperonen hinsichtlich ihrer Größe und zellulären Lokalisation scheinen sie einen generellen, gemeinsamen Funktionsmechanismus zu besitzen. Soweit bekannt ist, binden sie nicht kovalent an hydrophobe Bereiche, die normalerweise das hydrophobe Innere des Proteins bilden. Dieser hydrophobe Kern des Proteins ist zudem für die korrekte Faltung wichtig, und deshalb kommen hydrophobe Bereiche in der nativen Proteinstruktur nicht auf der Oberfläche vor. Chaperone erkennen somit falsch gefaltete Proteine. Aufgrund dieses grundsätzlich ähnlichen Mechanismus ist die Funktion vieler Chaperone redundant und Substrate können mit mehreren Chaperonen interagieren, z.B. während unterschiedlicher Stadien der Proteinfaltung (Ellis, 1999; Deuerling et al., 1999; Deuerling et al., 2003). Die hydrophoben Bereiche, die von Chaperonen erkannt werden, können durch die lineare Verknüpfung von aromatischen Aminosäuren oder durch die Anlagerung von nicht benachbarten Aminosäuren entstehen. Durch die reversible Bindung an diese Bereiche verhindern Chaperone die Ausbildung unproduktiver, hydrophober Wechselwirkungen, die zu intra- und intermolekularer Aggregation führen können. Das teilweise entfaltete Substrat wird stabilisiert und die Konzentration an möglichen aggregationsfähigen Molekülen reduziert. Da Aggregation als Prozess, der mehrere Moleküle beinhaltet, konzentrationsabhängig ist, wird dieser Prozess effektiv durch Chaperone inhibiert. Um die korrekte Faltung der Substrate zu gewährleisten, müssen die Substrate bei permissiven Bedingungen wieder freigesetzt werden. Deshalb besitzen zahlreiche Chaperone Regulationsmechanismen, die die Bindung und das Freisetzen der Substrate steuern (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Walter und Buchner, 2002). Oft werden diese Bindungs- und Freisetzungsreaktionen von der ATP-Hydrolyse angetrieben und Chaperone können konformationelle Veränderungen am Substrat einleiten (Hartl und Martin, 1995). Gegebenenfalls können diese Zyklen so lange wiederholt werden, bis keine hydrophoben Bereiche mehr exponiert werden.

Die Interaktion von Substraten mit Chaperonen ist nicht nur für das Erreichen ihrer nativen Konformation von Bedeutung. Vielmehr sind Chaperon-Substrat-Komplexe an einer Reihe von weiteren zellulären Prozessen beteiligt. Hsp70-Chaperone binden unter anderem an Proteine, die durch Membranen in Zellkompartimente transportiert werden sollen, und halten sie in einem translokationskompetenten Status, der die Voraussetzung für eine erfolgreiche Translokation ist (Ryan und Pfanner, 2001). Chaperone sind zudem an Signaltransduktionsprozessen in der Zelle beteiligt (Kelley und Georgopoulos, 1997; Buchner, 1999).

1.3.1 Hsp60

Die Hsp60-Chaperone sind eine der am besten untersuchten Gruppe von Chaperonen. Sie werden auch Chaperonine genannt und diese Chaperongruppe umfasst das in Bakterien und Organellen der Eukaryonten vorkommende GroEL, das TriC des eukaryontischen Zytosols und das Thermosom der Archaea (Goloubinoff et al., 1989; Frydman et al., 1992; Cowan und Lewis, 2001).

Ein intensiv charakterisiertes Hsp60 ist das GroEL Protein aus *E. coli* (Lorimer, 2001). Wie EM Aufnahmen und Kristallstrukturen zeigen, bildet es eine zylinderförmige Quartärstruktur aus (Chen et al., 1994; Braig et al., 1994; Xu et al., 1997). Die Struktur von GroEL aus *E. coli* ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

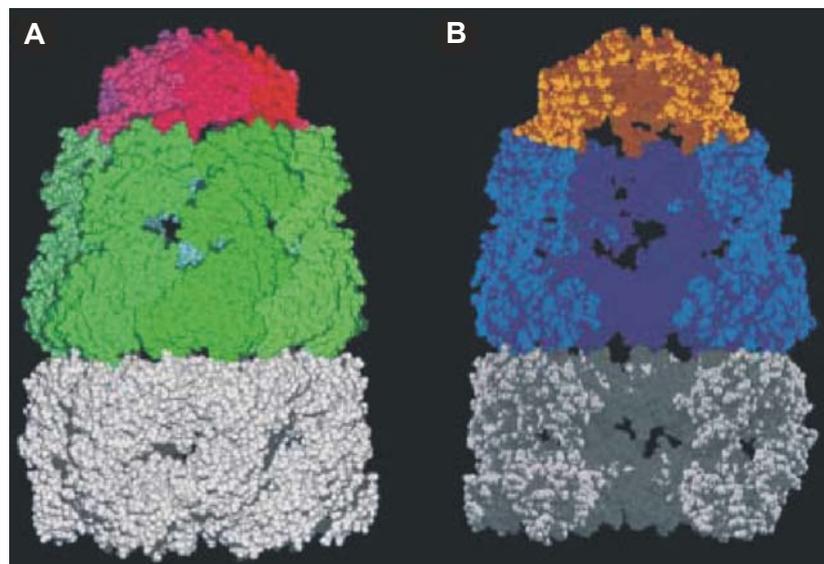


Abb. 1.1 Struktur von GroEL aus *E. coli*

A Seitenansicht des asymmetrischen Komplexes aus GroEL mit GroES

Gezeigt ist ein GroEL-Doppelring, der mit einem GroES-Ring einen Komplex bildet. Der distale GroEL-Ring ist grau dargestellt, der proximale GroEL-Ring (grün) bindet an GroES (rot)

B Querschnitt durch GroEL

Jeder GroEL-Ring umschließt eine Kammer, in der die Substrate gefaltet werden. GroES (orange) verschließt diese Kammer und induziert eine Strukturänderung von GroEL, die zu einer vergrößerten Kammer im proximalen GroEL-Ring (blau) führt. In der Kristallstruktur sind einige Aminosäurereste nicht aufgelöst worden, so dass der falsche Eindruck entsteht, dass die Kammern verbunden wären. Die Abbildung wurde entnommen aus (Walter und Buchner, 2002).

14 GroEL Moleküle bilden zwei Ringe die jeweils aus 7 GroEL Untereinheiten bestehen. Jeder der Ringe umschließt eine Öffnung, die nicht miteinander verbunden sind und einen Durchmesser von 45 Å haben. Jedes GroEL Monomer besitzt eine ATP Bindungsstelle, die sich im Innern des Zylinders befinden. Die Bindung von ATP innerhalb eines Rings ist kooperativ, reduziert jedoch die Affinität des zweiten Rings für Nukleotide (Yifrach und Horovitz, 1994; Horovitz et al., 2001).

GroEL interagiert mit dem 10 kDa großen Kochaperon GroES. GroES bildet einen Ring aus 7 Untereinheiten, der an die offenen Seiten der Kammern des GroEL Zylinders binden kann

und somit den Innenraum des Zylinders verschließt. GroES interagiert nur mit der nukleotidgebundenen Form von GroEL. Die Größe der Kammer beschränkt die Größe von entfalteten Proteinsubstraten auf ca. 55 kDa (Ewalt et al., 1997). Die Substratbindestellen von GroEL wurden durch Mutationsanalysen und anhand der bekannten GroEL-Strukturen bestimmt (Fenton et al., 1994; Xu et al., 1997; Saibil et al., 2001). GroEL erkennt entfaltete Substrate an hydrophoben Oberflächenbereichen (Lin et al., 1995). Die hydrophoben Aminosäuren der Substrate werden von relativ flexiblen Bereichen am Rande des Hohlraums gebunden. Diese strukturelle Flexibilität ermöglicht es GroEL mit vielen Substraten zu interagieren. Eine starke Spezialisierung auf ein Substrat führt zum Funktionsverlust für andere Substrate (Wang et al., 2002).

Die Bindung von GroES an GroEL führt nicht nur zum Verschließen der Faltungskammer, sondern löst auch eine große Konformationsänderung aus. Die hydrophoben Bereiche, die für die Substratbindung verantwortlich sind, werden durch polare Aminosäuren ersetzt und es kommt zusätzlich zu einer Vergrößerung des Kammervolumens (Roseman et al., 1996). Diese Umlagerung ermöglicht eine Rückfaltung des Substrats im Innern des GroEL/GroES Komplexes. Dieser von der Umgebung abgeschirmte Bereich, in dem das Protein seine native Struktur einnehmen kann, wird auch als „Anfinsen Käfig“ bezeichnet (Ellis, 2001).

Zusammen mit zahlreichen biochemischen Untersuchungen erlauben die Kristallstrukturen einen Funktionszyklus des Chaperonins zu beschreiben, der in Abbildung 1.2 gezeigt ist.

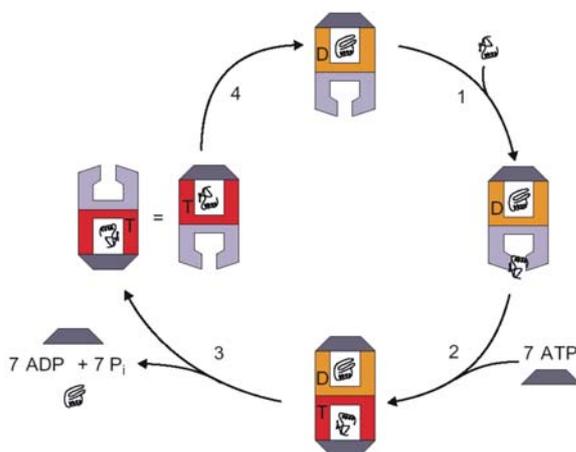


Abb. 1.2 Funktioneller Zyklus von GroEL

Der Mechanismus wird durch einem Zyklus aus vier Schritten beschrieben. Im 1. Schritt bindet ein Substrat an den nukleotidfreien cis-Ring (violett). Im trans-Ring (gelb) befinden sich zu diesem Zeitpunkt ADP, gefaltetes Substrat und GroES. Dann binden ATP und GroES an den cis-Ring (2) Durch die Bindung von ATP und GroES werden das gefaltete Substrat und GroES vom trans-Ring freigesetzt (3). Nach ATP-Hydrolyse und induzierter Substratfaltung (4) im cis-Ring kann ein neuer Zyklus beginnen. Die wurde Abbildung entnommen aus (Walter und Buchner, 2002).

Obwohl GroEL aus zwei Ringen besteht, wird der Funktionszyklus am einfachsten für einen einzelnen Ring beschrieben. Die Rückfaltung eines Substrates benötigt zwei Umläufe des Funktionszyklus, währenddessen es mit dem GroEL-GroES Komplex assoziiert bleibt.

Faltungsintermediate binden an die hydrophoben Bereiche des nukleotidfreien, aus GroEL bestehenden cis-Rings. Im trans-Ring, der durch GroES verschlossen ist, befinden sich zu diesem Zeitpunkt ADP und Substrat. An den cis-Ring binden nach Substratbindung ATP und GroES. Durch Bindung von GroES an einen GroEL-Ring wird die Faltungskammer

geschlossen und zudem eine umfassende Konformationsänderung von GroEL ausgelöst, welche eine Faltung des Substrats ermöglicht (Crouy-Chanel et al., 1995). Die Bindung von ATP an den cis-Ring bewirkt zusätzlich eine Reduktion der Affinität von GroEL für GroES und ADP im trans-Ring. Dies führt zur Dissoziation von Nukleotid und des Substrats, das bereits einen Zyklus durchlaufen hat. Als Zeitgeber bei den Faltungsreaktionen mit GroEL dient die ATP-Hydrolyse des Chaperons (Rye et al., 1997). Ist sie im cis-Ring abgeschlossen, kann das Substrat durch Bindung von GroES und ATP an den trans-Ring in einem neuen Zyklus freigesetzt werden.

Dieser Zyklus kann gegebenenfalls mehrfach von Substraten durchlaufen werden, bis keine hydrophoben Bereiche mehr für eine Bindung vorliegen. Studien in *E. coli* zeigen, dass ca. 10-20 % aller neu synthetisierten Proteine mit Hilfe von GroEL gefaltet werden (Houry et al., 1999; Bukau et al., 2000).

1.3.2 Hsp70

Hsp70-Chaperone wurden in nahezu allen Organismen und Zellkompartimenten gefunden. Im Gegensatz zu den ringförmigen, oligomeren Chaperoninen, wirken Hsp70-Chaperone meist als Monomere. Hsp70-Chaperone besitzen ATPase-Aktivität und binden nukleotidabhängig kurze hydrophobe Abschnitte innerhalb einer Polypeptidkette (McCarty et al., 1995; Buchberger et al., 1995). Wie bei der Gruppe der Chaperonine ist der *E. coli* Vertreter DnaK am besten untersucht, der in seiner Funktion von den Kochaperonen DnaJ und GrpE unterstützt wird.

DnaK besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen ATPase-Domäne (44 kDa) und einer C-terminalen peptidbindenden Domäne (24 kDa). Die Kristallstrukturen der ATPase-Domäne und der peptidbindenden Domäne wurden bestimmt und sind in Abbildung 1.3 dargestellt (Flaherty et al., 1990; Zhu et al., 1996; Harrison et al., 1997).

Die Struktur der ATPase-Domäne ähnelt den Strukturen der Hexokinase und des Aktins. Die ATPase-Domäne besteht aus zwei Subdomänen. Das ATP Molekül wird in einer Vertiefung zwischen den Subdomänen gebunden. Die peptidbindende Domäne wird von einer β -Faltblattstruktur und einer C-terminalen α -helikalen Subdomäne gebildet. Die β -Faltblätter bilden die Peptidbindungsstelle, die von den α -helikalen Bereichen umschlossen wird. Substrate werden in gestreckter Konformation gebunden und bestehen aus hydrophoben Aminosäuren, bevorzugt Leucin und Isoleucin, die von polaren Aminosäuren flankiert werden können. Für die Bindung sind Interaktionen mit hydrophoben Aminosäuren und Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat des Peptids wichtig (Landry et al., 1992). Dieses Bindungsmotiv kommt statistisch alle 40 Aminosäuren in Proteinen vor und ist normalerweise nicht oberflächenexponiert, so dass DnaK nur entfaltete Proteine als Substrate bindet (Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

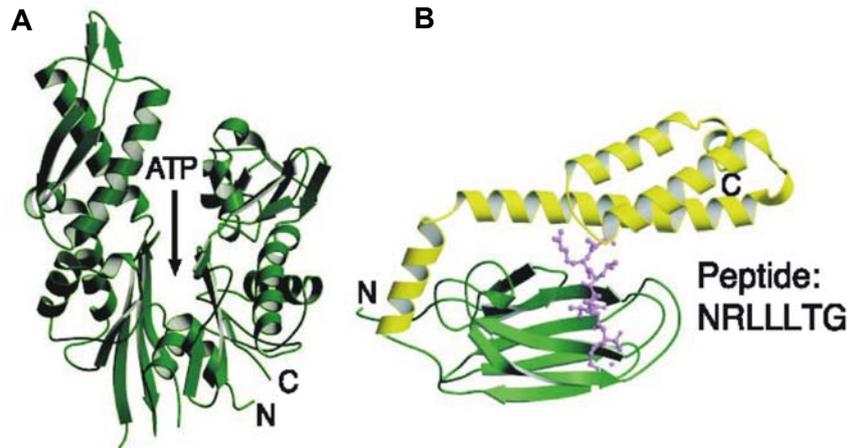


Abb. 1.3 Struktur von DnaK aus *E. coli*

A Kristallstruktur der ATPase-Domäne von DnaK

Das Nukleotid wird in der Vertiefung zwischen den beiden Subdomänen gebunden.

B Kristallstruktur der peptidbindenden Domäne

Die helikale Subdomäne ist in gelb, der β -Faltblattbereich ist in grün dargestellt. Die Sequenz des gebundenen Peptids (violett) ist angegeben. Die Abbildung wurde entnommen aus (Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

Da die Substrataffinität durch Nukleotide beeinflusst wird, muss eine Kommunikation zwischen den Domänen stattfinden (Schmid et al., 1994). Eine Hsp70-Struktur, die beide Domänen, die ATP- und die peptidbindende Domäne umfasst und somit Rückschlüsse über die Interaktion zulassen würde, ist nicht verfügbar.

Die kinetischen und biochemischen Eigenschaften von DnaK machen die Existenz von regulativen Proteinen erforderlich. Im nukleotidfreien und ADP gebundenem Zustand von DnaK werden Peptide relativ langsam gebunden, was bei einem Hitzeschock, bei dem es schnell zu einer starken Proteindenaturierung kommt, nicht ausreichen würde. Der DnaK-ATP-Komplex bindet Peptide schnell aber nur mit geringer Affinität. Für eine stabile Wechselwirkung ist die ATP-Hydrolyse essentiell (Buchberger et al., 1995). Der resultierende DnaK-ADP-Komplex bindet Peptide sehr fest, allerdings sehr langsam. Vermutlich wird durch die ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung der α -helikalen Subdomäne der peptidbindenden Domäne erreicht („Locking in“). Die ATP-Hydrolyserate von DnaK_{Eco} beträgt jedoch nur ca. 0.1 min^{-1} (Theysen et al., 1996).

DnaJ, ein Hsp40 Protein aus *E. coli*, beschleunigt die ATP-Hydrolyse von DnaK_{Eco} um einen Faktor von mindestens 1000 (Liberek et al., 1991; Laufen et al., 1999). Die namensgebende N-terminale J-Domäne stimuliert die ATP-Hydrolyse von DnaK, und zusätzlich können Substrate von einer C-terminalen Domäne mit ähnlicher Affinität wie von DnaK gebunden werden (Rüdiger et al., 2001). Ein stabiler Komplex von DnaK mit DnaJ und Substrat wird nur mit der ATP-Form von DnaK ausgebildet (Wawrzynow und Zylicz, 1995). Ein Modell für den Funktionszyklus des DnaK-Systems aus *E. coli* ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

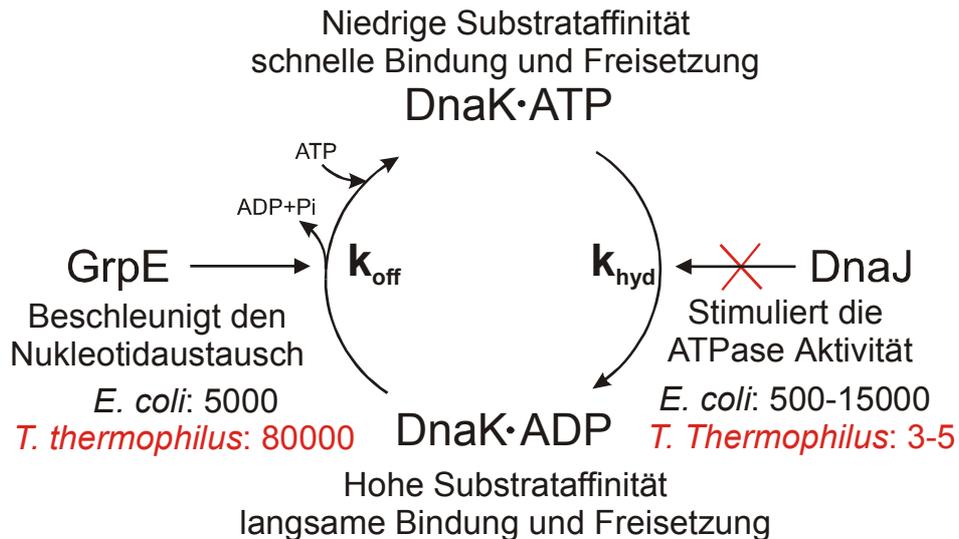


Abb. 1.4 Modell des Funktionszyklus von DnaK

In der ATP gebundenen Form ist die Affinität von DnaK für Substrate gering. Durch die ATP-Hydrolyse, die im unstimulierten Zustand ratenlimitierend ist, wird eine Konformationsänderung induziert, die zur Schließung der Peptidbindetasche führt. In der ADP-Form ist die Affinität von DnaK für Substrate hoch und die Freisetzungsrates gering. In *E. coli* stimuliert DnaJ die ATP-Hydrolyse im Gegensatz zu *T. thermophilus*. GrpE beschleunigt in beiden Organismen den Nukleotidaustausch.

Im ATP gebundenen Zustand bindet DnaK Substrate nur schwach, aber sehr schnell. Nach der durch DnaJ stimulierten ATP-Hydrolyse wird dieser instabile Komplex dann zu dem stabilen DnaK-ADP-Substrat Komplex umgewandelt. DnaJ kann zusätzlich noch Substrate rekrutieren und evtl. an DnaK übergeben. In Gegenwart von DnaJ wird die ATP-Hydrolyse durch DnaK stark beschleunigt, so dass nicht mehr die ATP-Hydrolyse, sondern der Nukleotidaustausch ratenlimitierend ist. Daher existiert auch für diesen Schritt des Zyklus ein Regulationsprotein. GrpE, ein dimeres 20 kDa großes Protein, beschleunigt den Austausch von ADP zu ATP um den Faktor 5000, wobei die Affinität um den Faktor 200 gesenkt wird (Packschies et al., 1997). Nach Austausch von ADP zu ATP wird das Substrat freigesetzt und der Zyklus ist abgeschlossen. DnaK kann nun erneut an Substrate binden. Ob DnaK durch die Bindung auch eine lokale Konformationsänderung im Substrat induziert und somit aktiv bei der Rückfaltung assistiert, ist jedoch nicht klar (Mayer et al., 2000).

Im Gegensatz zu GroEL ist aufgrund des Bindungsmodus von DnaK keine Größenlimitierung für Substrate vorhanden. Es gibt zudem experimentelle Hinweise, dass größere Multidomänenproteine besonders auf die Faltungsassistenz von DnaK angewiesen sind (Mogk et al., 1999).

Die Proteine des DnaK Chaperonsystem sind auch in *T. thermophilus* vorhanden (Motohashi et al., 1994). Die kinetischen Eigenschaften und die Regulation durch die Kochaperone DnaJ und GrpE unterscheiden sich jedoch deutlich von dem mesophilen *E. coli* System. DnaJ_{Th} fehlt im Vergleich zu dem *E. coli* Protein eine Zinkfingerdomäne, die für die Substratbindung wichtig sein soll und die ATPase-Aktivität von DnaK_{Th} wird durch DnaJ_{Th}

nicht stimuliert (Banecki et al., 1996; Klostermeier et al., 1998; Klostermeier et al., 1999). GrpE_{Th} hingegen beschleunigt wie das *E. coli* Protein den Nukleotidaustausch sehr effektiv, der ohne Stimulation ratenlimitierend wäre (Groemping et al., 2001). DnaK und DnaJ wurden aus *T. thermophilus* Zellen als stabiler ca. 300 kDa großer Komplex isoliert, der aus jeweils 3 Molekülen DnaK, DnaJ und DafA besteht (Motohashi et al., 1996). DafA (DnaK-DnaJ-assembly factor A) ist für die Komplexbildung essentiell. Dieser Komplex stellt vermutlich eine inaktive Lagerform der Chaperone da. Bei einem Hitzeschock wird DafA von Substraten verdrängt, und das aktive Chaperonsystem kann sich ausbilden (Klostermeier et al., 1999).

1.3.3 Hsp100/Clp-Proteine

Die Proteine dieser Chaperongruppe werden auch als Clp-Proteine bezeichnet. Der Name leitet sich von der Stimulierbarkeit ihrer ATPase-Aktivität durch Casein ab (caseino-lytic protease). Diese Chaperonklasse wurde in Prokaryonten, Archaea, Hefen, Pflanzen und Insekten identifiziert (Clarke, 1996; Gottesman et al., 1997; Wickner et al., 1999). Am besten charakterisiert sind die in *E. coli* vorkommenden Vertreter ClpA, ClpB, ClpX und HslU (ClpY) (Gottesman et al., 1990; Squires et al., 1991; Chuang et al., 1993; Gottesman et al., 1993). Der abweichende Name für HslU leitet sich aus der verstärkten Expression nach einem Hitzeschock von Heat shock locus ab.

Anhand der Anzahl ihrer Nukleotidbindungsdomänen (NBDs) werden die Hsp100 in zwei Klassen unterteilt (Schirmer et al., 1996). Die Mitglieder der Klasse 1 besitzen zwei Nukleotidbindungsdomänen, die Mitglieder der Klasse 2 hingegen nur eine. Die nukleotidbindenden Domänen werden zudem von zusätzlichen Domänen flankiert bzw. von diesen miteinander verbunden (Abbildung 1.5A). Die zwei NBDs der Klasse 1 Proteine unterscheiden sich untereinander recht stark, die jeweiligen NBDs verschiedener Klasse 1 Proteine sind sich jedoch sehr ähnlich (Schirmer et al., 1996). Die Nukleotidbindungsdomäne der Klasse 2 entspricht der zweiten NBD der Mitglieder der Klasse 1. Zusammen mit den AAA-Proteinen (ATPase associated with various cellular activities) wurden die Hsp100/Clp-Proteine zu der AAA+-Proteinsuperfamilie zusammengefasst (Neuwald et al., 1999). AAA-Proteine sind an zahlreichen zellulären Prozessen wie Organellenbiosynthese, DNA-Replikation und Vesikeltransport beteiligt. Trotz der unterschiedlichen Prozesse, an denen sie beteiligt sind, wird ihnen eine gemeinsame Funktion zugeschrieben: Sie sind an der Bildung und Auflösung von großen Proteinkomplexen beteiligt (Maurizi und Li, 2001). Alle AAA+-Proteine besitzen das konservierte AAA-Modul, das auch als „AAA-Kassette“ bezeichnet wird und für die Nukleotidbindung verantwortlich ist. Es besteht aus einer Nukleotidbindungsdomäne, die mit einer C-terminalen, α -helikalen Domäne verbunden ist. Die NBD zeigt den klassischen

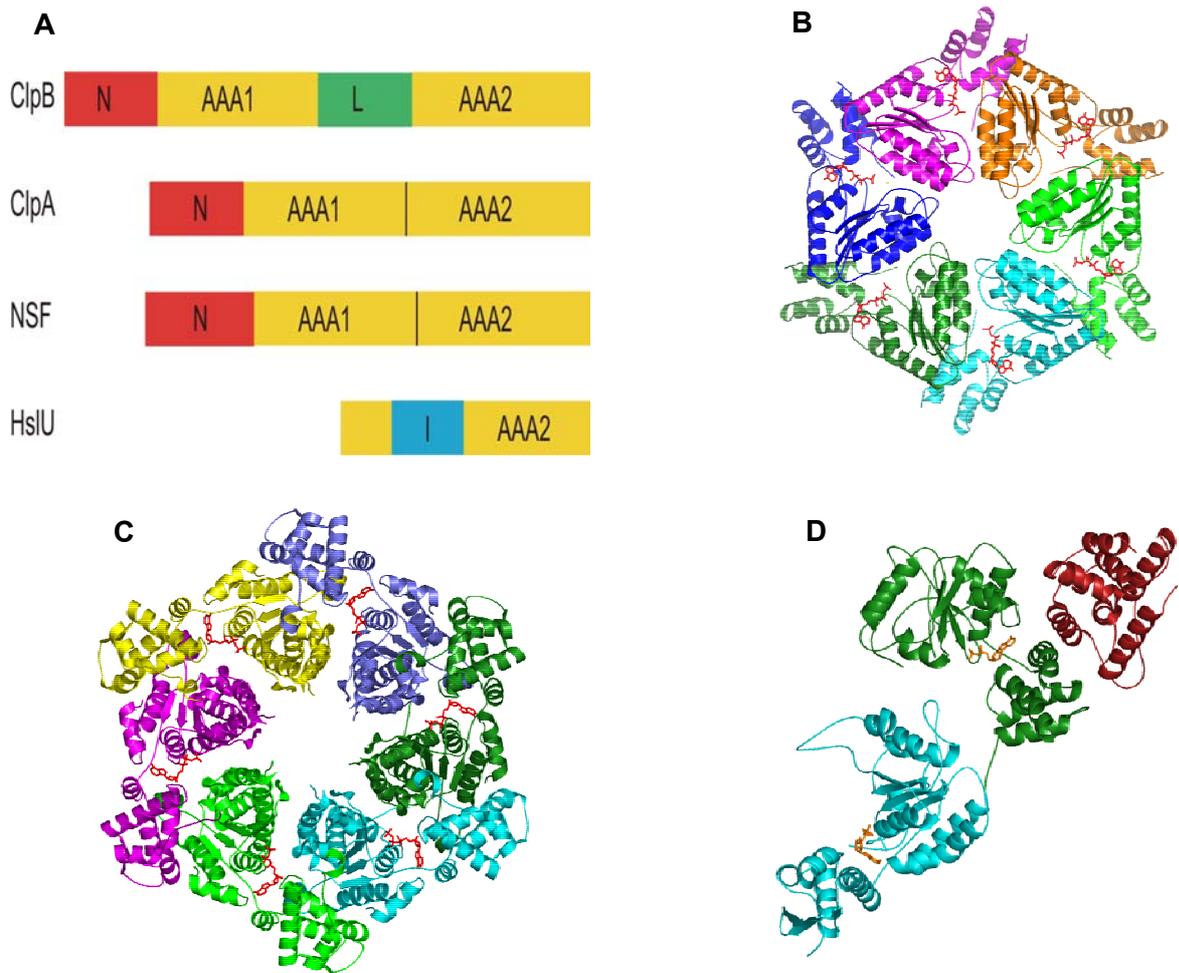


Abb. 1.5 Struktur von Clp-Proteinen

A Schematische Darstellung Clp-Klassen

Exemplarisch dargestellt sind die Klasse 1 Vertreter ClpB, ClpA und NSF sowie das Klasse 2 Protein HslU. ClpB besitzt neben den zwei AAA-Kassetten noch eine N-terminale Domäne (N) sowie den Linker (L) zwischen den beiden NBDs. Dieser Bereich ist in ClpA und NSF nicht vorhanden. HslU besitzt nur eine AAA-Kassette, die der zweiten AAA-Kassette von ClpB bzw. ClpA entspricht. In diese Kassette ist eine weitere Domäne (I) inseriert, die vermutlich die Substratbindung vermittelt.

B Struktur von NSF (D2)

Die Kristallstruktur der zweiten AAA-Kassette (D2) von NSF wurde als hexamere Ringform gelöst. Das gebundene ATP-Analog AMPPNP ist in rot dargestellt.

C Struktur von HslU

Die Struktur eines hexameren HslU-Rings aus *H. influenzae* ist dargestellt. Das gebundene ATP ist rot eingefärbt. Die inserierte I-Domäne ist nicht aufgelöst.

D. Struktur von ClpA

Die N-terminale ist in rot, die erste AAA-Kassette in grün und die zweite Kassette in cyan dargestellt. Die Verbindung der N-Domäne zur ersten AAA-Kassette ist nicht aufgelöst. Die gebundenen ADP Moleküle sind orange eingefärbt.

„Rossmann-Fold“ aus fünf zentralen β -Faltblattsträngen, die von mehreren α -Helices flankiert werden. Die Nukleotidbindungsdomäne besitzt zudem das Walker A Motiv (GX₄GKT), das für die Bindung des γ -Phosphats wichtig ist, und das Walker B Motiv (XXDE), welches an der Koordinierung des Mg²⁺-Ions beteiligt ist (Walker et al., 1982; Saraste et al., 1990). Weitere homologe Sequenzen wurden zusätzlich anhand von Sequenzanalysen identifiziert, z.B. das Sensor 1 Motiv (Patel und Latterich, 1998).

Clp-Proteine können in Gegenwart von ATP oligomerisieren. ClpA, ClpX und HslU bilden stabile Ringstrukturen aus, die auch von der zweiten AAA-Kassette (D2) des NSF Proteins bekannt sind (Rohrwild et al., 1997; Grimaud et al., 1998). Die Clp-ATPasen, mit Ausnahme von ClpB, bilden intrazellulär stabile Komplexe mit Proteasen. ClpA und ClpX binden an die Serinprotease ClpP, HslU bindet an HslV (Gottesman et al., 1997). Die Kristallstrukturen von NSF (D2) und der HslUV Komplexe von *E. coli* und *H. influenzae* zeigen hexamere Ringstrukturen mit ähnlichen Strukturen der AAA-Kassette (Abbildung 1.4B und C) (Lenzen et al., 1998; Bochtler et al., 2000; Sousa et al., 2000). Gut zu erkennen ist eine Pore im Zentrum des Rings. Die zweite AAA-Kassette (D2) von NSF ist für die Oligomerisierung ausreichend, die erste AAA-Kassette ist für die enzymatische Aktivität verantwortlich (Whiteheart et al., 1994). Das AAA-Modul von HslU zeigt erneut eine hexamere Anordnung im Kristall. Die Struktur des HslUV Komplexes von *H. influenzae* verdeutlicht zudem die Anordnung der Proteine zueinander. Die Protease HslV ist eingeschlossen zwischen zwei Ringen aus jeweils sechs HslU Molekülen. Die mögliche Verbindung von außen durch die zentrale Pore des HslU Rings zum aktiven Zentrum der Proteasen ist so schmal (ca. 20 Å), dass nur entfaltete Polypeptidketten dorthin gelangen und hydrolysiert werden können.

Die Struktur von ClpA aus *E. coli* konnte durch Röntgenstrukturanalyse kürzlich gelöst werden (Guo et al., 2002). Zu erkennen sind die zwei AAA-Kassetten, bestehend aus den Subdomänen (Abbildung 1.5 D). Die verbindenden Aminosäuren zwischen der N-terminalen Domäne und der ersten AAA-Kassette sind nicht aufgelöst. Das Protein hat zwei ADP Moleküle gebunden und liegt nicht in der physiologischen, hexameren Struktur vor.

In dem Proteinkomplex aus Clp-ATPase und assoziierter Protease wird die Entfaltungsreaktion der Polypeptidkette den Clp-ATPasen zugeschrieben. So konnte für ClpA gezeigt werden, dass es auch ohne ClpP in der Lage ist, ein für den Abbau markiertes Protein ATP-abhängig zu entfalten (Weber-Ban et al., 1999). Eine wichtige Signalsequenz für den Abbau von Substratproteinen durch die Proteinkomplexe ClpAP und ClpXP ist der SsrA-Tag. Dieses 11 Aminosäuren lange Peptid (AANDENYALAA) wird an den C-Terminus von Proteinen angebracht, falls ihre Biosynthese am Ribosom nicht komplett abgeschlossen werden kann (Gottesman et al., 1998). Die Entfaltung läuft vermutlich prozessiv, ausgehend von der Signalsequenz des Substrats am C-Terminus, und die entfaltete Polypeptidkette wird direkt in das aktive Zentrum der Protease überführt (Lee et al., 2001). Interessanterweise kann die Spezifität und Kinetik der Entfaltungsreaktionen von ClpA und ClpX durch Adaptorproteine moduliert werden. RssB ist ein Adaptorprotein für ClpXP, das für den Abbau des Transkriptionsfaktors σ^S notwendig ist (Zhou et al., 2001). SspB hingegen erkennt eine Sequenz innerhalb des SsrA-Tags und beschleunigt den Abbau der markierten Proteine durch ClpXP (Flynn et al., 2001). ClpS, ein erst kürzlich identifiziertes Protein in *E. coli* kann als Adaptorprotein für ClpA fungieren (Dougan et al., 2002). Es bindet an die N-terminale

Domäne und modifiziert die Substratauswahl von ClpA. ClpA entfaltet dann nicht mehr SsrA-markierte Proteine, sondern es werden Proteinaggregate als Substrate erkannt.

Im Gegensatz zu ClpA und ClpX bindet ClpB nicht an eine zelluläre Protease und hat auch keine eigene Proteaseaktivität. ClpB besitzt zwei AAA-Kassetten, die von einer Linkerdomäne verbunden werden. Die Struktur eines Fragments der ersten AAA-Kassette konnte durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden und zeigte die zuvor beschriebene Struktur einer AAA-Kassette (Li und Sha, 2002). Zusätzlich treten in *E. coli* aufgrund eines alternativen Startcodons in der mRNA zwei Isoformen mit unterschiedlichen N-Termini auf (Squires et al., 1991; Park et al., 1993). ClpB kann ebenfalls in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids und der Ionenstärke der Lösung oligomerisieren (Parsell et al., 1994a; Zolkiewski et al., 1999; Schlee et al., 2001). ClpB aus *E. coli* und das *S. cerevisiae* ClpB-Homolog Hsp104 wurden ursprünglich als Thermotoleranzfaktoren identifiziert, die das Überleben der Zellen unter Hitzeschockbedingungen ermöglichten (Sanchez und Lindquist, 1990; Parsell et al., 1991; Squires et al., 1991). Hefezellen, die kein aktives Hsp104 mehr besitzen, sind hitzeempfindlich und zeigen vermehrte Aggregation von Proteinen im Cytosol nach einem Hitzeschock. Wie diese Thermotoleranz erreicht wird, konnte ebenfalls ermittelt werden: Hsp104 reaktiviert aggregierte Proteine (Parsell et al., 1994b).

Für die Rückfaltung der Proteinaggregate *in vivo* und *in vitro* ist die Interaktion von Hsp104 mit dem Hsp70/DnaK-System notwendig (Glover und Lindquist, 1998). Für die Chaperonfunktion wird ATP-Hydrolyse an beiden AAA-Kassetten von ClpB bzw. Hsp104 benötigt (Parsell et al., 1994b; Schlee et al., 2001). Die funktionelle Kooperation mit DnaK konnte auch für ClpB aus *E. coli* und aus *T. thermophilus* gezeigt werden (Zolkiewski, 1999; Mogk et al., 1999; Motohashi et al., 1999). Eine schematische Darstellung der Chaperonfunktion von ClpB mit dem DnaK-System ist in Abbildung 1.6 gezeigt.

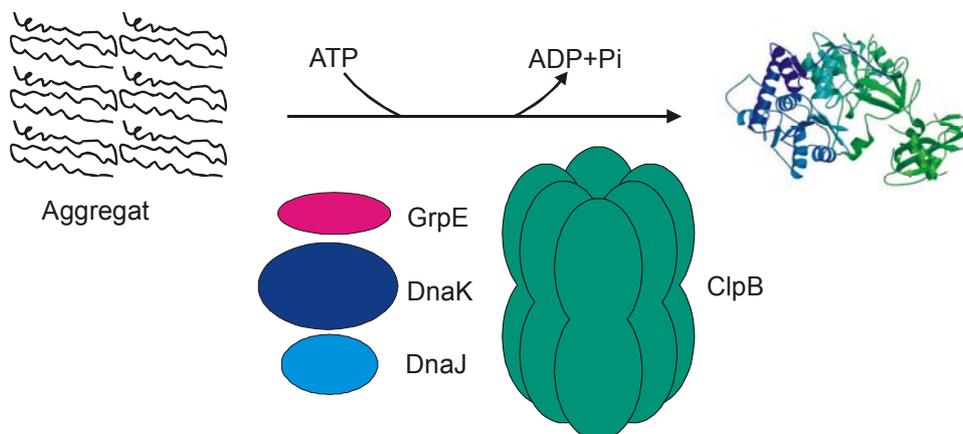


Abbildung 1.6 Rückfaltung von Proteinaggregaten durch das DnaK-System und ClpB

Aggregate können nur in Gegenwart von ClpB und dem DnaK-System unter ATP-Verbrauch in die native Proteinkonformation überführt werden. Das DnaK-System reicht für diese Reaktion nicht aus. Ebenso ist ClpB alleine nicht in der Lage Proteinaggregate zu reaktivieren.

Stabile Proteinaggregate könne von vielen Chaperonen nicht mehr zurückgefaltet werden. Das DnaK-System kann jedoch in Zusammenarbeit mit ClpB unter ATP-Verbrauch diese Aggregate reaktivieren (Motohashi et al., 1999; Diamant et al., 2000). Sowohl das DnaK-System alleine, als auch ClpB alleine können diese Reaktion nicht durchführen. Die Mechanismen der Interaktionen der Chaperone mit Aggregaten und der Chaperone miteinander sind nicht vollständig bekannt. Ein sequentieller Mechanismus der Proteinrückfaltung wurde postuliert: Zuerst sollen ClpB und DnaK gemeinsam große Aggregate soweit modifizieren, dass im weiteren Verlauf das DnaK-System alleine für die Reaktivierung der Substrate ausreichend ist (Goloubinoff et al., 1999; Ben Zvi und Goloubinoff, 2001).

Die Interaktion von ClpB und DnaK zeigt sich zusätzlich in der genetischen Organisation von *T. thermophilus*. In diesem Organismus liegen beide Proteine in einem Operon und werden folglich zusammen exprimiert (Klostermeier et al., 1999; Motohashi et al., 1999). In *E. coli* liegen die Proteine auf getrennten Operons, die Expression von beiden Proteinen wird jedoch durch den Hitzeschockpromotor σ^{32} gesteuert (Kitagawa et al., 1991).

Der exakte Ablauf der Interaktion von ClpB mit dem DnaK-System ist jedoch nicht bekannt. Eine direkte Interaktion von ClpB mit Proteinaggregaten konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, und bis jetzt ist kein Komplex aus DnaK, ClpB und Substrat gefunden worden. So bleibt die Fähigkeit, Proteinaggregate aufzulösen, eine bemerkenswerte Reaktion.

1.4 Proteinaggregation

1.4.1 Proteinaggregation in der Zelle

Die Exposition hydrophober Bereiche während der Translation und bei einer Missfaltung der Proteine oder die partielle Entfaltung von Proteinen unter Stressbedingungen, können zu Aggregation von Proteinen führen. Das Schicksal eines inaktivierten Proteins in der Zelle hängt vom Ausmaß der Schädigung ab. Wenn eine Rückfaltung nicht mehr möglich ist, kann es durch zelluläre Proteasen abgebaut werden. Einige Proteasen wie ClpA werden unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert (Kessel et al., 1995; Tomoyasu et al., 1995). So können falsch gefaltete Proteine und teilweise aggregierte Proteine abgebaut werden. Des Weiteren wird die Proteinbiosynthese unter Stressbedingungen reduziert, um eine weitere Aggregation zu minimieren. Zusätzlich kann mit dem Adaptorprotein ClpS die Substratspezifität der Protease ClpA zu Aggregaten hin verschoben werden (Dougan et al., 2002).

1.4.2 Proteinaggregate und humanpathogene Erkrankungen

Die Forschung an Proteinaggregaten wurde in den letzten Jahren intensiviert, da viele neurodegenerative Erkrankungen des Menschen ein gemeinsames Merkmal besitzen: die intra- und extrazelluläre Ablagerung von Proteinaggregaten (Taylor et al., 2002). Der genaue Mechanismus der Erkrankungen ist noch nicht bekannt, doch gibt es Hinweise, dass die Proteinaggregate an sich neurotoxisch sind (Hardy und Selkoe, 2002). Sie wären somit eine Ursache der Erkrankung und nicht ein Zeichen einer bereits erfolgten Zellschädigung, die durch andere Faktoren ausgelöst wurde.

Prionenerkrankungen wie die Creutzfeld-Jacob Krankheit (CJD) oder das Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrom (GSS) sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen. Sie können auch bei Tieren auftreten, als BSE beim Rind oder Scrapie bei Schafen. Sie wurden in letzter Zeit intensiv erforscht, da bei diesen Erkrankungen Proteine selbst der infektiöse Erreger sein sollen (Prusiner, 1997). Diese Prionenhypothese ist die zur Zeit akzeptierte Erklärung für die Übertragung dieser Erkrankungen, die jedoch auch spontan auftreten können. Das derzeitige Modell geht davon aus, dass die bei dieser Erkrankung auftretenden Aggregate aus einer falsch gefalteten Form (PrP^{Sc}) des körpereigenen Prion Proteins (PrP^{C}) bestehen. PrP^{C} ist ein hydrophiles, hauptsächlich aus α -Helices bestehendes Protein (Riek et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist die aus den Ablagerungen isolierte Form PrP^{Sc} wasserunlöslich und besteht zu einem größeren Prozentsatz aus β -Faltblattstrukturen. Es wird vermutet, dass PrP^{C} zwischen der nativen, helikalen Struktur und anderen Konformationen, die aggregationsfähig sind, fluktuieren kann (Prusiner et al., 1998). Falsch gefaltetes PrP^{C} soll dann als Matrize für die Konversion zu PrP^{Sc} dienen und so die Aggregation stark beschleunigen (Jackson et al., 1999). Diese Aggregation löst dann die Krankheitssymptome aus. Dieser Mechanismus erklärt zum einen die Übertragbarkeit zwischen einzelnen Individuen durch den Transfer bereits missgefalteter Proteine als auch das spontane Auftreten der Erkrankungen durch partielle Denaturierung oder mutationen-induzierte Instabilität des Proteins.

Eine weitere Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die mit Proteinablagerungen in Verbindung gebracht werden, sind die Polyglutamin-Erkrankungen, von denen die dominant vererbte Chorea Huntington (CH) die bekannteste ist. Es wird vermutet, dass die Polyglutamin-Erkrankungen auf einem gemeinsamen Mechanismus beruhen.

Bei Chorea Huntington besitzt das natürlich vorkommende, krankheitsassoziierte Protein eine Polyglutaminsequenz, die jedoch im Krankheitsfall verlängert ist (Rubinsztein et al., 1999). Diese Polyglutaminexpansion wird durch die Ausbreitung des CAG-Trippletts im codierenden Bereich des Gens ausgelöst. Die Überexpression von Proteinen mit verlängerten Polyglutaminsequenzen löst das Krankheitsbild aus. Die pathogene Wirkung der Polyglutaminsequenz konnte durch Zellkulturexperimente und in Tiermodellen der Krankheit

bestätigt werden (Davies et al., 1997; Narain et al., 1999). Zusätzlich bildeten sich intrazelluläre Ablagerungen des Proteins. Interessanterweise ist die Länge der Polyglutaminsequenz direkt mit dem Krankheitsverlauf gekoppelt. Die „normalen“ Proteine enthalten 10-34 Glutaminreste, wird die Anzahl jedoch erhöht, kommt es zur Ausbildung des Krankheitsbilds. Je länger die Glutaminsequenzen sind, desto früher tritt die Krankheit auf (Becher et al., 1998). Die kritische Grenze für die Erkrankungen beträgt ca. 36 Polyglutamine (Scherzinger et al., 1997). Als Mechanismus wurde ein „glutamin zipper“ vorgeschlagen (Perutz et al., 1994). Polyglutaminsequenzen können miteinander äußerst stabile antiparallele β -Faltblattstrukturen ausbilden. Proteine mit verlängerten Polyglutaminsequenzen können somit miteinander irreversible, nicht physiologische Interaktionen eingehen. Zusätzlich kann es zu einer stabilen Interaktion durch Ausbildung von „glutamin zippers“ mit Proteinen kommen, die natürlicherweise eine kürzere Polyglutaminsequenz besitzen.

Der Mechanismus der Zytotoxizität dieser Proteinaggregate in Nervenzellen ist jedoch noch nicht bekannt. Kürzlich wurde eine zusätzliche Struktur für die Polyglutaminsequenzen postuliert (Perutz et al., 2002). Die β -Faltblattstrukturen der Polyglutaminbereiche sollen sich zu Zylindern mit einem Durchmesser von 31 Å und 20 Glutaminresten pro Drehung aneinander lagern. Diese Struktur würde die besondere Bedeutung der kritischen Marke von ca. 40 Glutaminen erklären, da die Zylinder (nanotubes) erst durch die Wechselwirkungen zweier kompletter Faltblätter stabilisiert würden.

1.4.3 Chaperone und Proteinaggregate

Molekulare Chaperone wurden in Proteinablagerungen sowohl aus pathologischem Material als auch aus den Zellkulturmodellen der neurodegenerativen Erkrankungen identifiziert (Cummings et al., 1998; Bonini, 2002). In zahlreichen Studien konnte sowohl in Tiermodellen, in Zellkulturexperimenten und in Hefen gezeigt werden, dass Chaperone sowohl die Erkrankung unterdrücken, als auch die Größe der Proteinablagerungen reduzieren können. Als besonders effektiv wurden hier Hsp104, Hsp70 und Hsp40 eingestuft (Krobitsch und Lindquist, 2000; Carmichael et al., 2000; Kazemi-Esfarjani und Benzer, 2000; Cummings et al., 2001). Hsp104 spielt zudem bei der Vererbung von Hefeprionen eine wichtige Rolle. [PSI⁺] ist ein cytoplasmatisch vererbtes genetisches Element und basiert auf einem Aggregat des zellulären Protein Sup35, einem Terminationsfaktor der Proteinbiosynthese. Für die Weitergabe des [Psi⁺] ist eine gewisse Konzentration von Hsp104 notwendig. Überexpression oder Inaktivierung von Hsp104 bewirken einen Verlust des [Psi⁺]-Faktors (Lindquist et al., 1995). Als Mechanismus wird eine Umwandlung der Sup35 Konformation durch Interaktion mit Hsp104 postuliert. Die neue Sup35-Konformation kann vermutlich leichter aggregieren (Schirmer und Lindquist, 1997).

Die Untersuchung der Wechselwirkung von Chaperonen, insbesondere ClpB und Hsp104, mit Aggregaten und die Untersuchung des Mechanismus der Proteinerückfaltung können zum Verständnis dieser komplexen Vorgänge beitragen. Ein grundlegendes Verständnis dieser Reaktionen kann dann eventuell neue Ansätze für die Therapie der zuvor beschriebenen Erkrankungen liefern.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Informationen über die Struktur und Funktion von ClpB aus *T. thermophilus* zu erhalten. Die ATP-Hydrolyse ist essentiell für die Chaperonaktivität von ClpB (Motohashi et al., 1999). Eine Bindung von Substraten in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids, wie in den Hsp70/DnaK-Systemen, ist jedoch bisher nicht gezeigt worden. Es ist zudem nicht bekannt, ob durch ATP-Hydrolyse aktiv am Substrat gearbeitet wird und dadurch eine Auflösung von Aggregaten bewirkt wird. Um diese Fragen zu beantworten sollen zunächst zusätzliche Substratproteine für das DnaK-ClpB-System von *T. thermophilus* ausgewählt werden. Mit den neuen Substratproteinen sollen Aktivitätsassays etabliert werden, die eine zuverlässige Charakterisierung der Rückfaltungsreaktion des DnaK-ClpB-Systems ermöglichen. Anhand dieser Assays soll zudem der ATP-Verbrauch des DnaK-ClpB-Systems bestimmt werden und mögliche Stimulationen der ATPase-Aktivität von ClpB durch die einzelnen Komponenten untersucht werden. Die Effizienz der Rückfaltungsreaktion im Bezug auf den ATP-Verbrauch ist bislang nicht bestimmt worden, die Effizienz des Chaperonsystems ist somit unklar.

ClpB kann anhand von Sequenzvergleichen mit anderen Proteinen und anhand von Sekundärstrukturvorhersagen in verschiedene Domänen unterteilt werden: eine N-terminale Domäne und zwei AAA-Kassetten, die von einer weiteren Domäne verbunden werden (Linkerdomäne).

Die mRNAs von ClpB und ClpA von *E. coli* besitzen ein alternatives Startcodon. Daher werden *in vivo* zwei Genprodukte exprimiert: das vollständige Protein und ein Protein, das am alternativen Startcodon beginnt und die N-terminale Domäne nicht besitzt (Park et al., 1993). Für ClpA aus *E. coli* wurde gezeigt, dass die N-terminale Domäne nur schwach mit dem übrigen Protein interagiert und das verkürzte Protein reduzierte Aktivität besitzt (Lo et al., 2001). Bei ClpB aus *E. coli* erwies sich das N-terminal verkürzte Protein *in vitro* als inaktiv in Rückfaltungsexperimenten konnte aber noch oligomerisieren und ATP hydrolysieren (Barnett et al., 2000). Durch Untersuchungen mit der isolierten N-Domäne von ClpB aus *E. coli* wurde eine Funktion der N-Domäne in der Substraterkennung postuliert (Tek und Zolkiewski, 2002). Im Gegensatz dazu wurde eine Funktionalität des N-terminal verkürzten ClpBs *in vivo* gezeigt (Eriksson und Clarke, 2000).

Die Funktion der N-terminalen Domäne von ClpB aus *T. thermophilus* ist unbekannt. In dieser Arbeit sollen ein verkürztes ClpB-Fragment, das die N-terminale Domäne nicht mehr besitzt, und die N-Domäne einzeln kloniert werden. Diese Proteine sollen dann biochemisch charakterisiert werden und so die Funktion der N-terminalen Domäne untersucht werden.

Der Mechanismus der nukleotidabhängigen Oligomerisierung von ClpB und die Beeinflussung durch die Ionenstärke des Puffers sind nicht bekannt. Es ist nicht klar, welche Domänen für die Oligomerisierung von ClpB essentiell sind und wie die Oligomerisierung des Proteins mit der Chaperonfunktion verbunden ist. Für ClpB aus *E. coli* wurde eine wichtige Funktion der C-terminalen Domäne für die Oligomerisierung gezeigt und eine Verknüpfung von Oligomerisierung und Chaperonfunktion postuliert (Barnett et al., 2000). Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit ClpB-Fragmente mit unterschiedlichen C-Termini kloniert, aufgereinigt auf ihre Oligomerisierungsfähigkeit hin getestet werden. Diese Charakterisierung sollte Hinweise geben, ob die C-terminale Domäne von ClpB aus *T. thermophilus* für die Oligomerisierung essentiell ist. Diese Untersuchungen können helfen die Effekte der verschiedenen Nukleotide und der Ionenstärke auf die Oligomerisierung zu verstehen.

Die Substratbindestelle von ClpB ist bis jetzt nicht lokalisiert worden. Für andere Clp-Proteine (ClpA und ClpX) wurde eine Interaktion von Substraten mit der helikalen Domäne des zweiten AAA-Moduls gezeigt. Dieser Bereich wurde zudem als Substratbindestelle von Hsp104 vorgeschlagen (Smith et al., 1999; Cashikar et al., 2002). Daher sollen verschiedene ClpB-Konstrukte mit variablem C-Terminus auf ihre Chaperonaktivität und Interaktionen mit Substraten hin getestet werden. Diese Experimente sollten Rückschlüsse über die Position der Substratbindestelle von ClpB zulassen.

Die ATP-Hydrolyse an beiden NBDs ist notwendig für die funktionelle Aktivität, und ClpB zeigt ein allosterisches Verhalten in ATP-Hydrolyse Untersuchungen (Schirmer et al., 1998; Schlee et al., 2001). Bei ClpB/Hsp100-Proteinen wurde jedoch von unterschiedlichen Funktionen der AAA-Kassetten in Bezug auf die Oligomerisierung berichtet. Bei ClpB aus *E. coli* ist die erste AAA-Kassette sehr wichtig, hingegen beeinflussen bei Hsp104 aus *S. cerevisiae* und Hsp101 aus *N. tabacum* nur Punktmutationen der zweiten AAA-Kassette die Oligomerisierung stark (Schirmer et al., 1998; Kim et al., 2000; Gallie et al., 2002). Bei ClpB aus *T. thermophilus* sind beide AAA-Kassetten an der Oligomerisierung beteiligt, Punktmutationen in der ersten AAA-Kassette scheinen jedoch einen stärkeren Effekt zu haben (Schlee et al., 2001; Watanabe et al., 2002). Um die Oligomerisierung von ClpB_{Th} und Interaktionen der AAA-Kassetten von ClpB_{Th} genauer zu charakterisieren, sollen die beiden AAA-Kassetten getrennt untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten Rückschlüsse über das Oligomerisierungspotential der beiden AAA-Kassetten von ClpB zulassen, und Hinweise über den Mechanismus der Oligomerisierung geben. Die

Bestimmung der ATPase-Aktivitäten der AAA-Kassetten kann zusätzlich Informationen über die allosterischen Interaktionen des Proteins geben.

Zusätzlich besitzt ClpB eine Linkerdomäne zwischen den beiden AAA-Kassetten, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Ursprünglich wurde sie als reines Verbindungsmodul der beiden AAA-Kassetten betrachtet (Schirmer et al., 1996). Anhand von Sequenzvergleichen von ClpB mit ClpA und der kürzlich publizierten Struktur von ClpA wurde jedoch postuliert, dass der Linker in die helikale Domäne des ersten AAA-Moduls inseriert ist (Cashikar et al., 2002; Mogk et al., 2003). Die Funktion des Linkers soll daher auch bei ClpB aus *T. thermophilus* genauer untersucht werden. Dazu werden unterschiedliche Konstrukte der einzelnen AAA-Kassetten und des Linkers biochemisch charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Enzyme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

| Produkt | Hersteller |
|---|-------------------------------------|
| Acrylamid -Lösung (30 %), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | AppliChem (Darmstadt) |
| Ethanol, Essigsäure, HCl, Isopropanol, Kaliumacetat, Natriumacetat, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl, MgCl_2 , NaCl, NaOH, Harnstoff | J.T.Baker (Deventer, NL) |
| Gelfiltrationsstandard, LMW-Proteinstandard | Biorad (München) |
| TCA | Fluka (Neu-Ulm) |
| Borsäure, DTE, EDTA, GdnHCl, Glycerin, HEPES, IPTG, Kanamycin, MOPS | Gerbu (Gailberg) |
| Glucose-6-Phosphat | ICN (Eschwege) |
| Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 | Merck, Darmstadt |
| Luciferin | Mobitec (Göttingen) |
| T4 DNA-Ligase, Alkalische Phosphatase, DNA-Größenstandard (kb-Leiter), <i>EcoR</i> I, <i>Nde</i> I | New England Biolabs (Frankfurt) |
| Luciferase | Promega (Mannheim) |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase | Qiagen (Hilden) |
| NADH, PEP, Proteaseinhibitor-Tabletten, LDH (Schweinemuskel), Pyruvatkinase, DNase I | Roche Diagnostics (Mannheim) |
| Tris, Glycin, Agarose, Chloramphenicol, Ethidiumbromid, | Roth (Karlsruhe) |
| APS, Bromphenolblau, Coomassie Blue-R250/G250, NADP, SDS, TEMED, Xylencyanol | Serva (Heidelberg) |
| ADP, ATP, BSA, CoenzymA, PMSF, κ -Casein, FITC-Casein, Poly-L-Lysin, β -Mercaptoethanol, TFA, Pyruvat, p-Nitrophenyl α -D-glucopyranosid, α -Glucosidase, GPDH, LDH _{Bst} | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| <i>Pfu</i> DNA-Polymerase | Stratagene (Amsterdam, Niederlande) |

2.2 Plasmide, Oligonukleotide und Mikroorganismen

2.2.1 Plasmide und Oligonukleotide

Die Expressionsplasmide für die rekombinanten Proteine sind Derivate der pET-Serie (Novagen, Madison, WI, USA) und tragen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Das eingefügte Gen steht unter Kontrolle eines Promotors für die T7 RNA-Polymerase. Bei den verwendeten Expressionsstämmen von *E. coli* ist das Gen für die T7 RNA-Polymerase mittels des Prophagen DE 3 genomisch integriert. Die Transkription der RNA-Polymerase wird vom IPTG-induzierbaren lacUV5-Promotor kontrolliert. Die, nach IPTG-Zugabe, synthetisierte T7 RNA-Polymerase kann dann das eingefügte Gen transkribieren, da der Operator dereprimiert ist.

Die Gene der ClpB-Fragmente wurden durch gerichtete Mutagenese mittels PCR mit dem Plasmid pRS-ClpBwt als Matrize hergestellt (Schlee et al., 2001). Dieses Plasmid wurde von Dr. Ralf Seidel zur Verfügung gestellt. Die PCR-Produkte für die rekombinanten Proteine ohne His-Tag wurden durch *Nde* I und *EcoR* I Schnittstellen in den Vektor pET27b kloniert. Die ClpB Mutanten mit N-terminalen His-Tag wurden mit *Nde* I und *EcoR* I Schnittstellen in den Expressionsvektor pET28b kloniert.

Die verwendeten Oligonukleotide für die Mutagenese der verschiedenen ClpB-Fragmente sind in Tabelle 2.2 angegeben. Das Plasmid für die Expression von LDH_{Bst} mit N-terminalen His-Tag wurde von Dr. C. Halliwell zur Verfügung gestellt und ist ein Derivat von pET28 (Halliwell et al., 2001).

2.2.2 Mikroorganismen

Als *E. coli*-Klonierungsstämmen wurden XL-1 und TG-1 verwendet. Als Expressionsstämmen dienten *E. coli* BL21(DE3) (Studier und Moffatt, 1986) und *E. coli* BL21 Rosetta. Die kompetenten Zellen des Stammes TG-1 wurden von Elisabeth Hartmann und die kompetenten Zellen des Stammes BL21 Rosetta wurden von Dr. Wulf Blankenfeldt zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.2 Oligonukleotidsequenzen für die gerichtete Mutagenese

| Protein | Oligonukleotid | Sequenz |
|--------------------------|----------------|--|
| ClpBΔN (ClpB140-854) | ClpBΔNfor | GACTGCTAAGCATATGGTGCAGACGGAACACGCGGAAAGC |
| | T7terminator | CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC |
| ClpBΔC (ClpB1-762) | T7promotor | TTAATACGACTCACTATAGGGGAA |
| | ClpBΔCrev | CGAATTCATTAGATCTGCTCCTTGGTGA |
| ClpBΔL (ClpBΔ395-531) | T7promotor | TTAATACGACTCACTATAGGGGAA |
| | T7terminator | CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC |
| | ClpBΔLfor | GCCCGCCTGCGCATGCGCTGGACCGGGATCCCT |
| | ClpBΔLrev | GATCCCGGTCCAGCGCATGCGCAGGCGGGCCGC |
| ClpB1-845 | T7promotor | TTAATACGACTCACTATAGGGGAA |
| | ClpB1-845rev | AGCACTGAATTCACACGAGGCCCGCGGGCCCCA |
| ClpB1-828 | T7promotor | TTAATACGACTCACTATAGGGGAA |
| | ClpB1-828rev | CGACTGAATTCACTCGCCGGCCAGGATCTTCTG |
| ClpBN (ClpB1-140) | T7promotor | TTAATACGACTCACTATAGGGGAA |
| | ClpB140rev | CAGATGCCGTGAATTCAGGTTCTCCCTCCCCTCAGTTC |
| ClpBL (ClpB394-542) | ClpB394-542for | GCAGGCTTGGCATATGGCCCTGGAGAGCGCTCCC |
| | ClpB394-542rev | GACGGCCGTGAATTCACAGGAGCTTGGACACAGGGAT |
| ClpB141-393 | ClpB141-393for | GATCCTGCTCGCCATATGCAGACGGAACACGCGGAAAGC |
| | ClpB141-393rev | GTCGGCCGTGAATTCAGCGCAGGCGGGCCCGCCGCTC |
| ClpB141-519 | ClpB141-393for | GATCCTGCTCGCCATATGCAGACGGAACACGCGGAAAGC |
| | ClpB141-519rev | ACTGATCGAGGAATTCAGAGGCGGACGAAGCGGGCGCC |
| ClpB394-854 (ClpBIC) | ClpB394-542for | GCAGGCTTGGCATATGGCCCTGGAGAGCGCTCCC |
| | T7terminator | CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC |
| ClpB519-854 (ClpBC) | ClpBC2for | GATCCTGCTCGCCATATGGAGGTCACCGAGGAGGACATC |
| | T7terminator | CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC |

2.3 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden molekularbiologischen Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1982).

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1.0 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit wurde der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt, der zwischen 1.8 und 2.0 liegen sollte.

2.3.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen in LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) erfolgte je nach Bedarf auf Agarplatten oder in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen 1/5 des Gefäßvolumens) bei 37°C.

LB-Medium: 10 g/l NaCl, 10 g/l Peptone, 5 g/l Hefeextrakt, auf pH 7.5 mit NaOH eingestellt.

Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml Kanamycin in H₂O

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach Birnboim und Doly (1979). Die normalerweise durchgeführte Schnellmethode beinhaltete folgende Änderungen: Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde durch einmaliges Zugabe von 50 µl Chloroform ersetzt. Nach intensiven Mischen und Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand mit Ethanol gefällt. Die gewaschene und getrocknete DNA wurde in 25 µl DNA-Lagerpuffer aufgenommen. Zur Isolierung besonders reiner DNA für die Sequenzierungsreaktion wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Lösung 1: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA

Lösung 2: 0.2 M NaOH, 1 % SDS

Lösung 3: 2.8 M Kaliumacetat pH 5.1

DNA-Lagerpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.5

2.3.4 Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Die Restriktion von DNA erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen. Der Restriktionsansatz umfasste normalerweise ein Volumen von 20 µl, die Restriktionstemperatur richtete sich nach den Herstellerangaben. Für die Berechnung der Inkubationszeit für eine vollständige Restriktion wurde die Unit Definition für Restriktionsenzyme angewendet.

2.3.5 Analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in analytischen und präparativen Maßstab erfolgte durch horizontale Agarosegelelektrophorese in 0.8 bis 2.0 % igen Agarosegelen in TBE-Puffer mit Ethidiumbromidzusatz (500 µg/l). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese bei einer elektrischen Feldstärke von 10 V/cm bei Raumtemperatur durchgeführt. Als DNA-Größenstandard wurden 500 ng der 1 kb DNA-Leiter aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm.

TBE-Puffer: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA

5 x Probenpuffer: 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanol, 50 % Glycerin.

2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben isoliert.

2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

In einem 20 µl Ligationsansatz wurden ca. verwendet:

100 ng Vektor-DNA

200 ng Insert-DNA (2-3 facher Überschuss zum Vektor)

1 U T4 DNA-Ligase

Zur Ligation wurde die Reaktion 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Eine eventuelle Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurde zuvor mittels alkalischer Phosphatase nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.8 PCR für die ClpB-Mutagenese

Für die zielgerichtete Erstellung von ClpB-Varianten wurde die PCR eingesetzt. Ein Ansatz hatte normalerweise ein Volumen von 100 µl und enthielt ca. :

10 ng Plasmid-DNA als Matrize

50 pmol je Oligonukleotid (sense und antisense)

250 µM der einzelnen dNTPs

2 U der *Pfu* DNA-Polymerase

Für alle Proteine außer ClpB Δ L wurde nur eine PCR durchgeführt. Bei ClpB Δ L wurden zuerst die DNA-Fragmente codierend für die Aminosäuren 1-394 (Oligonukleotide: T7promotor, ClpB Δ Lrev) bzw. 532-854 (Oligonukleotide: T7terminator, ClpB Δ Lfor)

hergestellt. In einer weiteren PCR mit den zuvor gewonnenen PCR-Produkten wurde dann das vollständige DNA-Fragment erstellt (Oligonukleotide: T7promotor, T7terminator).

PCR-Programm:

| Schritt | Reaktion | Dauer | Temperatur |
|---------|------------------------|---|----------------------------|
| 1 | Initiale Denaturierung | 3 min | 95°C |
| 2 | Denaturierung | 30 sec | 95°C |
| 3 | Hybridisierung | 30 sec | Abhängig vom Oligonukletid |
| 4 | Amplifikation | Abhängig von der Länge des Fragments (1 min pro 500 bp) | 72°C |
| 5 | Amplifikation | 5 min | 72°C |
| 6 | | Unbegrenzt | 4°C |

Die Schritte 2-4 wurden 24 mal im Laufe des Programms wiederholt.

2.3.9 „Colony-PCR“

Zur Identifizierung eines positiven Klons nach einer Transformation wurde eine „Colony-PCR“ durchgeführt. Zum Test auf Plasmidgehalt wurden geringe Mengen der *E. coli*-Zellen in den PCR-Ansatz gegeben der folgende Chemikalien enthielt:

10 pmol je Oligonukleotid (sense und antisense)

200 µM der dNTPs

1 U der *Taq* DNA-Polymerase

in 1 x Reaktionspuffer mit 1 mM MgCl₂

PCR-Programm:

| Schritt | Reaktion | Dauer | Temperatur |
|---------|------------------------|---|----------------------------|
| 1 | Initiale Denaturierung | 5 min | 95°C |
| 2 | Denaturierung | 30 sec | 95°C |
| 3 | Hybridisierung | 30 sec | Abhängig vom Oligonukletid |
| 4 | Amplifikation | Abhängig von der Länge des Fragments (1 min pro 750 bp) | 72°C |
| 5 | Amplifikation | 5 min | 72°C |
| 6 | | Unbegrenzt | 4°C |

Die Schritte 2-4 wurden 19 mal im Laufe des Programms wiederholt.

2.3.10 DNA-Sequenzierungsprotokoll

Die Integrität der Sequenzen und die eingefügten Mutationen wurden für alle ClpB-Fragmente mittels einer DNA-Sequenzierung überprüft. Hierfür wurde das BigDye Terminator System von Applied Biosystems (Foster City, Ca, USA) verwendet, das auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden während einer PCR beruht.

Reaktionsansatz für die Sequenzierung von Plasmid-DNA:

500 ng Plasmid-DNA

25 pmol des jeweiligen Oligonukleotids

5 µl des BigDye Terminator Mix (Vers. 3.1)

mit reinst. H₂O ad 20 µl.

PCR-Programm:

| Schritt | Reaktion | Dauer | Temperatur |
|---------|----------------|--------|------------|
| 1 | Denaturierung | 30 sec | 95°C |
| 2 | Hybridisierung | 30 sec | 50°C |
| 3 | Amplifikation | 4 min | 60°C |

Die Schritte 1-3 wurden 20 mal im Laufe des Programms wiederholt.

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch eine Ethanolfällung abgetrennt:

Sequenzierungsansatz mit H₂O ad 100 µl

+ 10 µl Natriumacetat pH 4.8

+ 250 µl 100 % Ethanol

Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert (14000 rpm, 20 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, RT) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die Analyse der Sequenzierungsreaktion wurde mit einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) durchgeführt.

2.3.11 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die *E. coli* Stämme XL-1 und BL21(DE3) wurden in LB-Medium bei 37°C angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0.6 auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5000 g, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden in 80 ml 5 % Glycerin resuspendiert und weitere 320 ml Glycerin zugegeben. Nach einer Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in 20 ml 5 % Glycerin resuspendiert und 380 ml 5 % Glycerin zugegeben. Nach einer Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in 15 ml 5 % Glycerin resuspendiert und 30 ml 5 % Glycerin zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in ca. 5 ml 10 % Glycerin resuspendiert und in 80 µl Aliquots nach Einfrieren in flüssigen N₂ bei – 80°C

gelagert. Für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurden gekühlte Lösungen verwendet.

2.3.12 Transformation von *E. coli*-Zellen

Transformation durch Elektroporation:

Der Ligationsansatz bzw. eine Plasmidlösung wurde für die Transformation von XL-1-Zellen durch Elektroporation eingesetzt. 80 µl kompetenter Zellen und 20 µl des 1:4 verdünnten Ligationsansatzes (Plasmidlösung) wurden auf Eis gemischt und in eine Elektroporationsküvette gefüllt. Bei einem Elektrodenabstand von 2 mm wurde mit 1.5 kV, einem Widerstand von 800 Ohm und einer Kapazität von 25 µF eine elektrische Entladung mit einer Zeitkonstante von ca. 10 ms ausgelöst. Die Transformanten wurden mit 1 ml LB-Medium verdünnt, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und auf Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) ausgestrichen.

Transformation durch Hitzeschock:

Für die Transformation von TG-1-Zellen wurde die Hitzeschock-Methode eingesetzt. 80 µl kompetente Zellen und 20 µl des 1:2 verdünnten Ligationsansatzes wurden gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 2 minütiger Inkubation bei 42°C (Hitzeschock) und kurzem Abkühlen (30 Sekunden auf Eis) wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Transformationsansatz auf Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) ausgestrichen.

Für die Transformation von BL21 Rosetta-Zellen wurde ebenfalls die Hitzeschock-Methode verwendet. 80 µl kompetente Zellen und 20 µl der 1:5 verdünnten Plasmidlösung wurden gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 2 minütiger Inkubation bei 42°C (Hitzeschock) und kurzem Abkühlen (30 Sekunden auf Eis) wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Transformationsansatz auf Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) ausgestrichen.

Chloramphenicol-Stammlösung: 34 mg/ml in Ethanol

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Proteinexpressionen

Vor jeder Expression wurde zunächst das entsprechende Plasmid in den Expressionsstamm transformiert. Die nicht mit einem His-Tag modifizierten Proteine ClpB, ClpB Δ N, ClpB Δ C, ClpB1-828, ClpB1-845, ClpB Δ L und die mit einem His-Tag klonierten Proteine ClpBN, ClpBL wurden in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert.

2TY-Medium (50 μ g/ml Kanamycin) wurde aus einer Übernachtskultur mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm 1:50 angeimpft, und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Expression des rekombinanten Proteins wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5-0.6 mit IPTG (1 mM) induziert. Nach 4 h Induktion bei 37°C wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation pelletiert (6000 g, 4°C, 15 min), das Zellpellet mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Expression von ClpB141-393, ClpB141-519, ClpB394-854 und ClpB519-854 wurde der *E. coli* Stamm BL21 Rosetta verwendet. 2TY-Medium (50 μ g/ml Kanamycin und 34 mg/ml Chloramphenicol) wurde aus einer Übernachtskultur mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm 1:50 angeimpft, und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Überproduktion wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5-0.6 mit IPTG (1 mM) induziert. Nach 3 h Induktion bei 37°C wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation pelletiert (6000 g, 4°C, 15 min), das Zellpellet mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Lactatdehydrogenase aus *B. stearothermophilus* mit N-terminalem His-Tag wurde in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert. LB-Medium (50 μ g/ml Kanamycin) wurde hierzu mit einer Übernachtskultur 1:50 angeimpft, und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Überproduktion wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5-0.6 mit IPTG (1 mM) induziert. Nach 3 h Induktion bei 37°C wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (6000 g, 4°C, 15 min), das Zellpellet mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

2TY-Medium: 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, auf pH 7.2 mit NaOH eingestellt.

2.4.2 Proteinaufreinigung

2.4.2.1 Proteine ohne His-Tag

ClpB, ClpB Δ N, ClpB Δ C und ClpB Δ L wurden folgendermaßen gereinigt (Schlee et al., 2001): Die Zellen wurden in Gegenwart von Proteaseinhibitoren in Lysepuffer aufgetaut und nach Homogenisierung der Suspension mit einem Homogenisator (Novodirect, Kehl) in einem Microfluidizer (Microfluidics, Newton, Mass, USA) bei einem Druck von 600 kPa unter Kühlung der Druckzelle aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Beckman Ti-45 Rotor, 35000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt. Die Proteine wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat (40 % Sättigung) aus dem Überstand gefällt und durch Zentrifugation (Beckman Ti-45 Rotor, 35000 rpm, 4°C, 30 min) pelletiert. Nach Auflösen des Pellets in Puffer A wurde das Protein für 4 Stunden und über Nacht gegen je 2 l Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde nochmals zentrifugiert (Beckman Ti-45 Rotor, 35000 rpm, 4°C, 30 min) und die Proteine im Überstand einer Anionenaustauscher-Chromatographie an EMD-DEAE (EMD-DEAE-Säule, 300 ml, Merck, Darmstadt) unterworfen. Der Ansatz wurde mit 5 ml/min auf die mit Puffer A äquilibrierte EMD-DEAE-Säule aufgetragen und ein linearer Gradient von 0-40 % Puffer B mit 6 ml/min gefahren. Die Proteine eluierten in einem Bereich zwischen 230 und 260 mM KCl. Proteinhaltige Fraktionen (Überprüfung mittels SDS-PAGE) wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfatfällung (40 % Sättigung) konzentriert.

Für die folgende Gelfiltration wurde das Ammoniumsulfatpellet in S300-Puffer aufgenommen und mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine in S300-Puffer äquilibrierte Sephacryl 300-Säule (60 ml, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und in Ultrafiltrationskammern (Millipore, Eschborn) auf eine Konzentration von ca. 10 mg/ml konzentriert. Die Proteine wurden in 1 ml Aliquots nach Einfrieren in flüssigem N₂ bei -80°C gelagert.

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTE, 10 % (v/v) Glycerin, 0.2 mM PMSF mit 100 µg DNase I

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 10 % (v/v) Glycerin

Puffer B: Puffer A mit 1 M KCl

S300-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 10 % (v/v) Glycerin

2.4.2.2 Proteine mit His-Tag

Proteine mit His-Tags wurden mittels Superflow Ni-NTA Sepharose der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Zellen wurden in Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren aufgetaut und nach Homogenisieren der Suspension mit einem Homogenisator in einem Microfluidizer bei einem Druck von 600 kPa unter Kühlung der Druckzelle aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Beckman Ti-45 Rotor, 35000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt.

Der Überstand wurde mit 1 ml/min auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule gegeben und mit Lysepuffer (2 ml/min) gewaschen. Nach Waschen mit dem Waschpuffer (2 ml/min) wurde das Protein mit dem Elutionspuffer (2 ml/min) eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen (Überprüfung mittels SDS-PAGE) wurden vereinigt und mittels Ultrafiltrationskammern aufkonzentriert. Für eine Abtrennung des His-Tags mit Thrombin wurde die Proteinlösung für 4 Stunden und über Nacht gegen je 2 l Gelfiltrationspuffer dialysiert. Der Thrombinverdau wurde im Anschluss bei 37°C mit 1 U Thrombin pro 10 mg Protein durchgeführt. Nach vollständiger Reaktion wurde die Reaktion durch Zugabe von PMSF (0.2 mM) gestoppt. Nach dem Entfernen des His-Tags mit Thrombin verbleiben 3 zusätzliche Aminosäuren (GSH) am N-Terminus des Proteins. Das Abtrennen des nicht geschnittenen Proteins bzw. der abgetrennten His-Tags erfolgte durch eine erneute Chromatographie mit der Ni-NTA Matrix. Die Probe wurde mit 2 ml/min nach Einstellen des Reaktionsansatzes auf 20 mM Imidazol auf die mit Puffer äquilibrierte Säule injiziert. Durch das Abtrennen des His-Tags interagiert das Protein nicht mehr an die Ni-NTA Matrix, nicht geschnittenes Protein und His-Tags eluieren im Elutionspuffer.

Für die anschließende Gelfiltration wurde das mit Thrombin geschnittene Protein zuvor in Ultrafiltrationskammern aufkonzentriert. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte S200-Säule bzw. S75-Säule bei ClpBN und ClpBL aufgetragen (60 ml, Merck, Darmstadt). Proteinhaltige Fraktionen (Kontrolle durch SDS-Page) wurden vereinigt und in Ultrafiltrationskammern aufkonzentriert. Die Proteine wurden in 1 ml Aliquots nach Einfrieren in flüssigem N₂ bei -80°C gelagert.

Lysepuffer: 50 mM Natriumphosphat pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol

Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 10 % (v/v) Glycerin

LDH von *B. stearothermophilus* mit N-terminalen His-Tag wurde aufgereinigt wie beschrieben (Halliwell et al., 2001). DnaK_{Tth}, DnaJ_{Tth} und GrpE_{Tth} wurden gereinigt wie beschrieben (Klostermeier et al., 1998; Klostermeier et al., 1999; Groemping et al., 2001) und von Sandra Schlee und Petra Herde zur Verfügung gestellt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen zur Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Das Trenngel enthielt 15 % Acrylamid, 0.4 % Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8.8 und 0.4 % SDS, das Sammelgel 4.5 % Acrylamid, 0.12 % Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6.8 und 0.4 % SDS. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 μ l 10 % APS-Lösung und 5 μ l TEMED pro 10 ml Volumen gestartet.

Vor dem Auftragen wurden Proteinproben mit Probenpuffer gemischt und 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in Mini 2D-Gelkammern (Biorad, München) mit SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15 Minuten in Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung entfärbt.

4-fach-Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 200 mM DTE, 4 % (w/v) SDS, 0.02 % (w/v)

Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

Färbelösung: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0.1 % (w/v) Coomassie Blue-R250, 0.01 % Coomassie Blue-G250

Entfärbelösung: 20 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Ethanol

Als Molekulargewichtsstandard diente eine Mischung aus Phosphorylase b (97 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa).

2.4.4 TCA-Fällung von Proteinen

Für eine quantitative Proteinfällung wurde die Proteinlösung auf 10 % (w/v) TCA eingestellt. Nach Inkubation auf Eis (15 Minuten) wurde das entstandene Präzipitat durch Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde zur Neutralisation zu zwei Volumen einer 2 M Natriumacetat-Lösung gegeben. Eine eventuelle Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.4.5 Bestimmung des Nukleotidgehalts von Lösungen

Messungen der Nukleotidbindung und kinetische Messungen der ATP-Hydrolyseaktivität von Proteinen müssen mit nukleotidfreiem Protein vorgenommen werden. Die Nukleotidzusammensetzung von Lösungen zu einem definierten Zeitpunkt während einer ATP-Hydrolysereaktion kann nur nach Stoppen der ATP-Hydrolyse genau bestimmt werden. Daher erfolgte die Bestimmung der Nukleotidkonzentrationen im Anschluss an eine TCA-Fällung durch eine HPLC Analyse.

10 µl einer 1:10 oder 1:50 Verdünnung des neutralisierten Überstands der TCA-Fällung wurden auf eine, mit Laufpuffer äquilibrierte, ODS Hypersil Reversed Phase C-18-Säule (5 µm, 120 x 4.6 mm, Bischoff, Leonberg) aufgetragen. Die Säule wurde mit 1.5 ml/min entwickelt und die Detektion erfolgte über die Absorption bei 254 nm.

Durch den Vergleich der Peakfläche mit einer Kalibrierkurve mit Nukleotidlösungen unterschiedlicher Konzentrationen konnte so die Nukleotidkonzentration in der Probe und bei Kenntnis der Proteinkonzentration der relative Nukleotidgehalt des Proteins berechnet werden.

Laufpuffer: 50 mM KPi pH 6.8

2.4.6 Analytische Gelfiltrationen der Proteine

2.4.6.1 Gelfiltrationen zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von ClpB, ClpBΔN, ClpB1-845, ClpB1-828 und ClpBΔC

Die Oligomerisierung der Proteine wurde durch Gelfiltration mit einer Superdex S200-Säule (1.5 x 30 cm; Amersham Bioscience, Freiburg) mit einem Waters HPLC-System analysiert. Die KCl-Konzentration (1-500 mM) sowie der Nukleotidgehalt (1 mM ADP bzw. ATP) im Laufpuffer variieren je nach Angabe. 50 µl der Proteinlösung (5 mg/ml) wurden appliziert und die Elution der Probe bei einer Flussrate von 0.2 ml/min über die Absorption bei 290 nm verfolgt. Mit Hilfe einer Eichgerade (Gelfiltrationsstandard) wurde das Molekulargewicht von Proteinen anhand der Retentionszeiten (Rt) bestimmt. Für ClpB, ClpBΔN, ClpBΔC, ClpB1-845 und ClpB1-828 wurde die zuvor ermittelte Eichgerade verwendet (Schlee et al., 2001):
$$Rt = (\ln A - \ln(MW))/k, A = 57836.1 \text{ kDa}, k = 0.10227 \text{ min}^{-1}.$$

Ausgehend von den aus der Eichkurve ermittelten Parametern wurden die Grenzen für die verschiedenen Oligomere von ClpB (MW 96.2 kDa), ClpBΔN (MW 80.1 kDa), ClpB1-845 (MW 95.1 kDa), ClpB1-828 (MW 93.6 kDa) und ClpBΔC (86.0 kDa) festgelegt und sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1-500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, 10 % Glycerin

Tab. 2.3 Retentionszeiten der ClpB-Oligomere bei der Gelfiltration

Die Retentionszeiten (Rt) wurden mit den aus der Eichgerade ermittelten Konstanten berechnet:
 $A = 57836.1 \text{ kDa}$, $k = 0.10227 \text{ min}^{-1}$, $Rt = (\ln A - \ln(MW))/k$.

| Protein | Oligomere Form | MW (kDa) | Rt (min) |
|-----------------|----------------|----------|-----------|
| ClpB | Monomer | 80-150 | 64.5-58.2 |
| ClpB | Dimer | 150-240 | 58.2-53.6 |
| ClpB | Trimer | 240-340 | 53.6-50.2 |
| ClpB | bis Hexamer | 340-590 | 50.2-44.9 |
| ClpB Δ N | Monomer | 60-130 | 65.7-59.6 |
| ClpB Δ N | Dimer | 130-200 | 59.6-55.4 |
| ClpB Δ N | Trimer | 200-290 | 55.4-51.8 |
| ClpB Δ N | bis Hexamer | 290-530 | 51.8-45.9 |
| ClpB1-845 | Monomer | 80-150 | 64.5-58.2 |
| ClpB1-845 | Dimer | 150-240 | 58.2-53.6 |
| ClpB1-845 | Trimer | 240-340 | 53.6-50.2 |
| ClpB1-845 | bis Hexamer | 340-590 | 50.2-44.9 |
| ClpB1-828 | Monomer | 80-150 | 64.8-58.2 |
| ClpB1-828 | Dimer | 150-240 | 58.2-53.6 |
| ClpB1-828 | Trimer | 240-330 | 53.6-50.5 |
| ClpB1-828 | bis Hexamer | 330-580 | 50.5-45.0 |
| ClpB Δ C | Monomer | 70-140 | 65.8-58.9 |
| ClpB Δ C | Dimer | 140-200 | 58.9-55.4 |
| ClpB Δ C | Trimer | 200-290 | 55.4-51.8 |
| ClpB Δ C | bis Hexamer | 290-530 | 51.8-45.9 |

2.4.6.2 Gelfiltrationen zur Bestimmung des Oligomerisierungspotentials der AAA-Kassetten

Die Gelfiltrationen wurden, wie in Abschnitt 2.4.6.1 beschrieben, durchgeführt. Für die Proteine Clp141-393 (28.3kDa), ClpB141-519 (MW 43.2 kDa), ClpB519-854 (MW 38.3kDa), ClpB394-854 (MW 53.1 kDa), ClpB Δ L (MW 80.1 kDa) und ClpBL (MW 17.8 kDa) wurde eine neue Eichgerade mittels des Gelfiltrationsstandard erstellt mit einer Exponentialgleichung ausgewertet. $Rt = (\ln A - \ln(MW))/k$, $A = 58420.1 \text{ kDa}$, $k = 0.1015 \text{ min}^{-1}$.

Die Eichgerade ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Durch die ermittelten Parameter konnten die Grenzen der Retentionszeiten (Rt) für die Oligomere der Proteine festgelegt werden. Mittels dieser Eichgerade wurde auch der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 untersucht. Für die Einteilung in bestimmte Oligomere wurden die Grenzen wie für ClpB Δ N verwendet (siehe Tab. 2.3).

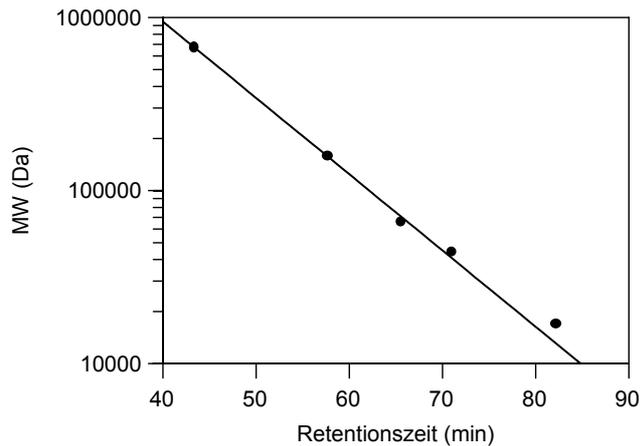


Abb. 2.1 Eichkurve für S200-Gelfiltration (0.2 ml/min)

Die Retentionszeiten von Thyroglobulin (670 kD, $R_t = 43.4$ min), Gammaglobulin (158 kD, $R_t = 57.7$ min), BSA (67 kDa $R_t = 65.5$ min), Ovalbumin (44 kD, $R_t = 71.0$ min), Myoglobin (17 kD, $R_t = 82.2$ min) bei einer Flussrate von 0.2 ml/min wurden gegen das Molekulargewicht aufgetragen und an eine exponentielle Gleichung ($MW = A \cdot e^{-k \cdot R_t}$) angepasst.

Tabelle 2.4 Retentionszeiten der oligomeren Proteinformen bei der Gelfiltration

Die Retentionszeiten (R_t) wurden mit den aus der Eichgerade ermittelten Konstanten berechnet: $A = 58420.1$ kDa, $k = 0.1015 \text{ min}^{-1}$, $R_t = (\ln A - \ln(MW))/k$.

| Protein | Oligomere Form | MW (kDa) | R_t (min) |
|-----------------|----------------|----------|-------------|
| ClpB141-393 | Monomer | 20-45 | 78.0-70.0 |
| ClpB141-393 | Dimer | 45-70 | 70.0-65.6 |
| ClpB141-393 | Trimer | 70-100 | 65.6-62.1 |
| ClpB141-393 | bis Hexamer | 100-180 | 62.1-56.3 |
| ClpB141-519 | Monomer | 30-60 | 74.1-67.2 |
| ClpB141-519 | Dimer | 60-100 | 67.2-62.1 |
| ClpB141-519 | Trimer | 100-150 | 62.1-58.1 |
| ClpB141-519 | bis Hexamer | 150-270 | 58.1-52.3 |
| ClpB519-854 | Monomer | 25-55 | 75.8-68.1 |
| ClpB519-854 | Dimer | 55-90 | 68.1-63.2 |
| ClpB519-854 | Trimer | 90-140 | 63.2-58.8 |
| ClpB519-854 | bis Hexamer | 140-250 | 58.8-53.1 |
| ClpB394-854 | Monomer | 35-75 | 72.5-65.0 |
| ClpB394-854 | Dimer | 75-130 | 65.0-59.5 |
| ClpB394-854 | Trimer | 130-190 | 59.5-55.8 |
| ClpB394-854 | bis Hexamer | 190-320 | 55.8-50.7 |
| ClpB Δ L | Monomer | 60-130 | 67.2-59.6 |
| ClpB Δ L | Dimer | 130-200 | 59.6-55.3 |
| ClpB Δ L | Trimer | 200-290 | 55.3-51.7 |
| ClpB Δ L | bis Hexamer | 290-530 | 51.7-45.7 |
| ClpBL | Monomer | 12.5-25 | 82.6-75.8 |
| ClpBL | Dimer | 25-45 | 75.8-70.0 |
| ClpBL | Trimer | 45-65 | 70.0-66.4 |
| ClpBL | bis Hexamer | 65-110 | 66.4-61.2 |

2.4.6.3 Gelfiltrationen zur Untersuchung der Komplexe aus ClpB Δ N mit ClpBN und ClpB Δ L mit ClpBL

Die Komplexbildung der Proteine wurde durch Gelfiltration mit einer Superdex S200-Säule mit einem Waters HPLC-System analysiert. Der Laufpuffer enthielt 1 mM KCl und 1 mM ATP. 50 μ l der Proteinlösungen wurden appliziert und die Elution der Probe bei einer Flussrate von 0.4 ml/min über die Absorption bei 290 nm verfolgt. Mit Hilfe einer Eichgerade (Daten nicht gezeigt) wurde das Molekulargewicht der Proteine anhand der Retentionszeiten bestimmt.

$Rt = (\ln A - \ln(MW))/k$; bestimmte Parameter: $A = 47274.4$ kDa, $k = 0.1953 \text{ min}^{-1}$

2.4.7 Single turnover ATPase-Messungen

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität bei einmaligen Umsatz (single turnover) wurde das entsprechende Protein (100 μ M) mit ATP (50 μ M) in SFP bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, die Proteine mit TCA gefällt und der Nukleotidgehalt mittels HPLC bestimmt. Die relativen Mengen von ATP und ADP wurden aus den integrierten Peakflächen der Absorption bei 254 nm berechnet. Die Hydrolyserate wurde aus einer Anpassung der Daten (% Hydrolyse gegen die Zeit) an eine exponentielle Funktion ermittelt. $y = A \cdot (1 - e^{-kt})$

Die ATPase-Aktivität von ClpB519-854 und ClpB394-854 wurde mit einer Quench Flow Anlage (RQF-3, KinTek Corp., University Park, PA, USA) bei 25°C untersucht. Die Reaktionen wurden durch schnelles Mischen der Reaktanden in SFP (je 15 μ l) gestartet und durch Zugabe von Trifluoressigsäure (0.6 %) gestoppt und der Nukleotidgehalt mittels HPLC bestimmt. Die relativen Mengen von ATP und ADP wurden aus den integrierten Peakflächen der Absorption bei 254 nm berechnet. Die Hydrolyserate wurde aus einer Anpassung der Daten (% Hydrolyse gegen die Zeit) an eine Exponentialfunktion mit Offset ermittelt.

$y = O + A \cdot (1 - e^{-kt})$

SFP: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTE

2.4.8 Koppletierungsexperimente von LDH mit ClpB

500 μ l Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) wurde mit dreimal 1000 μ l NTA-Puffer durch Aufschwemmen der Matrix, Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, RT) und Abnehmen des Überstandes gewaschen. Für die Experimente wurde LDH von *B. stearothermophilus* mit N-terminalem His-Tag verwendet.

2.0 μ M LDH wurde 30 min bei 80°C in Bindungspuffer denaturiert. Nach der Denaturierung wurde 1.0 μ M ClpB zugeben und 5 Minuten bei 50°C inkubiert. Zur Kopplung wurde 25 μ l Ni-NTA-Agarose mit 500 μ l der LDH-ClpB Mischung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, RT) wurde der Überstand entfernt. Das Pellet

Material und Methoden

wurde mit 500 µl Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, RT) wurde der Überstand des Waschschriffs abgenommen und die gebundenen Proteine mit 100 µl Elutionspuffer eluiert. Ein Aliquot (10 µl) des Auftrags, des Überstand des Auftrags, des Überstands des Waschpuffers und der Eluate wurde durch SDS-PAGE analysiert. Unspezifische Bindung von ClpB an die Agarose-Matrix wurde durch Kontrollexperimente mit nativer LDH und BSA quantifiziert. Für die Experimente mit ATP und ADP wurden die Nukleotide (1 mM) den Puffern zugesetzt.

Bindungspuffer: 50 mM MOPS/HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM β-Mercaptoethanol, 10 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM MOPS/HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM β-Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleotiden

Absorptionsmessungen für Konzentrationsbestimmungen wurden an einem Spektrophotometer durchgeführt.

Proteinkonzentrationsbestimmung:

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Ehresmann (Ehresmann et al., 1973) durch Messung der Absorption bei 228.5 nm und 234.5 nm in Quarzküvetten bestimmt. Die Proteinkonzentration in mg/ml ergibt sich nach Gleichung 2.1:

$$c = (A_{228.5} - A_{234.5}) / 3.14 \quad (\text{Gl. 2.1})$$

c: Proteinkonzentration in mg/ml

$A_{228.5}$: Absorption bei 228.5 nm

$A_{234.5}$: Absorption bei 234.5 nm

Da die Methode nach Ehresmann nur bei reinen Proteinen zuverlässige Ergebnisse liefert, wurde zusätzlich die Methode von Bradford (Bradford, 1976) zur Konzentrationsbestimmung angewendet. Diese Methode nutzt die Bindung von globulären Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Absorption der Protein-Farbstoffmischung bei 595 nm ist in einem Konzentrationsbereich von 1-10 µg/ml linear abhängig von der Proteinkonzentration und kann nach Erstellung einer Eichgeraden mit BSA zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen angewendet werden.

Nukleotidkonzentrationsbestimmung:

Nukleotidkonzentrationen wurden photometrisch in Quarzküvetten mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt (Gleichung 2.2):

$$A = c \cdot d \cdot \epsilon \quad (\text{Gl. 2.2})$$

A: Absorption

ϵ : Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke in cm

c: Konzentration in M

Verwendung wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten (25°C, pH 7.5):

(AXP) $\epsilon_{259} = 15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (Mant-AXP) $\epsilon_{255} = 23300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hiratsuka, 1983).

2.5.2 Bestimmung der Steady State ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität von ClpB unter Steady State Bedingungen wurde im gekoppelten Enzymtest nach Bergmeyer in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems bestimmt (Adam, 1962). Die Hydrolyse von ATP durch das entsprechende Protein (10 µM) wurde

dabei über die Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt, die mit einer Abnahme der Absorption bei 340 nm verbunden ist. Die Aktivität der zu untersuchenden Proben wurde in einem Reaktionsvolumen von 150 μl in NADH-Puffer (20 $\mu\text{g/ml}$ LDH, 50 $\mu\text{g/ml}$ PK) und unterschiedlichen Mg•ATP-Konzentrationen (0.1 - 5 mM) bestimmt. Die Messungen erfolgten in Mikrotiterplatten und wurden durch Zugabe der Proteinprobe gestartet. Für die Untersuchungen zur Stimulierung der ATPase-Aktivität wurden κ -Casein bzw. Poly-L-Lysin (15-30 kDa) den Ansätzen zugegeben.

NADH-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 0.4 mM PEP, 0.5 mM NADH, 0.1 mg/ml BSA

Die Umsatzrate der ATPase-Reaktion (k) ergibt sich nach Gleichung 2.3:

$$k = \Delta A / (\epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot c) \quad (\text{Gl. 2.3})$$

k: Umsatzrate in s^{-1}

ΔA : Änderung der Absorption bei 340 nm pro s

ϵ_{NADH} : Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d: Schichtdicke (0.4 cm)

c: Proteinkonzentration in M

Zeigte die Auftragung der ATPase-Aktivität (k) gegen die eingesetzte ATP-Konzentration einen sigmoiden Kurvenverlauf, so wurden die Daten an die Hill-Gleichung (Gl. 2.4) angepasst.

$$k = k_{\text{cat}} \cdot S^n / (K_m^n + S^n) \quad (\text{Gl. 2.4})$$

k: Umsatzrate in s^{-1} bei bestimmter ATP-Konzentration

k_{cat} : Umsatzrate in s^{-1} bei ATP-Sättigung

S: ATP-Konzentration (mM)

K_m : Substratkonzentration (mM) mit halbmaximaler Enzymaktivität

n: Hill-Koeffizient

2.5.3 Zircularer Dichroismus (CD)

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte an einem Jasco-J 710 Spektropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan). Fern-UV-Spektren wurden im Bereich von 200-250 nm in einer Küvette mit 0.02 cm Schichtdicke bei 25°C mit 50 nm/min bei einer Empfindlichkeit von 100 mGrad, einer Zeitkonstante von 1 s aufgenommen und 10-fach akkumuliert. Sämtliche Spektren wurden um den Pufferbeitrag korrigiert. Die Proteinkonzentration bei den Messungen betrug ca. 3 mg/ml.

Die gemessene Elliptizität in Grad wurde nach Gleichung 2.5 in die mittlere molare Elliptizität in Grad pro Aminosäurerest $[\Theta]_{\text{MRE}}$ umgerechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRE}} = \Theta \cdot 100 / (c \cdot d \cdot N) \quad (\text{Gl. 2.5})$$

$[\Theta]_{\text{MRE}}$: mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest in Grad $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$

Θ : gemessene Elliptizität in Grad

c: Proteinkonzentration in M

d: Schichttiefe in cm

N: Anzahl der Aminosäuren des Proteins

2.5.4 Fluoreszenzspektroskopie

2.5.4.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Gleichgewichtstitration

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Aminco Bowman 8100 Fluorimeter (SLM, Urbana, USA) in Standardfluoreszenzpuffer (SFP) bei 25°C durchgeführt.

Zur Ermittlung von Gleichgewichtskonstanten wurde der fluoreszierende Ligand vorgelegt, die Konzentration des Bindungspartners schrittweise erhöht und die Fluoreszenzzunahme gemessen. Die Mant-Fluoreszenz wurde bei 360 nm (Spaltbreite 1 – 2 nm) angeregt und die Emission bei 440 nm (Spaltbreite 16 nm) aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) wurde das gemessene Fluoreszenzsignal in jedem Titrationsschritt nach Berücksichtigung der Volumenänderung mit der Konzentration des zugegebenen Bindungspartners in Beziehung gesetzt und eine Kurvenanpassung nach der quadratischen Gleichung (Gl. 2.6) vorgenommen. Die Herleitung der Gleichung wird im Anhang erläutert. Die freien Parameter dieser Gleichung (K_d , F_{max} und F_0) wurden mit dem Programm GraFit (Version 3.09b, Erithacus Software Ltd., Staines, Großbritannien) iterativ an die gemessenen Daten angepasst.

$$F = F_0 + (F_{\text{max}} - F_0) \cdot \frac{\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\frac{([E]_0 + [L]_0 + K_d)^2}{4} - [E]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0}} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

F: Volumen-korrigierte Fluoreszenzemission bei einer bestimmten Proteinkonzentration

F_{max} : Fluoreszenz bei Substratsättigung

F_0 : Fluoreszenz des freien Fluorophors

$[E]_0$: Gesamtkonzentration des Proteins in μM

$[L]_0$: Gesamtkonzentration des Fluorophors in μM

K_d : Dissoziationskonstante des Komplexes in μM

Die Affinität eines nicht-fluoreszierenden Liganden kann durch Verdrängungstitration ermittelt werden, wenn dieser mit einem fluoreszierenden Liganden um die gleiche Bindungsstelle am Enzym konkurriert. Hierzu wurde eine Mischung aus Mant-Nukleotid und ClpB vorgelegt und der nichtfluoreszierende Ligand bis zum Erreichen der Grundfluoreszenz zugegeben. Die Herleitung der Gleichung, die die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Kompetitors beschreibt, erfordert die Lösung eines Polynom dritten Grades und ist im Anhang dargestellt (kubische Gleichung (Thrall et al., 1996)). Die entsprechenden Gleichungen sind in einem TurboPascal-Programm (Jochen Reinstein, unveröffentlicht) zusammengefasst, das mit der bekannten Dissoziationskonstante für den fluoreszierenden Liganden über einen nichtlinearen Minimierungsalgorithmus eine Kurvenanpassung an die Daten erlaubt.

SFP: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTE

2.5.4.2 Bindung von Liganden an FITC-Casein

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem SLM Aminco AB2 Fluorimeter (SLM, Urbana, USA) in Standardfluoreszenzpuffer (SFP) mit 0.1 mg/ml BSA bei 25°C durchgeführt. Da FITC-Casein nicht in einem definierten Zustand vorliegt und zudem die FITC-Markierung unspezifisch ist und somit von Molekül zu Molekül variiert, war die Bestimmung von Dissoziationskonstanten nicht möglich. Durch Auftragen der volumenkorrigierten Fluoreszenz gegen die Konzentration des zugegebenen Liganden konnten jedoch Aussagen über relative Bindungsaffinitäten getroffen werden. 0.1 mg/ml FITC-Casein Type I wurde vorgelegt und die Konzentration des Bindungspartners schrittweise erhöht. Die Fluoreszenz von FITC-Casein wurde bei 490 nm (Spaltbreite 1 nm) angeregt und die Emission bei 520 nm (Spaltbreite 16 nm) aufgezeichnet. Die Möglichkeit der Signalgebung durch Lichtstreuung wurde durch eine Variation der Anregungswellenlänge ausgeschlossen.

SFP: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTE

2.5.5 Lichtstreuungsmessungen

Lichtstreuungsmessungen wurden an einem SLM Aminco AB2 Fluorimeter (SLM, Urbana, USA) durchgeführt. Die Substratproteine wurden bei 55°C in Denaturierungspuffer aufgenommen und die Lichtstreuung bei 550 nm bestimmt. Anregung und Emissionswellenlängen waren somit identisch, die Spaltbreiten betragen 1 nm (Anregung) und 16 nm (Emission). Für die Messungen wurde eine verschließbare Fluoreszenzküvette verwendet, um den Volumenverlust bei der Erwärmung auf 75 bzw. 80°C (LDH) zu minimieren.

Denaturierungspuffer: 50 mM MOPS/NaOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 2 mM DTE

2.6 Rückfaltungsassays

Durch die *in vitro* Rückfaltungsassays sollte die Chaperonaktivität von ClpB mit verschiedenen Substraten getestet werden. Um die thermophilen Eigenschaften der Chaperone aus *T. thermophilus* zu berücksichtigen, wurden zusätzlich zu dem bereits existierenden Substratprotein Luciferase neue Substrate aus *B. stearothermophilus* etabliert.

2.6.1 α -Glucosidase

Die Chaperonaktivität von ClpB wurde anhand der Renaturierung von hitzedenaturierter α -Glucosidase aus *B. stearothermophilus* gemessen (Motohashi et al., 1999). α -Glucosidase (555 Aminosäuren, 65 kDa) katalysiert die Abspaltung von p-Nitrophenol aus dem Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid. Die Entstehung des p-Nitrophenols kann bei 405 nm detektiert werden.

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 min bei 75°C in Denaturierungspuffer vollständig denaturiert, dann die angegebenen Chaperone (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) zugegeben und bei 55°C inkubiert. An den angegebenen Messpunkten wurden 20 μ l der Reaktion entnommen und 1:10 in Assaypuffer verdünnt. Die α -Glucosidase-Aktivität wurde in Mikrotiterplatten bei 40°C anhand der zeitabhängigen Absorptionzunahme bei 405 nm bestimmt. Die Aktivität der nicht denaturierten α -Glucosidase entsprach einer Aktivität von 100 %. Bei den Versuchen zum ATP-Verbrauch während der Rückfaltungsreaktion wurden auch andere Substratproteinkonzentrationen eingesetzt. Der Verdünnungsfaktor durch Zugabe eines Aliquots des Rückfaltungsansatzes in den vorgelegten Assaypuffer und gegebenenfalls die Reaktionstemperatur wurden so modifiziert, dass stets ein linearer Messbereich vorhanden war.

Denaturierungspuffer: 50 mM MOPS/NaOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂,

5 mM ATP, 2 mM DTE

Assaypuffer: 50 mM KPi pH 6.8, 2 mM p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid

2.6.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Chaperonaktivität von ClpB wurde auch anhand der Renaturierung von hitzedenaturierter Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (GPDH) aus *B. stearothermophilus* gemessen. GPDH katalysiert die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat, was mit der Reduktion von NADP zu NADPH gekoppelt ist. Diese Reaktion wurde über die Zunahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt (Watanabe et al., 2000). Die Aminosäuresequenz von GPDH wurde mittels einer Datenbankrecherche in dem Contig 321 des *B. stearothermophilus* Genomsequenzierungsprojekt der Universität Oklahoma (Oklahoma City, OK, USA) identifiziert. Als Suchmatrize wurde die Sequenz des homologen

Proteins aus *B. subtilis* verwendet. Die bestimmte Aminosäuresequenz (497 Aminosäuren, 57.2 kDa) stimmte mit der durch MALDI-MS bestimmten Masse des Proteins von 57.2 kDa überein. GPDH (0.2 μ M) wurde 7½ min bei 75°C in Denaturierungspuffer vollständig denaturiert, dann die angegebenen Chaperone (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) zugegeben und bei 55°C inkubiert. An den angegebenen Messpunkten wurden 10 μ l der Reaktion entnommen und 1:40 in Assaypuffer verdünnt. Die GPDH-Aktivität wurde in Mikrotiterplatten bei 25°C anhand der zeitabhängigen Absorptionzunahme bei 340 nm bestimmt. Die Aktivität der nicht denaturierten GPDH entsprach einer Aktivität von 100 %. Bei den Versuchen zum ATP-Verbrauch während der Rückfaltungsreaktion wurden auch andere Substratproteinkonzentrationen eingesetzt. Der Verdünnungsfaktor durch Zugabe eines Aliquots des Rückfaltungsansatzes in den vorgelegten Assaypuffer wurde so gewählt, dass stets ein linearer Messbereich vorhanden war.

Denaturierungspuffer: 50 mM MOPS/NaOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂,
5 mM ATP, 2 mM DTE

Assaypuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8.8, 40 mM MgCl₂, 3 mM Glucose-6-Phosphat,
1 mM NADP, 0.1 mg/ml BSA

2.6.3 Lactatdehydrogenase

Die Chaperonaktivität von ClpB wurde zusätzlich mittels der Renaturierung von hitzedenaturierter Lactatdehydrogenase (LDH) aus *B. stearothermophilus* gemessen. LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat, was mit der Oxidation von NADH zu NAD gekoppelt ist. Diese Reaktion wurde über die Abnahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt. Die zunächst verwendete LDH (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) war sehr stabil und die verschiedenen Produktionschargen wiesen eine stark schwankende Aktivität auf (Watanabe et al., 2000). Daher wurde LDH von *B. stearothermophilus* mit N-terminalem His-Tag exprimiert und aufgereinigt. Der eingefügte His-Tag hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms (Halliwell et al., 2001).

LDH (0.2 μ M) wurde 30 min bei 80°C in Denaturierungspuffer denaturiert, dann die angegebenen Chaperone (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) zugegeben und bei 55°C inkubiert. An den angegebenen Messpunkten wurden 5 μ l der Reaktion entnommen mit 193 μ l Assaypuffer verdünnt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l Pyruvatstammlösung (1 M) gestartet und die LDH-Aktivität in Mikrotiterplatten bei 25°C anhand der zeitabhängigen Absorptionsabnahme bei 340 nm bestimmt. Die Aktivität der nicht denaturierten GPDH entspricht einer Aktivität von 100 %.

Denaturierungspuffer: 50 mM MOPS/NaOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 2 mM DTE

Assaypuffer: 25 mM Bis/Tris pH 6.5, 50 mM KCl, 0.25 mM NADH

2.6.4 Luciferase

Luciferase katalysiert die mit Lichtemission verbundene, ATP-abhängige Oxidation des Substrates Luciferin. Die Lumineszenzausbeute wurde als Maß für die Luciferaseaktivität verwendet. Der Assay wurde in Lumineszenzpuffer bei 25°C durchgeführt, die Mikrotiterplatten (White Cliniplate, Labsystems, Helsinki, Finnland) wurden vor ihrer Benutzung 30 Minuten mit BSA-Lösung (1 mg/ml) inkubiert.

Hitzedenaturierung:

Luciferase (0.8 µM) wurde in Denaturierungspuffer 30 Minuten bei 42°C denaturiert und dann 1:10 in Lumineszenzpuffer mit Chaperonen verdünnt (3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE, 0.5 µM ClpB). 250 µl dieses Reaktionsgemisches wurden in Mikrotiterplatten gefüllt und die Rückfaltung der Luciferase anhand der produzierten Lumineszenz kontinuierlich verfolgt.

Denaturierungspuffer: 25 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP

Lumineszenzpuffer: 25 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoenzymA, 0.1 mM Luciferin

Harnstoffdenaturierung:

Luciferase (10 µM) wurde in Denaturierungspuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert und dann 1:125 in Lumineszenzpuffer mit Chaperonen verdünnt (3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE, 0.5 µM ClpB). 250 µl dieses Reaktionsgemisches wurden in Mikrotiterplatten gefüllt und die Rückfaltung der Luciferase anhand der produzierten Lumineszenz kontinuierlich verfolgt.

Denaturierungspuffer: 25 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 7 M Harnstoff

Lumineszenzpuffer: 25 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoenzymA, 0.1 mM Luciferin, 10 mM PEP, 50 µg/ml PK

2.7 Geräte

HPLC

Für die analytische Gelfiltration und die Bestimmung des Nukleotidverhältnisses während Rückfaltungsreaktionen wurde ein computergesteuertes System von Waters (Milford, Mass, USA), bestehend aus Pumpe, Autosampler, automatischer Entgasereinheit, Absorptionsdetektor, Fraktionssammler und der Software Millennium32 (Version 3.05) benutzt.

Für die Analyse des „single turnover“ ATPase-Messungen und die Bestimmung des Nukleotidgehalts von Proteinen wurde ein Latek P403 HPLC-System mit Integrator verwendet (Latek, Heidelberg).

FPLC

Die säulenchromatographischen Reinigungsschritte wurden an einer Waters FPLC 650E bestehend aus Pumpe, Autosampler, Mehrfach-Wellenlängen-Detektor 490E und Analog-Schreiber durchgeführt.

PCR

Für die durchgeführten Reaktionen wurde ein PTC-200 Thermocycler verwendet (MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf).

Mikrotiterplattenmessungen

Absorptionsmessungen:

Für Messungen der Steady State ATPase-Aktivität und die Rückfaltungsassays mit α -Glucosidase, GPDH und LDH wurde ein iEMS Reader für Mikrotiterplatten (96 wells) eingesetzt (Labsystems, Helsinki, Finnland).

Lumineszenzmessungen:

Die Lumineszenz wurde in einem Fluoroskan FL für Mikrotiterplatten gemessen (Labsystems, Helsinki, Finnland).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung neuer Substratproteine für das DnaK-ClpB-System aus *Thermus thermophilus*

Luciferase von *P. pyralis* ist als Substrat für das DnaK-ClpB-System von *E. coli* und *T. thermophilus* etabliert (Zolkiewski, 1999; Schlee et al., 2001). Im nativen Zustand setzt Luciferase das Substrat Luciferin unter ATP-Verbrauch zu Oxyluciferin um. Bei dieser Reaktion wird freiwerdende Energie in Form von Licht abgegeben und die entstehende Lumineszenz wird als Maß für die Aktivität des Enzyms genommen. Luciferase kann durch unterschiedliche Stressfaktoren, wie GdnHCl, Harnstoff oder Hitzeschock denaturiert werden. Die Rückfaltung mit Hilfe von Chaperonen ist nach Denaturierung durch jede der drei genannten Methoden möglich (Groemping, 2000). Dieser Aktivitätsassay für Chaperone (Luciferaseassay) wird durch mehrere Faktoren limitiert. Luciferase benötigt für die enzymatische Aktivität reduzierte Cysteingruppen und ist daher empfindlich gegenüber einer Oxidation durch Sauerstoff. Zusätzlich ist Luciferase ein hydrophobes Protein, das leicht an Kunststoffoberflächen bindet. Oberhalb von 30°C ist Luciferase instabil und deshalb im Temperaturbereich, in dem *T. thermophilus* wächst (50-80°C), nicht als Substratprotein zu benutzen. Außerdem zeigt Luciferase eine starke Produktinhibierung durch das entstehende Oxyluciferin. Aufgrund dieser Inhibierung kommt es bei langer Messdauer zu einer Lumineszenzabnahme. Daher wurde zum Teil auf ein diskontinuierliches Messsystem umgestellt, bei dem eine Probe der Rückfaltungsreaktion in Lumineszenzpuffer gegeben wurde und die Lumineszenz nur für Sekunden gemessen wird. Allerdings zeigt sich auch hier nach kurzer Zeit eine deutliche Abnahme der Lumineszenz, und der kurze Messbereich erhöht die Messgenauigkeit (Groemping, 2000).

Neben der Optimierung des Luciferaseassays sollen neue Substrate etabliert werden, die keine Produktinhibierung während der Aktivitätsbestimmung zeigen. Enzyme, die auch bei Temperaturen oberhalb von 50°C noch aktiv sind, erlauben zusätzlich eine Rückfaltungsreaktion im natürlichen Temperaturbereich von *T. thermophilus*.

3.1.1 α -Glucosidase

α -Glucosidase von *B. stearothermophilus*, einem Organismus, der bei 50-55°C sein Temperaturoptimum hat, ist als Substratprotein für das thermophile Chaperonsystem beschrieben worden (Motohashi et al., 1999). α -Glucosidase ist ein monomeres Enzym mit einer Größe von 65 kDa und katalysiert die Abspaltung von p-Nitrophenol aus dem Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid. Das entstehende p-Nitrophenol kann spektroskopisch detektiert werden.

3.1.1.1 Stabilität der α -Glucosidase

Die Stabilität von α -Glucosidase wurde zunächst ermittelt, um die notwendige Denaturierungsdauer zu bestimmen. Als Denaturierungsmethode wurde ein Hitzeschock bei 75°C verwendet. Dies ist für thermophile Organismen wie *T. thermophilus*, die in heißen Quellen leben, die wahrscheinlichste Stressbedingung. Die Chaperone sollten daher mit Aggregaten, die durch Hitzeschock entstanden sind, interagieren können. Die Aktivität von α -Glucosidase wurde durch Zugabe eines Aliquots der Enzymlösung zu dem Assaypuffer bestimmt und ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit unter Hitzeschockbedingungen in Abbildung 3.1.1A dargestellt.

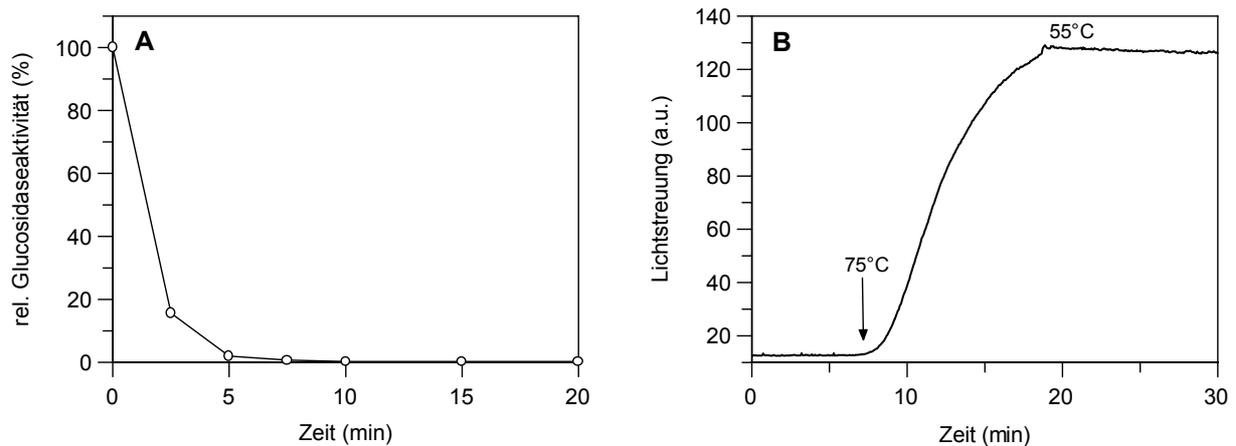


Abb. 3.1.1 Stabilität der α -Glucosidase

A Zeitabhängigkeit der α -Glucosidasedenaturierung

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde bei 75°C in Denaturierungspuffer inkubiert. Die Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und relativ zur Aktivität vor der Denaturierung gesetzt (\circ).

B Lichtstreuung von denaturierter α -Glucosidase

Die Lichtstreuung von α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde bei 550 nm und 55°C gemessen. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur von 75°C kommt es zu starker Lichtstreuung, die ein konstantes Niveau erreicht.

α -Glucosidase konnte durch Inkubation bei 75°C denaturiert werden. Bereits nach Inkubation für 10 Minuten bei Hitzeschockbedingungen war weniger als 1 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Da eine vollständige Denaturierung von Substraten der Ausgangspunkt für die Rückfaltungsversuche ist, wurde bei den Rückfaltungsexperimenten mit einer Denaturierungszeit von 10 Minuten gearbeitet. Um zu testen, ob die Inaktivierung mit einer Bildung von Aggregaten einherging, wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Die Lichtstreuung von α -Glucosidase durch Hitzedenaturierung ist in Abbildung 3.1.1B gezeigt.

α -Glucosidase zeigte im nativen Zustand zu Beginn der Messung bei 55°C ein stabiles Signal. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur wurde eine starke Zunahme der Lichtstreuung um einen Faktor von 10 beobachtet. Diese Zunahme deutet auf eine Aggregationsbildung von α -Glucosidase hin. Diese Aggregation war zudem irreversibel, da auch nach erneutem Erreichen von 55°C das Signal konstant blieb.

3.1.1.2 Rückfaltung von α -Glucosidase

Große Proteinaggregate können normalerweise nicht von dem isolierten DnaK-System in ihre native Konformation überführt werden. Für diese Reaktivierung ist die Interaktion mit ClpB erforderlich (Parsell et al., 1994b; Diamant et al., 2000). Die Aktivität von ClpB kann daher durch die Rückfaltung bzw. Reaktivierung von Proteinaggregaten gemessen werden. Für die Rückfaltungsassays wurden erst stabile Aggregate durch Hitzedenaturierung in der Abwesenheit von Chaperonen erzeugt. Die Dauer der Denaturierung wurde so gewählt, dass einerseits kaum spontane Rückfaltungen auftraten, andererseits aber die durch Chaperone vermittelten Rückfaltungen noch möglich waren. Die Rückfaltung erfolgte nach Denaturierung bei einer permissiven Temperatur. Es wurden zunächst die im Luciferaseassay eingesetzten Chaperonverhältnisse verwendet (Schlee et al., 2001). Es wurde ein diskontinuierlicher Assay verwendet, d.h. Rückfaltung und Aktivitätsmessung fanden in getrennten Systemen statt (Abb. 3.1.2A).

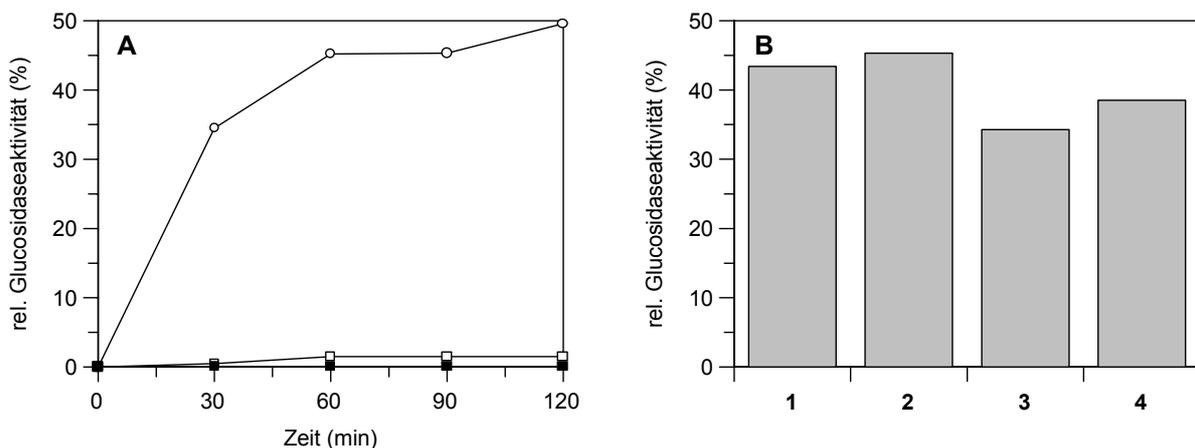


Abb. 3.1.2 Rückfaltung von α -Glucosidase

A Zeitabhängigkeit der Rückfaltung von α -Glucosidase

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert und dann ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, □) oder mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 0.5 μ M ClpB, ○) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Abhängigkeit der α -Glucosidaserückfaltung von den Chaperonmengen

Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit

1: (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 0.5 μ M ClpB),

2: (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB),

3: (3.2 μ M DnaK, 0.8 μ M DnaJ, 0.4 μ M GrpE, 0.5 μ M ClpB),

4: (3.2 μ M DnaK, 0.8 μ M DnaJ, 0.4 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB).

Die Aktivität wurde nach 90 Minuten in Assaypuffer bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

α -Glucosidase wurde durch den Hitzeschock dauerhaft denaturiert. Nach 2 h Inkubation bei 55°C ohne Chaperone war keine Enzymaktivität vorhanden. Auch das DnaK-System konnte nur einen geringen Anteil der α -Glucosidase reaktivieren (2 %). War jedoch zusätzlich ClpB in dem Ansatz, wurde die α -Glucosidase zu ca. 45 % der Ausgangsaktivität reaktiviert. Der

starke ClpB-Effekt (ca. Faktor 10) im Verhältnis zu dem DnaK-System alleine zeigte die Bedeutung von ClpB für die Reaktivierung von Proteinaggregaten. Die Reaktion war nach ca. 90 Minuten beendet, d.h. ein konstantes Aktivitätsniveau wurde erreicht. Vermutlich konnten die restlichen 50 % der α -Glucosidase trotz der Anwesenheit von ClpB aufgrund einer irreversiblen Aggregation nicht mehr reaktiviert werden. Bei einer kürzeren Denaturierungszeit konnte das DnaK-ClpB-System einen höheren Anteil der α -Glucosidase zurückfalten, allerdings war dann der Effekt durch ClpB-Zugabe geringer (Daten nicht gezeigt). Das Erhöhen der Chaperonkonzentrationen bei gleichen Chaperonverhältnissen hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Reaktionsausbeute (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.3 Optimierung des α -Glucosidaseassays

Für eine Standardanwendung im Labor und zur Quantifizierung der ClpB-Aktivität musste der Assay optimiert werden. Die verwendete α -Glucosidase denaturierte bereits bei 75°C, dem Temperaturoptimum von *T. Thermophilus*, irreversibel. Daher wurde die optimale Rückfaltungstemperatur bestimmt (Abb. 3.1.3A).

Die Rückfaltung von α -Glucosidase war stark von der Temperatur während der Rückfaltungsreaktion mit Chaperonen abhängig. Unterhalb von 40°C war die Reaktivierung nur sehr eingeschränkt möglich. Die Ausbeute stieg dann stark an und erreichte bei 55°C ihr Maximum, um bei höheren Temperaturen wieder abzusinken. Die Rückfaltungsreaktion wurde deshalb bei 55°C inkubiert, dem optimalen Temperaturbereich des Herkunftsorganismus *B. stearothermophilus*.

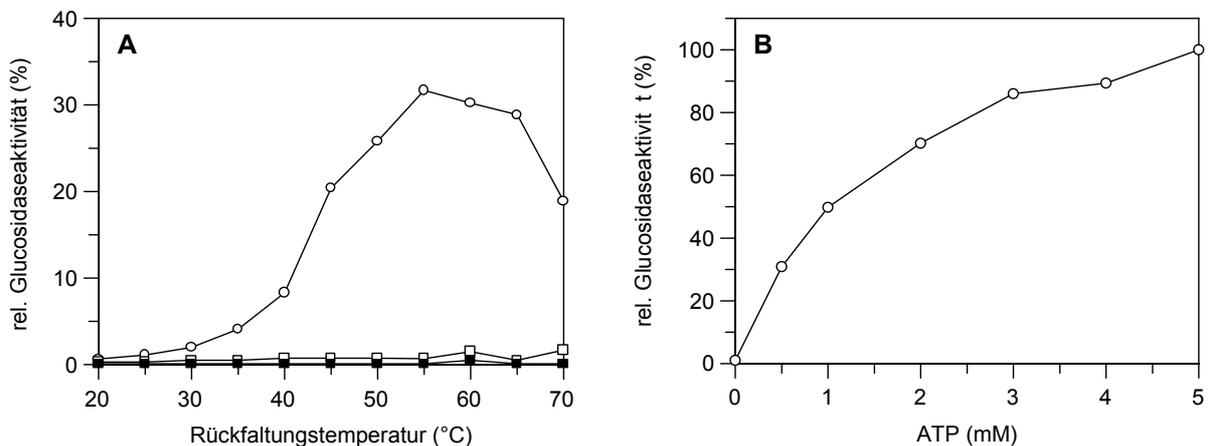


Abb. 3.1.3 Optimierung der Bedingungen des α -Glucosidaseassays

A Temperaturabhängigkeit der α -Glucosidaserückfaltung

α -Glucosidase (0.2 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei den angegebenen Temperaturen ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, □) oder mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB, ○). Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Effekt der ATP-Konzentration auf die α -Glucosidaserückfaltung

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB, ○) und den angegebenen ATP-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 120 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

Für die Rückfaltung ist die ATP-Hydrolyse durch die Chaperone DnaK und ClpB notwendig (Zolkiewski, 1999; Motohashi et al., 1999). Deshalb wurde der Assay in Bezug auf die ATP-Konzentration hin optimiert (Abb. 3.1.3B). Die ATP-Konzentration beeinflusste die Ausbeute der Rückfaltungsreaktion. Die Ausbeute der Rückfaltung nahm mit der Höhe der ATP-Konzentration zu und erreichte bei 4 - 5 mM ATP ein konstantes Niveau. Daher wurde eine ATP-Konzentration von 5 mM für alle Experimente verwendet.

In den folgenden Experimenten wurden die Konzentrationen der eingesetzten Chaperone optimiert. Die Konzentration von drei Chaperonen wurde konstant gehalten und der Einfluss der vierten Komponente auf die α -Glucosidaserückfaltung untersucht. Die Effekte der einzelnen Chaperone sind in Abbildung 3.1.4 gezeigt.

Die DnaK-Konzentration wurde von 0 bis 12.8 μ M variiert (Abb. 3.1.4A). Ohne DnaK wurde nur ein Bruchteil der α -Glucosidase zurückgefaltet. Dies zeigte, dass sowohl ClpB als auch DnaJ und GrpE keine Rückfaltungskompetenz besitzen. Die optimale DnaK-Konzentration beträgt 1.6 μ M, damit lag DnaK im Überschuss zu dem denaturierten Substrat vor. Sehr hohe DnaK-Konzentrationen zeigten eine geringere Aktivität. Bei diesen DnaK-Konzentrationen könnten die Konzentrationen der Kochaperone DnaJ und GrpE nicht mehr ausreichend sein, um den produktiven Rückfaltungszyklus zu steuern.

Als nächste Komponente wurde DnaJ optimiert. Der Effekt der getesteten DnaJ-Konzentrationen ist in Abbildung 3.1.4B gezeigt. Wie bei der Titration mit DnaK zeigte sich, dass DnaJ ebenfalls essentiell für eine Rückfaltung des Substrats ist, denn ohne DnaJ wurde kaum α -Glucosidaseaktivität detektiert. Bei einer DnaJ-Konzentration von 0.4 μ M war die Ausbeute maximal, bei höheren DnaJ-Konzentrationen sinkt die Ausbeute dann ab. Damit wird DnaJ in substöchiometrischen Mengen im Verhältnis zu DnaK für die optimale Funktion des Chaperonsystems benötigt.

Die Optimierung der GrpE-Konzentration ist in Abbildung 3.1.4C dargestellt. Die beste Konzentration von GrpE für die α -Glucosidaserückfaltung betrug 0.2 μ M. Damit lag GrpE, wie DnaJ, in geringerer Konzentration als DnaK unter optimalen Bedingungen vor. Das Chaperonsystem reagierte weniger stark auf Konzentrationsänderungen von GrpE als auf Änderungen von DnaK und DnaJ. Ohne GrpE war zudem auch eine Rückfaltung von α -Glucosidase möglich, was ohne DnaK und DnaJ nicht beobachtet wurde. Bei noch höheren GrpE-Konzentrationen als hier angegeben ($> 1.6 \mu$ M) nahm die Ausbeute weiter ab (Daten nicht gezeigt).

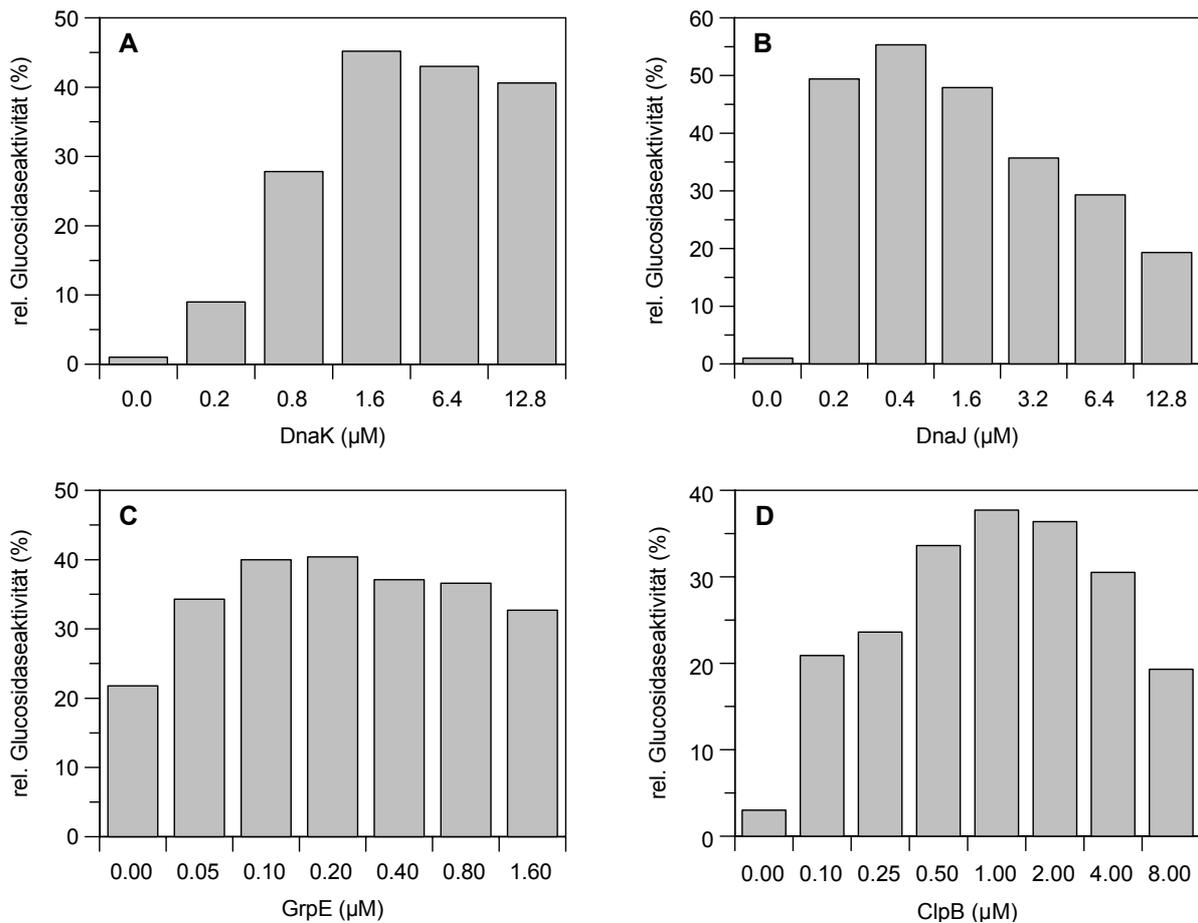


Abb. 3.1.4 Abhängigkeit der α -Glucosidaserückfaltung von den Chaperonkonzentrationen

A Abhängigkeit von der DnaK-Konzentration

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB und den angegebenen DnaK-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Abhängigkeit von der DnaJ-Konzentration

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 1.6 μ M DnaK, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB und den angegebenen DnaJ-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

C Abhängigkeit von der GrpE-Konzentration

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 1.0 μ M ClpB und den angegebenen GrpE-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

D Abhängigkeit von der ClpB-Konzentration

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE und den angegebenen ClpB-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

Für die weitere Optimierung des Rückfaltungsassays wurde die ClpB-Konzentration variiert (Abb. 3.1.4D). Ohne ClpB wurde nur ein geringer Anteil des Proteins reaktiviert (siehe auch Abb. 3.1.1), bei hohen ClpB-Konzentrationen nahm die Ausbeute wieder ab. Die optimale ClpB-Konzentration für die α -Glucosidaserückfaltung lag um 1.0 μ M. Betrachtet man ein Hexamer als die funktionelle Einheit von ClpB, lag ClpB (0.16 μ M) in ähnlicher Konzentration wie das Substrat vor (0.1 μ M). Im Vergleich zu DnaK war es jedoch in geringerer Konzentration vorhanden.

Durch die Optimierung der Chaperonkonzentrationen für die α -Glucosidaserückfaltung ist ein Rückfaltungssystem etabliert worden, das bis zu 50 % der Proteinaktivität nach Hitzedenaturierung wiederherstellen kann. Das Rückfaltungssystem zeigte zudem eine starke Abhängigkeit von ClpB. Dieser Effekt kann zur Charakterisierung von ClpB-Fragmenten hinsichtlich ihrer Rückfaltungsaktivität eingesetzt werden.

3.1.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Neben α -Glucosidase sollten zusätzliche Substrate für das DnaK-ClpB-System etabliert werden. Dies erlaubt anschließend eine Charakterisierung des Chaperonsystems mit mehreren Substraten. Dadurch kann abgeschätzt werden, ob das Chaperonsystem eine breite Substratspezifität besitzt oder ob es verschiedene Aggregate unterschiedlich gut erkennt. Zudem kann die Effizienz der Rückfaltungsreaktionen miteinander verglichen werden. Die Chaperonaktivität von ClpB wurde anhand der Renaturierung von hitzedenaturierter Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (GPDH) aus *B. stearothermophilus* gemessen (Watanabe et al., 2000). GPDH, ein Homotetramer aus 53 kDa Untereinheiten, katalysiert die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phospho-Gluconat, was mit der Reduktion von NADP zu NADPH gekoppelt ist. Diese Reaktion wurde über die Zunahme der Absorption spektroskopisch verfolgt.

3.1.2.1 Stabilität von GPDH

Die Stabilität von GPDH wurde zunächst durch Inkubation bei Hitzeschockbedingungen (75°C) ermittelt. Die Aktivität von GPDH wurde durch Zugabe eines Aliquots der Enzymlösung zu dem Assaypuffer bestimmt und ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der Denaturierungstemperatur in Abbildung 3.1.5A dargestellt.

GPDH wurde unter Hitzeschockbedingungen sehr schnell denaturiert. Bereits nach 10-minütiger Inkubation bei 75°C war weniger als 1 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Um zu testen, ob die Inaktivierung mit einer Bildung von Proteinaggregaten einherging, wurde die Lichtstreuung von GPDH gemessen. Die Messung ist in Abbildung 3.1.5B dargestellt. GPDH zeigte zu Beginn der Messung bei 55°C, der optimalen Wachstumstemperatur für *B. stearothermophilus*, ein stabiles Lichtstreuungssignal. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur wurde eine starke Zunahme der Lichtstreuung um einen Faktor von ca. 10 beobachtet. Diese Zunahme deutet auf eine Aggregationsbildung von GPDH hin. Diese Aggregation war zudem irreversibel, da auch nach Abkühlen auf 55°C das erhöhte Signal konstant blieb.

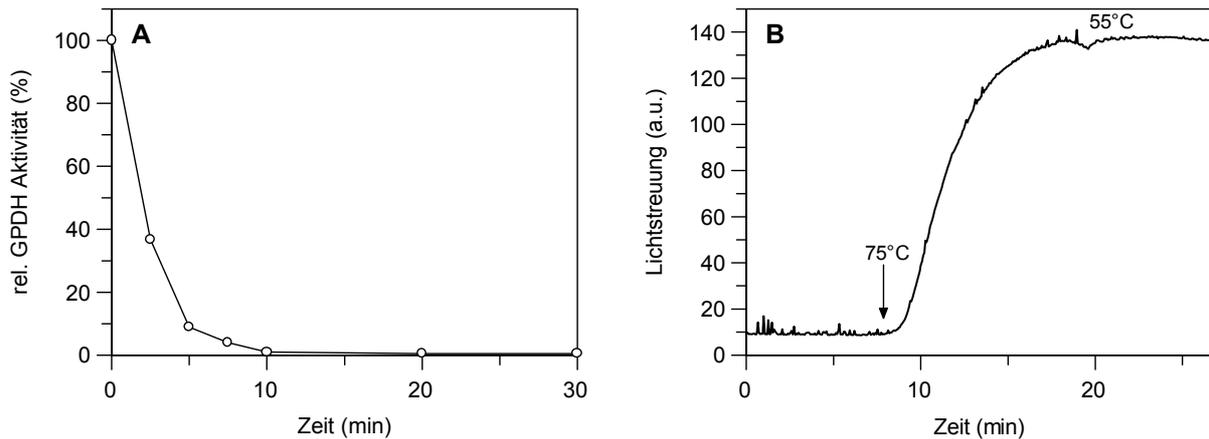


Abb. 3.1.5 Stabilität der GPDH

A Zeitabhängigkeit der GPDH-Denaturierung

GPDH (0.2 μM) wurde bei 75°C in Denaturierungspuffer inkubiert. Die Aktivität wurde in Assaypuffer bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben (\circ).

B Lichtstreuung von denaturierter GPDH

Die Lichtstreuung von GPDH (0.1 μM) wurde bei 550 nm und 55°C gemessen. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur von 75°C kommt es zu starker Lichtstreuung, die ein konstantes Niveau erreicht.

GPDH wurde unter Hitzeschockbedingungen sehr schnell denaturiert. Bereits nach 10-minütiger Inkubation bei 75°C war weniger als 1 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Um zu testen, ob die Inaktivierung mit einer Bildung von Proteinaggregaten einherging, wurde die Lichtstreuung von GPDH gemessen. Die Messung ist in Abbildung 3.1.5B dargestellt. GPDH zeigte zu Beginn der Messung bei 55°C, der optimalen Wachstumstemperatur für *B. stearothermophilus*, ein stabiles Lichtstreuungssignal. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur wurde eine starke Zunahme der Lichtstreuung um einen Faktor von ca. 10 beobachtet. Diese Zunahme deutet auf eine Aggregationsbildung von GPDH hin. Diese Aggregation war zudem irreversibel, da auch nach Abkühlen auf 55°C das erhöhte Signal konstant blieb.

3.1.2.2 Rückfaltung von GPDH

Für die Rückfaltungsassays mit GPDH wurden stets erst stabile Aggregate durch Hitzedenaturierung in der Abwesenheit von Chaperonen erzeugt. Die Rückfaltung erfolgte nach Chaperonzugabe bei der permissiven Temperatur von 55°C. Als Denaturierungspuffer wurde der für die α -Glucosidase optimierte Puffer verwendet. Da eine vollständige Denaturierung der Substrate der Ausgangspunkt für Messungen war, wurde mit einer Denaturierungszeit von 7½ Minuten gearbeitet. Es wurde erneut ein diskontinuierlicher Assay verwendet. Ein Rückfaltungsversuch mit den im α -Glucosidaseassay optimierten Chaperonkonzentrationen ist in Abbildung 3.1.6A dargestellt.

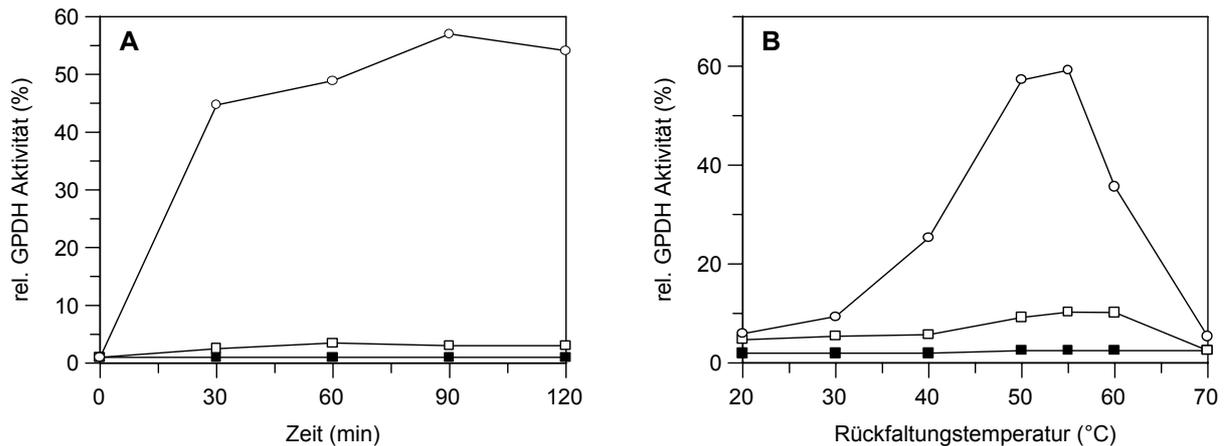


Abb. 3.1.6 Rückfaltung von GPDH

A Zeitabhängigkeit der Rückfaltung von GPDH

GPDH (0.2 µM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert und dann ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, □) oder mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, 1.0 µM ClpB, ○) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in Assaypuffer bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von GPDH

GPDH (0.2 µM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung bei den angegebenen Temperaturen erfolgte ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, □) oder mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, 1.0 µM ClpB, ○). Die Aktivität wurde nach 90 Minuten in Assaypuffer bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

GPDH wurde durch den Hitzeschock dauerhaft denaturiert, nach 90 Minuten Inkubation bei 55°C ohne Chaperone wurde weniger als 1 % der Ausgangsaktivität erreicht. Das thermophile DnaK-System konnte nur einen geringen Anteil der GPDH reaktivieren (5 %). War jedoch ClpB in dem Ansatz vorhanden, wurden ca. 50 % der Ursprungsaktivität der GPDH erreicht. Der starke ClpB-Effekt (ca. Faktor 10) im Verhältnis zu dem isolierten DnaK-System zeigte erneut die Bedeutung von ClpB für die Reaktivierung von Proteinaggregaten. Die Reaktion war nach 60 - 90 Minuten beendet, da dann ein konstantes Aktivitätsniveau erreicht wurde. Bei einer längeren Denaturierungszeit (z.B. 10 min) konnte das DnaK-ClpB-System nur einen geringeren Anteil der GPDH zurückfalten (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.3 Optimierung des GPDH-Assays

Die Rückfaltungstemperatur für GPDH von *B. stearothermophilus* wurde zuerst optimiert. Der Effekt der Rückfaltungstemperatur auf die Ausbeute ist in Abbildung 3.1.6B dargestellt. Die Rückfaltung von GPDH war stark von der Temperatur während der Rückfaltungsreaktion mit Chaperonen abhängig. Wie bei α-Glucosidase war die Reaktivierung unterhalb von 40°C nur eingeschränkt möglich. Die Ausbeute stieg dann stark an und erreichte bei 50-55°C ihr Maximum, um bei höheren Temperaturen wieder abzusinken. Diese Rückfaltungstemperatur

lag erneut im optimalen Temperaturbereich für das Wachstum des Herkunftsorganismus *B. stearothermophilus*. Daher wurden die Rückfaltungsreaktionen mit GPDH bei 55°C inkubiert. In den folgenden Experimenten wurden die Konzentrationen der eingesetzten Chaperone optimiert. Die Konzentration von drei Chaperonen wurde konstant gehalten und der Einfluss der vierten Komponente auf die GPDH-Rückfaltung untersucht. Der Einfluss der Chaperonkonzentrationen ist in Abbildung 3.1.7 dargestellt.

Die DnaK-Konzentration wurde zwischen 0 und 6.4 μM variiert (Abb. 3.1.7A). Ohne DnaK wurde nur ein geringer Anteil der GPDH zurückgefaltet. Dieses Experiment bestätigte, dass sowohl ClpB alleine als auch DnaJ mit GrpE nur geringe Rückfaltungsaktivität besitzen. Die optimale DnaK-Konzentration betrug 1.6 μM , damit lag DnaK erneut im Überschuss zu dem denaturierten Substrat vor. Bei sehr hohen DnaK-Konzentrationen sank die Aktivität wieder ab. Bei diesen Konzentrationen könnten die Mengen an Kochaperonen DnaJ und GrpE nicht mehr ausreichend sein um den produktiven Rückfaltungszyklus zu steuern.

Als nächstes wurde die Konzentration von DnaJ in den Ansätzen optimiert. DnaJ wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1.6 μM getestet (Abb. 3.1.7B). Ohne DnaJ wurde nur eine geringe GPDH Aktivität detektiert. Wie bei der Titration mit DnaK zeigte sich, dass DnaJ ebenfalls essentiell für eine Rückfaltung des Substrats war. Bei einer DnaJ-Konzentration von 0.4 μM war die Ausbeute maximal. Bei höheren Konzentrationen nahm die Ausbeute der Reaktion dann ab. Damit wird DnaJ für die optimale Funktion des Chaperonsystems erneut in substöchiometrischen Mengen im Verhältnis zu DnaK benötigt.

Die Optimierung der GrpE-Konzentration für die Rückfaltungsreaktion ist in Abbildung 3.1.7C dargestellt. Die optimale Konzentration von GrpE betrug 0.2 μM . Damit lag GrpE ähnlich wie DnaJ unter optimierten Bedingungen in geringerer Konzentration als DnaK vor. Dies wurde zuvor auch in dem α -Glucosidaseassay beobachtet. Das Chaperonsystem reagierte weniger stark auf Konzentrationsänderungen von GrpE als auf Konzentrationsänderungen von DnaK. Die Rückfaltungsausbeuten zwischen 0.2 und 0.8 μM GrpE unterschieden sich nur geringfügig. Bei höheren GrpE-Konzentrationen nahmen die Ausbeuten jedoch wieder ab. Außerdem war ohne GrpE auch eine Rückfaltung von GPDH möglich. Dies war unmöglich, wenn DnaK oder DnaJ fehlten. Für die weitere Optimierung des Rückfaltungsassays wurde noch die ClpB-Konzentration variiert. Wie in Abbildung 3.1.6A gezeigt, ist ClpB für die effiziente Rückfaltung von GPDH notwendig. Die Optimierung der ClpB-Konzentration ist in Abbildung 3.1.7D dargestellt. Ohne ClpB wurde wie bei α -Glucosidase nur ein geringer Anteil des Proteins reaktiviert, bei hohen ClpB-Konzentrationen reduzierte sich die Rückfaltungsausbeute ebenfalls. Die optimale ClpB-Konzentration lag um 1.0 μM , allerdings war die Ausbeute zwischen 0.1 μM und 1.0 μM ähnlich hoch.

Die optimierten Chaperonkonzentrationen bei der Rückfaltung von GPDH sind mit denen des α -Glucosidaseassays identisch. Mit dem GPDH-Assay wurde ein zweites

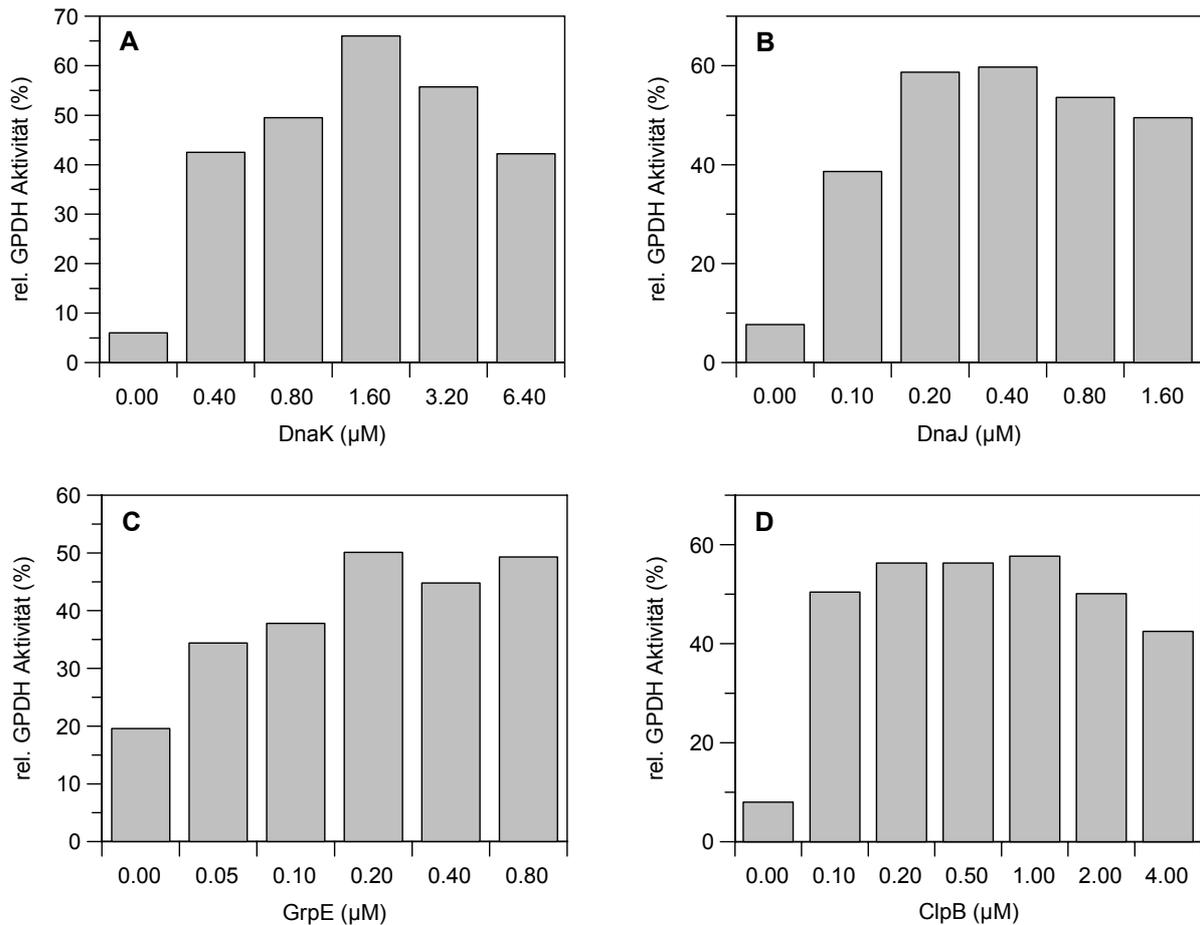


Abb. 3.1.7 Abhängigkeit der GPDH-Rückfaltung von den Chaperonkonzentrationen

A Abhängigkeit der von der DnaK-Konzentration

GPDH (0.2 μM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 0.4 μM DnaJ, 0.2 μM GrpE, 1.0 μM ClpB und den angegebenen DnaK-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Abhängigkeit von der DnaJ-Konzentration

GPDH (0.2 μM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 1.6 μM DnaK, 0.2 μM GrpE, 1.0 μM ClpB und den angegebenen DnaJ-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

C Abhängigkeit von der GrpE-Konzentration

GPDH (0.2 μM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 1.6 μM DnaK, 0.4 μM DnaJ, 1.0 μM ClpB und den angegebenen GrpE-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

D Abhängigkeit von der ClpB-Konzentration

GPDH (0.2 μM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C mit 1.6 μM DnaK, 0.4 μM DnaJ, 0.2 μM GrpE und den angegebenen ClpB-Konzentrationen. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

Rückfaltungssystem etabliert, dass eine hohe Ausbeute aufweist und für die Charakterisierung von ClpB-Fragmenten verwendet werden kann.

3.1.3 Luciferase

Das bereits charakterisierte Substratprotein Luciferase wurde ebenfalls für Rückfaltungsversuche verwendet. Die Art der Denaturierung ist für Luciferaserückfaltungsstudien sehr wichtig, weil die Fähigkeit von Chaperonen Proteinaggregate aufzulösen von der Art der Denaturierung abhängt. Luciferase, die mit GdnHCl denaturiert wurde, zeigt nur einen sehr geringen ClpB-Effekt, das DnaK-System kann dort auch ohne ClpB effektiv zurückfalten. Bei harnstoffdenaturierter und hitzedenaturierter Luciferase ist jedoch ein positiver Effekt durch ClpB zu beobachten (Groemping, 2000).

3.1.3.1 Luciferaserückfaltung

Ausgehend von den etablierten Rückfaltungsbedingungen wurde der Luciferaseassay optimiert. Im Anschluss an die Denaturierung ohne Chaperone wurde nach Verdünnung und Chaperonzugabe die Lumineszenz bestimmt (Abb. 3.1.8).

Luciferase konnte durch Hitzeschock effizient denaturiert werden (Abb. 3.1.8A). Ohne Chaperone war keine Lumineszenz zu beobachten. Das DnaK-System alleine bewirkte nur eine sehr geringe Lumineszenzzunahme und zeigte eine lange Verzögerungsphase zu Beginn der Messung. In Kooperation mit ClpB konnte das DnaK-System Luciferase effizienter zurückfalten. Die Lumineszenz stieg kurze Zeit nach Beginn der Messung an und erreichte ein höheres Niveau als ohne ClpB. Insgesamt war die gemessene Lumineszenz jedoch gering.

Um die Rückfaltungsausbeute und das Lumineszenzsignal zu erhöhen, wurde Luciferase mit Harnstoff denaturiert. Weil es bei der langen Dauer des Assays zu verminderter Lumineszenz aufgrund des Verbrauchs von ATP kam, wurde ein ATP-regenerierendes System dem Assaypuffer zugesetzt. Das bei der Chaperonaktivität entstehende ADP wurde hierbei durch Pyruvatkinase und PEP zu ATP umgesetzt. Nach der Denaturierung mit Harnstoff ohne Chaperone wurde die Luciferase im Assaypuffer mit Chaperonen verdünnt. Eine Rückfaltungsreaktion ist in Abbildung 3.1.8B gezeigt.

Durch die Inkubation mit Harnstoff wurde die Luciferase irreversibel denaturiert. Während der Messdauer konnte in den Ansätzen ohne Chaperone kaum Lumineszenz detektiert werden. Das DnaK-System konnte nach einer Verzögerungsphase von 50 Minuten geringe Mengen der Luciferase reaktivieren, das Maximum wurde erst nach 500 Minuten erreicht. Durch ClpB wurde die Ausbeute der Rückfaltung stark erhöht und die Rückfaltung startete unmittelbar nach der Chaperonzugabe und erreichte das Maximum nach 150 Minuten. Bei den Ansätzen mit ClpB zeigte sich auch der deutliche Effekt des zugegebenen ATP-regenerierenden Systems. Die Lumineszenz erreichte einen höheren Maximalwert, der zudem schneller erreicht wurde. Die Lumineszenz nahm im Lauf der Messung durch Produktinhibierung ab.

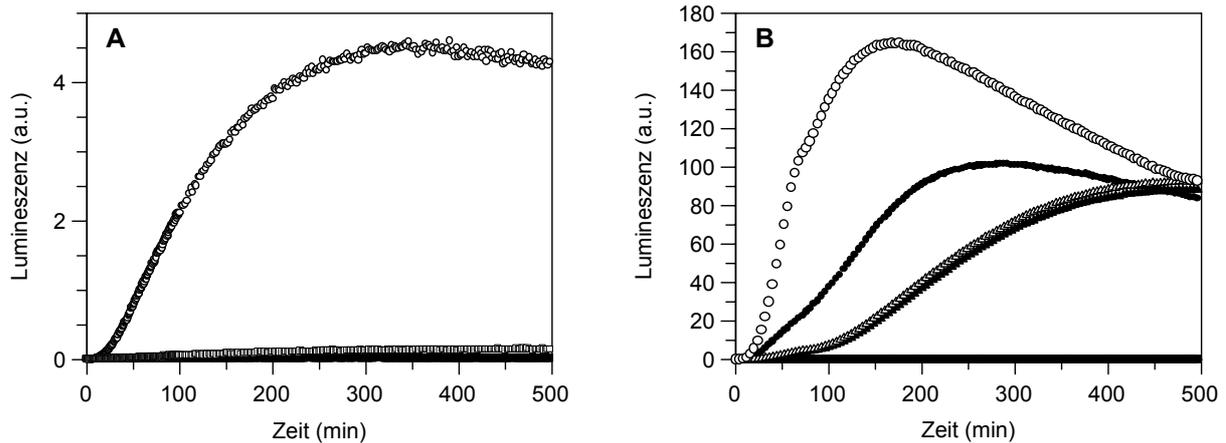


Abb. 3.1.8 Rückfaltung denaturierter Luciferase

A Rückfaltung hitzedenaturierter Luciferase

Luciferase ($0.8 \mu\text{M}$) wurde 30 Minuten bei 42°C in Denaturierungspuffer inkubiert und 1:10 verdünnt in Assaypuffer ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System ($3.2 \mu\text{M}$ DnaK, $0.8 \mu\text{M}$ DnaJ, $0.4 \mu\text{M}$ GrpE, □) oder mit dem DnaK-System mit ClpB ($3.2 \mu\text{M}$ DnaK, $0.8 \mu\text{M}$ DnaJ, $0.4 \mu\text{M}$ GrpE, $0.5 \mu\text{M}$ ClpB, ○). Die Lumineszenz wurde in einem kontinuierlichen Assay bestimmt.

B Rückfaltung harnstoffdenaturierter Luciferase

Luciferase ($10 \mu\text{M}$) wurde 30 Minuten bei RT in Denaturierungspuffer mit 7 M Harnstoff inkubiert und dann 1:125 verdünnt in Assaypuffer mit bzw. ohne das ATP-regenerierende System. Die Rückfaltung erfolgte ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System ($3.2 \mu\text{M}$ DnaK, $0.8 \mu\text{M}$ DnaJ, $0.4 \mu\text{M}$ GrpE: ▲ mit PEP: △) oder mit dem DnaK-System mit ClpB ($3.2 \mu\text{M}$ DnaK, $0.8 \mu\text{M}$ DnaJ, $0.4 \mu\text{M}$ GrpE, $0.5 \mu\text{M}$ ClpB: ●, mit PEP: ○). Die Lumineszenz wurde in einem kontinuierlichen Assay bestimmt.

Die Rückfaltung nach Harnstoffdenaturierung zeigte eine größere Lumineszenz im Vergleich zur Hitzedenaturierung und konnte für die Quantifizierung der ClpB-Aktivität ebenfalls verwendet werden. Wurde eine Kontrollmessung mit nativer Luciferase durchgeführt, zeigte sich, dass bis zu 40 % der nativen Aktivität durch das DnaK-System in Kooperation mit ClpB reaktiviert wurden (siehe Abb. 3.3.8C). Damit ist neben den hitzedenaturierten Substraten auch ein harnstoffdenaturiertes Protein als Modellsubstrat verfügbar.

3.1.4 Lactatdehydrogenase

Die Chaperonaktivität von ClpB wurde zusätzlich anhand der Renaturierung von hitzedenaturierter Lactatdehydrogenase (LDH) aus *B. stearothermophilus* gemessen. LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat, was mit der Oxidation von NADH zu NAD gekoppelt ist. Diese Reaktion wurde über die Abnahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt. Es wurde LDH mit N-terminalem His-Tag exprimiert und aufgereinigt. Der eingefügte His-Tag hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms (Halliwell et al., 2001).

3.1.4.1 Stabilität der LDH

Die Stabilität von LDH von *B. stearothermophilus* wurde durch Inkubation bei Hitzeschockbedingungen ermittelt. Die Aktivität wurde durch Zugabe eines Aliquots der Enzymlösung zu dem Assaypuffer bestimmt und ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Hitzeschockbedingungen in Abbildung 3.1.9A dargestellt. Als Denaturierungstemperatur wurden 80°C gewählt.

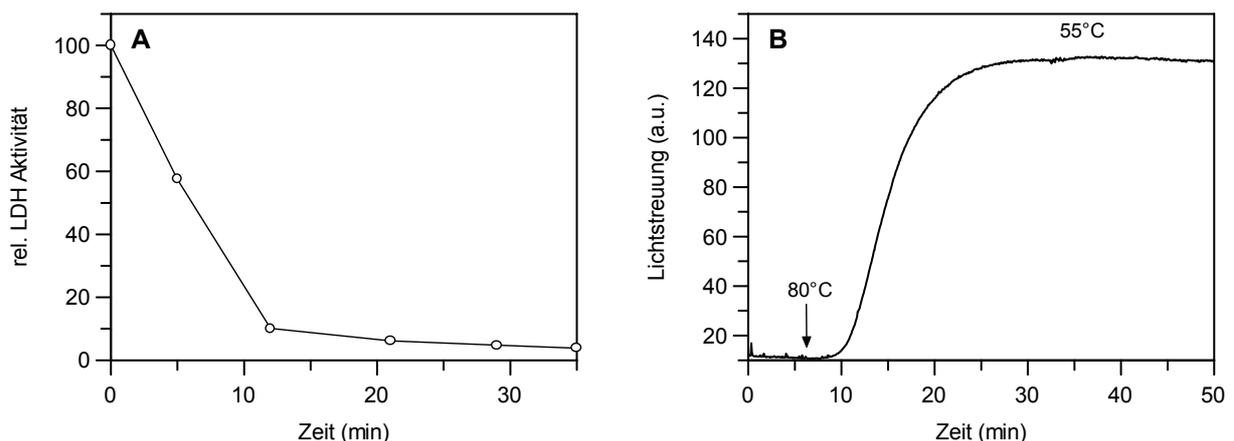


Abb. 3.1.9 Stabilität der LDH

A Zeitabhängigkeit der LDH-Denaturierung

LDH wurde (0.2 μM) bei 80°C in Denaturierungspuffer inkubiert. Die Aktivität wurde in Assaypuffer bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung gesetzt (\circ).

B Lichtstreuung von denaturierter LDH

Die Lichtstreuung von LDH (0.1 μM) wurde bei 55°C und 550 nm gemessen. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur von 80°C kommt es zu starker Lichtstreuung, die ein konstantes Niveau erreicht.

LDH war stabiler als die zuvor getesteten Substratproteine α -Glucosidase und GPDH. Auch nach 10-minütiger Inkubation bei 80°C war noch Restaktivität vorhanden, die erst bei Inkubationszeiten von über 30 Minuten deutlich reduziert wurde. Um zu testen, ob diese Inaktivierung mit einer Bildung von Aggregaten einherging, wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Die Lichtstreuung von LDH ist in Abbildung 3.1.9B dargestellt. LDH zeigte zu Beginn der Messung bei 55°C, der Wachstumstemperatur für *B. stearothermophilus*, eine stabiles Signal in der Lichtstreuungsmessung. Nach Erreichen der Denaturierungstemperatur von 80°C wurde eine starke Zunahme der Lichtstreuung um einen

Faktor von mehr als 10 beobachtet. Diese Zunahme deutete auf eine Aggregation von LDH hin. Im Vergleich zu den zuvor getesteten Substratproteinen war jedoch die Zeitdauer bis zum Erreichen eines stabilen Signals nach Beginn der Denaturierung länger. Dies bestätigte die im Aktivitätsassay beobachtete größere Stabilität der LDH. Die Aggregation der LDH war irreversibel, da auch nach Abkühlen auf 55°C das Signal konstant blieb.

3.1.4.2 Rückfaltung von LDH

Da stabile Aggregate als Ausgangspunkt der Rückfaltung verwendet wurden, wurde mit einer Denaturierungszeit von 30 Minuten ohne Chaperone gearbeitet. Die für α -Glucosidase und GPDH optimierten Chaperonkonzentrationen wurden auch für die LDH-Assays eingesetzt. Die Rückfaltung erfolgte nach Chaperonzugabe bei der optimierten Temperatur von 55°C. Es wurde wieder ein diskontinuierlicher Assay verwendet. Die Rückfaltung von LDH ist in Abbildung 3.1.10 gezeigt.

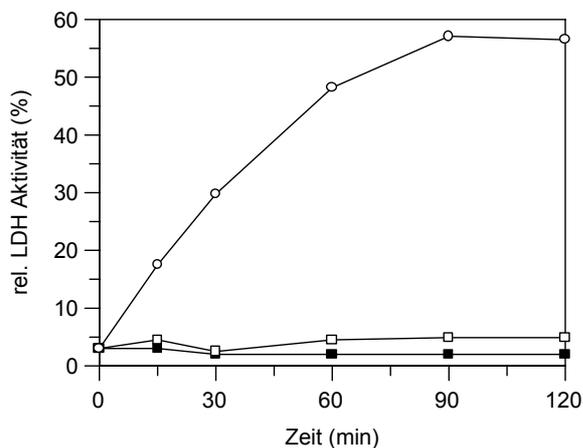


Abb. 3.1.10 Zeitabhängigkeit der Rückfaltung von LDH

0.2 μ M LDH wurde 30 Minuten bei 80°C denaturiert und dann ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, □) oder mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB, ○) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

LDH wurde durch den Hitzeschock bei 80°C dauerhaft denaturiert. Nach 90 Minuten Inkubation bei 55°C ohne Chaperone wurde weniger als 2 % der ursprünglichen Aktivität gemessen. Auch das DnaK-System konnte nur einen geringen Anteil der LDH reaktivieren (5 %). War jedoch ClpB zusätzlich in dem Ansatz vorhanden wurde die LDH zu ca. 60 % der Ursprungsaktivität reaktiviert. Der starke ClpB-Effekt (ca. Faktor 10) im Verhältnis zu dem isolierten DnaK-System zeigte erneut die Bedeutung von ClpB für die Reaktivierung von Proteinaggregaten, da hier das DnaK-System allein nur unzureichend arbeitete. Die Reaktion war nach 90 Minuten beendet, da ein konstantes Aktivitätsniveau erreicht wurde. LDH mit N-terminalem His-Tag kann somit effektiv von dem DnaK-System in Kooperation mit ClpB reaktiviert werden und ist ein weiteres Substratprotein, das für weiterführende Untersuchungen eingesetzt werden kann.

3.1.4.3 Interaktion von ClpB mit denaturierter LDH

Eine direkte Interaktion von ClpB mit Substraten konnte bisher noch nicht biochemisch nachgewiesen werden. Um einen ClpB-Substrat-Komplex zu isolieren, wurde LDH mit N-terminalem His-Tag verwendet. Das Substratprotein wurde zunächst in Abwesenheit von ClpB denaturiert, dann erfolgte eine Inkubation der Aggregate mit ClpB. Diese Mischung (Auftrag) wurde mit Ni-NTA Matrix gemischt und der ClpB-Substrat-Komplex über die Interaktion des His-Tags der LDH mit der Matrix durch Pelletierung isoliert. Nach Waschen mit Puffer konnte der Komplex mit Imidazol von der Ni-NTA Matrix eluiert werden. Da bisherige Experimente auf einen eher instabilen Komplex aus ClpB und Substrat schließen ließen, wurde die Komplexbildung ohne Nukleotide durchgeführt, um Effekte durch ATP-Hydrolyse oder ADP-Bindung zu minimieren. Die Identifizierung erfolgte dann durch ein SDS-Gel und ist in Abbildung 3.1.11 gezeigt.

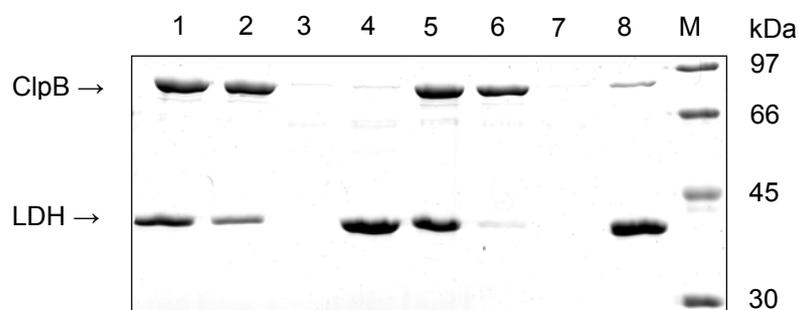


Abb. 3.1.11 Kopelletierung des Komplexes aus LDH und ClpB

2.0 μM LDH wurde mit 1.0 μM ClpB ohne Nukleotide mit der Ni-NTA Matrix inkubiert. Es wurde native LDH (Spuren 1-4) und denaturierte LDH (Spuren 5-8) verwendet. Aufgetragen wurden Aliquots des Auftrags der Mischung aus LDH und ClpB (Spuren 1 bzw. 5), des Überstands des Auftrags (Spuren 2 bzw. 6), des Überstands des Waschschriffs (Spuren 3 bzw. 7) und des Eluats (Spuren 4 bzw. 8).

Gleiche Mengen von ClpB (96 kDa) und nativer bzw. denaturierter LDH (37 kDa) wurden mit der Ni-NTA Matrix inkubiert (Spuren 1 und 5). Nach Zentrifugation zeigte sich, dass der Großteil der denaturierten LDH an die Matrix gebunden hatte, bei der nativen LDH verbleibt ein geringer Anteil im Überstand (Spuren 2 und 6). Dies spricht dafür, dass alle Bindungsstellen der Matrix besetzt waren. Der überwiegende Teil des ClpBs interagiert nicht mit der Ni-NTA-Agarose und verblieb im Überstand. Durch den Waschschriff sollten noch unspezifische Bindungen entfernt werden (Spurten 3 und 7), um nur die spezifisch gebundenen Proteine mit dem Elutionspuffer zu eluieren. Bei der Elution der nativen LDH wurde nur wenig ClpB koeluiert (Spur 4). Dies belegte, dass ClpB nicht an die native LDH gebunden hatte und die unspezifische Bindung von ClpB an die Matrix gering war. Bei der Elution der denaturierten LDH wurde ClpB koeluiert (Spur 8). Dies zeigte eindeutig, dass ClpB mit denaturierter LDH interagiert. Somit konnte eine direkte Interaktion von ClpB mit Aggregaten gezeigt werden. Diese Interaktion war jedoch nur transient. Waren Nukleotide (ATP bzw. ADP) im Puffer vorhanden wurde die Stabilität des Komplexes deutlich reduziert (Daten nicht gezeigt).

In diesem Abschnitt wurde die Optimierung des DnaK-ClpB-System für vier Substratproteine beschrieben. Die bevorzugte Methode, um stabile Proteinaggregate herzustellen, ist der Hitzeschock, da dieser für thermophile Organismen die wahrscheinlichste Stressbedingung ist. Die Chaperone sollten daher mit Aggregaten, die durch Hitzeschock entstanden sind, interagieren können. Alle getesteten Substrate konnten durch Hitzeschock bzw. Harnstoff irreversibel in stabile Aggregate überführt werden. Die Dauer der Denaturierung wurde so gewählt, dass kaum spontane Rückfaltungen auftraten, die durch Chaperone vermittelten Rückfaltungen aber noch möglich waren. Es konnte gezeigt werden, dass das DnaK-System von *T. thermophilus* ein effektives Chaperonsystem darstellt. Alle Substrate wurden mit Ausbeuten von 40-70 % zurückgefaltet. In den optimierten Rückfaltungsassays wurden die besten Rückfaltungsausbeuten mit ähnlichen Chaperonkonzentrationen erzielt. DnaK musste stets im Überschuss zum Substrat vorliegen, die Kochaperone DnaJ und GrpE wurden in substöchiometrischen Konzentrationen benötigt. Ohne DnaK oder DnaJ war keine produktive Rückfaltung möglich, GrpE war jedoch nicht essentiell für eine Substratrückfaltung.

Die Proteinaggregate konnten nicht von dem isolierten DnaK-System in ihre native Konformation überführt werden. Für diese Reaktivierung ist die Kooperation mit ClpB erforderlich. Zudem konnte eine direkte Interaktion von ClpB mit einem Substrat (LDH) gezeigt werden.

Es wurden Bedingungen etabliert, die einen großen Effekt auf die Rückfaltungsausbeuten durch die Zugabe von ClpB ermöglichen. Die optimale ClpB-Konzentration war bei allen Substraten ähnlich und lag im Bereich der Substratkonzentration.

In allen optimierten Rückfaltungsexperimenten war sowohl das DnaK-System als auch ClpB in jeweils identischen Verhältnissen am effektivsten. Dies deutet daraufhin, dass die Chaperonverhältnisse zueinander ein wichtiger Faktor für die effektive Rückfaltung sind. Die Etablierung von vier Modellsubstraten mit großem ClpB-Effekt ermöglicht nun die genaue Charakterisierung von verschiedenen ClpB-Fragmenten und eine Quantifizierung ihrer Aktivität.

3.2 ATP-Verbrauch der Rückfaltung durch das DnaK-ClpB-System

Die ATP-Hydrolyse ist notwendig für die Rückfaltung von Proteinaggregaten durch das DnaK-ClpB-System (Motohashi et al., 1999). Der Funktionszyklus von DnaK wird durch das gebundene Nukleotid gesteuert, die funktionelle Bedeutung der ATP-Hydrolyse von ClpB ist jedoch nicht bekannt. Es ist nicht geklärt, ob die Rate der ATP-Hydrolyse von ClpB durch Substrate oder die anderen Chaperone beeinflusst wird. Mit den in Abschnitt 3.1 etablierten Rückfaltungsassays kann der ATP-Verbrauch des DnaK-ClpB-Systems bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt werden. Dazu wird parallel zu den Aktivitätsbestimmungen der Substratproteine der Nukleotidgehalt des Puffers bestimmt, wodurch eine Stimulierung der ATPase-Aktivität durch Substrate oder andere Faktoren untersucht werden kann.

3.2.1 ATP-Verbrauch und Rückfaltung von α -Glucosidase

Verschiedene Konzentrationen von α -Glucosidase wurden nach Denaturierung mit den optimierten Chaperonkonzentrationen bei 55°C zurückgefaltet. Die Aktivität wurde durch Zugabe eines Aliquots der Rückfaltungsreaktion zu dem Assaypuffer bestimmt und der Nukleotidgehalt parallel durch eine HPLC-Analyse ermittelt. Exemplarisch sind die Ergebnisse mit 0.2 μ M α -Glucosidase in Abbildung 3.2.1 gezeigt.

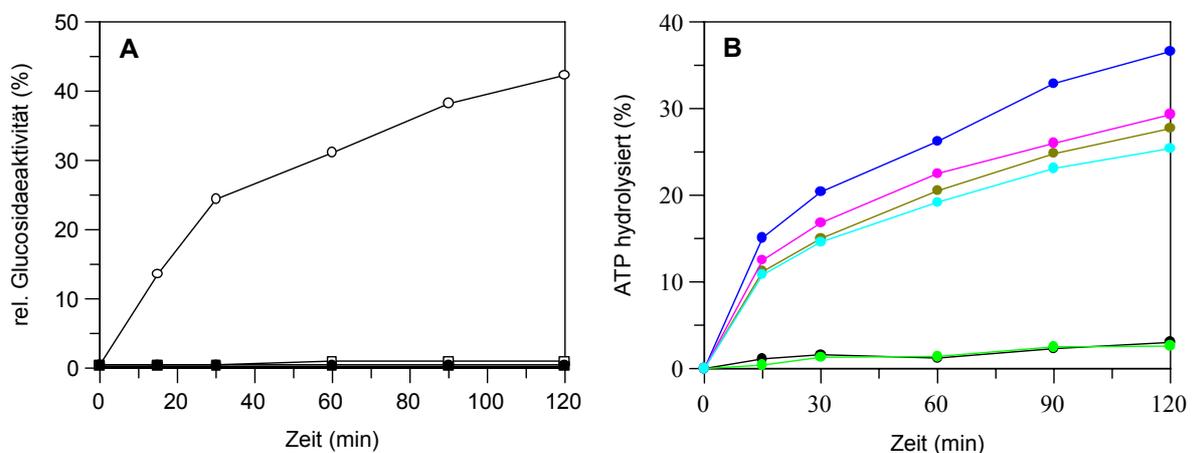


Abb. 3.2.1 Rückfaltung von α -Glucosidase und ATP-Verbrauch

A Rückfaltung von α -Glucosidase

α -Glucosidase (0.2 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert und dann ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, □), mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB, ○) und nur mit ClpB (1.0 μ M, ●) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B ATP-Verbrauch der Rückfaltung

Von den Rückfaltungsansätzen wird die Nukleotidzusammensetzung an den angegebenen Zeitpunkten durch HPLC-Analyse bestimmt. Die Ansätze ohne Chaperone werden als Nullwerte betrachtet, dargestellt sind das DnaK-System (●), das DnaK-System mit ClpB (●), und nur ClpB (●). Parallel werden als Kontrollen identische Ansätze ohne Substrat (-S) inkubiert. Dargestellt sind das DnaK-System (-S, ●), das DnaK-System mit ClpB (-S, ●), und nur ClpB (-S, ●).

Wie in Abschnitt 3.1.1 gezeigt wurde, kann nur die Kombination aus DnaK-System und ClpB α -Glucosidase zurückfalten. In dem in Abbildung 3.2.1A dargestellten Experiment wurde mit dem DnaK-System und ClpB eine Rückfaltungsausbeute von ca. 40 % erzielt. Sowohl das DnaK-System alleine als auch ClpB alleine waren nicht in der Lage das Enzym zu reaktivieren. Parallel wurden Ansätze mit identischen Chaperonkonzentrationen ohne denaturierte α -Glucosidase inkubiert. Von allen Ansätzen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Nukleotidzusammensetzung des Puffers bestimmt (Abb. 3.2.1B). Das DnaK-System allein hatte eine relativ geringe ATP-Hydrolyseaktivität, die zudem von dem Substrat bei dieser Konzentration kaum stimuliert wurde. Nach 90 Minuten waren nur 2.6 % des ATPs verbraucht. In den Ansätzen in denen nur ClpB vorlag, war deutlich mehr ATP hydrolysiert worden. Nach 90 Minuten ohne Substrat wurden 23.1 % des ATPs verbraucht. Durch die Anwesenheit von Substraten erhöhte sich dieser Anteil auf 24.8 %. Die Unterschiede in der ATP-Hydrolyse spiegeln die zuvor publizierten ATPase-Aktivitäten von ClpB und DnaK wider (Klostermeier et al., 1998; Schlee et al., 2001). Die Reaktionen mit dem DnaK-System und ClpB zeigten die höchste ATPase-Aktivität. So wurden von dieser Kombination in den Ansätzen mit Substrat 32.9 %, in den Ansätzen ohne Substrat 26.1 % des ATPs hydrolysiert worden. Aufgrund der höheren ATPase-Aktivität von ClpB dürfte der Hauptanteil des ATPs in diesen Ansätzen von ClpB hydrolysiert worden sein.

Die Analysen der Rückfaltungsreaktion und des ATP-Verbrauchs wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Ein Vergleich der Rückfaltungsausbeuten nach 90 Minuten zeigte, dass das thermophile Chaperonsystem α -Glucosidase in einem großen Konzentrationsbereich zurückfalten konnte (Abb. 3.2.2A).

Zwischen 0.05 μ M und 0.4 μ M änderte sich die Ausbeute der Reaktivierung nur geringfügig. Erst bei höheren Konzentrationen sank die Ausbeute von ca. 40 % bis auf 13 % bei 6.4 μ M α -Glucosidase ab. Die Abnahme der Ausbeute ist durch die stärkere Aggregation der α -Glucosidase zu erklären. Aggregation ist ein stark konzentrationsabhängiger Prozess, so dass bei hohen Proteinkonzentrationen die Aggregation zunimmt. Es entstehen somit auch Aggregate, die nicht mehr von dem DnaK-ClpB-System reaktiviert werden können.

Der ATP-Verbrauch dieser Rückfaltungsreaktion wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt. Der ATP-Verbrauch der Ansätze des DnaK-Systems mit ClpB und Substrat ist in Abbildung 3.2.2B dargestellt.

Es zeigte sich, dass in dem getesteten Substratbereich der Anteil des hydrolysierten ATPs nur geringfügig zunimmt, von 31.3 % bei 0.05 μ M auf 41.8 % bei 6.4 μ M α -Glucosidase. Diese Steigerung von 34.5 % belegt, dass die ATP-Hydrolyseaktivität des Systems nur geringfügig zunahm, trotz einer Steigerung der Substratkonzentrationen um den Faktor 128.

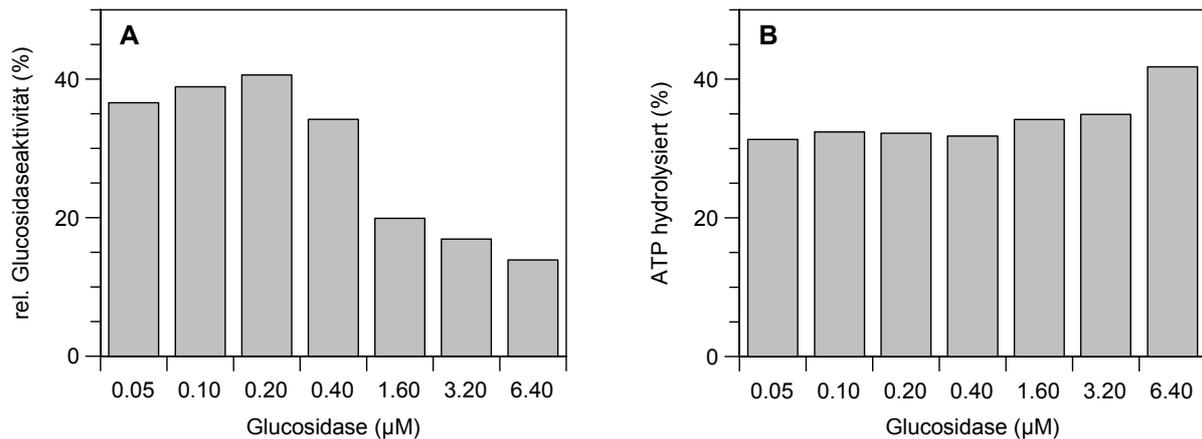


Abb. 3.2.2 Rückfaltung verschiedener α -Glucosidasekonzentrationen und ATP-Verbrauch

A Rückfaltung verschiedener α -Glucosidasekonzentrationen

Die angegebenen Konzentrationen α -Glucosidase wurden 10 Minuten bei 75°C denaturiert und dann mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B ATP-Verbrauch der Rückfaltungsreaktionen

Die angegebenen Konzentrationen α -Glucosidase wurden 10 Minuten bei 75°C denaturiert und dann mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) bei 55°C inkubiert. Die Nukleotidzusammensetzung wurde nach 90 Minuten bestimmt.

Der Unterschied zwischen den Ansätzen der einzelnen Chaperone mit und ohne Substrat wurde bestimmt, um die Stimulierung der einzelnen Chaperone durch Substrate zu untersuchen. Vergleicht man den ATP-Verbrauch in Anwesenheit und Abwesenheit des Substrats kann die relative Stimulierung der ATPase-Aktivität der einzelnen Chaperone berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.1 aufgelistet.

| α -Glucosidase | DnaK+ClpB | ClpB | DnaK |
|-----------------------|-----------|------|------|
| 0.05 μ M | 1.17 | 1.11 | 1.00 |
| 0.1 μ M | 1.23 | 1.16 | 1.22 |
| 0.2 μ M | 1.24 | 1.07 | 1.13 |
| 0.4 μ M | 1.32 | 1.16 | 1.05 |
| 1.6 μ M | 1.29 | 1.26 | 1.08 |
| 3.2 μ M | 1.53 | 1.33 | 1.22 |
| 6.4 μ M | 1.69 | 1.34 | 1.35 |

Tabelle 3.2.1: Stimulierung der ATPase-Aktivität durch α -Glucosidase

Der Faktor der ATP-Hydrolyse-Stimulierung nach 90 Minuten durch Substratanwesenheit ist relativ zur der ATPase-Aktivität ohne Substrat angegeben.

Die ATPase-Aktivität des DnaK-Systems wurde in dem untersuchten Substratkonzentrationsbereich nur wenig stimuliert. Dies kann damit erklärt werden, dass der Chaperonzyklus durch die Kochaperone GrpE und DnaJ reguliert wird und daher die ATP-Hydrolyse nicht durch Substrate moduliert werden muss. Bei ClpB alleine zeigte sich eine ATPase-Stimulation durch Aggregate ebenfalls erst bei hohen Substratkonzentrationen. Die

Stimulation war gering und erreichte ihr Maximum von 1.34 bei 6.4 μM α -Glucosidase. In den Ansätzen mit dem DnaK-System und ClpB war die stärkste Stimulierung zu beobachten. Sie tritt ebenfalls erst bei höheren Substratkonzentrationen auf und ist bei 6.4 μM α -Glucosidase mit einem Wert von 1.69 am größten. Die Stimulation war in diesen Ansätzen größer als in den Einzelansätzen, die nur ClpB bzw. das DnaK-System beinhalteten. Dies deutet auf eine gemeinsame Stimulierung durch Substrate und Kochaperone hin.

Der ATP-Verbrauch der Rückfaltungsreaktion kann mit der Ausbeute der Rückfaltung in Bezug gesetzt werden. Diese Energiebilanz der Chaperonfunktion lässt Rückschlüsse über die Effizienz des Systems zu (Abb. 3.2.3).

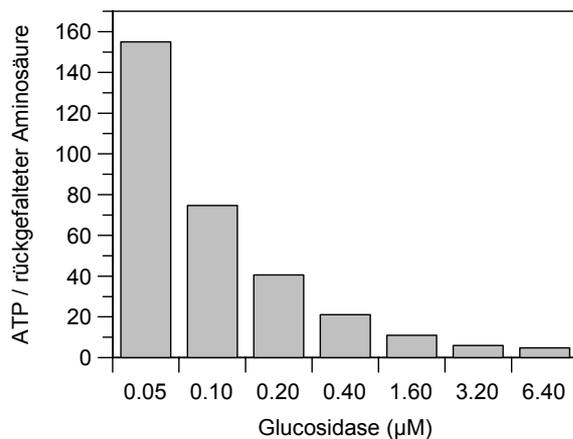


Abb. 3.2.3 ATP-Verbrauch pro rückgefalteter Aminosäure

Der Anteil rückgefalteter α -Glucosidase wurde mit der Aminosäurezahl des Proteins multipliziert und durch die verbrauchte ATP-Menge geteilt. Die Auswertung bezieht sich auf den Messpunkt nach 90-minütiger Inkubation.

Der ATP-Verbrauch wurde durch die HPLC Analyse bestimmt. Die Anzahl der rückgefalteten Aminosäuren wurde durch die Rückfaltungsausbeute und die Substratkonzentration berechnet. Berechnet man die Anzahl der ATP Moleküle (energiereichen Phosphatbindungen), die pro rückgefalteter Aminosäure des Substratproteins zu ADP umgesetzt wurden, ergibt sich folgendes Bild. Die Energiebilanz des Chaperonsystems wurde mit steigender Substratkonzentration besser. Bei Substratkonzentration von 0.05 μM werden noch 150 Moleküle ATP für jede rückgefaltete Aminosäure benötigt. Dieser Wert sank auf ca. 3 Moleküle ATP bei 6.4 μM α -Glucosidase ab. Dies zeigt, dass das DnaK-System in Kooperation mit ClpB ein effizientes Chaperonsystem darstellt.

3.2.2 ATP-Verbrauch und Rückfaltung von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Experimente zur Untersuchung des ATP-Verbrauchs der Rückfaltungsreaktion werden ebenfalls mit GPDH durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen GPDH werden nach Denaturierung mit den optimierten Chaperonkonzentrationen bei 55°C zurückgefaltet. Die Aktivität des Substrats wurde bestimmt und der Nukleotidgehalt des Puffers parallel ermittelt. Exemplarisch sind die Ergebnisse mit 0.2 µM GPDH in der Abbildung 3.2.4 gezeigt.

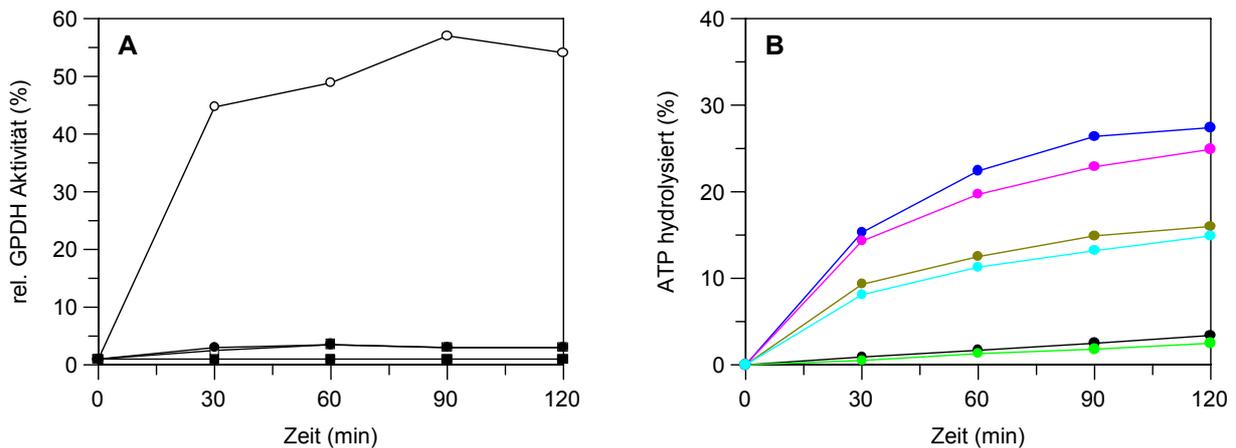


Abb. 3.2.4 Rückfaltung von GPDH und ATP-Verbrauch

A Rückfaltung von GPDH

GPDH (0.2 µM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert und dann ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, □), mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, 1.0 µM ClpB, ●) oder nur mit ClpB (1.0 µM, ○) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B ATP-Verbrauch der Rückfaltung

Von den Rückfaltungsansätzen wird die Nukleotidzusammensetzung an den angegebenen Zeitpunkten durch HPLC-Analyse bestimmt. Die Ansätze ohne Chaperone werden als Nullwerte betrachtet, dargestellt sind das DnaK-System (●), das DnaK-System mit ClpB (●), nur ClpB (●). Parallel werden als Kontrollen identische Ansätze ohne Substrat (-S) inkubiert. Dargestellt sind das DnaK-System (-S, ●), das DnaK-System mit ClpB (-S, ●), und nur ClpB (-S, ●).

Wie auch in Abschnitt 3.1.2 gezeigt wurde, konnte nur die Kombination aus DnaK-System und ClpB GPDH effektiv zurückfalten. Sowohl das DnaK-System alleine als auch ClpB alleine waren nicht in der Lage das Enzym zu reaktivieren. In diesem Experiment wurde mit dem DnaK-System und ClpB eine Ausbeute von ca. 60 % erzielt (Abb. 3.2.4A). Parallel wurden Ansätze mit identischen Chaperonkonzentrationen ohne denaturierte GPDH inkubiert. Wie in Abschnitt 3.2.1 für α-Glucosidase beschrieben, wurde von den Ansätzen zu den angegebenen Zeitpunkten die Nukleotidzusammensetzung des Puffers bestimmt (Abb. 3.2.4B). Das DnaK-System allein hatte erneut eine relativ geringe ATP-Hydrolyseaktivität, die zudem durch das Substrat bei dieser Konzentration kaum stimuliert wurde. Nach 90 Minuten waren nur 2.5 % des ATPs verbraucht. In den Ansätzen in denen nur ClpB vorhanden war, wurde mehr ATP hydrolysiert. Nach 90 Minuten ohne Substrat wurden 13.2 % des ATPs hydrolysiert, durch die Anwesenheit von Substrat erhöhte sich dieser Anteil auf

14.9 %. Die Reaktionen mit dem DnaK-System und ClpB wiesen die höchste ATPase-Aktivität auf. So waren von dieser Kombination in den Ansätzen mit Substrat 26.4 % ATP, in den Ansätzen ohne Substrat 22.9 % des ATPs hydrolysiert worden. Aufgrund der höheren ATPase-Aktivität dürfte ClpB für den Hauptanteil der ATP-Hydrolyse in diesen Ansätzen verantwortlich gewesen sein.

Wie bei α -Glucosidase wurde diese Analyse der Rückfaltung und des ATP-Verbrauchs bei verschiedenen GPDH-Konzentrationen durchgeführt. Ein Vergleich der Rückfaltungsausbeuten nach 90 Minuten zeigt, dass das thermophile Chaperonsystem GPDH in dem gesamten Konzentrationsbereich zurückfalten konnte (Abb. 3.2.5A). Die Reaktionsausbeute schwankte zwischen 26 % und 58 %. Die starke Schwankung wurde vermutlich durch unkontrollierte Aggregation der GPDH verursacht. Der ATP-Verbrauch der Rückfaltungsreaktion wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt. Der ATP-Verbrauch der Ansätze des DnaK-Systems mit ClpB und Substrat ist in Abbildung 3.2.5B gezeigt.

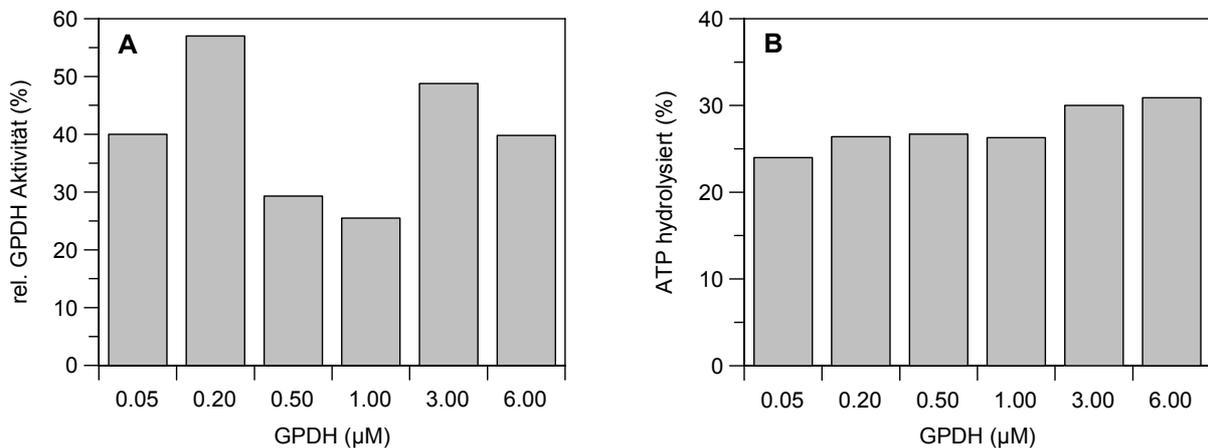


Abb. 3.2.5 Rückfaltung verschiedener GPDH-Konzentrationen und ATP-Verbrauch

A Rückfaltung verschiedener GPDH-Konzentrationen

Die angegebenen Konzentrationen GPDH wurden 7½ Minuten bei 75°C denaturiert und dann mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) bei 55°C inkubiert. Die Aktivität wurde nach 90 Minuten bestimmt und ist relativ zu der Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B ATP-Verbrauch der Rückfaltungsreaktionen

Die angegebenen Konzentrationen GPDH wurden 7½ Minuten bei 75°C denaturiert und dann mit dem DnaK-System mit ClpB (1.6 μ M DnaK, 0.4 μ M DnaJ, 0.2 μ M GrpE, 1.0 μ M ClpB) bei 55°C inkubiert. Die Nukleotidzusammensetzung wurde nach 90 Minuten bestimmt.

In dem untersuchten Substratbereich wurde die ATP-Hydrolyse der Chaperone nur geringfügig stimuliert. Von 24.0 % bei 0.05 μ M GPDH steigt der ADP-Anteil auf 30.9 % bei 6.0 μ M GPDH. Diese Steigerung um 28.3 % bei einer Steigerung der Substratkonzentration um den Faktor 120 zeigt, dass die ATPase-Aktivität nur geringfügig bei höheren Substratkonzentrationen ansteigt.

Der Unterschied zwischen den Ansätzen der einzelnen Chaperone mit und ohne Substrat wurde ebenfalls bestimmt. Vergleicht man den ATP-Verbrauch in Anwesenheit und

Abwesenheit denaturierter GPDH, konnte die substratbedingte Stimulierung der ATPase-Aktivität der einzelnen Chaperone bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

| GPDH | DnaK+ClpB | ClpB | DnaK |
|--------------------------------------|-----------|------|------|
| 0.05 μM | 1.06 | 1.02 | 1.11 |
| 0.2 μM | 1.15 | 1.12 | 1.04 |
| 0.5 μM | 1.20 | 1.01 | 1.23 |
| 1.0 μM | 1.16 | 1.01 | 1.11 |
| 3.0 μM | 1.28 | 1.13 | 1.07 |
| 6.0 μM | 1.45 | 1.13 | 1.11 |

Tabelle 3.2: Stimulierung der ATPase-Aktivität durch GPDH

ATP-Hydrolyse-Stimulierung nach 90 Minuten durch Substratanwesenheit ist relativ zur der ATPase-Aktivität ohne Substrat angegeben.

Bei geringen Substratkonzentrationen (0.05 - 1.0 μM) wurde die ATPase-Aktivität der einzelnen Komponenten nur geringfügig stimuliert. Erst bei höheren Substratkonzentrationen zeigte sich ein stimulierender Effekt durch Aggregate.

Die ATPase-Aktivität des DnaK-Systems wurde erneut nur wenig stimuliert. Dies zeigt, dass Substrate die ATPase-Aktivität von DnaK in Gegenwart von GrpE und DnaJ nicht beeinflussten. Bei ClpB alleine zeigte sich kaum eine ATPase-Stimulation durch denaturierte GPDH. Die Stimulation war gering und erreicht maximal den Faktor 1.13 bei 6.0 μM GPDH. In den Ansätzen mit dem DnaK-System und ClpB war die deutlichste Stimulierung zu beobachten. Sie trat ebenfalls erst bei höheren Substratkonzentrationen auf und erreichte bei der maximal getesteten Substratkonzentration ihr Maximum von 1.45. Interessanterweise war die Stimulation in diesen Ansätzen größer als in den Einzelansätzen, die nur ClpB bzw. nur das DnaK-System enthielten. Dies deutet, wie bei den Messungen mit α -Glucosidase, auf eine gemeinsame Stimulierung durch Substrate und die Chaperone untereinander hin.

Der ATP-Verbrauch der Rückfaltungsreaktion kann mit der Ausbeute in Bezug gesetzt werden. In Abbildung 3.2.6 ist die Anzahl der energiereichen Phosphatbindungen, die pro rückgefalteter Aminosäure verbraucht wurden, gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Energiebilanz des Systems verbesserte sich deutlich mit steigender Substratkonzentration. Wurden bei einer GPDH-Konzentration von 0.05 μM noch 120 Moleküle ATP pro rückgefalteter Aminosäure verbraucht, reduzierte sich dieser Wert bei der größten getesteten Substratkonzentration auf unter 2 Moleküle ATP pro rückgefalteter Aminosäure. Auch bei diesem Substrat ist das DnaK-System in Kooperation mit ClpB somit ein effizientes Chaperonsystem.

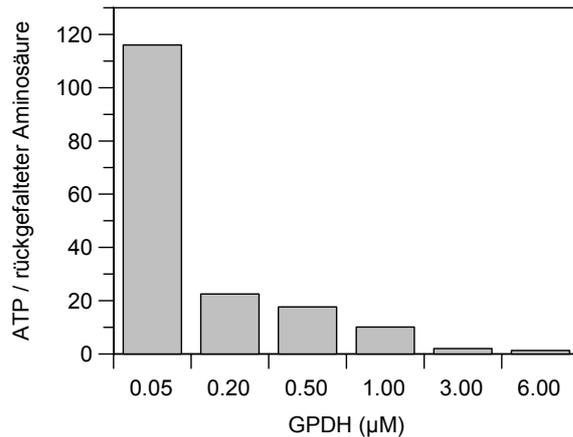


Abb. 3.2.6 ATP-Verbrauch pro rückgefalteter Aminosäure

Der Anteil rückgefalteter GPDH wurde mit der Aminosäurezahl des Proteins multipliziert und durch die verbrauchte ATP-Menge geteilt. Die Auswertung bezieht sich auf den Messpunkt nach 90 minütiger Inkubation.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das DnaK-System in Kooperation mit ClpB α -Glucosidase und GPDH in einem großen Substratkonzentrationsbereich zurückfalten kann. Die ATPase-Aktivität des Chaperonsystems wurde durch die Anwesenheit der Substrate nur geringfügig stimuliert. Zusätzlich nahm der ATP-Verbrauch der Rückfaltungsreaktionen mit der Höhe der Substratkonzentration nur wenig zu. Die Höhe der Stimulation in den Ansätzen von ClpB und dem DnaK-System mit Substraten war höher als in den Einzelansätzen. Dies deutet auf eine gemeinsame Stimulierung durch Substrat und Kochaperone hin.

Bei energetischer Betrachtung der Rückfaltungsreaktion zeigt sich, dass bei hohen Substratkonzentrationen, wie sie bei einem Hitzeschock intrazellulär entstehen würden, das DnaK-ClpB-System effizient arbeitet. Bei maximaler Substratkonzentration wurden nur 2-3 Moleküle ATP pro rückgefalteter Aminosäure verbraucht. Das DnaK-System in Kooperation mit ClpB ist somit ein energetisch effizientes Chaperonsystem.

3.3 Funktion der N-terminalen Domäne von ClpB

ClpB besitzt zwei AAA-Kassetten, die durch einen Linker verbunden werden. Der ersten AAA-Kassette von ClpB geht eine N-terminale Domäne voraus. Die mRNA von ClpB aus *E. coli* hat ein internes Translationsinitiationssignal. Daher werden *in vivo* zwei Genprodukte exprimiert: das vollständige Protein und ein Protein, das am alternativen Startcodon beginnt und die N-terminale Domäne nicht besitzt. Das N-terminal verkürzte Protein aus *E. coli* war *in vitro* inaktiv in Rückfaltungsexperimenten, konnte aber noch oligomerisieren und ATP hydrolysieren (Barnett et al., 2000). Bei ClpB von *T. thermophilus* ist bisher nicht bekannt, welche Auswirkungen die Deletion der N-terminalen Domäne hat. ClpB aus *T. thermophilus* zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu dem *E. coli* Protein (41 % Identität). Es besitzt wie ClpB aus *E. coli* einen konservierten Valin-Rest (Val-141), der von einem GUG-Codon codiert wird. Dies ist identisch zu dem Val-149 in *E. coli*, das als internes Startcodon verwendet wird. Bei Überexpression von ClpB_{Th} in *E. coli* wird jedoch kein verkürztes Protein gebildet. Um die Eigenschaften eines verkürzten ClpB-Fragments zu untersuchen wurde ein ClpB-Konstrukt hergestellt, das die N-Domäne nicht mehr besitzt (ClpB Δ N). Zusätzlich wurde die N-Domäne (ClpBN) einzeln kloniert (Abb. 3.3.1A).

3.3.1 Stabilität der verwendeten Proteine

Die klonierten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die korrekte Faltung der gereinigten Proteine und der Effekt der N-terminalen Verkürzung auf die Proteinfaltung wurden durch CD-Spektren untersucht (Abb. 3.3.1B). Das CD-Spektrum von ClpB Δ N war dem CD-Spektrum von ClpB ähnlich. Es zeigte die, für α -helikale Proteine charakteristischen, Minima bei 208 nm und 222 nm. Das Spektrum von ClpBN besaß ebenfalls das Minimum bei 208 nm, der zweite Minimalwert ist jedoch weniger stark ausgeprägt. Diese Spektren zeigen, dass das verkürzte Protein korrekt gefaltet ist und dass die isolierte N-Domäne selbstständig die native Struktur einnehmen kann.

3.3.2. Oligomerisierungsverhalten von ClpB und ClpB Δ N

Die Oligomerisierung von ClpB Δ N und ClpB wurde durch Gelfiltrationsläufe analysiert und ist in Abbildung 3.3.2 dargestellt. Vergleicht man die beiden Proteine zeigte ClpB Δ N ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten wie ClpB. ATP und eine geringe Ionenstärke stabilisierten höhere oligomere Formen bis zu Hexameren. ADP und eine hohe Ionenstärke des Puffers führte zur Ausbildung von kleineren Oligomeren. Durch eine quantitative Analyse kann die Verteilung der oligomeren Formen direkt verglichen werden. Die Quantifizierung wurde anhand definierter Grenzen (siehe Material und Methoden) zwischen den Oligomeren vorgenommen und ist in Tabelle 3.3.1 zusammengefasst.

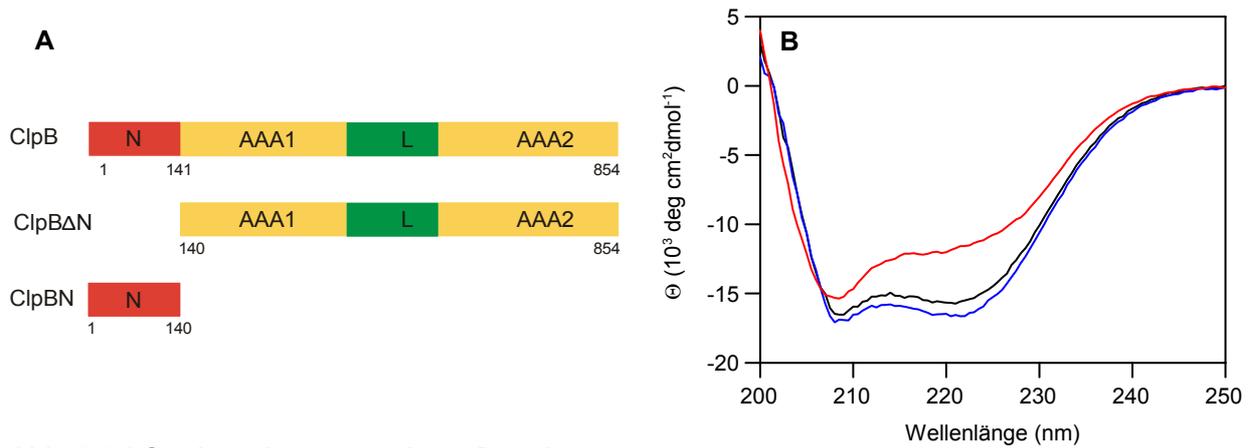


Abb. 3.3.1 Struktur der verwendeten Proteine

A Schematische Darstellung der verwendeten Proteine

Gezeigt sind die AAA-Module, die N-terminale Domäne und die Linker Domäne. Die Grenzen wurden anhand der Konsensussequenzen für AAA+-Proteine gezogen (Neuwald et al., 1999). In ClpBΔN wurden die ersten 139 Aminosäuren entfernt und Thr-140 wurde durch Met ersetzt. Bei ClpBN wurde ein Stopcodon an Position 140 eingefügt.

B Sekundärstrukturanalyse der Proteine

Die CD-Spektren von ClpB (—), ClpBΔN (—) und ClpBN (—) sind dargestellt. Die Messwerte sind als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest (Θ) angegeben.

Bei ATP und niedriger Salzkonzentration ist das Hexamer die bevorzugte oligomere Form (1 mM ATP, 1 mM KCl: ClpB 77.6 %, ClpBΔN 68.7 %). Durch ADP und Hochsalzbedingungen wurde das Monomer stabilisiert (1 mM ADP, 500 mM KCl: ClpB 88.9 %, ClpBΔN 90.3 %). Unterschiede zwischen den Proteinen gab es bei mittlerer Salzkonzentration. Hier bildete ClpBΔN mehr Oligomere als ClpB aus (1 mM ADP, 200mM KCl: ClpB 62.1 Monomer, ClpBΔN 34.1 % Monomer). Die Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass die N-terminale Domäne nicht notwendig für die Oligomerisierung von ClpB ist.

Tabelle 3.3.1 Quantifizierung der Oligomerisierung von ClpB und ClpBΔN

Die Quantifizierung erfolgte anhand der festgelegten Grenzen zwischen den einzelnen Oligomeren. Die Werte für ClpB sind fett gedruckt, die Werte für ClpBΔN sind in Klammern angegeben. Die Werte geben die prozentualen Anteile der jeweiligen oligomeren Formen an. Die Werte für ClpB wurden aus (Schlee et al., 2001) entnommen.

ATP

| Salz | Monomer | Dimer | Trimer | Tetra-Hexamer |
|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1mM | 3.2 (1.2) | 7.2 (9.9) | 12.0 (20.2) | 77.6 (68.7) |
| 200mM | 15.3 (10.7) | 39.7 (42.3) | 39.0 (43.9) | 6.0 (3.1) |
| 500mM | 18.7 (24.4) | 68.9 (68.2) | 12.3 (5.2) | 0.1 (2.2) |

ADP

| Salz | Monomer | Dimer | Trimer | Tetra-Hexamer |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 mM | 10.4 (7.1) | 24.0 (18.5) | 37.6 (32.4) | 28.0 (42.2) |
| 200 mM | 62.1 (34.7) | 34.2 (57.5) | 2.3 (5.1) | 1.4 (2.7) |
| 500 mM | 88.9 (90.3) | 10.5 (6.6) | 0.5 (1.4) | 0.1 (1.7) |

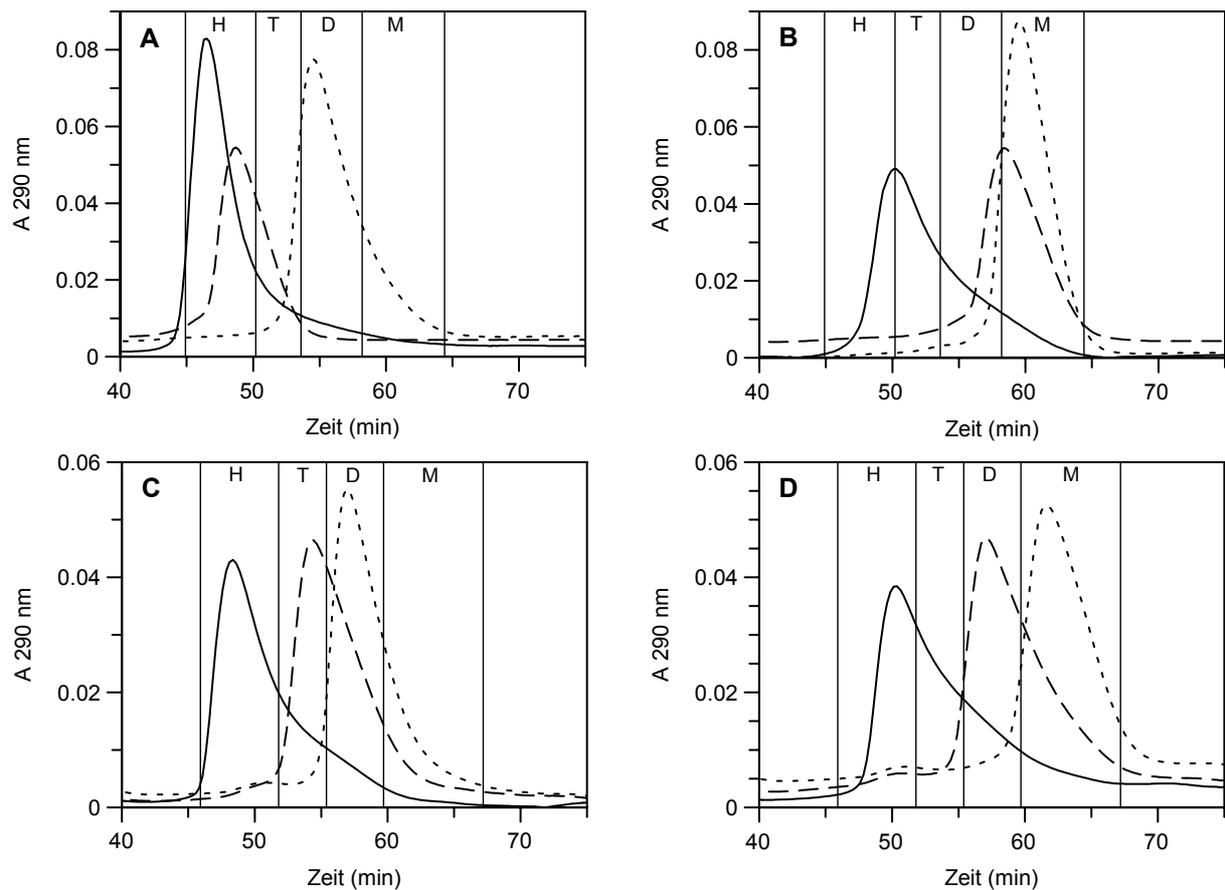


Abb. 3.3.2 Gelfiltration von ClpB und ClpBΔN

Die Proteine wurden mit 0.2 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule injiziert. Die dünnen Linien geben die Grenzen zwischen Monomeren (M), Dimeren (D), Trimeren (T) und höheren Oligomeren bis zu Hexameren (H) an (siehe Material und Methoden).

Die Proteine wurden mit Nukleotiden und verschiedenen Salzkonzentrationen untersucht:

1 mM KCl: durchgezogene Linie, 200 mM KCl gestrichelte Linie, 500 mM KCl: gepunktete Linie ClpB wurde mit ATP (A) und mit ADP untersucht (B), ClpBΔN wurde ebenfalls mit ATP (C) und mit ADP (D) untersucht.

Um einen direkten Effekt der N-Domäne auf die Oligomerisierung von ClpBΔN zu untersuchen, wurden Gelfiltrationsläufe von einer Mischung der Proteine durchgeführt und mit den Läufen der von ClpBN und ClpBΔN verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.3 dargestellt. ClpBΔN zeigte die zuvor beschriebene Oligomerisierung (Retentionszeit 24 Minuten) bei niedriger Salzkonzentration und ATP. ClpBN eluierte erst nach einer Retentionszeit von 42 Minuten. Anhand der Eichgerade konnte der N-Domäne ein apparentes Molekulargewicht von 15 kDa zugewiesen werden. Dies entspricht der Größe eines Monomers. Die Mischung aus ClpBN und ClpBΔN zeigte keine Komplexbildung bei der Gelfiltration. Die Proteine eluierten in zwei getrennten Peaks mit den Retentionszeiten, die für die Einzelkomponenten gefunden wurden. Dies belegt, dass nur schwache Wechselwirkungen zwischen der N-Domäne und dem Rest des ClpB-Proteins existieren

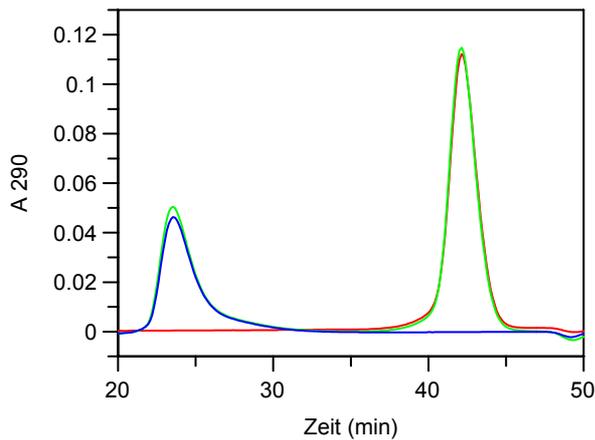


Abb. 3.3.3 Gelfiltration von ClpB Δ N und ClpB Δ N
 Die Proteine (5 mg/ml) wurden mit 0.4 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule gegeben, der Puffer enthielt 1 mM KCl und 1 mM ATP. ClpB Δ N (—) eluierte aufgrund der Oligomerisierung bereits nach kurzer Retentionszeit. ClpB (—) eluierte erst deutlich später. Die Mischung aus ClpB Δ N und ClpB (—) zeigte keine Veränderung im Vergleich zur Summe der Einzelkomponenten.

3.3.3 Nukleotidbindung von ClpB und ClpB Δ N

Der Effekt der N-terminalen Verkürzung des Proteins auf die Nukleotidbindung wurde ebenfalls untersucht. Die Affinitäten für die fluoreszierenden Nukleotidanaloga Mant-ADP und Mant-ATP wurden durch Gleichgewichtstitrationen, die Affinitäten für die nicht modifizierten Nukleotide durch Verdrängungsexperimente ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.2 zusammengefasst.

| | ClpB | ClpB Δ N |
|-----------------|------|-----------------|
| ADP | 1.5 | 4.5 |
| Mant-ADP | 0.2 | 0.4 |
| ATP | 21 | 26.0 |
| Mant-ATP | 5.4 | 5.4 |

Tabelle 3.3.2 Nukleotiddissoziationskonstanten (K_d , μ M) für ClpB and ClpB Δ N

Die Bindung von ATP und Mant-ATP wurden aufgrund der geringen intrinsischen ATPase-Aktivität und der kurzen Zeitdauer der Experimente als Gleichgewichtsreaktion betrachtet. Die Affinitäten von ClpB zu ADP und ATP sind aus (Schlee et al., 2001) übernommen.

Die getesteten Nukleotide wurden von ClpB Δ N und ClpB ähnlich stark gebunden. Die Affinität für Mant-ADP war sehr ähnlich (ClpB 0.2 μ M, ClpB Δ N 0.4 μ M), die Affinität für Mant-ATP war identisch (5.4 μ M). Im Allgemeinen wurden die nicht modifizierten Nukleotide eine Größenordnung schwächer gebunden als die modifizierten Nukleotide. Die Dissoziationskonstanten für ADP wurden für ClpB mit 1.5 μ M und für ClpB Δ N mit 4.5 μ M bestimmt. Die Affinität für ATP betrug bei ClpB 21 μ M und bei ClpB Δ N 26 μ M. Zusammengefasst zeigt die große Ähnlichkeit der K_d -Werte, dass die N-terminale Domäne ist nicht an der Nukleotidbindung von ClpB beteiligt ist.

3.3.4 ATPase-Aktivität von ClpB und ClpB Δ N

Um den Einfluss der N-Domäne auf die ATPase-Aktivität zu bestimmen wurden Steady State Messungen durchgeführt. Wurden die beobachteten Ratenkonstanten (k) gegen die ATP-Konzentration aufgetragen zeigte sich ein sigmoider Verlauf der Messwerte zwischen 0.1 und 2 mM ATP (Abb. 3.3.4). Aufgrund des sigmoiden Verlaufs wurden die gemessenen Daten mit der Hill-Gleichung ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.3.3 angegeben.

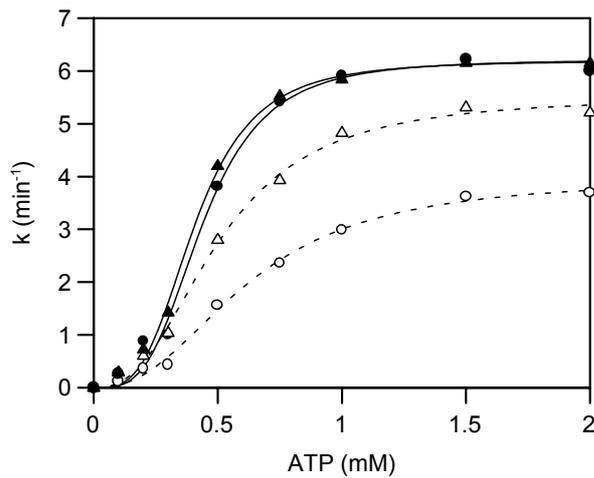


Abb. 3.3.4 Steady State ATPase-Aktivitäten von ClpB und ClpBΔN

ClpB (10 μ M, \circ) oder ClpBΔN (10 μ M, \triangle) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mg•ATP bei 25°C inkubiert. Für die Stimulation mit Casein wurden 0.1 mg/ml κ -Casein zu den Reaktionen mit ClpB (\bullet) oder ClpBΔN (\blacktriangle) gegeben. Die beobachteten Ratenkonstanten wurden gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und mit der Hill-Gleichung ausgewertet.

Tabelle 3.3.3 Kinetische Analyse der Steady State ATPase-Aktivität mit der Hill-Gleichung

Die Messwerte ohne Casein sind fett gedruckt, die Werte mit Casein in Klammern angegeben.

| | k_{cat} (min^{-1}) | K_m (mM) | Hill-Koeffizient |
|---------------|---------------------------------|--------------------|------------------|
| ClpB | 3.9 (6.2) | 0.62 (0.44) | 2.4 (3.4) |
| ClpBΔN | 5.5 (6.2) | 0.50 (0.41) | 2.5 (3.4) |

ClpB zeigte eine positive Kooperativität der ATP-Hydrolyse und eine starke Stimulation durch Casein. ClpBΔN hatte eine höhere basale ATPase-Aktivität, die nur schwach durch Casein stimuliert wurde. Der k_{cat} -Wert von ClpB (3.9 min^{-1}) wurde durch Casein um 60 % gesteigert. Der k_{cat} -Wert von ClpBΔN (5.5 min^{-1}) nahm durch Casein nur um 10 % zu. Der k_{cat} -Wert in Anwesenheit von Casein war für beide Proteine ähnlich (6.2 min^{-1}). Dieser Wert könnte der maximalen ATP-Hydrolyserate des ClpB-Hexamers bei der angegebenen Temperatur entsprechen. Das allosterische Verhalten des Proteins wurde durch das Entfernen des N-Terminus nicht verändert. Dies wird durch die Hill-Koeffizienten (N_h) ohne Casein (ClpB N_h : 2.4, ClpBΔN N_h : 2.5) und mit Casein (N_h 3.4 für beide Proteine) und die ähnlichen K_m -Werte bestätigt. Diese Ergebnisse belegen, dass die N-terminale Domäne nicht an intermolekularen Kontakten beteiligt ist, die wichtig für das allosterische Verhalten des Proteins sind.

Eine mögliche Komplexbildung von ClpBN zu ClpBΔN wurde ebenfalls durch Messungen der ATPase-Aktivität untersucht. Die Auswirkungen von ClpBN auf die Steady State ATPase-Aktivität von ClpBΔN wurden getestet und sind in Abbildung 3.3.5 gezeigt. Die Zugabe der N-Domäne zu ClpBΔN beeinflusste die ATPase-Aktivität von ClpBΔN nicht. Die ATPase-Aktivität nahm durch die Zugabe von ClpBN nicht auf den Wert von ClpB ab. Ebenso war keine Stimulierung der ATPase-Aktivität durch Casein zu beobachten, wenn ClpBN in den Ansätzen vorhanden war. Dies bestätigt die Ergebnisse der Gelfiltration von ClpBΔN mit ClpBN, die ebenfalls keinen Hinweis auf eine Komplexbildung geliefert hatten.

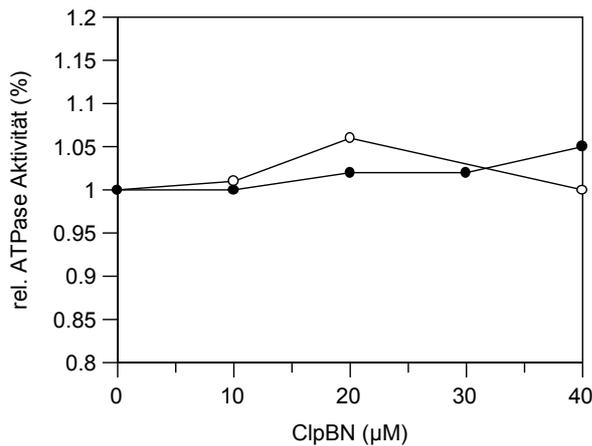


Abb. 3.3.5 Einfluss von ClpBN auf die ATPase-Aktivität von ClpBΔN

ClpBΔN (10 µM) wurde unter Steady State Bedingungen mit ATP (1 mM) bei 25°C inkubiert. Die beobachteten Ratenkonstanten mit (●) und ohne Casein (○) wurden relativ zu der Aktivität ohne ClpBN gesetzt und gegen die ClpBN-Konzentration aufgetragen.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die weniger starke Stimulierung der ATPase-Aktivität von ClpBΔN durch κ-Casein auf einer schwächeren Bindung oder einer verminderten Kopplung von Caseinbindung und ATPase-Stimulierung beruht. Als Bindungspartner wurde fluorescein-markiertes Casein (FITC-Casein) verwendet. Es wurde zunächst getestet, ob dieses modifizierte Casein ebenfalls die ATPase-Aktivitäten von ClpB und ClpBΔN stimuliert. ClpB und ClpBΔN wurden mit unter Steady State Bedingungen mit steigenden Konzentrationen von FITC-Casein inkubiert und die ATPase-Aktivität der Proteine bestimmt (Abb. 3.3.6A).

Die ATPase-Aktivität von ClpB nahm durch FITC-Casein um 250 % zu, die ATPase-Aktivität von ClpBΔN wurde durch FITC-Casein nur um 25 % erhöht. Diese Werte waren der Stimulation der ATPase-Aktivitäten durch κ-Casein sehr ähnlich (siehe Abb. 3.3.4).

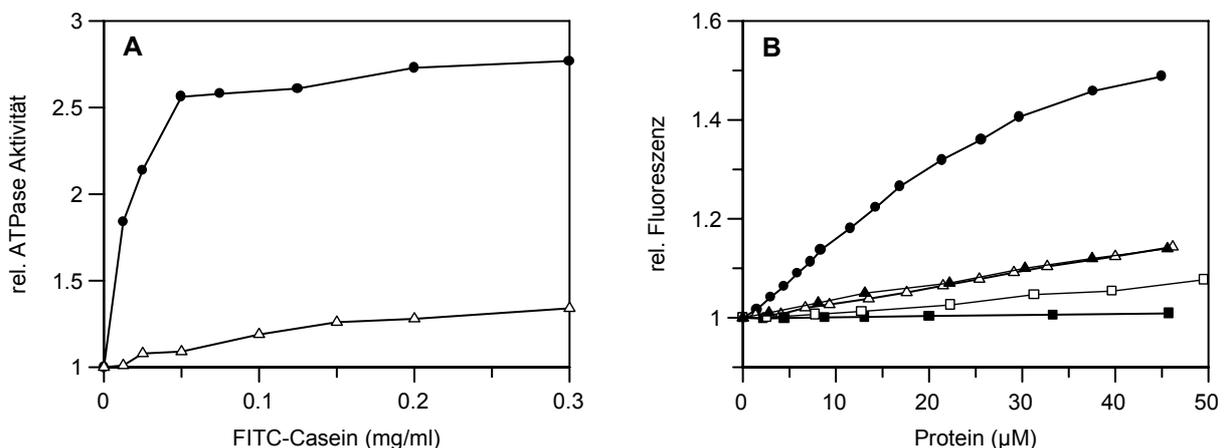


Abb. 3.3.6 Interaktion von ClpB und ClpBΔN mit FITC-Casein

A Stimulierung der ATPase-Aktivität durch FITC-Casein

ClpB (10 µM, ●) und ClpBΔN (10 µM, △) wurden bei 25°C mit ATP (1 mM) unter Steady State Bedingungen mit steigenden Mengen FITC-Casein inkubiert. Die beobachteten Ratenkonstanten wurden relativ zur unstimulierten Aktivität gesetzt und gegen die FITC-Casein-Konzentration aufgetragen.

B Bindung von FITC-Casein an ClpB und ClpBΔN

Die Bindung von Proteinen an FITC-Casein wurde durch die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 25°C von FITC-Casein nach Proteinzugabe beobachtet. Aufgetragen sind die Messergebnisse für ClpB (●), ClpBΔN (△), ClpBΔN+ClpBN (▲), ClpBN (□) und für BSA (■).

Die Bindung von ClpB an FITC-Casein wurde durch die Änderung des Fluoreszenzsignals nach Proteinzugabe detektiert (Abb. 3.3.6B). Durch Zugabe von ClpB stieg die Fluoreszenz stärker an (ca. 50 %), als nach Zugabe von ClpB Δ N, und erreichte den Sättigungsbereich des Signals. Die Fluoreszenzzunahme nach ClpB Δ N Zugabe (ca. 10 %) war proportional zur zugegebenen Proteinmenge und erreichte keine Sättigung. Die Zugabe der Mischung aus ClpB Δ N und ClpBN zeigte keine Veränderung zu den Messungen nur mit ClpB Δ N. Dies ist ein weiteres Indiz für eine nur schwache Interaktion von ClpB Δ N und ClpBN. ClpBN alleine bewirkte nur eine sehr geringe Fluoreszenzzunahme von FITC-Casein, die sich nur geringfügig von dem Kontrollsignal für BSA unterschied. Aufgrund der heterogenen Struktur von Casein und des unspezifischen Markierens mit dem Fluoreszenzfarbstoff konnten keine Dissoziations-konstanten bestimmt werden. Es ist aber ersichtlich, dass FITC-Casein besser von ClpB als von ClpB Δ N gebunden wird. Dies deutet daraufhin, dass die reduzierte Stimulation der ATPase-Aktivität von ClpB Δ N durch Casein mit einer reduzierten Bindung von Casein an ClpB Δ N korreliert.

Um zu überprüfen, ob die reduzierte Stimulationsfähigkeit der ATPase-Aktivität eine generelle Eigenschaft von ClpB Δ N ist, wurden Messungen mit Poly-L-Lysin durchgeführt. Poly-L-Lysin wurde bereits zuvor als Stimulans der ATPase-Aktivität von ClpB und Hsp104 verwendet (Tek und Zolkiewski, 2002; Cashikar et al., 2002). ClpB und ClpB Δ N wurden unter Steady State Bedingungen mit ATP und steigenden Poly-L-Lysin-Konzentrationen inkubiert (Abb. 3.3.7).

ClpB und ClpB Δ N reagierten sehr ähnlich auf Poly-L-Lysin. Die ATPase-Aktivität von beiden Proteinen wurde 2.5 fach stimuliert. Dies zeigt, dass die ATPase-Aktivität von ClpB Δ N stimulierbar ist und dass beide Proteine Poly-L-Lysin binden.

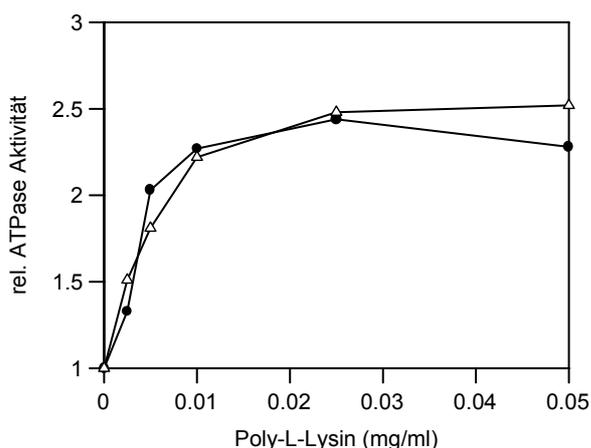


Abb. 3.3.7 Stimulierung der ATPase-Aktivität von ClpB und ClpB Δ N durch Poly-L-Lysin

ClpB (10 μ M, ●) und ClpB Δ N (10 μ M, △) wurden bei 25°C mit ATP (1 mM) unter Steady State Bedingungen mit steigenden Mengen Poly-L-Lysin inkubiert. Die beobachteten Ratenkonstanten wurden relativ zur unstimulierten Aktivität gesetzt und gegen die Poly-L-Lysin -Konzentration aufgetragen.

3.3.5 Chaperonaktivität von ClpB und ClpB Δ N

Wie in den vorigen Abschnitten dargestellt, kann ClpB Δ N sowohl oligomerisieren als auch ATP hydrolysieren. In diesen Merkmalen hatte die Deletion der N-terminalen Domäne nur einen geringen Effekt auf die Funktionen des Proteins. Die funktionelle Aktivität von ClpB Δ N im Vergleich zu ClpB wurde durch Rückfaltungsassays untersucht. Die etablierten Substratproteine wurden ohne Chaperone denaturiert und mit den optimierten Chaperonkonzentrationen zurückgefaltet (siehe auch Abschnitt 3.1). Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.3.8 dargestellt.

Denaturierte α -Glucosidase konnte von ClpB in Kooperation mit dem DnaK-System effektiv zurückgefaltet werden. Die Ausbeute der Rückfaltung betrug ca. 40 % der Ausgangsaktivität. ClpB Δ N zeigte $\frac{2}{3}$ der Aktivität von ClpB. Das DnaK-System alleine bewirkte kaum eine Rückfaltung der α -Glucosidase, weniger als 5 % der α -Glucosidase wurde reaktiviert. Bei Inkubation ohne Chaperone wurde keine α -Glucosidaseaktivität gemessen.

GPDH wurde nach kürzerer Denaturierungszeit mit Chaperonen inkubiert. Bei der Rückfaltung des denaturierten Substrats besaß ClpB Δ N ca. 70 % der Aktivität von ClpB, und konnte nur 50 % statt 70 % der Aktivität der GPDH wieder herstellen. Das N-terminal verkürzte Protein zeigte somit erneut Chaperonaktivität. Das DnaK-System allein konnte ca. 10 % der Aktivität wiederherstellen, ohne Chaperone war nur geringe Enzymaktivität bestimmbar.

Luciferase, die mit Harnstoff denaturiert wurde, konnte ebenfalls mit dem DnaK-ClpB-System reaktiviert werden. Nach der Denaturierung wurde Luciferase in den Assaypuffer mit vorgelegten Chaperonen verdünnt. In diesem Assay hatte ClpB Δ N eine identische Chaperonaktivität wie ClpB. Die Lumineszenz, als Maß für die Aktivität der Luciferase, nahm sofort nach Verdünnung der Luciferase in den Lumineszenzpuffer mit dem DnaK-System und ClpB bzw. ClpB Δ N zu und erreichte ihr Maximum nach ca. 200 Minuten. Das DnaK-System allein erreichte erst nach 500 Minuten den höchsten Lumineszenzwert und zeigte zu Beginn eine Verzögerungsphase von 50 Minuten.

LDH mit N-terminalem His-Tag wurde ebenfalls als Substratprotein verwendet. ClpB konnte in Kooperation mit dem DnaK-System 60 % der LDH-Aktivität nach Hitzedenaturierung reaktivieren. Nach 90 Minuten zeigte ClpB Δ N ca. 75 % der Aktivität des Wildtypproteins. In diesem Assay konnte das DnaK-System alleine 5 % der Substrataktivität wieder herstellen, ohne Chaperone war kaum LDH Aktivität zu messen.

Für die Rückfaltungsassays wurden vier Substrate eingesetzt. Drei Proteine wurden durch Hitzeschock und ein Substrat durch Harnstoff denaturiert. In den Rückfaltungsassays zeigte ClpB Δ N zwischen 60 und 100 % der Aktivität von ClpB. Dies belegt, dass die N-terminale Domäne nicht essentiell für die Rückfaltung von Substraten ist. Die geringen Abweichungen in der Ausbeute der Rückfaltung im Vergleich zum Wildtypprotein könnten daraufhin weisen,

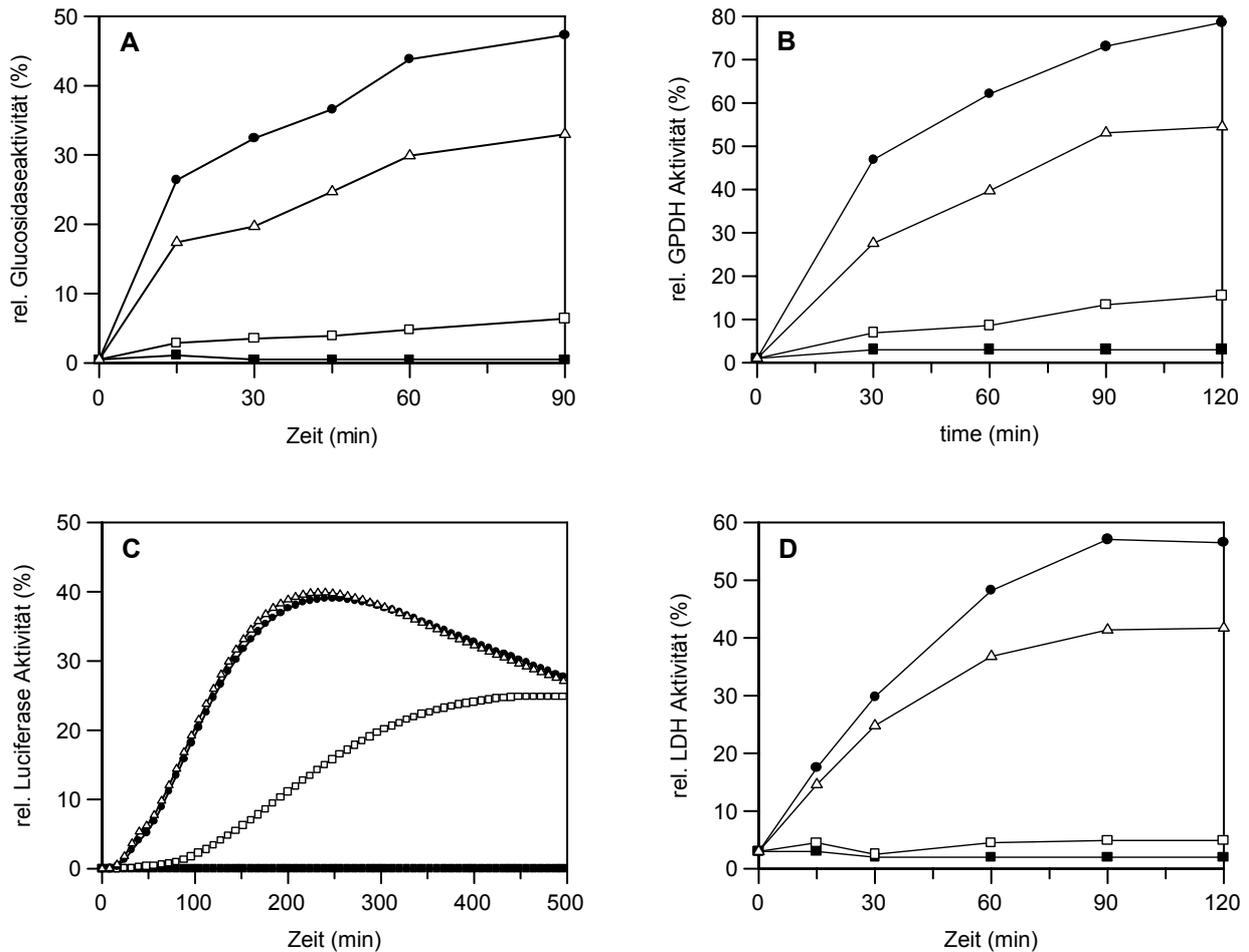


Abb. 3.3.8 Rückfaltungsassays von ClpB und ClpBΔN

A Rückfaltung von α-Glucosidase

α-Glucosidase (0.1 μM) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (□), mit dem DnaK-System mit ClpB (●) und mit dem DnaK-System mit ClpBΔN (Δ). Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Rückfaltung von GPDH

GPDH (0.2 μM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (□), mit dem DnaK-System mit ClpB (●) und mit dem DnaK-System mit ClpBΔN (Δ). Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

C Rückfaltung von Luciferase

Luciferase (10 μM) wurde 30 Minuten bei RT mit 7 M Harnstoff denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte nach Verdünnung bei 25°C ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (□), mit dem DnaK-System mit ClpB (●) und mit dem DnaK-System mit ClpBΔN (Δ). Die Aktivität wurde relativ zu einer Kontrolle mit nativer Luciferase angegeben und wurde in einem kontinuierlichen Assay bestimmt.

D Rückfaltung von LDH

LDH (0.2 μM) wurde 30 Minuten bei 80°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (□), mit dem DnaK-System mit ClpB (●) und mit dem DnaK-System mit ClpBΔN (Δ). Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

dass die N-Domäne nur für eine Untergruppe der Aggregate wichtig ist. Diese Aggregate entstehen jedoch nicht bei der Harnstoffdenaturierung von Luciferase, die durch ClpB und ClpBΔN in gleichem Maße rückgefaltet werden konnte.

Eine Zugabe von ClpBN zu ClpB Δ N führte zu keiner Erhöhung der Ausbeute in den Rückfaltungsassays, in denen ClpB Δ N eine geringere Aktivität zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die zuvor beschriebenen Ergebnisse, die keinen Komplex aus ClpB und ClpB Δ N zeigten. Eine Erhöhung der ClpB Δ N-Konzentration hatte ebenfalls keinen positiven Effekt auf die Rückfaltungsausbeute (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die geringere Rückfaltungsausbeute nicht auf einer geringeren Aktivität derselben Substratbindestelle beruhte.

ClpB Δ N, ein ClpB-Fragment dem die N-terminale Domäne fehlt, und die isolierte N-Domäne wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die stabilen, gefalteten Proteine wurden biochemisch charakterisiert.

Ein Komplex aus ClpB Δ N und ClpBN konnte weder in Gelfiltrationsexperimenten noch bei biochemischen Untersuchungen identifiziert werden. Dies deutet auf eine schwache Wechselwirkung der beiden Proteine hin.

Durch die N-terminale Verkürzung wurde die Oligomerisierung und Nukleotidbindung des Proteins kaum beeinflusst. Im Vergleich zu ClpB hatte ClpB Δ N eine höhere ATPase-Aktivität, die jedoch durch Casein nur schwach stimuliert wurde. Diese geringe Stimulierung der ATPase-Aktivität korrelierte mit einer schwachen Bindung von ClpB Δ N an Casein im Vergleich zu dem Wildtypprotein. Die ATPase-Aktivität von ClpB Δ N konnte jedoch ebenso wie die ATPase-Aktivität von ClpB durch Poly-L-Lysin stimuliert werden.

In den Rückfaltungsstudien zeigte sich, dass ClpB Δ N noch Chaperonaktivität besitzt. Abhängig von dem verwendeten Substratprotein besaß ClpB Δ N zwischen 60 und 100 % der Aktivität von ClpB. Diese Charakterisierung belegt, dass die N-terminale Domäne nicht notwendig für die Chaperonaktivität ist. Die N-Domäne von ClpB ist jedoch an der Caseinbindung beteiligt.

3.4. Funktion des C-Terminus von ClpB

ClpB besitzt zwei AAA-Module, die jeweils aus zwei Domänen bestehen. Die erste Domäne bildet einen „Rossmann-Fold“, die zweite Domäne besteht hauptsächlich aus α -Helices. Diese α -helikale Domäne ist weniger konserviert und variiert stärker in der Größe zwischen den AAA-Proteinen als die vorhergehende Domäne. Der α -helikalen Domäne von ClpB wird eine wichtige Funktion bei der Unterscheidung des gebundenen Nukleotids (ADP oder ATP) zugeschrieben (Hattendorf und Lindquist, 2002). Von Clp-Proteinen, die mit Proteasen assoziiert sind, wurde eine Interaktion dieser Domäne mit Substratproteinen postuliert. Daher wurde die α -helikale Domäne auch SSD (Sensor and Substrate Discrimination) Domäne genannt. Die biochemischen Daten für ClpB sind jedoch nicht aussagekräftig, da die untersuchte Domäne nicht korrekt gefaltet war (Smith et al., 1999). Bei Hsp104 wurde die Bindung von Poly-L-Lysin an diesen Bereich gezeigt (Cashikar et al., 2002).

Für ClpB aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne der zweiten AAA-Kassette für die Oligomerisierung, ATP-Hydrolyse und Chaperonaktivität notwendig ist (Barnett et al., 2000). Für ClpB von *T. thermophilus* ist die Funktion dieses Proteinbereichs jedoch nicht bekannt. Um die Funktion dieser Domäne bei ClpB *T. thermophilus* zu untersuchen, wurden ClpB-Fragmente mit unterschiedlich langen C-terminalen Deletionen hergestellt (Abb. 3.4.1A). ClpB1-845 wurde um die letzten 9 Aminosäuren, ClpB1-828 um die letzten 26 Aminosäuren verkürzt. Das kürzeste Konstrukt, ClpB Δ C (ClpB1-762) besitzt die gesamte α -helikale Domäne der zweiten AAA-Kassette nicht mehr.

3.4.1. Stabilität der verwendeten Proteine

Die klonierten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die korrekte Faltung der gereinigten Proteine und der Effekt der C-terminalen Verkürzung auf die Struktur wurden durch CD-Spektren untersucht (Abb. 3.4.1B). Die CD-Spektren der untersuchten Proteine ähnelten dem CD-Spektrum des Wildtypproteins. Sie besaßen die, für α -helikale Proteine charakteristischen, Minima bei 208 nm und 222 nm. Diese Spektren belegen, dass die verkürzten Proteine korrekt gefaltet sind und ihre native Konformation besitzen. Die Verkürzungen haben somit nicht zu Fehlfaltungen der Proteine geführt.

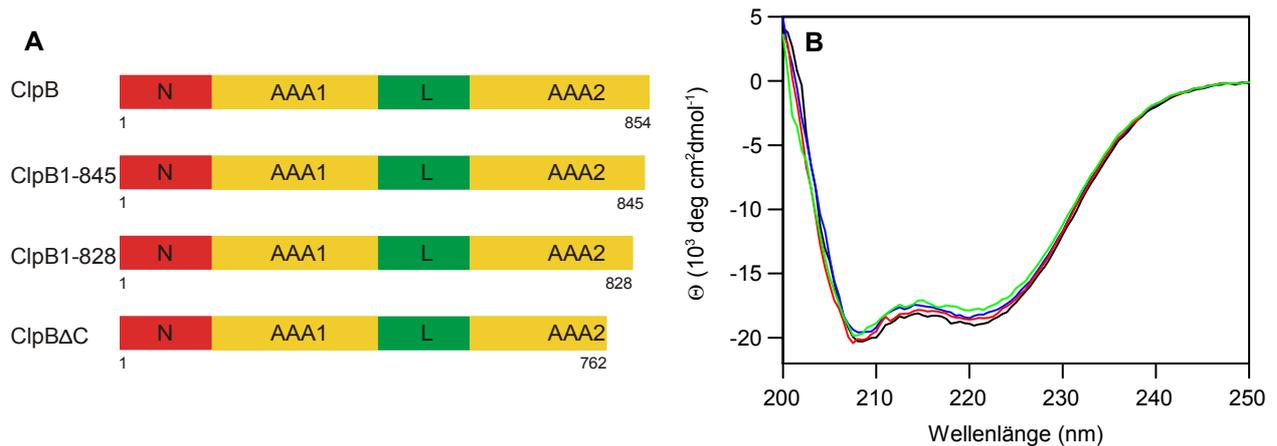


Abb. 3.4.1 Struktur der verwendeten Proteine

A Schematische Darstellung der verwendeten ClpB-Fragmente

Dargestellt sind die N-terminale Domäne, die Linkerdomäne und die zwei AAA-Kassetten. Die Grenzen zwischen den einzelnen Domänen wurden nach den Konsensussequenzen für AAA+-Proteine gesetzt (Neuwald et al., 1999). Für die verkürzten Konstrukte wurde ein Stopcodon an der angegebenen Stelle eingefügt.

B Sekundärstrukturanalyse der Proteine

Die CD-Spektren von ClpB (—), ClpB1-845 (—), ClpB1-828 (—) und ClpBΔC (—) sind dargestellt. Die Messwerte sind als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest (Θ) angegeben.

3.4.2. Oligomerisierungsverhalten der C-terminal verkürzten Fragmente

Die Oligomerisierung von ClpB1-845, ClpB1-828 und ClpBΔC wurde durch Gelfiltrationsläufe analysiert und ist in Abbildung 3.4.2 dargestellt. Wenn man die Oligomerisierung der verkürzten Konstrukte mit dem Verhalten des Wildtypproteins, das in Abschnitt 3.3.2 beschrieben wurde, vergleicht, waren Unterschiede erkennbar.

ClpB1-845 hatte ein ähnliches Oligomerisierungsvermögen wie ClpB. ATP und eine geringe Ionenstärke stabilisierten höhere oligomere Formen. Das Hexamer war bei 1 mM ATP und 1 mM KCl das dominierende Oligomer. ADP und eine hohe Ionenstärke des Puffers führten zur Ausbildung von kleineren Oligomeren. Bei 500 mM KCl überwog das Monomer. Im Vergleich zum Wildtypprotein waren jedoch weniger Dimere und Trimere bei mittleren Salzkonzentrationen vorhanden. ClpB1-828 war in der Oligomerisierung im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich eingeschränkt. Bei geringer Ionenstärke der Lösung waren keine höheren Oligomere vorhanden, es kam nur noch zu einer schwachen Dimerisierung des Proteins. Diese Dimerisierung wurde durch ATP unterstützt. Bei den anderen Bedingungen lag ClpB1-828 als Monomer vor. Bei ClpBΔC war die Oligomerisierung kaum noch vorhanden. Die dominante Proteinform bei allen getesteten Bedingungen war das Monomer. Die Gelfiltrationsanalysen zeigen, dass die C-terminale Domäne notwendig für die Oligomerisierung von ClpB ist. Die neun C-terminalen Aminosäuren können ohne Auswirkungen entfernt werden. Bei 26 entfernten Aminosäuren sind jedoch bereits deutliche Einschränkungen der Oligomerisierung zu beobachten. Fehlt die gesamte C-terminale Domäne ist keine Oligomerisierung des Proteins mehr nachweisbar.

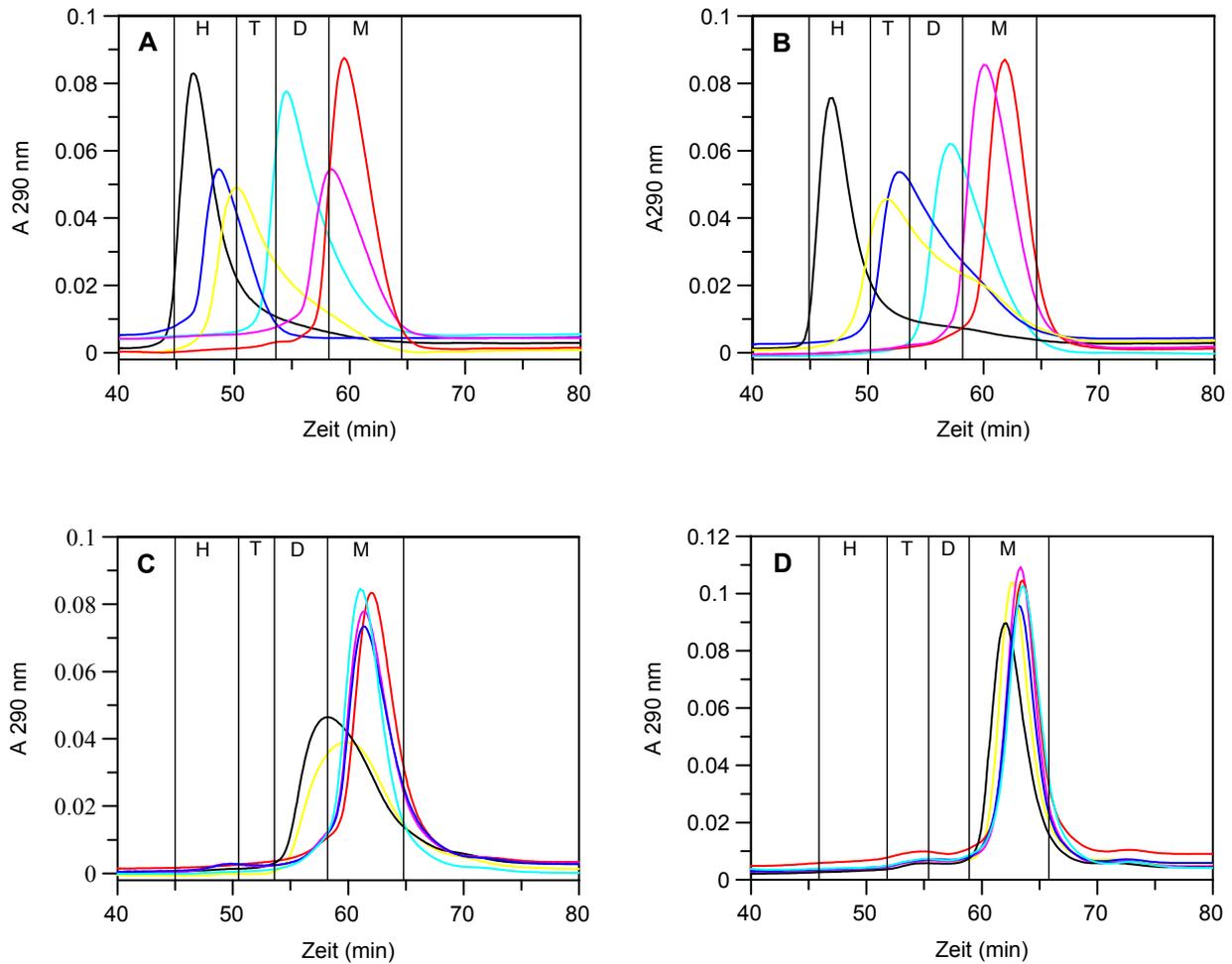


Abb. 3.4.2 Gelfiltration der C-terminal verkürzten Konstrukte

Die Proteine wurden mit 0.2 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule injiziert. Die dünnen Linien geben die Grenzen zwischen Monomeren (M), Dimeren (D), Trimeren (T) und höheren Oligomeren bis zu Hexameren (H) an (siehe Material und Methoden). ClpB (A), ClpB1-845 (B), ClpB1-828 (C) und ClpBΔC (D) wurden mit Nucleotiden und verschiedenen Salzkonzentrationen analysiert:
 ATP 1 mM KCl: (—), ATP 200 mM KCl: (—), ATP 500 mM KCl: (—).
 ADP 1 mM KCl: (—), ADP 200 mM KCl: (—), ADP 500 mM KCl: (—).

3.4.3 Nucleotidbindung der C-terminal verkürzten Fragmente

Im folgenden Abschnitt wird der Effekt der C-terminalen Verkürzung des Proteins auf die Nucleotidbindungseigenschaften von ClpB untersucht. Die Affinitäten für die fluoreszierenden Nucleotidanaloga Mant-ADP und Mant-ATP und die Affinitäten für die nicht modifizierten Nucleotide ADP und ATP wurden bestimmt wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.4.1 zusammengefasst.

| | ClpB | ClpB1-845 | ClpB1-828 | ClpBΔC |
|-----------------|------|-----------|-----------|--------|
| ADP | 1.5 | 0.2 | 186 | - |
| Mant-ADP | 0.2 | 0.014 | 5.4 | 45 |
| ATP | 21.0 | 2.4 | 1570 | - |
| Mant-ATP | 5.4 | 0.9 | - | - |

Tabelle 3.4.1

Nucleotiddissoziationskonstanten (K_d , μM) für ClpB-Fragmente

Die Bindung von ATP und Mant-ATP wurden aufgrund der geringen intrinsischen ATPase-Aktivität und der kurzen Zeitdauer der Experimente als Gleichgewichtsreaktion betrachtet.

Wie bei ClpB wurden die fluoreszenzmarkierten Nukleotide eine Größenordnung besser gebunden als die nicht modifizierten Nukleotide. Die Verkürzung des C-Terminus beeinflusste die Nukleotidbindung der untersuchten Proteine. Die Affinität für Nukleotide stieg zunächst bei einer Verkürzung um neun Aminosäuren an und sank dann mit der Länge der Verkürzung ab. Nukleotide wurden von ClpB1-845 um den Faktor 10 besser gebunden als vom Wildtypprotein, der K_d -Werte für ADP von ClpB betrug $1.5 \mu\text{M}$ und von ClpB1-845 $0.02 \mu\text{M}$. Bei einer längeren Verkürzung des C-Terminus sank dann die Affinität stark ab, so dass nicht mehr alle Affinitäten in den Titrationsexperimenten bestimmt werden konnten. Die Affinität für Mant-ADP betrug bei ClpB1-828 $5.4 \mu\text{M}$ im Vergleich zu der Affinität von $0.014 \mu\text{M}$ von ClpB1-845. Durch die Verkürzung um 17 Aminosäuren werden Nukleotide um den Faktor 300 schwächer gebunden. Bei ClpB Δ C war nur noch die Affinität für Mant-ADP bestimmbar (K_d $45 \mu\text{M}$), die restlichen Nukleotide wurden so schwach gebunden, dass eine Bestimmung durch Titrationsexperimente nicht mehr möglich war.

Die Messergebnisse zeigten, dass die C-terminale Domäne von ClpB wichtig für die Nukleotidbindung ist und Nukleotide vermutlich von der zweiten AAA-Kassette von ClpB gebunden werden. ClpB1-845, das nur 9 Aminosäuren kürzer ist als das Wildtypprotein, bindet Nukleotide sehr fest, eine weitere Verkürzung des C-Terminus reduziert die Affinität für Nukleotide.

3.4.4 ATPase-Aktivität der C-terminal verkürzten Fragmente

Die Verkürzung des C-Terminus beeinflusste die Nukleotidbindung und Oligomerisierung der Proteine. Um den Effekt der Deletionen auf die ATPase-Aktivität der Proteine zu bestimmen, wurden Steady State Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4.3 dargestellt. Verglichen mit dem Wildtypprotein, beeinflusste die C-terminale Verkürzung die ATPase-Aktivität der Proteine. Wurden die beobachteten Ratenkonstanten (k) gegen die ATP-Konzentration aufgetragen, zeigte sich ein sigmoider Verlauf der Messwerte für ClpB1-845 und ClpB1-828, wie zuvor für das Wildtypprotein beschrieben (siehe auch Abb. 3.3.4). Aufgrund des sigmoiden Verlaufs wurden die Werte für ClpB, ClpB1-845 und ClpB1-828 mit der Hill-Gleichung ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.4.2 angegeben. Einen ähnlichen Kurvenverlauf wie ClpB zeigte ClpB1-845, allerdings stieg hier die ATPase-Aktivität bei geringeren ATP-Konzentrationen stärker an. Dies wird durch den niedrigeren K_m -Wert bestätigt. Die etwas schwächere Kooperativität der ATPase-Aktivität von ClpB1-845 wurde durch den niedrigeren Hill-Koeffizienten (N_h) belegt (N_h ClpB: 2.4, N_h ClpB1-845: 2.2). Die maximale ATPase-Aktivität von ClpB1-845 bei hohen ATP-Konzentrationen lag im Bereich des Wildtypproteins (k_{cat} : 3.7 min^{-1} bzw. 3.9 min^{-1}). ClpB1-828 zeigte bereits ein deutlich anderes Aktivitätsprofil. Die ATPase-Aktivität war geringer und hatte einen schwächeren sigmoiden Charakter. Die Veränderung der Kooperativität wurde

durch den Hill-Koeffizienten (N_h) von 1.4 unterstrichen. Die insgesamt geringere ATPase-Aktivität wurde auch in dem geringeren k_{cat} -Wert (2.4 min^{-1}) deutlich. Bei ClpB Δ C war die ATPase-Aktivität um 90 % im Vergleich zu ClpB reduziert. Diese geringe ATPase-Aktivität zeigte keinen sigmoiden Kurvenverlauf und wurde nicht weiter ausgewertet.

Die gemessenen ATPase-Aktivitäten der Proteine verdeutlichen, dass der C-Terminus nicht nur an der Nukleotidbindung und Oligomerisierung beteiligt ist, sondern auch die ATPase-Aktivität beeinflusst. Die schwächere Oligomerisierung und Nukleotidbindung ist mit einer reduzierten ATPase-Aktivität gekoppelt.

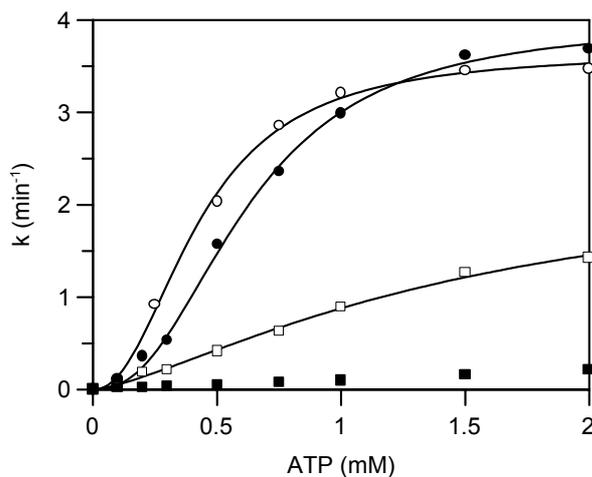


Abb. 3.4.3 Steady State ATPase-Aktivitäten der ClpB-Konstrukte
ClpB (●), ClpB1-845 (○), ClpB1-828 (□) und ClpB Δ C (■) wurden mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen bei 25°C inkubiert. Die beobachteten Ratenkonstanten wurden gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und mit der Hill-Gleichung ausgewertet.

| | k_{cat} (min^{-1}) | K_m (μM) | Hill-Koeffizient |
|------------------|---------------------------------|-------------------------|------------------|
| ClpB | 3.9 | 0.62 | 2.4 |
| ClpB1-845 | 3.7 | 0.43 | 2.2 |
| ClpB1-828 | 2.4 | 1.5 | 1.4 |

Tabelle 3.4.2 Kinetische Analyse der Steady State ATPase-Aktivität mit der Hill-Gleichung

Die Messwerte von ClpB Δ C wurden aufgrund der schwachen ATPase-Aktivität nicht mit der Hill-Gleichung ausgewertet.

3.4.5 Chaperonaktivität der C-terminal verkürzten Fragmente

Der C-Terminus beeinflusste die Oligomerisierung, Nukleotidbindung und ATPase-Aktivität von ClpB. Der Einfluss der unterschiedlich langen Deletionen auf die Chaperonaktivität wurde durch Rückfaltungsassays bestimmt. Die Verwendung mehrerer Substrate ermöglichte die umfassende Charakterisierung der funktionellen Aktivität. Die etablierten Substratproteine wurden ohne Chaperone denaturiert und mit den optimierten Chaperonkonzentrationen zurückgefaltet. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.4.4 dargestellt.

Denaturierte α -Glucosidase konnte von ClpB in Kooperation mit dem DnaK-System effektiv zurückgefaltet werden. In diesem Experiment betrug die Ausbeute beträgt ca. 50 % der Ausgangsaktivität. Die Aktivität von ClpB1-845 war etwas höher als die Aktivität des

Wildtypproteins. ClpB1-828 war deutlich weniger aktiv. Nur 6 % der Ausgangsaktivität der α -Glucosidase wurden nach 90 Minuten Inkubation mit den Chaperonen erreicht, dies entsprach ca. 10 % der ClpB-Aktivität. ClpB Δ C war inaktiv in dem α -Glucosidaseassay. ClpB Δ C inhibierte nicht das DnaK-System, so dass, wie in dem Ansatz mit dem DnaK-System, 2 % der Ausgangsaktivität reaktiviert wurden. Ohne Chaperone wurde keine α -Glucosidaseaktivität detektiert.

GPDH wurde nach Denaturierung mit dem DnaK-System und den ClpB-Konstrukten inkubiert. In diesem Experiment wurde mit 70 % eine hohe Ausbeute der Rückfaltung mit ClpB erzielt. Bei der Rückfaltung des denaturierten Substrats war ClpB1-845 gleich aktiv wie ClpB. ClpB1-828 zeigte erneut eine reduzierte, aber messbare Chaperonaktivität. 35 % der ursprünglichen GPDH-Aktivität wurden nach 90 Minuten wiederhergestellt. Damit besaß ClpB1-828 50 % der Aktivität von ClpB. ClpB Δ C war inaktiv, nur das DnaK-System konnte in diesen Ansätzen das Substrat reaktivieren. Das DnaK-System allein hatte nur geringe Rückfaltungsaktivität (10 %), ohne Chaperone war keine Enzymaktivität mehr messbar.

Harnstoffdenaturierte Luciferase wurde als drittes Substratprotein für die Messungen eingesetzt. Nach Denaturierung wurde Luciferase in den Assaypuffer mit vorgelegten Chaperonen verdünnt. In diesem Assay zeigte ClpB1-845 eine etwas höhere Chaperonaktivität als ClpB. Die Lumineszenz stieg unmittelbar nach Reaktionsbeginn an und erreichte den Maximalwert schon nach ca. 200 Minuten. ClpB1-828 besaß eine reduzierte Aktivität, ClpB Δ C hatte keine Chaperonfunktion mehr. ClpB Δ C inhibierte das DnaK-System jedoch erneut nicht. Das DnaK-System allein erreichte erst nach 500 Minuten den höchsten Lumineszenzwert und zeigte zu Beginn eine Verzögerungsphase von 50 Minuten.

LDH mit N-terminalem His-Tag wurde ebenfalls als Substratprotein verwendet. ClpB konnte 45 % der Aktivität nach Hitzedenaturierung reaktivieren. Nach 90 Minuten zeigte ClpB1-845 erneut die Aktivität des Wildtypproteins und ClpB1-828 eine geringe, aber noch messbare, Aktivität. In diesem Assay konnte das DnaK-System alleine 5-10 % der Substrataktivität wieder herstellen. Diese Aktivität wurde auch in Anwesenheit von ClpB Δ C erreicht. Ohne Chaperone war keine LDH Aktivität messbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Deletionen am C-Terminus von ClpB die Chaperonfunktion beeinflussen. In den Rückfaltungsassays mit den etablierten Substraten zeigte ClpB1-845 eine mit dem Wildtypprotein vergleichbare Rückfaltungsaktivität. ClpB1-828 hatte eine reduzierte aber noch messbare Chaperonaktivität, ClpB Δ C war in allen Assays inaktiv. Der Verlust der Aktivität von ClpB Δ C hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des DnaK-Systems.

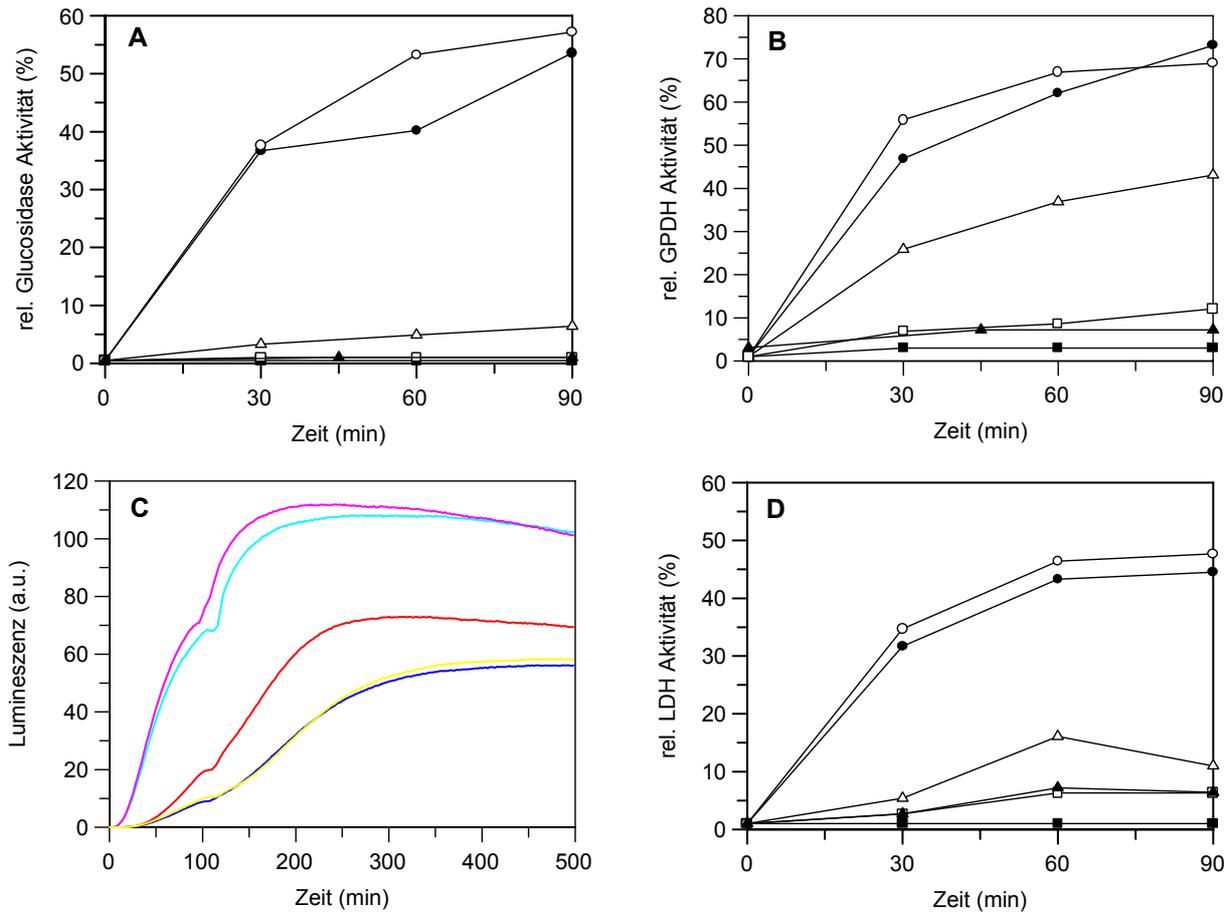


Abb. 3.4.4 Rückfaltungsaktivität von ClpB und den C-terminal verkürzten Konstrukten

Die Rückfaltung der denaturierten Substrate erfolgte ohne Chaperone (■), mit dem DnaK-System (□), mit dem DnaK-System mit ClpB (●), mit dem DnaK-System mit ClpB1-845 (○), mit dem DnaK-System mit ClpB1-828 (△) und mit dem DnaK-System mit ClpBΔC (▲).

A Rückfaltung von α-Glucosidase

α-Glucosidase (0.1 μM) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Rückfaltung von GPDH

GPDH (0.2 μM) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

C Rückfaltung von Luciferase

Luciferase (10 μM) wurde 30 Minuten bei RT mit 7 M Harnstoff denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte nach Verdünnung bei 25°C ohne Chaperone (—), dem DnaK-System (—), dem DnaK-System mit ClpB (—) mit dem DnaK-System mit ClpB1-845 (—), mit dem DnaK-System mit ClpB1-828 (—) und mit dem DnaK-System mit ClpBΔC (—). Die Lumineszenz wurde in einem kontinuierlichen System gemessen.

D Rückfaltung von LDH

LDH (0.2 μM) wurde 30 Minuten bei 80°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

Die Funktion des C-Terminus von ClpB wurde durch Konstrukte mit unterschiedliche langen Deletionen der C-terminalen Domäne untersucht. ClpB Δ C, ClpB1-828 und ClpB1-845 wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die korrekt gefalteten Proteine wurden biochemisch charakterisiert. Durch die C-terminale Verkürzung wurden alle getesteten Funktionen der Proteine beeinflusst.

ClpB1-845 zeigte ein ähnliches Oligomerisierungspotential wie ClpB, band allerdings Nukleotide besser. Die ATPase-Aktivität unterscheidet sich nur geringfügig vom Wildtypprotein. In den Rückfaltungsassays zeigte dieses Konstrukt eine etwas höhere Rückfaltungsaktivität als ClpB.

ClpB1-828 war in der Oligomerisierung bereits deutlich eingeschränkt und band Nukleotide schlechter. Zudem besaß dieses Fragment im Vergleich zu ClpB eine geringere ATPase-Aktivität, die eine geringere Kooperativität aufwies. In den Rückfaltungsstudien zeigte sich, dass ClpB1-828 noch reduzierte Chaperonaktivität besaß. Abhängig von dem verwendeten Substratprotein hatte ClpB1-828 zwischen 10 und 50 % der Aktivität von ClpB.

ClpB Δ C zeigt keine Oligomerisierung mehr, band Nukleotide schwach und die ATPase-Aktivität war um mehr als 90 % reduziert. ClpB Δ C besaß keine Chaperonaktivität mehr, aber inhibierte das DnaK-System auch nicht.

Die Deletionen am C-Terminus beeinflussen somit alle untersuchten Funktionen von ClpB. Dies deutet auf eine enge Verknüpfung dieser Funktionen hin. Die Oligomerisierung ist vermutlich mit der Nukleotidbindung, ATPase-Aktivität und Chaperonfunktion gekoppelt. Sinkt der Grad der Oligomerisierung, werden auch die anderen Funktionen behindert.

3.5 Struktur und Interaktionen der AAA-Kassetten von ClpB

ClpB von *T. thermophilus* gehört zur AAA+-Proteinfamilie und besitzt zwei AAA-Kassetten. Die Eigenschaften der AAA-Kassetten unterscheiden sich sowohl zwischen den einzelnen AAA-Proteinen als auch bei homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen. Bei den ClpB/Hsp100 Proteinen wurde der Einfluss der AAA-Kassetten auf die Oligomerisierung der Proteine intensiv untersucht. Bei ClpB aus *E. coli* ist die erste AAA-Kassette sehr wichtig (Kim et al., 2000; Mogk et al., 2003), hingegen beeinflussen bei Hsp104 aus *S. cerevisiae* und Hsp101 aus *N. tabacum* nur Punktmutationen der zweiten AAA-Kassette die Oligomerisierung stark (Schirmer et al., 2001; Gallie et al., 2002). Bei ClpB aus *T. thermophilus* sind beide AAA-Kassetten an der Oligomerisierung beteiligt, Punktmutationen in der ersten AAA-Kassette scheinen jedoch einen stärkeren Effekt zu haben (Schlee et al., 2001; Watanabe et al., 2002). Um die Oligomerisierung von ClpB aus *T. thermophilus* genauer zu untersuchen, wurden die Interaktionen der beiden AAA-Module biochemisch charakterisiert. ClpB besitzt zusätzlich eine Linkerdomäne zwischen den beiden AAA-Kassetten, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Ursprünglich wurde sie als reines Verbindungsmodul der beiden AAA-Kassetten betrachtet (Schirmer et al., 1996). Anhand von Sequenzvergleichen von ClpB und ClpA und der kürzlich publizierten Struktur von ClpA wurde jedoch postuliert, dass der Linker in die helikale Domäne des ersten AAA-Moduls inseriert ist (Cashikar et al., 2002).

Die Position des Linkers zwischen den AAA-Kassetten wurde auch bei ClpB aus *T. thermophilus* genauer untersucht. Anhand eines Sequenzvergleichs mit ClpA aus *E. coli* und der ClpA Struktur zeigte sich, dass auch bei ClpB aus *T. thermophilus* die Linkerdomäne in die erste AAA-Kassette an Position 394 inseriert ist und ca. bis Aminosäure 525 reicht. Allerdings war die exakte Position der Fortsetzung der ersten AAA-Kassette am C-terminalen Ende anhand der Sequenzvergleiche und Sekundärstrukturvorhersagen nicht exakt zu bestimmen (siehe Anhang). Kurz nach hinter dem Ende der Linkerregion beginnt zudem die zweite AAA-Kassette. Um die Funktionen der Linkerdomäne von ClpB aus *T. thermophilus* zu untersuchen, wurden unterschiedliche ClpB-Fragmente hergestellt (Abb. 3.5.1A). Bei ClpB Δ L wurde die Linkerdomäne (Aminosäuren 395-531) entfernt und die beiden AAA-Module direkt miteinander verbunden. Zusätzlich wurde die isolierte Linkerdomäne (ClpBL, Aminosäuren 394-542) mit N-terminalen His-Tag kloniert.

Um die Funktionen des Linkers genauer zu charakterisieren, wurden die Interaktionen des Linkers mit den AAA-Kassetten analysiert. Es wurde zunächst die erste AAA-Kassette mit Linkerdomäne (ClpB141-519) und ohne Linkerdomäne (ClpB141-394) sowie ebenfalls die zweite AAA-Kassette mit Linkerdomäne (ClpB394-854) und ohne Linkerdomäne (ClpB519-854) kloniert (Abb. 3.5.1A). Diese Proteine wurden mit N-terminalen His-Tags kloniert. Um

die Stabilität der rekombinanten Proteine zu erhöhen wurde zusätzlich die N-terminale Domäne von ClpB entfernt.

3.5.1 Stabilität der verwendeten Proteine

Die klonierten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Nach Abtrennen des His-Tags mit Thrombin wurde die korrekte Faltung der gereinigten Proteine durch CD-Spektren untersucht (Abb. 3.5.1B). Die CD-Spektren der untersuchten Proteine zeigten Minima bei 208 nm und 222 nm. Diese Minimalwerte sind charakteristisch für α -helikale Proteine und die Spektren waren dem Spektrum von ClpB ähnlich. Diese CD-Spektren belegen, dass die Konstrukte korrekt gefaltet sind und ihre native Struktur besitzen.

ClpBL (ClpB394-542) konnte exprimiert und aufgereinigt werden. Die Linkerdomäne zeigt ein starkes Signal im CD-Spektrum, das für α -helices charakteristisch ist. Dies stimmt mit einer für den Linker von Hsp104 postulierten „coiled-coil“ Struktur überein. Das „Coiled coil“-Vorhersageprogramm Parcoil prognostiziert ebenfalls für ClpB aus *T. thermophilus* eine „coiled coil“ Struktur zwischen Position 425 und 495 (Berger et al., 1995).

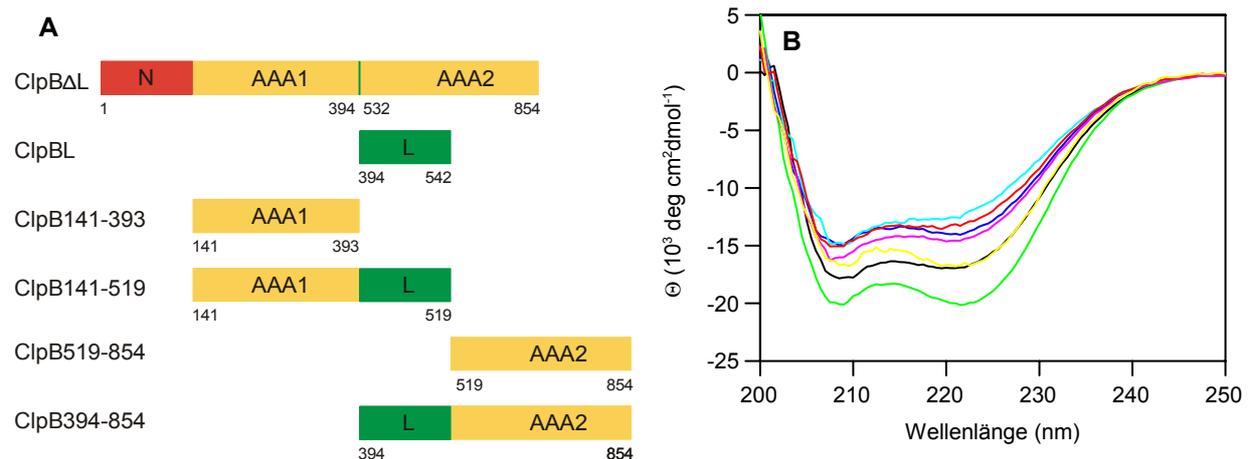


Abb. 3.5.1 Verwendete Proteine

A Schematische Darstellung der verwendeten Proteine

Die Nummerierungen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen im Wildtypprotein. An den angegebenen Positionen wurden Start- bzw. Stopcodons eingefügt. Gezeigt sind die AAA-Module, die N-terminale Domäne und die Linkerdomäne. Die Grenzen wurden anhand der Konsensussequenzen für AAA+-Proteine gezogen (Neuwald et al., 1999).

B Sekundärstrukturanalyse der Proteine

Die CD-Spektren von ClpB (—), ClpB Δ L (—), ClpBL (—) und ClpB141-393 (—), ClpB141-519 (—), ClpB394-854 (—) und ClpB519-854 (—) sind dargestellt. Die Messwerte sind als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest (Θ) angegeben.

3.5.2. Charakterisierung der Linkerdomäne

3.5.2.1 Effekt der Linkerdomäne auf die Oligomerisierung von ClpB

Die Oligomerisierung von ClpB Δ L und ClpBL wurde durch Gelfiltrationsläufe analysiert, die in Abbildung 3.5.2 dargestellt sind.

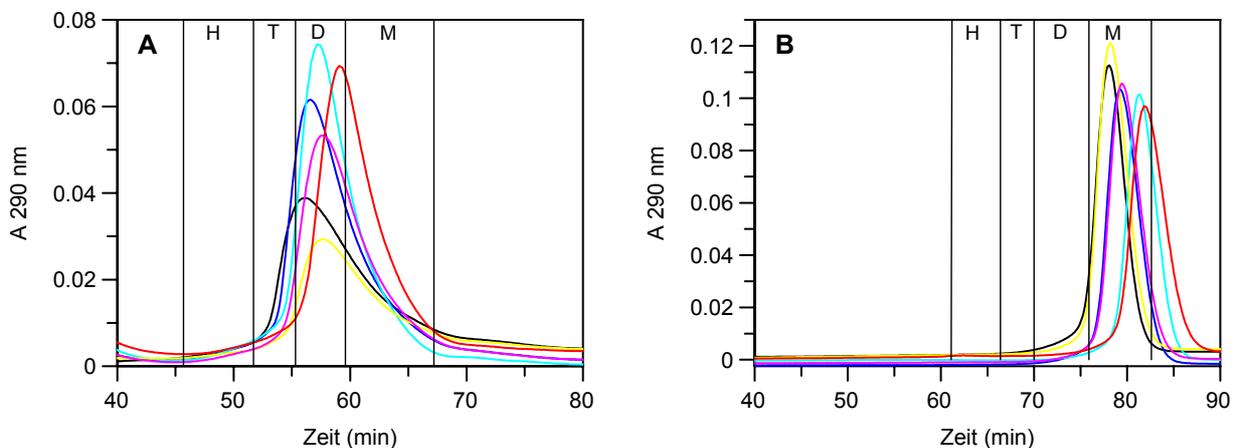


Abb. 3.5.2 Gelfiltration von ClpB Δ L und ClpBL

ClpB Δ L und ClpBL wurden mit 0,2 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule injiziert. Die dünnen Linien geben die Grenzen zwischen Monomeren (M), Dimeren (D), Trimeren (T) und höheren Oligomeren bis zu Hexameren (H) an (siehe Material und Methoden). ClpB Δ L (A) und ClpBL (B), wurden mit Nukleotiden und verschiedenen Salzkonzentrationen analysiert:

ATP 1 mM KCl: (—), ATP 200 mM KCl: (—), ATP 500 mM KCl: (—).

ADP 1 mM KCl: (—), ADP 200 mM KCl: (—), ADP 500 mM KCl: (—).

Das Oligomerisierungsverhalten von ClpB Δ L wies deutliche Unterschiede zum Verhalten des Wildtypproteins auf, das in Abschnitt 3.3.3 beschrieben wurde. Im Vergleich zu ClpB war ClpB Δ L in seinem Oligomerisierungsvermögen reduziert. Es wurden weniger größere Oligomere (z.B. Tetramere und Hexamere) gebildet. Die dominante oligomere Form von ClpB Δ L unter den getesteten Bedingungen war das Dimer. Der Einfluss von Nukleotiden und der Salzkonzentration war analog zum Verhalten des Wildtypproteins. ATP und eine geringe Ionenstärke stabilisierten höher oligomere Formen, so dass auch Trimere auftraten. ADP und eine hohe Ionenstärke des Puffers führten zur Ausbildung von Monomeren. Hexamere wurden unter den eingesetzten Bedingungen nicht beobachtet.

ClpBL zeigte in den Gelfiltrationsläufen eine Abhängigkeit der Retentionszeiten von der Ionenstärke der Lösung. Bei einem Molekulargewicht von 17 kDa entsprach die Retentionszeit unter Hochsalzbedingungen (81,5 Minuten) vermutlich dem Monomer. Die geringe Abweichung von der, anhand der Eichgerade berechneten, Retentionszeit (79,2 Minuten) kann mit einer nicht globulären Form des „coiled-coil“ Proteins und der abnehmenden Trennleistung der Gelfiltrationssäule in Bereich dieser Proteingröße erklärt werden. Bei niedriger Ionenstärke verkürzten sich die Retentionszeiten auf 78 Minuten, was durch eine Dimerisierung erklärt werden kann. Interaktionen von ClpBL mit der Säulenmatrix als Ursache für diese kleine Verzögerung der Retentionszeiten sind unwahrscheinlich. Sie

können zwar bei niedrigen Salzkonzentrationen auftreten, würden aber eine Erhöhung der Retentionszeiten bei niedriger Ionenstärke bewirken. Bei den Messungen mit ClpBL wird jedoch das Gegenteil beobachtet.

Eine Interaktion von ClpBΔL mit ClpBL wurde ebenfalls durch Gelfiltrationsläufe untersucht (Abb. 3.5.3). Der Gelfiltrationslauf der Mischung aus ClpBΔL und ClpBL zeigte eine Veränderung im Elutionsprofil im Vergleich zu den Läufen der Einzelkomponenten. ClpBΔL lief in der Gelfiltration hauptsächlich als Dimer. Die Retentionszeit des Peaks (29 Minuten) erhöhte sich in Anwesenheit eines Überschusses von ClpBL auf 31 Minuten und gleichzeitig reduzierte sich die Peakgröße von ClpBL. Dies lässt auf eine Interaktion von monomeren ClpBΔL mit ClpBL schließen. Dieser Komplex ist jedoch nicht in der Lage produktiv zu oligomerisieren. Eine Analyse durch ein SDS-Gel bestätigte die Komplexbildung von ClpBΔL und ClpBL (Daten nicht gezeigt). Die Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass die Linkerdomäne für die Bildung kleinerer Oligomere wie z.B. Dimere, nicht notwendig ist. Für die Bildung von Hexameren wird die Linkerdomäne allerdings benötigt.

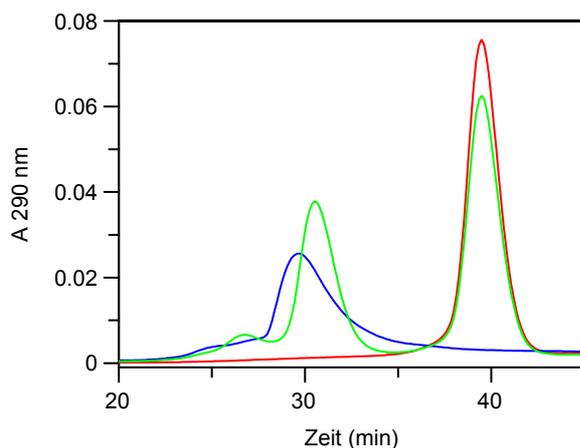


Abb. 3.5.3 Komplexbildung von ClpBΔL und ClpBL

Die Proteine (3 mg/ml) wurden mit 0.4 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule gegeben, der Puffer enthielt 1mM ATP und 1 mM KCl. ClpBΔL (—) eluierte aufgrund der Dimerisierung bereits nach kurzer Retentionszeit. ClpBL (—) eluierte erst deutlich später. Die Mischung aus ClpBΔL und ClpBL (—) zeigte eine Interaktion der Proteine an. Die Peakgröße von ClpBL nahm ab und es bildete sich ein neuer Peak, der dem Proteinkomplex entsprach.

3.5.2.2 ATPase-Aktivität und Chaperonaktivität von ClpBΔL

Die ATPase-Aktivität von ClpBΔL wurde unter Steady State und „single turnover“ Bedingungen gemessen und ist in Abbildung 3.5.4 dargestellt.

ClpBΔL zeigte noch ATPase-Aktivität in den Steady State ATPase Messungen (Abb.3.5.4A). Wurden die gemessenen Ratenkonstanten gegen die ATP-Konzentrationen aufgetragen ergab sich ein sigmoider Verlauf der Messwerte. Daher wurden die Daten mit der Hill-Gleichung ausgewertet. Im Vergleich zu der ATPase-Aktivität des Wildtypproteins (siehe Abschnitt 3.3.4) waren erhebliche Unterschiede erkennbar. Der k_{cat} -Wert (7.0 min^{-1}) ist deutlich höher als bei ClpB. Die ATPase-Aktivität stieg zudem schon bei niedrigeren ATP-Konzentrationen stark an, was sich in dem sehr niedrigen K_m -Wert (0.31) widerspiegelt. Der Hill-Koeffizient war mit 2.3 etwas geringer als bei dem ClpB. Durch das Entfernen der Linkerdomäne scheint es zu einer gewissen Entkoppelung der ATPase-Aktivität von ClpBΔL

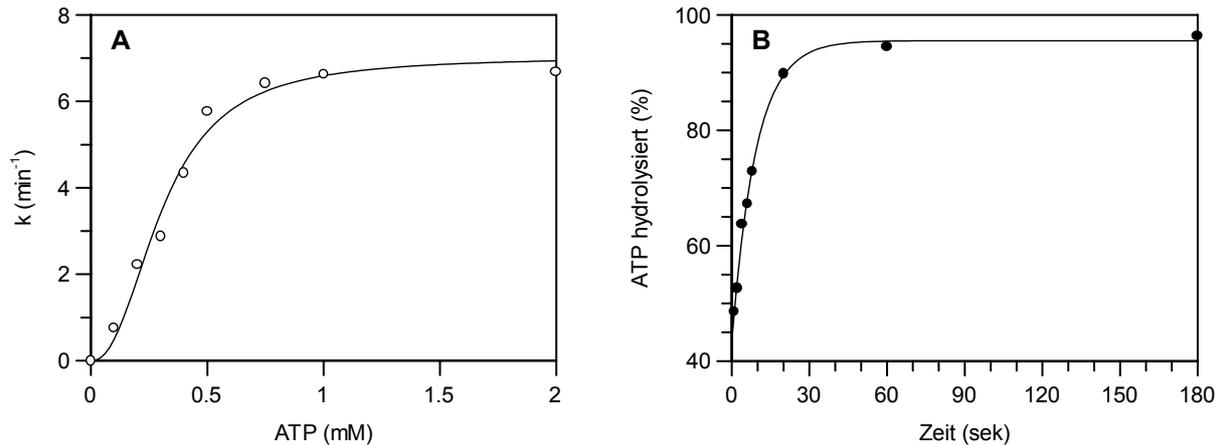


Abb. 3.5.4 ATPase-Aktivität von ClpBΔL

A Steady State ATPase-Aktivität von ClpBΔL

ClpBΔL (10 μM, ○) wurde mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen bei 25°C inkubiert. Die beobachteten Ratenkonstanten (k) wurden gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und mit der Hill-Gleichung ausgewertet.

B Single turnover ATPase-Aktivität von ClpBΔL

ClpBΔL (100 μM) wurde bei 25°C mit ATP (50 μM) inkubiert. Die Reaktion wurde mittels einer Quench Flow Anlage untersucht, der Nukleotidgehalt mittels HPLC Analyse bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Messdaten wurden mit einer Exponentialgleichung mit Offset ausgewertet. Die Ratenkonstante beträgt 0.11 sek⁻¹ für ClpBΔL.

zu kommen: der Hill-Koeffizient nimmt leicht ab, die ATPase-Aktivität wird höher und steigt bereits bei niedrigeren ATP-Konzentrationen an.

Die höhere ATPase-Aktivität wurde auch bei „single turnover“ Messungen beobachtet (Abb.3.5.4B). Aufgrund der hohen Rate der ATP-Hydrolyse wurde die Ratenkonstanten mittels einer Quench Flow Apparatur untersucht. Nach einer Reaktionszeit von einer Sekunde war bereits fast die Hälfte des ATPs hydrolysiert. Diese „Burst-Phase“ vor dem ersten Messpunkt deutet auf eine extrem schnelle ATP-Hydrolyse durch einen Teil der ClpBΔL Moleküle hin. Aus dem beobachteten Zeitfenster (nach einer Sekunde) wurden eine Ratenkonstanten von 0.11 sek⁻¹ für ClpBΔL bestimmt. Diese Ratenkonstante von umgerechnet ca. 7 min⁻¹ entspricht zudem der maximalen ATPase-Aktivität von ClpBΔL unter Steady State Bedingungen.

Die Ergebnisse der Messungen zur ATPase-Aktivität von ClpBΔL zeigten, dass die Linkerdomäne eine wichtige Funktion in dem ATPase-Zyklus des Proteins hat. Durch das Entfernen wird die ATPase-Aktivität des Proteins erhöht. Dies wurde besonders bei den Untersuchungen der „single turnover“ ATPase-Aktivität deutlich.

Die Chaperonaktivität von ClpBΔL wurde ebenfalls untersucht. ClpBΔL war in allen durchgeführten Rückfaltungsassays inaktiv (Daten nicht gezeigt). Dies belegt, dass die Linkerdomäne notwendig für die Chaperonfunktion von ClpB ist. Eine Zugabe von ClpBL hatte keinen positiven Effekt auf die Chaperonaktivität von ClpBΔL (Daten nicht gezeigt).

Dies legt nahe, dass die Interaktion von ClpB Δ L und ClpBL nicht ausreicht um die Funktionalität des Proteins wieder herzustellen.

Die Zugabe eines Überschusses von ClpBL zu Rückfaltungsreaktionen mit ClpB beeinflusste die Chaperonaktivität nur gering (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass die Linkerregion vermutlich nicht die Substratbindestelle von ClpB ist, da sonst einst ein inhibierender Effekt aufgrund einer kompetitiven Substratbindung auftreten würde.

3.5.3 Position der Linkerdomäne und Charakterisierung der AAA-Kassetten

Eine Insertion der Linkerdomäne in die erste AAA-Kassette oder eine mögliche Interaktion des Linkers mit der zweiten AAA-Kassette wurde durch die weiteren Experimente untersucht.

3.5.3.1 Oligomerisierung der ClpB-Fragmente

Das Oligomerisierungsverhalten von ClpB141-393 und ClpB141-519, die hauptsächlich die erste AAA-Kassette darstellen, sowie ClpB394-854 und ClpB519-854, die hauptsächlich die zweite AAA-Kassette darstellen, wurde durch Gelfiltrationsläufe analysiert (Abb. 3.5.5).

Die Oligomerisierung von ClpB141-393 und ClpB141-519 war verglichen mit ClpB reduziert, und die Fragmente unterschieden sich in ihrem Oligomerisierungspotential.

Die Retentionszeiten von ClpB141-393 variierten kaum zwischen den getesteten Bedingungen. Eine Nukleotid- oder Salzabhängigkeit der Oligomerbildung war nicht zu beobachten. Die Größe des Proteins konnte durch die Retentionszeit (71 Minuten) mit der zuvor bestimmten Eichgerade berechnet werden. Für ClpB141-393 ergab sich daraus ein Molekulargewicht von 40 kDa. Dieser Wert liegt etwas oberhalb der Größe des Monomers (28 kDa), kann jedoch mit einer nicht globulären Proteinform erklärt werden.

ClpB141-519 zeigte eine Verschiebung der Retentionszeiten in Abhängigkeit der Ionenstärke des Puffers, die Zugabe von Nukleotiden hatte jedoch keinen Effekt. Geringere Ionenstärken verkürzten die Retentionszeiten, hohe Ionenstärken erhöhten die Retentionszeiten. Die Retentionszeiten unter Hochsalzbedingungen (71 Minuten) ergaben ein Molekulargewicht von 40 kDa, das dem Molekulargewicht des Monomers (43 kDa) nahe kommt. Bei 1 mM KCl entsprach die Retentionszeit (69 Minuten) einem Protein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Diese Verschiebung der Retentionszeit kann durch eine Dimerisierung des Proteins mit einer Veränderung der Proteinform zustande kommen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es durch die Insertion der Linkerdomäne zu einer Veränderung des Oligomerisierungsverhalten der ersten AAA-Kassette kommt.

ClpB519-854 entspricht der zweiten AAA-Kassette von ClpB. Die Oligomerisierung dieses Konstrukts war im Vergleich zum Wildtypprotein eingeschränkt: es wurden keine größere Oligomere (Hexamere) gebildet wurden. Die Oligomerisierung wurde von der Ionenstärke

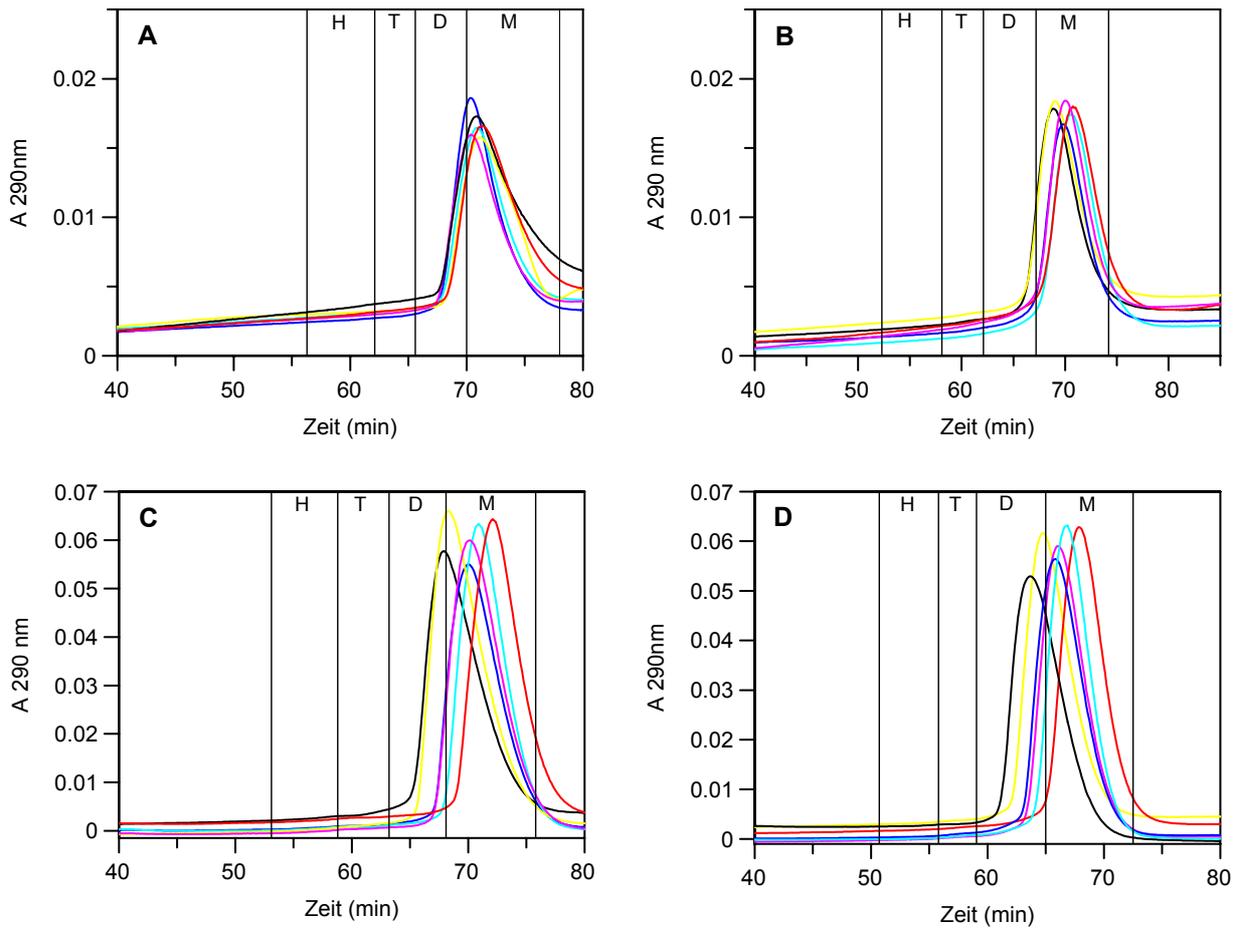


Abb. 3.5.5 Gelfiltration der ClpB-Fragmente

Die Proteine wurden mit 0.2 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule injiziert. Die dünnen Linien geben die Grenzen zwischen Monomeren (M), Dimeren (D), Trimeren (T) und höheren Oligomeren bis zu Hexameren (H) an (siehe Material und Methoden). ClpB141-393 (A), ClpB141-519 (B), ClpB519-854 (C) und ClpB394-854 (D) wurden mit Nukleotiden und verschiedenen Salzkonzentrationen analysiert:

ATP 1 mM KCl: (—), ATP 200 mM KCl: (—), ATP 500 mM KCl: (—).

ADP 1 mM KCl: (—), ADP 200 mM KCl: (—), ADP 500 mM KCl: (—).

und dem gebundenem Nukleotid beeinflusst. Hochsalzbedingungen und ADP stabilisierten kleinere Oligomere, eine geringe Ionenstärke und ATP stabilisierten hingegen größere Oligomere. Die Retentionszeit mit 500 mM KCl und 1 mM ADP (72 Minuten) entsprach dem Molekulargewicht des Monomers (38 kDa). Bei 1 mM KCl und ATP entsprach die Retentionszeit (67.5 Minuten) einem Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa. Dieses Molekulargewicht kommt dem Molekulargewicht eines Dimers der zweiten AAA-Kassette nahe. Daher ist anzunehmen, dass die zweite AAA-Kassette von ClpB dimerisieren kann. ClpB394-854 entspricht der zweiten AAA-Kassette mit der vorhergehenden Linkerdomäne. Die Oligomerisierung dieses ClpB-Fragments war der Oligomerisierung von ClpB519-854 sehr ähnlich. Hochsalzbedingungen und ADP stabilisierten kleinere Oligomere, eine geringe Ionenstärke und ATP stabilisierten höhere Oligomere. Die Retentionszeit mit 500 mM KCl und 1 mM ADP (69 Minuten) entsprach dem Molekulargewicht des Monomers (53 kDa). Bei

1 mM KCl und 1 mM ATP entsprach die Retentionszeit (63 Minuten) einem Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa. Dieses Molekulargewicht entspricht fast dem Molekulargewicht eines Dimers aus ClpB394-854. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass dieses ClpB-Fragment, wie auch ClpB519-854 ohne Linkerregion, dimerisieren kann. Die Linkerdomäne hat somit einen Einfluss auf die Oligomerisierung der ersten, nicht jedoch auf die Oligomerisierung der zweiten AAA-Kassette. Die isolierte zweite AAA-Kassette von ClpB kann in der ATP-Form im Gegensatz zu NSF (D2) keine stabilen Hexamere ausbilden. Interaktionen der untersuchten Proteine mit der Säulenmatrix als Ursache für geringe Verzögerung der Retentionszeiten sind unwahrscheinlich. Sie können zwar bei niedrigen Salzkonzentrationen auftreten, würden aber eine Erhöhung der Retentionszeiten bei niedriger Ionenstärke bewirken. Bei den Messungen mit ClpB-Fragmenten wird jedoch eine Verkürzung der Retentionszeiten bei niedrigen Salzkonzentrationen beobachtet.

3.5.3.2 ATPase-Aktivität der ClpB-Fragmente

Ein Effekt der Linkerdomäne auf die ATPase-Aktivität der Proteine wurde ebenfalls bestimmt. ClpB141-393, ClpB141-519, ClpB394-854 und ClpB519-854 wurden unter „single turnover“ Bedingungen mit ATP inkubiert. Der relative Anteil des hydrolysierten ATPs wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5.6 dargestellt.

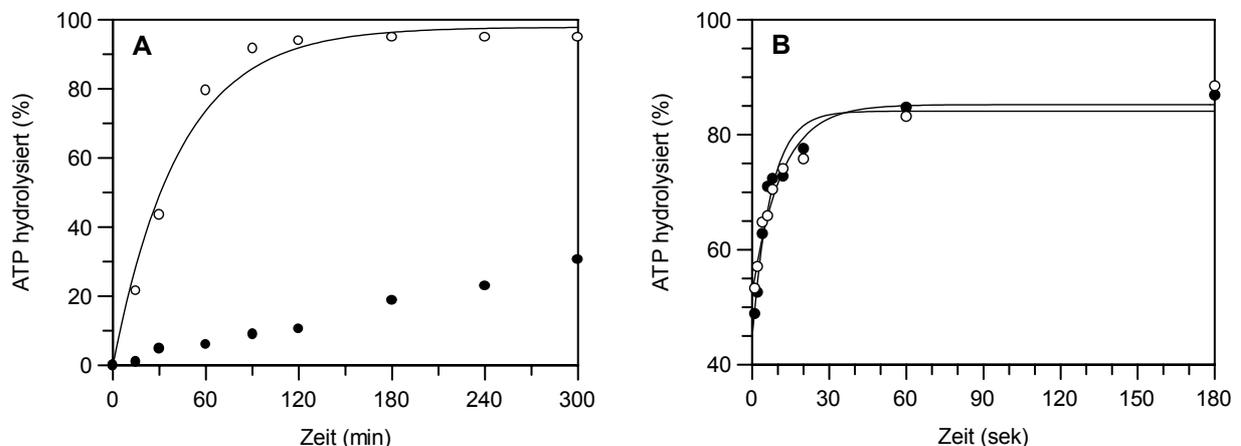


Abb. 3.5.6 Single turnover ATPase-Aktivität der AAA-Kassetten

A Analyse der ersten AAA-Kassette

Die Proteine (100 μM) wurden bei 25°C mit ATP (50 μM) inkubiert. Der hydrolysierte ATP-Anteil wurde nach TCA-Fällung mittels HPLC-Analyse bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Dargestellt sind ClpB141-393 (○) und ClpB141-519 (●). Die ATP-Hydrolyse durch ClpB141-519 ist sehr langsam und wurde nicht quantifiziert. Daher wurden nur die Ergebnisse von ClpB141-393 mit einer einfachen Exponentialgleichung ausgewertet. Die Ratenkonstante beträgt $2.3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

B Analyse der zweiten AAA-Kassette

Die Proteine (100 μM) wurden bei 25°C mit ATP (50 μM) inkubiert. Die Reaktion wurde mittels einer Quench Flow Anlage untersucht, der Nukleotidgehalt mittels HPLC-Analyse bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Dargestellt sind ClpB519-854 (●) und ClpB394-854 (○). Die Messdaten wurden mit einer Exponentialgleichung mit Offset ausgewertet. Die Ratenkonstanten betragen 0.14 sek^{-1} für ClpB519-854 und 0.09 sek^{-1} für ClpB394-854.

Die Konstrukte der ersten AAA-Kassette zeigten eine geringere ATPase-Aktivität als die Konstrukte der zweiten AAA-Kassette. Zudem trat bei den Konstrukten der ersten AAA-Kassette ein Effekt durch die Linkerdomäne auf. Die ATPase-Aktivität von ClpB141-394 ($k = 2.3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) war höher als die ATPase-Aktivität von ClpB141-519, die aufgrund der sehr langsamen Reaktion nicht exakt bestimmt werden konnte. Dies bedeutet, dass durch den Linker die „single turnover“ ATPase-Aktivität der ersten AAA-Kassette reduziert wird. In Steady State ATPase Messungen sind jedoch beide Konstrukte inaktiv (siehe Abb. 3.5.9).

Die Konstrukte der zweiten AAA-Kassette hatten eine hohe ATPase-Aktivität unter den getesteten Bedingungen. Daher wurden die Ratenkonstanten mittels einer Quench Flow Apparatur untersucht. Es zeigte sich, dass in beiden Fällen bereits nach einer Reaktionszeit von einer Sekunde fast die Hälfte des ATPs hydrolysiert wurde. Diese „Burst-Phase“ vor dem ersten Messpunkt wurde bereits bei ClpB Δ L beobachtet und deutet auf eine extrem schnelle ATP-Hydrolyse durch einen Teil der Proteine hin. Aus dem beobachteten Zeitfenster (nach einer Sekunde) wurden die Ratenkonstanten von 0.14 sek^{-1} für ClpB519-854 und 0.09 sek^{-1} für ClpB394-854 bestimmt. Diese sind um den Faktor 300 höher als die für die erste AAA-Kassette bestimmten Werte. Die Ratenkonstanten von umgerechnet $6-8 \text{ min}^{-1}$ entsprechen zudem der maximalen ATPase-Aktivität des stimulierten ClpB Hexamers (siehe Abb. 3.3.4). Die Linkerdomäne hatte keinen Effekt auf die ATPase-Aktivität der zweiten AAA-Kassette, da sich ClpB394-854 und ClpB519-854 in ihrer Aktivität nicht voneinander unterschieden.

Diese Versuche zeigten, dass die Linkerdomäne die Eigenschaften der ersten AAA-Kassette deutlich beeinflusst, die Eigenschaften der zweiten AAA-Kassette jedoch unverändert lässt. Dies wurde auch durch Untersuchungen zur Nukleotidbindung bestätigt. Die Konstrukte der ersten AAA-Kassette hatten nur noch eine sehr geringe Affinität zu Nukleotiden, so dass die Affinitäten für Mant-ADP und ADP nicht mehr durch Titrationsexperimente bestimmt werden konnten. In der publizierten Struktur der ersten AAA-Kassette von ClpB aus *E. coli* war ebenfalls kein Nukleotid gebunden (Li und Sha, 2002). Die Affinitäten von ClpB519-854 und ClpB394-854 für Nukleotide sind in Tabelle 3.5.1 dargestellt.

| | Clp519-854 | ClpB394-854 |
|-----------------|------------|-------------|
| ADP | 1.5 | 0.9 |
| Mant-ADP | 0.07 | 0.06 |
| ATP | - | - |
| Mant-ATP | 1.5 | 1.9 |

Tabelle 3.5.1 Nukleotiddissoziationskonstanten (K_d , μM) für die ClpB-Fragmente

Die Affinitäten für die modifizierten Nukleotide wurden durch Gleichgewichtstitrationen bestimmt, die Bindung von ADP durch Verdrängungsexperimente untersucht. Die Bindung von ATP wurde aufgrund der hohen ATPase-Aktivität der Proteine nicht untersucht.

Die untersuchten Fragmente ClpB519-854 und ClpB394-854 zeigten noch hohe Affinitäten für die untersuchten Nukleotide. Das modifizierte Nukleotid wurde etwas stärker gebunden als die unmodifizierten Nukleotide. Die K_d -Werte waren leicht niedrigerer als für das Wildtypprotein (siehe Tab. 3.3.2), was zeigt, dass die zweite AAA-Kassette eine hochaffine

Nukleotidbindungsstelle besitzt. Dies bestätigt die Vermutung, dass die zweite AAA-Kassette für die Nukleotidbindung von ClpB verantwortlich ist.

Aufgrund der präsentierten Ergebnisse und der Beobachtung, dass ClpB₁₄₁₋₅₁₉ während der Proteinaufreinigung deutlich stabiler als ClpB₁₄₁₋₃₉₃ war (Daten nicht gezeigt), ist eine Insertion des Linkers in die erste AAA-Kassette wahrscheinlich. Aufgrund dieser Ergebnisse werden die erste AAA-Kassette und der Linker von ClpB als funktionelle Einheit betrachtet. Die erste AAA-Kassette umfasst daher die Aminosäuren 141-519, die zweite AAA-Kassette umfasst die Aminosäuren 519-854.

3.5.4 Interaktionen der AAA-Kassetten von ClpB

Die Interaktionen der zwei AAA-Kassetten wurden durch die Charakterisierung der Wechselwirkungen von ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ untersucht. Dies erlaubt eine Zuordnung der verschiedenen Funktionen zu den einzelnen AAA-Kassetten. Als Vergleichsprotein wurde ClpB Δ N benutzt, da es von der Größe und der Domänenstruktur einem möglichen Komplex aus ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ entspricht.

3.5.4.1 Komplexbildung der AAA-Kassetten

Um eine mögliche Interaktion der zwei AAA-Kassetten zu untersuchen, wurden Gelfiltrationsläufe durchgeführt. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 3.5.7 dargestellt. Das Oligomerisierungsverhalten einer Mischung aus ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ unterschied sich deutlich von den Elutionsprofilen der Einzelkomponenten. Bei der Gelfiltration der Proteinmischung war eine Komplexbildung der Proteine zu beobachten. Im Bereich der Retentionszeiten der Einzelproteine (ca. 70 Minuten) war nur ein geringer Proteinpeak zu erkennen (siehe Abb. 3.5.5). In Abhängigkeit der Ionenstärke und des Nukleotids konnte der Proteinkomplex aus ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ Oligomere bis hin zu Hexameren bilden. Wiederum stabilisierten ATP und eine geringe Salzkonzentration die großen Oligomere, ADP und Hochsalzbedingungen stabilisierten die kleineren oligomeren Formen. Bei 500 mM KCl und 1 mM ADP entsprach die Retentionszeit (63 Minuten) einem Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa. Das kommt dem Molekulargewicht eines Monomers des Proteinkomplexes aus ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ (80.5 kDa) sehr nahe. Im Vergleich zur Oligomerisierung des Referenzproteins ClpB Δ N (siehe auch Abb. 3.3.2) war die Oligomerisierung nur geringfügig reduziert. So bildete der Proteinkomplex bei 1 mM KCl und ADP hauptsächlich Trimere und weniger Hexamere im Vergleich zu ClpB Δ N.

Die Gelfiltrationsanalysen belegten, dass ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ einen Komplex bilden. Dieser Proteinkomplex ist stabil und kann oligomerisieren. Das Oligomerisierungsverhalten ähnelte dem Verhalten von ClpB Δ N. Für die Oligomerisierung ist somit die kovalente Verknüpfung zwischen den AAA-Kassetten nicht essentiell.

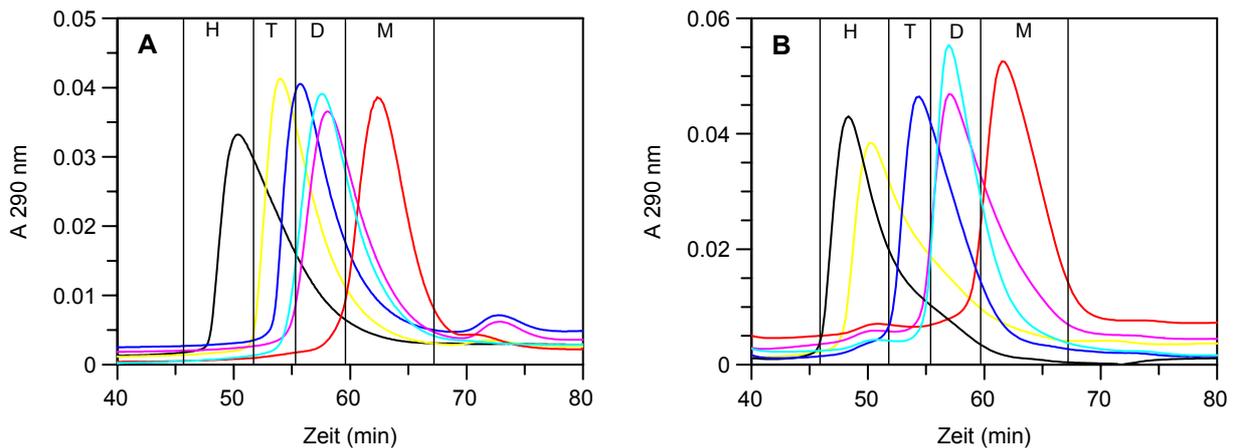


Abb. 3.5.7 Gelfiltrationsanalyse der Interaktion der AAA-Kassetten von ClpB

Die Proteine (je 50 μ M) wurden mit 0.2 ml/min auf eine Sephadex S200 HR Säule injiziert. Die dünnen Linien geben die Grenzen zwischen Monomeren (M), Dimeren (D), Trimeren (T) und höheren Oligomeren bis zu Hexameren (H) an (siehe Material und Methoden). ClpB141-519 mit ClpB519-854 (A) und ClpB Δ N (B) wurden mit Nukleotiden und verschiedenen Salzkonzentrationen analysiert:

ATP 1 mM KCl: (—), ATP 200 mM KCl: (—), ATP 500 mM KCl: (—).

ADP 1 mM KCl: (—), ADP 200 mM KCl: (—), ADP 500 mM KCl: (—).

3.5.4.2 ATPase-Aktivität des Komplexes

Die Auswirkung der Komplexbildung von ClpB141-519 und ClpB519-854 auf die ATPase-Aktivität wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Zunächst wurde die ATPase-Aktivität des Komplexes unter „single turnover“ Bedingungen gemessen. Als Referenzproteine wurden ClpB und ClpB Δ N untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5.8 zusammengefasst. Verglichen mit den „single turnover“ ATPase-Aktivitäten der Einzelkomponenten (siehe Abb. 3.5.6) zeigte sich eine Änderung der Aktivität durch die Komplexbildung von ClpB141-519 und ClpB519-854. Die Aktivität des Komplexes lag oberhalb der Aktivität von ClpB141-519 und unterhalb der Aktivität von ClpB519-854. Die ATP-Hydrolyserate zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei ClpB Δ N und ClpB. Werden die Messdaten mit einer Exponentialgleichung erster Ordnung ausgewertet, können die Ratenkonstanten bestimmt werden. Die Ratenkonstante des Komplexes ist den Ratenkonstanten, die für ClpB Δ N und ClpB bestimmt wurden, sehr ähnlich. Diese Untersuchungen der ATPase-Aktivitäten zeigten, dass der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 eine ähnliche „single turnover“ ATPase-Aktivität wie ClpB Δ N und ClpB besitzt.

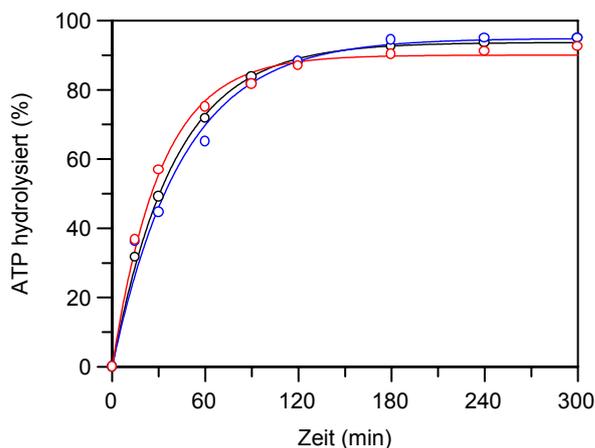


Abb. 3.5.8 Single turnover ATPase-Aktivität des Komplexes aus ClpB141-519 und ClpB519-845

Die ATPase-Aktivitäten wurden untersucht wie in Abb. 3.5.6A beschrieben. Dargestellt wurden der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-845 (○) sowie ClpB (○) und ClpB Δ N (○). Nach Auswertung mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung wurden die Ratenkonstanten bestimmt. Sie betragen $2.2 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ für den Proteinkomplex, $3.2 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ für ClpB Δ N und für $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ für ClpB.

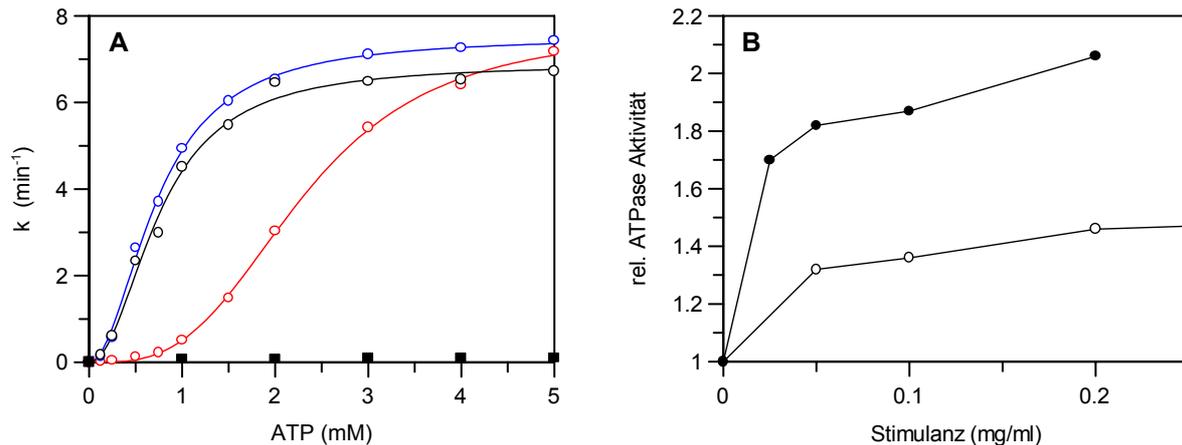


Abb. 3.5.9 ATPase-Aktivitäten der ClpB-Konstrukte

A Steady State ATPase-Aktivität

ClpB141-519 (10 μ M, ■), ClpB519-854 (10 μ M, ○), ClpB Δ N (10 μ M, ○) und der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 (je 10 μ M, ○) wurden mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen bei 25°C inkubiert. Die beobachteten Ratenkonstanten wurden gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und mit der Hill-Gleichung ausgewertet.

B Stimulierung der ATPase-Aktivität von ClpB519-854

Die Stimulierung der ATPase-Aktivität von ClpB519-854 (10 μ M) durch Poly-L-Lysin (●) und Casein (○) wurde bei 25°C und 1 mM ATP unter Steady State Bedingungen gemessen. Die Aktivitäten sind relativ zu der unstimulierten ATPase-Aktivität gesetzt.

Anschließend wurde die Steady State ATP-Hydrolyserate des Komplexes und der Referenzproteine untersucht. Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.5.9A dargestellt. ClpB Δ N zeigte die in Abschnitt 3.3.4 beschriebene ATPase-Aktivität. Der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 zeigte ebenfalls ATPase-Aktivität. Bei niedrigeren ATP-Konzentrationen war die ATP-Hydrolyserate geringer als für das Vergleichsprotein ClpB Δ N, bei hohen ATP-Konzentrationen näherten sich die Ratenkonstanten jedoch an. Die zweite AAA-Kassette (ClpB519-854) war ebenfalls aktiv und zeigte eine relativ hohe ATPase-Aktivität. Die isolierte erste AAA-Kassette (ClpB141-519) zeigte hingegen nur eine sehr geringe ATPase-Aktivität, die im Vergleich zu der zweiten AAA-Kassette um mehr als 90 % reduziert war und im Bereich der ATPase-Aktivität der P-Loop Mutanten von ClpB lag (Schlee et al., 2001).

Die ATPase-Aktivitäten von ClpB Δ N, ClpB519-854 und des Komplexes aus ClpB141-519 mit ClpB519-854 zeigten einen sigmoiden Kurvenverlauf, wenn die Ratenkonstanten (k) gegen die ATP-Konzentration aufgetragen wurden. Daher wurden diese Messungen mit der Hill-Gleichung ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.5.2 angegeben. Die Messwerte von ClpB141-519 wurden aufgrund der geringen Aktivität nicht ausgewertet. ClpB519-854 zeigte eine allosterische ATPase-Aktivität. Der Hill-Koeffizient (N_h) von 2.0 belegt, dass mindestens zwei aktive Zentren an der ATPase-Reaktion beteiligt sind. Dies kann mit der Dimerisierung des Proteins erklärt werden, die in den Gelfiltrationsläufen beobachtet wurde. Die maximale ATPase-Aktivität (k_{cat}) beträgt 6.8 min^{-1} .

Tabelle 3.5.2 Analyse der Steady State ATPase-Aktivitäten der Proteine

Die Messdaten wurden mit der Hill-Gleichung ausgewertet.

| | k_{cat} (min^{-1}) | K_m (mM) | Hill-Koeffizient |
|---------------------------------|--|------------|------------------|
| ClpB519-845 | 6.8 | 0.73 | 2.0 |
| ClpB141-519+ClpB591-854 | 7.7 | 2.3 | 3.2 |
| ClpBΔN | 7.5 | 0.76 | 2.0 |

Die ATPase-Aktivität von ClpB Δ N zeigte den zuvor beschriebenen sigmoiden Verlauf (siehe Abschnitt 3.3.4). Die maximale ATPase-Aktivität (k_{cat}) wurde bereits bei niedrigeren ATP-Konzentrationen erreicht. Der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 zeigte ebenfalls eine allosterische ATPase-Aktivität. Die maximale ATPase-Aktivität (k_{cat}) von 7.7 min^{-1} ist im Bereich des k_{cat} -Werts von ClpB Δ N (7.5 min^{-1}). Sie wurde jedoch erst bei höheren ATP-Konzentrationen erreicht. Dies spiegelt sich auch in dem hohen K_m -Wert wider. Der Hill-Koeffizient des Komplexes aus ClpB141-519 und ClpB519-854 von 3.2 ist höher als bei ClpB Δ N (N_h : 2.0). Dies deutet auf eine weniger starke Kopplung der beteiligten aktiven Zentren des Komplexes hin. Diese schwächere Kopplung kann durch die nicht mehr existierende kovalente Verknüpfung der beiden AAA-Kassetten erklärt werden.

Die ATPase-Aktivität von ClpB519-854 konnte zudem durch Poly-L-Lysin stimuliert werden, obwohl diese AAA-Kassette keine Chaperonfunktion mehr besitzt (Abb. 3.5.9B). Dieses Verhalten der ATPase-Aktivität gleicht dem Verhalten des Wildtypproteins und ClpB Δ N. Da ClpB519-854 die N-terminale Domäne von ClpB nicht besitzt, ist die Stimulierung durch Casein schwächer. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Poly-L-Lysin die ATPase-Aktivität der zweiten AAA-Kassette stimuliert. Eine Kommunikation zwischen den beiden AAA-Kassetten ist für eine Stimulierung der ATPase-Aktivität somit nicht notwendig.

3.5.4.3 Chaperonaktivität des Komplexes

Die bisher untersuchten biochemischen Eigenschaften des Komplexes aus ClpB141-519 und ClpB519-854 wiesen auf eine große Ähnlichkeit mit ClpB Δ N hin. Die Chaperonaktivität des Komplexes wurde daher in den zuvor etablierten Rückfaltungsassays untersucht und mit ClpB Δ N verglichen. Die etablierten Substratproteine wurden ohne Chaperone denaturiert und dann mit den Chaperonen zurückgefaltet. Die Ergebnisse der Rückfaltungsexperimente sind in Abbildung 3.5.10 dargestellt.

Denaturierte α -Glucosidase konnte von ClpB Δ N in Kooperation mit dem DnaK-System zurückgefaltet werden. In diesem Experiment betrug die Ausbeute nach 90 Minuten ca. 25 % der Ausgangsaktivität. Der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 zeigte eine, im Vergleich zu ClpB Δ N, identische Chaperonaktivität. Die einzelnen AAA-Kassetten ClpB141-519 bzw. ClpB519-854 hatten keine Chaperonaktivität mehr, so dass in diesen Ansätzen nur

die durch das DnaK-System reaktivierte Aktivität gemessen wurde (ca. 2 %). Ohne Chaperone wurde keine α -Glucosidaseaktivität detektiert.

GPDH wurde als zweites Substratprotein eingesetzt. Bei Inkubation mit ClpB Δ N und dem DnaK-System wurde in diesem Experiment nach 90 Minuten eine Rückfaltungsausbeute von 45 % erzielt. Der Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 zeigte erneut eine identische Chaperonaktivität wie ClpB Δ N. Die einzelnen AAA-Kassetten waren inaktiv. In diesen Ansätzen und in den Ansätzen des DnaK-Systems allein wurden 10 % des Substrats reaktiviert. Ohne Chaperone war nur geringe Enzymaktivität detektierbar.

Harnstoffdenaturierte Luciferase wurde ebenfalls als Substrat eingesetzt. Nach Denaturierung wurde Luciferase in den Assaypuffer mit vorgelegten Chaperonen verdünnt. Die Lumineszenz wurde als Maß für die Aktivität der Luciferase verwendet. In diesem Assay zeigte ClpB Δ N eine etwas höhere Chaperonaktivität verglichen mit dem Komplex aus ClpB141-519 mit ClpB519-854. Der maximal gemessene Lumineszenzwert bei Inkubation des Substrats mit dem Proteinkomplex betrug 71 % des Maximalwerts in Anwesenheit von ClpB Δ N. Die Lumineszenz dieser Ansätze stieg zudem unmittelbar nach Reaktionsbeginn an und erreichte den Maximalwert nach ca. 100 Minuten. Die reduzierte Aktivität des Proteinkomplexes kann mit der geringeren ATPase-Aktivität im Vergleich zu ClpB Δ N bei der verwendeten ATP-Konzentration von 1 mM erklärt werden. Die isolierten AAA-Kassetten zeigten keine Chaperonfunktion mehr, sie inhibierten jedoch das DnaK-System nicht. Das DnaK-System allein erreichte erst nach 500 Minuten den höchsten Lumineszenzwert und hatte zu Beginn eine Verzögerungsphase von ca. 30 Minuten.

Als viertes Substratprotein wurde LDH mit N-terminalem His-Tag verwendet. ClpB Δ N konnte ca. 40 % der LDH-Aktivität nach Hitzedenaturierung reaktivieren. Nach 90 Minuten zeigte der Komplex aus ClpB141-519 mit ClpB519-854 63 % der Aktivität von ClpB Δ N. In diesem Assay konnte das DnaK-System alleine 3.6 % der Substrataktivität wieder herstellen. Diese Aktivität wurde auch in Anwesenheit der einzelnen AAA-Kassetten mit dem DnaK-System erreicht. Ohne Chaperone war keine LDH-Aktivität messbar.

Für die Charakterisierung der Chaperonaktivität des Komplexes aus ClpB141-519 und ClpB519-854 wurden vier Substrate eingesetzt. In den Rückfaltungsassays zeigte der Proteinkomplex zwischen 63 und 100 % der Aktivität von ClpB Δ N. Der Komplex konnte bis zu 50 % der Ausgangsaktivität der Substrate wiederherstellen. Dies zeigt eindeutig, dass die kovalente Verknüpfung der beiden AAA-Kassetten nicht notwendig für die Chaperonfunktion von ClpB ist. Die einzeln eingesetzten AAA-Kassetten besitzen keine Chaperonaktivität mehr. Der Verlust der Chaperonaktivität von ClpB hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des DnaK-Systems.

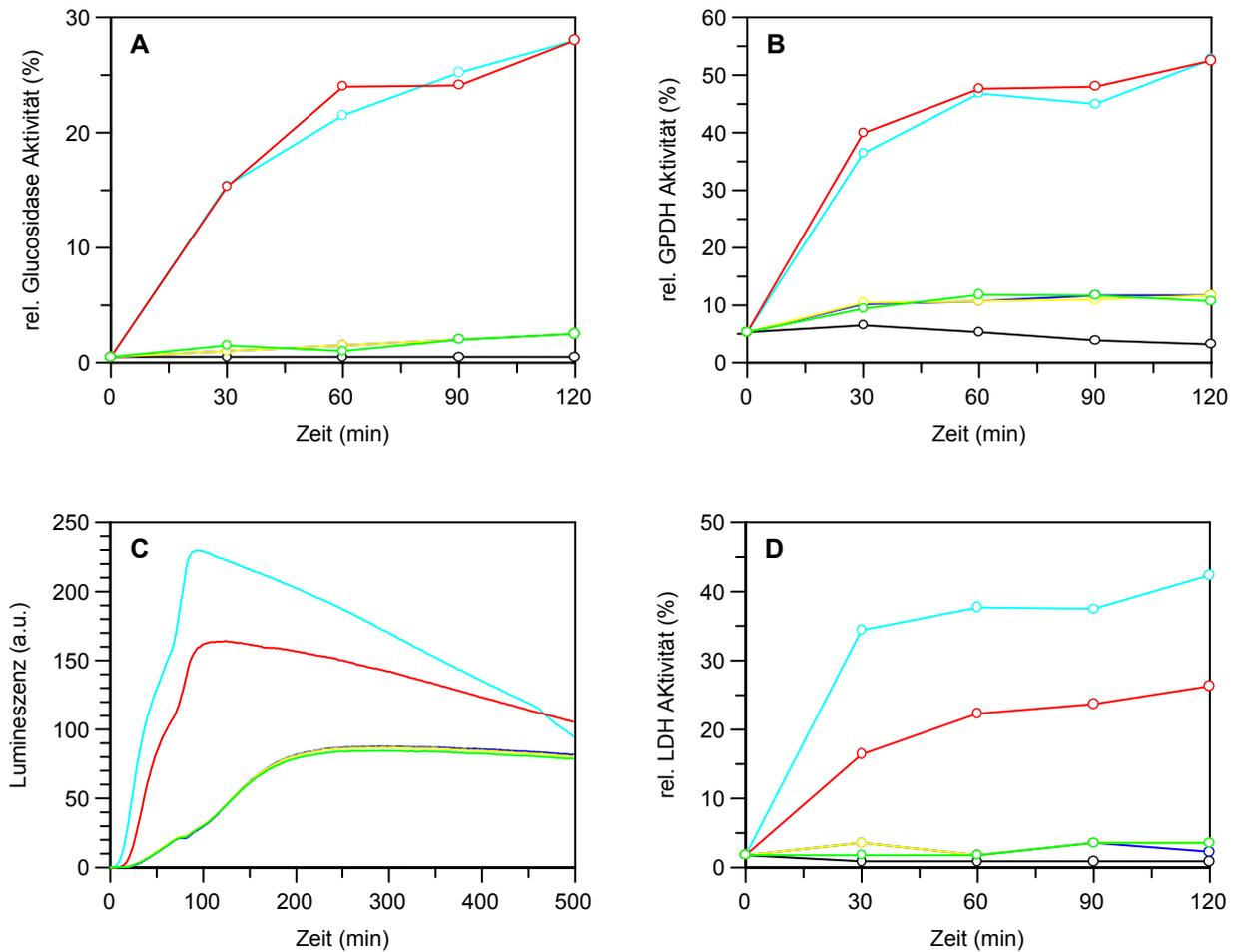


Abb. 3.5.10 Rückfaltungsaktivität des Komplexes aus ClpB141-519 und ClpB519-845

Die Rückfaltung der denaturierten Substrate erfolgte ohne Chaperone (—), mit dem DnaK-System (—), mit dem DnaK-System mit ClpB Δ N (—), mit dem DnaK-System mit dem Komplex aus ClpB141-519 und ClpB519-854 (—), mit dem DnaK-System mit ClpB141-519 (—) und mit dem DnaK-System mit ClpB519-854 (—). Die Konzentration der ClpB-Fragmente betrug jeweils 0.5 μ M.

A Rückfaltung von α -Glucosidase

α -Glucosidase (0.1 μ M) wurde 10 Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

B Rückfaltung von GPDH

GPDH (0.2 μ M) wurde 7½ Minuten bei 75°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

C Rückfaltung von Luciferase

Luciferase (10 μ M) wurde 30 Minuten bei RT mit 7 M Harnstoff denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte nach Verdünnung bei 25°C. Die Lumineszenz wurde in einem kontinuierlichen System gemessen.

D Rückfaltung von LDH

LDH (0.2 μ M) wurde 30 Minuten bei 80°C denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 55°C. Die Aktivität wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und ist relativ zur Aktivität vor der Denaturierung angegeben.

In diesem Abschnitt wurden die Position und Funktion der Linkerdomäne sowie die Struktur und die Interaktionen der AAA-Kassetten von ClpB untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Linkerdomäne essentiell für die Chaperonfunktion ist, obwohl sie vermutlich nicht die Substratbindestelle darstellt. Ohne Linkerdomäne ist die Oligomerisierung von ClpB reduziert, die ATPase-Aktivität ist jedoch höher. Im Vergleich zum Wildtypprotein hatte ClpB Δ L eine entkoppelte ATPase-Aktivität. In Steady State Messungen wurde bei geringeren ATP-Konzentrationen die maximale Geschwindigkeit erreicht, und die „single turnover“ ATPase-Aktivität ist um den Faktor 300 erhöht. Dies belegt, dass die Linkerdomäne für die Regulation der ATP-Hydrolyse und für die Kommunikation zwischen den aktiven Zentren wichtig ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Linkerdomäne in die erste AAA-Kassette inseriert ist und die untersuchten Aktivitäten der ersten AAA-Kassette beeinflusst. Daher kann die Linkerdomäne mit der ersten AAA-Kassette als Einheit betrachtet werden.

Eine Charakterisierung der so definierten AAA-Kassetten zeigte, dass die erste AAA-Kassette weniger aktiv in den ATPase-Assays war und schwach Nukleotide band. Die zweite AAA-Kassette zeigte jedoch eine hohe Affinität für Nukleotide und eine sehr hohe ATPase-Aktivität, insbesondere in den „single turnover“ Messungen.

Bei Gelfiltrationsanalysen wurde gezeigt, dass die beiden AAA-Kassetten miteinander interagieren. Es bildete sich ein Proteinkomplex, der wie das Referenzprotein ClpB Δ N oligomerisieren konnte, obwohl die einzelnen AAA-Kassette nur Dimere bildeten. Dieser Proteinkomplex hatte zudem eine ähnliche „single turnover“ ATPase-Aktivität wie ClpB Δ N. Die Steady State ATPase-Aktivität war bei niedrigeren ATP-Konzentrationen reduziert, erreichte bei hohen ATP-Konzentrationen jedoch den Wert von ClpB Δ N. Das allosterische Signal kann somit auch ohne die kovalente Verbindung zwischen den AAA-Kassetten weitergeleitet werden.

Die Chaperonaktivität des Komplexes aus ClpB₁₄₁₋₅₁₉ und ClpB₅₁₉₋₈₅₄ wurde mit den in dieser Arbeit etablierten Substraten getestet. Der Proteinkomplex besaß Aktivität in allen benutzten Rückfaltungsassays. Es wurden zwischen 63 und 100 % der Aktivität von ClpB Δ N beobachtet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die kovalente Verbindung der beiden AAA-Kassetten nicht essentiell für die Chaperonfunktion von ClpB ist.

4. Diskussion

ClpB wurde ursprünglich als Thermotoleranzfaktor in *S. cerevisiae* identifiziert, der das Überleben bei erhöhten Temperaturen ermöglicht. In Kooperation mit dem DnaK-System reaktiviert ClpB zuvor aggregierte Proteine (Parsell et al., 1994b). ClpB gehört zu der AAA+-Proteinsuperfamilie und besitzt zwei AAA-Kassetten. Der ersten AAA-Kassette geht eine N-terminale Domäne voraus, deren Funktion bisher nicht charakterisiert wurde. Zusätzlich ist eine Linkerregion zwischen den AAA-Kassetten vorhanden (Schirmer et al., 1996). Im Rahmen dieser Diskussion werden die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

4.1 Optimierung der Chaperonkonzentrationen

Das Chaperonnetzwerk aus dem DnaK-System und ClpB wurde für die Rückfaltung von vier Substratproteinen verwendet (siehe Abschnitt 3.1). Die optimierten Chaperonverhältnisse des DnaK-Systems waren bei allen getesteten Substraten gleich, bei Luciferase wurde für die höchste Ausbeute jedoch die doppelte Chaperonmengen eingesetzt. Eine weitere Erhöhung der Chaperonkonzentrationen hatte keinen Einfluss mehr auf die Rückfaltungsausbeute. Die DnaK-Konzentration (1.6 μM) war höher als die Konzentrationen der Kochaperone DnaJ (0.4 μM) und GrpE (0.2 μM). Die substöchiometrischen Mengen der Kochaperone wurden auch für das DnaK-System aus *E. coli* als optimal für *in vitro* Rückfaltungen bestimmt (Pierpaoli et al., 1998).

Bei geringeren Konzentrationen von GrpE und DnaJ nahm die Ausbeute der Rückfaltung ab. Vermutlich sind diese Konzentrationen der Kochaperone nicht mehr in der Lage den Funktionszyklus von DnaK produktiv zu steuern. Dieser Effekt kann auch die Beobachtung erklären, dass sehr hohe DnaK-Konzentrationen keinen positiven Effekt mehr auf die Rückfaltung haben.

Die optimale DnaK-Konzentration war höher als die eingesetzte Substratkonzentration in den Assays. Eventuell bindet DnaK als Trimer an Substrate, da bereits ein trimerer DnaK-DnaJ Komplex aus *T. thermophilus* isoliert wurde (Motohashi et al., 1994). Eine weitere Erklärung für diesen notwendigen Konzentrationsüberschuss könnte in einer geringen Affinität für einen Teil der Substrate liegen. Ohne DnaK war keine Rückfaltung der Proteinaggregate möglich, was erneut die Bedeutung des Chaperons für die Reaktivierung von Aggregaten zusammen mit ClpB zeigt.

DnaJ war notwendig für die Rückfaltung der Substrate mit dem DnaK-System. Da DnaJ nicht die ATPase-Aktivität von DnaK stimuliert, ist es vermutlich für die Rekrutierung von Substraten notwendig. Von DnaJ aus *E. coli* wurde eine DnaK-unabhängige Bindung an Substrate mit hoher Affinität berichtet (Rüdiger et al., 2001). Hohe DnaJ-Konzentrationen inhibieren die Substratrückfaltung des Chaperonsystems. Diese Inhibierung der Rückfaltung

kann durch eine kompetitive Bindung von DnaJ_{Tth} an Substrate von DnaK_{Tth} erklärt werden. Die so gebundenen Substrate können bei einem DnaJ-Überschuss nicht mehr an DnaK übergeben werden und werden somit nicht mehr zurückgefaltet. Eine Inhibierung aufgrund eines Missverhältnisses zwischen Stimulation der ATPase-Aktivität und Nukleotidfreisetzung scheidet aus, da DnaJ_{Tth} die ATPase-Aktivität von DnaK_{Tth} nicht stimuliert.

GrpE wird nur in katalytischen Mengen für die optimale Rückfaltung der Substrate benötigt. Die Freisetzung von Nukleotiden aus DnaK wird durch GrpE stark beschleunigt, so dass die ATP-Hydrolyse durch DnaK wieder ratenlimitierend ist. Auch ohne GrpE ist eine Teilaktivität des DnaK-Systems vorhanden, obwohl der unstimulierte Nukleotidaustausch sehr langsam ist (Groemping et al., 2001). Eventuell beschleunigen gebundene Peptide die Nukleotidfreisetzung von DnaK und ermöglichen so einen funktionellen Chaperonzyklus (Theyssen et al., 1996). Der negative Effekt von sehr hohen GrpE-Konzentrationen kann durch Interaktionen von GrpE mit der Substratbindestelle von DnaK erklärt werden (Mehl et al., 2001).

Die optimale ClpB-Konzentration war bei drei Substraten 1.0 μM , für eine optimale Rückfaltung von Luciferase wurde 0.5 μM ClpB eingesetzt. Die Ausbeute der Rückfaltung ist bei niedrigen Substratkonzentrationen, wie sie bei den Standardtests eingesetzt wurden, relativ unempfindlich gegenüber der Konzentration von ClpB. Wird das Hexamer von ClpB als aktive Form angesehen, lag ClpB nicht im Überschuss zu den Substraten vor. Dies deutet auf einen nicht-permanenten Komplex von ClpB mit den Substraten hin. Bei einer reinen „holder“-Funktion, durch die Substrate dem DnaK-System von ClpB präsentiert würden, hätten höhere ClpB-Konzentration einen positiven Effekt auf die Rückfaltungsreaktion, da mehr Substrate einem DnaK-Überschuss präsentiert werden könnten. Hohe ClpB-Konzentrationen inhibierten jedoch die Rückfaltung der denaturierten Proteine. Diese Beobachtung kann durch mehrere Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnte eine kompetitive Bindung der Substrate zwischen ClpB bzw. DnaK das Chaperonsystem inhibieren. Allerdings trat bei den Optimierungsexperimenten trotz hoher ClpB-Konzentrationen niemals eine komplette Inhibierung der Rückfaltung auf. Daher ist es wahrscheinlicher, dass bei sehr hohen ClpB-Konzentrationen und langer Inkubationszeit die ATP-Menge limitierend wird.

Das Chaperonnetzwerk arbeitete bei allen getesteten Substraten mit ähnlichen Konzentrationen optimal. Daher scheinen die optimalen Chaperonkonzentrationen nicht von der Art des eingesetzten Substrates abhängig zu sein. Das ist ein Hinweis auf eine breite Substratspezifität des DnaK-Systems in Kooperation mit ClpB *in vitro*, die auch *in vivo* beschrieben wurde (Mogk et al., 1999).

4.2 Substraterkennung und Rückfaltungsausbeuten des Chaperonsystems

Die Substratspezifität des Chaperonsystems wurde mit vier Substraten untersucht, die mit Ausbeuten zwischen 40 und 70 % zurückgefaltet wurden. LDH, GPDH und α -Glucosidase wurden hitzedenaturiert, Luciferase wurden mit Harnstoff denaturiert. Die Ausbeuten der Rückfaltung von Substraten hängen stark von der Art und Dauer der Denaturierung ab, da sich unterschiedlich große Aggregate bilden können (Diamant et al., 2000). Bei Denaturierung mit GdnHCl aggregiert die denaturierte Luciferase nicht, so dass das DnaK-System alleine effektiv zurückfalten kann (Groemping, 2000). Bei Harnstoff und Hitze als Stressauslöser kommt es jedoch zu einer Aggregation des denaturierten Proteins. Bei der anschließenden Rückfaltung der Luciferase hatte ClpB einen positiven Effekt auf die Rückfaltungsausbeute. Bei vorhergehender Hitzedenaturierung war ClpB für die produktive Rückfaltung von Luciferase essentiell. Die Rückfaltung von harnstoffdenaturierter Luciferase wurde als eine Standardreaktion in dieser Arbeit eingesetzt, weil bei der Hitzedenaturierung die Gesamtausbeute der Reaktivierung gering war. Luciferase als eukaryontisches Protein war das empfindlichste Substrat mit der schnellsten Inaktivierung durch die getesteten Stressfaktoren. Wurden nach Harnstoffdenaturierung bis zu 40 % der Aktivität reaktiviert, war dieser Prozentsatz nach Hitzedenaturierung deutlich geringer (< 5 %). Bei der Rückfaltung von hitzedenaturierter Luciferase erwies sich das thermophile Chaperonsystem als effizienter als das mesophile *E. coli* Chaperonsystem (Groemping, 2000). Thermophile Chaperone scheinen somit für Renaturierung von hitzedenaturierten Proteinen besonders geeignet zu sein. Dies kann mit ihrem natürlichen Lebensraum in heißen Quellen in Verbindung stehen, wo ein Hitzeschock eine wahrscheinliche Stressbedingung ist. Daher sind Chaperone aus thermophilen Organismen vermutlich auf hitzedenaturierte Substrate spezialisiert.

Die drei prokaryontischen Proteine (LDH, α -Glucosidase, GPDH) wurden aus diesem Grund für die Untersuchungen mit Hitzeschock denaturiert. Die optimale Rückfaltungstemperatur war bei den Proteinen identisch mit der Wachstumstemperatur des Herkunftsorganismus *B. stearothermophilus*. Dies deutet auf eine Optimierung der Faltung an die Lebensbedingungen des Herkunftsorganismus hin.

In allen vorgestellten Untersuchungen wurde das denaturierte Protein nicht vollständig zurückgefaltet. Der nicht reaktivierbare Anteil der Proteine aggregierte vermutlich so stark, dass auch das Chaperonsystem aus ClpB und dem DnaK-System nicht mehr in der Lage war die Aggregate aufzulösen (Diamant et al., 2000). Dies erklärt auch, warum höhere Chaperonmengen keinen positiven Effekt auf die Rückfaltung haben. In Abbildung 4.1 ist der Vorgang der Proteinaggregation schematisch dargestellt.

Die Aufteilung der denaturierten Proteine in verschiedene Gruppen von Substraten erklärt die Ausbeute des Chaperonsystems. Bei denaturierten, aber nicht aggregierten Proteinen,

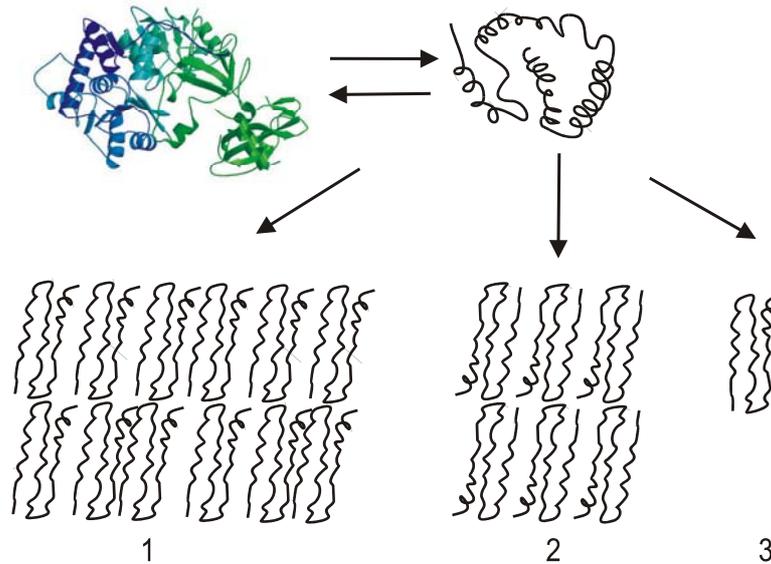


Abbildung 4.1 Aggregation von Proteinen

Die native Proteinstruktur wird durch die Denaturierung aufgelöst. Die Aggregation verläuft in der Regel über ein aggregationsfähiges, entfaltetes Intermediat. Das DnaK-System kann nur entfaltete aber nicht aggregierte Proteine rückfalten (3). Mit ClpB können auch Aggregate reaktiviert werden (2), wenn eine kritische Größe der Aggregate jedoch überschritten ist dies nicht mehr möglich (1).

wie GdnHCl-denaturierte Luciferase, kann das DnaK-System alleine effektiv arbeiten. Mit ClpB können zusätzlich größere Aggregate reaktiviert werden. Die durchgeführten Lichtstreuungsmessungen bestätigen die Aggregation der Substratproteine durch Hitzedenaturierung. Ist eine gewisse Größe der Aggregate jedoch überschritten, können die Aggregate auch in Kooperation mit ClpB nicht mehr vom DnaK-System reaktiviert werden. Die Höhe der Rückfaltungsausbeute zwischen den Ansätzen des DnaK-Systems mit und ohne ClpB war zudem sehr unterschiedlich. Durch ClpB wurde die Ausbeute in der Regel um einen Faktor von 10 erhöht. Der große Effekt deutet daraufhin, dass ClpB direkt mit den Substraten interagiert. Diese direkte Interaktion von ClpB mit Substraten konnte für LDH aus *B. stearothermophilus* gezeigt werden. ClpB besitzt somit eine Substratbindestelle für denaturierte Proteine, allerdings scheint diese Wechselwirkung schwach ausgeprägt zu sein und von dem gebundenen Nukleotid beeinflusst zu werden.

Eine Konsensussequenz für Substrate von ClpB ist bisher nicht identifiziert worden. Die hier vorgestellten Substrate unterscheiden sich in ihrer Größe von LDH mit N-terminalen His-Tag (337 Aminosäuren, 37 kDa), GPDH (497 Aminosäuren, 57 kDa) Luciferase (550 Aminosäuren, 61 kDa) bis zu α -Glucosidase (555 Aminosäuren, 65 kDa). Zusätzlich sind die oligomeren Formen der Proteine unterschiedlich. So sind α -Glucosidase und Luciferase als Monomere aktiv, LDH und GPDH bilden Tetramere aus (Okuno et al., 1985; Takii et al., 1992; Conti et al., 1996; Halliwell et al., 2001). Trotz dieser Unterschiede werden die Substrate mit ähnlichen Ausbeuten zurückgefaltet. Daher müssen die Aggregate dieser

Proteine gemeinsame Eigenschaften besitzen. Diese gemeinsamen Merkmale werden dann von ClpB erkannt werden.

Für Hsp104, das *S. cerevisiae* Homolog von ClpB, wurden lysinreiche und unstrukturierte Bereiche als Erkennungsmotive postuliert (Cashikar et al., 2002). Das synthetische Polypeptid Poly-L-Lysin wurde daher als Substratanalogon von ClpB verwendet. Die Struktur von Poly-L-Lysin ist stark abhängig vom pH-Wert der Lösung. Bei physiologischen pH-Werten liegt Poly-L-Lysin als „random coil“ vor und kann somit einem natürlichen Aggregat ähneln (Cashikar et al., 2002; Paynter und Russell, 2002). Der Lysingehalt der verwendeten Substratproteine von ClpB ist in Tabelle 4.1 angegeben.

Tabelle 4.1 Lysingehalt der eingesetzten Substrate

| Protein | Lysingehalt (%) |
|----------------------|------------------------|
| α-Glucosidase | 5.2 % |
| Luciferase | 7.3 % |
| GPDH | 5.0 % |
| LDH | 4.2 % |

Alle eingesetzten Substrate wiesen einen Lysingehalt auf, der im Bereich des statistischen Auftretens der Aminosäure in Proteinen liegt (5.8 %) und Poly-L-Lysin stimuliert die ATPase-Aktivität von ClpB stärker, als es mit natürlichen Substraten beobachtet werden konnte. Damit sind lysinreiche Regionen als alleiniges Erkennungsmerkmal von Substraten durch ClpB von *T. thermophilus* somit unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse lassen Zweifel an der Funktion von Poly-L-Lysin als Substratanalogon von ClpB zu. Eventuell ist Poly-L-Lysin kein Substratanalogon, sondern ein unspezifisches Stimulans der ATPase-Aktivität der zweiten AAA-Kassette. Da Poly-L-Lysin nicht das entscheidende Merkmal der Substraterkennung ist, müssen andere Faktoren die Spezifität der Bindung verursachen.

Ein mögliches Erkennungskriterium von Substraten durch ClpB sind Kontakte zum Peptidrückgrat, da die Carbonyl- und Aminogruppen normalerweise mit Wasserstoffbrückenbindungen im Innern des Proteins abgesättigt sind. Interaktionen mit hydrophoben Seitenketten könnten die Bindung zusätzlich stabilisieren. Dieses allgemeinere Erkennungsmerkmal würde eine Erkennung von unterschiedlichen Substratproteinen, wie sie in den Experimenten beobachtet wurde, erklären.

Dieses Bindungsmotiv ähnelt vermutlich jedoch nicht dem Bindungsmotiv des DnaK-Systems, weil sonst ein stärkerer Wettbewerb zwischen den Chaperonen um Substrate auftreten würde. Diese Konkurrenz wurde in den durchgeführten Messungen jedoch nicht beobachtet. Zudem muss ClpB in der Lage sein, zwischen nativen Proteinstrukturen und Aggregaten zu unterscheiden. Denn nur Aggregate werden gebunden und zurückgefaltet. Native Proteine haben auch keinen inhibierenden Effekt auf die Rückfaltung.

4.3 Funktion des C-Terminus

Die α -helikale Domäne der zweiten AAA-Kassette ist bei ClpB aus *E. coli* an der Nukleotidbindung, ATP-Hydrolyse und Oligomerisierung beteiligt (Barnett et al., 2000; Mogk et al., 2003). Bei HslU ist sie ebenfalls an Kontakten zwischen den Protomeren beteiligt und für die Oligomerisierung notwendig (Sousa et al., 2000).

Wurde diese Domäne bei ClpB aus *T. thermophilus* entfernt, war das Protein in allen getesteten Funktionen stark eingeschränkt (siehe Abschnitt 3.4). Die α -helikale Domäne scheint für die Oligomerisierung von ClpB notwendig zu sein. Ist die Oligomerisierung des Proteins eingeschränkt, werden auch die weiteren Funktionen (Nukleotidbindung, ATPase-Aktivität, Chaperonfunktion) von ClpB beeinträchtigt. Dies deutet auf eine ähnliche Funktion dieser Domäne von ClpB aus *E. coli* und *T. thermophilus* hin, obwohl sich die Eigenschaften der AAA-Kassetten zwischen diesen Proteinen deutlich unterscheiden.

Eine modulierende Wirkung der helikalen Domäne der zweiten AAA Domäne auf den Nukleotidzyklus von ClpB wird durch das Fragment ClpB1-845 unterstützt. Dieses um 9 Aminosäuren verkürzte Protein bindet Nukleotide um den Faktor 10 stärker als das Wildtypprotein (siehe Tab. 3.4.1). Den C-terminalen Aminosäuren wird aufgrund der bekannten Strukturen der AAA-Kassetten keine direkte Interaktion mit dem Nukleotid zugeschrieben (Lenzen et al., 1998; Sousa et al., 2000; Li und Sha, 2002; Guo et al., 2002). Eventuell wird durch das Abtrennen von 9 Aminosäuren die Orientierung der helikalen Domäne relativ zu der vorhergehenden Domäne der AAA-Kassette verändert und dadurch die Nukleotidbindung erleichtert. Die bekannten Kristallstrukturen zeigen diese Variabilität in der Position der Domänen zueinander. Durch das weitere Verkürzen der C-terminalen Domäne wird dann die Nukleotidbindung stark reduziert. Eventuell wird bei ClpB1-828 aufgrund der Deletion die Position der C-terminalen Domäne so verändert, dass die Bindestelle des Nukleotids beeinträchtigt wird. Wird die komplette Domäne entfernt, ist die Nukleotidbindung kaum detektierbar und die ATPase-Aktivität kaum messbar. Dies kann mit dem Fehlen der Aminosäuren der helikalen Domäne erklärt werden, die Kontakte zum Nukleotid ausbilden, wie zuvor auch bei ClpA gefunden wurde (Guo et al., 2002). Obwohl bei ClpB und ClpA aus *E. coli* sowie tendenziell auch bei ClpB aus *T. thermophilus* die erste AAA-Kassette wichtiger für die Oligomerisierung ist, liegt ClpB Δ C als Monomer vor (Abb. 3.4.2). In diesem Punkt gleicht ClpB aus *T. thermophilus* dem *E. coli* Protein. Dies zeigt erneut die Bedeutung beider AAA-Kassetten für die Oligomerisierung und ATPase-Aktivität von ClpB (Barnett et al., 2000; Schlee et al., 2001).

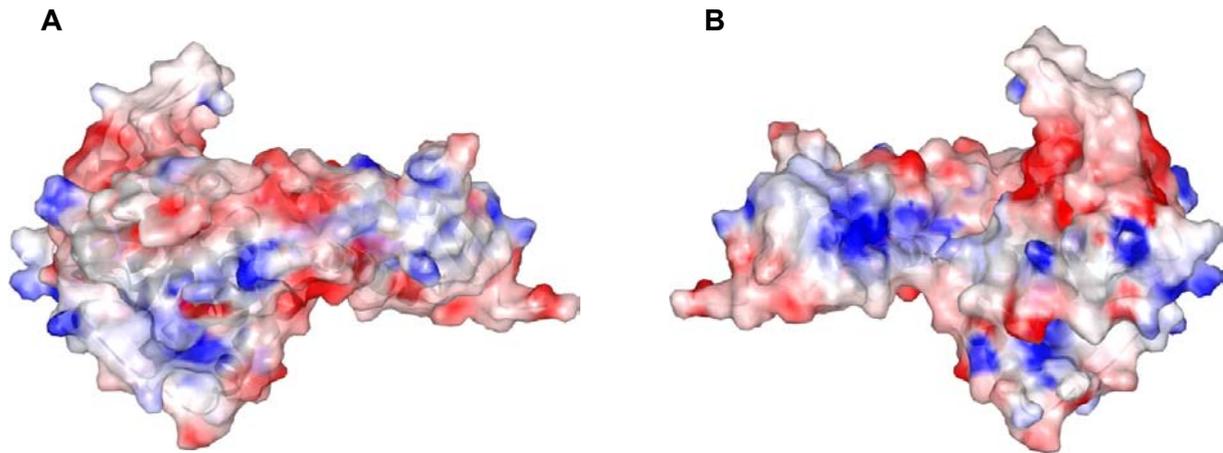


Abbildung 4.2 Struktur der zweiten AAA-Kassette von ClpB

Die Struktur der zweiten AAA-Kassette von ClpB (Aminosäuren 542-854) wurde mittels des Programms SWISS-Model und der Struktur von ClpA gemodelt. Das Oberflächenpotential wurde mittels des Programms GRASP berechnet. Negative Ladungen sind rot, positive Ladungen sind blau dargestellt. Die beiden Bilder geben die Seitenansicht wider und sind um 180° zueinander gedreht.

Bei ClpA und ClpX wurde eine Substratbindung an der helikalen Domäne der zweiten AAA-Kassette gezeigt. Bei Hsp104 konnte der Poly-L-Lysin bindende Bereich dort lokalisiert werden, woraus ebenfalls eine Substratbindestelle abgeleitet wurde (Smith et al., 1999; Cashikar et al., 2002). Bei ClpB ist die Substratbindestelle jedoch noch nicht eindeutig identifiziert worden.

Bei ClpB aus *T. thermophilus* kann die isolierte zweite AAA-Kassette mit Poly-L-Lysin stimuliert werden, jedoch erst mit höheren Konzentrationen als das Wildtypprotein. Daher liegt es nahe auch bei ClpB die helikale Domäne der zweiten AAA-Kassette als Poly-L-Lysin-Bindestelle anzunehmen. Anhand der bekannten Struktur von ClpA und aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen ClpB und ClpA wurde die Struktur der helikalen Domäne der zweiten AAA-Kassette berechnet (Guo et al., 2002). Dieses Modell ist in Abbildung 4.2 dargestellt. In der Abbildung ist ein kleiner, negativ geladener Bereich an der Proteinoberfläche erkennbar. Dieser Bereich liegt jedoch nicht ausschließlich in der helikalen Subdomäne der zweiten AAA-Kassette, sondern schließt die vorhergehende Domäne ein. Dieser Bereich könnte eventuell die Poly-L-Lysin Bindestelle sein.

Die relativ schwache negative Ladung und die geringe Ausdehnung dieses Bereichs könnte die im Vergleich zu Hsp104 (Faktor 14) schwächere Stimulierung von ClpB (Faktor 2.5) durch Poly-L-Lysin erklären (Cashikar et al., 2002). Eventuell müssen für eine optimale Bindung von Poly-L-Lysin Oligomere von ClpB gemeinsam eine negativ geladene Bindestelle formen. Dies wird durch die Notwendigkeit von höheren Poly-L-Lysin Konzentrationen für die Stimulierung des dimeren ClpB519-854 bestätigt. Dieses ClpB-Fragment kann mit Poly-L-Lysin stimuliert werden, obwohl es inaktiv in Rückfaltungsstudien ist und die ATPase-Aktivität nicht von Substraten stimuliert wird (Daten nicht gezeigt). Daher

haben Substrate und Poly-L-Lysin eventuell unterschiedliche Effekte auf die ATPase-Aktivität des Proteins.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen natürlichen Substraten und dem synthetischen Polypeptid Poly-L-Lysin sowie das Oberflächenpotential des Modells, kann bei ClpB aus *T. thermophilus* weder eine Substratbindestelle noch die Poly-L-Lysin-Bindestelle eindeutig im C-terminalen Bereich der zweiten AAA-Kassette identifiziert werden.

4.4. Effizienz der Rückfaltungsreaktion

Anhand von zwei Substratproteinen wurde die energetische Bilanz der Rückfaltungsreaktion des DnaK-ClpB-Systems bestimmt. Denaturierte α -Glucosidase und GPDH wurden durch das Chaperonnetzwerk aus DnaK-System und ClpB mit Ausbeuten zwischen 40 % und 70 % zurückgefaltet. Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Substratproteine die ATPase-Aktivität von ClpB und DnaK nur geringfügig stimulieren und diese Stimulation erst bei hohen Substratkonzentrationen auftritt. Die insgesamt geringe Stimulation der ATPase-Aktivität durch Substrate ist überraschend, weil die als Modellsubstrate von ClpB/Hsp104 etablierten Polypeptide Casein und Poly-L-Lysin die ATPase-Aktivität deutlich stimulieren (Motohashi et al., 1999; Barnett et al., 2000; Cashikar et al., 2002; Liu et al., 2002). Bei ClpB aus *T. thermophilus* wird die ATPase-Aktivität durch geringe Konzentrationen von Casein oder Poly-L-Lysin um den Faktor 2-3 gesteigert. Bei der maximal getesteten Substratkonzentration tritt jedoch nur eine geringe Stimulation von ca. 50 % auf. Dies zeigt erneut die Unterschiede zwischen physiologischen Substraten und Casein und Poly-L-Lysin.

Zudem tritt in den Ansätzen des DnaK-Systems mit ClpB und Substrat eine Stimulierung der ATPase-Aktivität ein, die größer ist als für die einzelnen Ansätze (nur das DnaK-System bzw. nur ClpB mit Substrat). Dies lässt auf eine Kostimulation von ClpB durch Substrat und DnaK schließen und könnte auf einen Komplex aus DnaK, ClpB und Substrat hinweisen.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die gemessene ATPase-Aktivität nicht von den Interaktionen mit Substraten reguliert wird. Es scheint vielmehr der Fall zu sein, dass ClpB ständig ATP hydrolysiert. Das Chaperon arbeitet somit permanent, auch in Abwesenheit von Substraten. Dies kann als „futile cycle“ bezeichnet werden. Eine Regulation des ATP-Verbrauchs würde dann nur über die Syntheserate des Proteins oder noch nicht identifizierte Regulatoren erfolgen. So nimmt die Biosynthese von ClpB aus *E. coli* nach einem Hitzeschock, wenn Proteinaggregate auftreten, stark zu (Squires et al., 1991). Bei ClpB aus *T. thermophilus* ist die vermehrte Biosynthese des Proteins unter Stressbedingungen jedoch noch nicht gezeigt worden.

Nach der derzeitigen Vorstellung wird die freiwerdende Energie der ATP-Hydrolyse für die Rückfaltung bzw. Disaggregation der Proteine eingesetzt, d.h. ClpB arbeitet aktiv am

Substrat (Goloubinoff et al., 1999; Ben Zvi und Goloubinoff, 2001). Für die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Chaperonfunktion gibt es zwei generelle Möglichkeiten (Hubbard und Sander, 1991). Bei dem „Plucking-Modell“ (Zupfen) bindet das Chaperon in der ATP-Form an das Substrat und nach der ATP-Hydrolyse wird das Substrat freigesetzt. Dieser Zyklus kann gegebenenfalls öfter wiederholt werden. Durch die Bindung soll jedes Mal ein Stück des Peptidrückgrats des Substrats gestreckt werden und dadurch die Rückfaltung ermöglicht werden. Der zweite Mechanismus wird als „threading“ (Entwinden) bezeichnet werden. Das Chaperon bindet an das Substrat und gleitet an der Polypeptidkette entlang, wodurch sie entfaltet wird. Die Energie der ATP-Hydrolyse könnte für das Strecken eines gewissen Abschnitts eingesetzt werden. Dieser Mechanismus ähnelt dem Mechanismus der Entfaltung von Substraten für ClpP durch ClpA und ist der wahrscheinlichere der beiden Mechanismen für die Funktion von ClpB (Weber-Ban et al., 1999; Singh et al., 1999; Hoskins et al., 2000).

Wird der ATP-Verbrauch des Chaperonsystems mit der Rückfaltungsausbeute in Korrelation gesetzt, zeigt sich, dass das DnaK-System in Kooperation mit ClpB ein effizientes Chaperonsystem ist. Der Energieverbrauch pro rückgefalteter Aminosäure sinkt von über 100 Molekülen ATP bei niedrigen Substratkonzentrationen auf wenige Moleküle bei hohen Konzentrationen ab. Hohe Substratkonzentrationen nutzen das Chaperonsystem somit voll aus. Bei 6.4 μM α -Glucosidase bzw. 6.0 μM GPDH werden pro rückgefalteter Aminosäure nur noch 2-3 Moleküle ATP verbraucht. Dieser Energieverbrauch liegt deutlich unter dem Energiebedarf für die Neusynthese des Proteins, der bei 10 energiereichen Phosphatbindungen pro Aminosäure liegt. Dieser Wert zeigt, dass das Chaperonnetzwerk auch *in vitro* effektiv arbeiten kann. Durch die Disaggregationswirkung von ClpB mit DnaK werden somit nicht nur potentiell zytotoxische Proteinaggregate entfernt, sondern die Rückfaltung ist auch energetisch sinnvoll im Vergleich zum Abbau der Aggregate durch Proteasen und der Neusynthese des Proteins.

Eine solche Energiebilanz der Chaperonfunktion wurde zuvor nur für GroEL durchgeführt. Bei diesem Chaperon wurde ebenfalls nur eine geringe Beeinflussung der ATP-Hydrolyserate durch Substrate beobachtet. Für die Faltung eines Protomers von Rhodanese bzw. Rubisco wurden ca. 100-130 Moleküle ATP hydrolysiert (Martin et al., 1991; Azem et al., 1995). Dieser Wert entspricht einem Verbrauch von weniger als 0.5 Molekülen ATP pro rückgefalteter Aminosäure. Wie ClpB hydrolysiert GroEL auch in Abwesenheit von Substraten ATP. Eine beobachtete Stimulierung der ATPase-Aktivität von GroEL durch Substrate konnte auf die Anwesenheit von GdnHCl, das zur Denaturierung des Substrats eingesetzt wurde, zurückgeführt werden (Todd und Lorimer, 1995). Bei GroEL ist somit der Faltungsprozess mit dem ATPase-Zyklus gekoppelt, die Faltungsreaktion stimuliert die ATPase-Aktivität allerdings nicht. Der ATPase-Zyklus von GroEL wurde daher ebenfalls als

„futile cycle“ bezeichnet (Martin et al., 1993; Todd et al., 1994). Die ATPase-Aktivität dient bei der Faltungsreaktion durch GroEL als Zeitgeber, der die Dauer der Faltung des Substrats im „Anfinsen-Käfig“ bestimmt. Nach Hydrolyse wird das Substrat wieder aus der Faltungskammer freigesetzt. Es bedarf somit eines Kompromisses zwischen der ausreichenden Zeit für die Faltung des Substrats und möglichst geringem ATP-Verbrauch. Bei GroEL muss berücksichtigt werden, dass bis zu 20 % der neusynthetisierten Proteine in *E. coli* Substrate für dieses Chaperon sind (Bukau et al., 2000). Daher sind ständig Substrate für GroEL verfügbar. Ein eventueller, unproduktiver Zyklus von GroEL ohne Substrat, der ebenfalls ATP verbraucht wird für die ständige Bereitschaft des Chaperons hingenommen. Dieses gilt vermutlich auch für ClpB. Die ATP-Hydrolyse ohne gebundene Substrate wird hingenommen, damit bei einem Hitzeschock sofort Aggregate reaktiviert werden können.

4.5 Funktion des N-Terminus von ClpB

Die Funktion des N-Terminus von ClpB wurde in dieser Arbeit ausführlich untersucht. ClpB Δ N und ClpB^N konnten exprimiert und aufgereinigt werden. Die Faltung von ClpB Δ N wurde durch die N-terminale Verkürzung nicht negativ beeinflusst und die isolierte N-Domäne erreichte ebenfalls ihre native Struktur, war stabil gefaltet und gut löslich. Diese Stabilität spricht bereits für eine eher schwache Interaktion der Proteine miteinander. Eine Interaktion der N-Domäne mit ClpB Δ N von ClpB aus *T. thermophilus* konnte nicht experimentell bestätigt werden. Eine nur schwache Interaktion der N-Domäne mit dem verkürzten Protein wurde zuvor auch für ClpA von *E. coli* publiziert (Lo et al., 2001).

Die N-terminale Verkürzung von ClpB hatte nur einen geringen Effekt auf die Oligomerisierung. ClpB Δ N konnte noch Hexamere bilden und zeigte dasselbe Verhalten wie das Wildtypprotein bei Nukleotidzugabe bzw. wechselnden Ionenstärken des Puffers. Dies zeigt, dass die N-Domäne nicht an intermolekularen Wechselwirkungen im Hexamer von ClpB beteiligt ist, die wichtig für die Oligomerisierung sind. Dies kann mit einer Position an der Außenseite des Hexamers erklärt werden. Diese postulierte Position konnte später durch die Kristallstruktur von ClpA für die N-Domäne dieses Proteins bestätigt werden (Guo et al., 2002). Die Abbildung 4.3A zeigt die Position der N-terminalen Domäne an der Außenseite des ClpA-Hexamers. Die unveränderten Hill-Koeffizienten der ATPase-Aktivität von ClpB Δ N im Vergleich zu ClpB bestätigen die Nichtbeteiligung an intermolekularen Kontakten, die die Allosterie des Proteins beeinflussen. ClpB Δ N besitzt allerdings eine höhere basale ATPase-Aktivität als das Wildtypprotein. Die ATPase-Aktivität von ClpB Δ N wird von Casein jedoch schwächer stimuliert, als die niedrigere basale ATPase-Aktivität des Wildtypproteins.

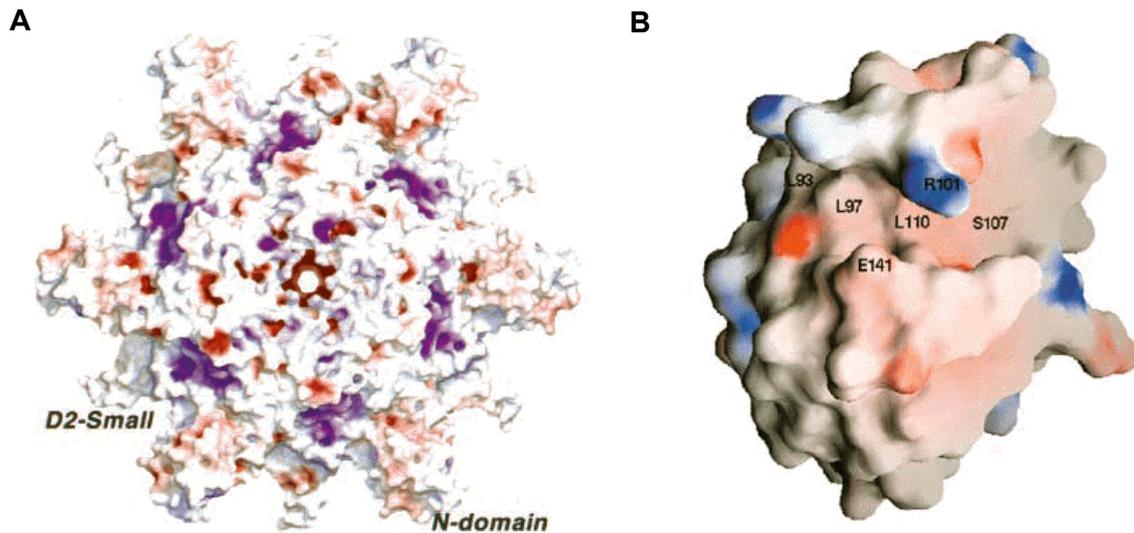


Abbildung 4.3 Position und Oberflächenpotential der N-Domäne

A Position der N-Domäne von ClpA aus *E. coli*

Gezeigt ist das hexamere Modell von ClpA. Der Blick geht entlang der hexagonalen Achse auf die erste AAA-Kassette. Gut zu erkennen ist die Position der N-Domäne an der Außenseite des Moleküls. Die Abbildung wurde entnommen (Guo et al., 2002).

B Oberflächenpotential der N-Domäne von ClpB aus *E. coli*

Dargestellt ist die Oberfläche der N-terminalen Domäne mit dem Oberflächenpotential. Zu erkennen ist ein kleiner hydrophober Bereich an der Proteinoberfläche, der von Leucinseitenketten gebildet wird. Die Abbildung wurde entnommen aus (Li und Sha, 2003).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Bindung von Casein durch die N-terminale Domäne vermittelt. Dies wird durch Experimente bestätigt, die zeigen, dass Punktmutationen in der N-Domäne von ClpB aus *E. coli* die Bindung von Casein, nicht aber die Bindung von Luciferase und die Stimulierung der ATPase-Aktivität durch Poly-L-Lysin beeinflussen (Liu et al., 2002). In der kürzlich publizierten Struktur der N-terminalen Domäne von ClpB aus *E. coli* ist ein kleiner hydrophober Bereich zu erkennen, der für die Interaktion mit Substraten verantwortlich sein soll (Li und Sha, 2003). Die Struktur der N-Domäne ist in Abbildung 4.3B dargestellt.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese reduzierte Stimulation durch Casein mit einer schwächeren Bindung von Casein an ClpB Δ N einhergeht und es sich nicht um einen Defekt in der Kopplung von Bindung und Stimulierung der ATPase-Aktivität handelt. Die noch mögliche Stimulierung durch Poly-L-Lysin belegt, dass auch das verkürzte Protein noch eine stimulierbare ATPase-Aktivität besitzt. Zusammengenommen spricht das dafür, dass es mindestens zwei Bindestellen für Stimulantien bzw. für Substrate an der Proteinoberfläche gibt. Eine dieser Bindestellen befindet sich am N-Terminus des Proteins und interagiert mit Casein. Dies ist jedoch nicht die Bindestelle für Poly-L-Lysin und für physiologische Substrate, da die N-terminale Verkürzung nur geringen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der ATPase-Aktivität durch Poly-L-Lysin und die Chaperonaktivität des

Proteins *in vitro* hatte. Alle getesteten Substrate konnten noch reaktiviert werden, teilweise jedoch mit etwas geringerer Ausbeute. Die N-terminale Domäne von ClpB ist somit nicht essentiell für die Chaperonaktivität.

Dies bestätigt auch die Ergebnisse, die eine *in vivo* Funktionalität des N-terminal verkürzten ClpBs in Cyanobakterien zeigten (Eriksson und Clarke, 2000). Bei ClpB aus *E. coli* gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Eine Inaktivität von ClpB Δ N wurde aufgrund eines Luciferaseassay *in vitro* berichtet (Barnett et al., 2000). Eine aktuellere Publikation zeigt jedoch die Funktionalität des N-terminal verkürzten Proteins *in vivo* und *in vitro* und bestätigt somit die Ergebnisse dieser Arbeit (Mogk et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne nicht die Hauptbindestelle für Substrate ist. Die Verbindung zwischen N-Domäne und dem Rest des Proteins ist in der Kristallstruktur von ClpA nicht aufgelöst. Dies spricht für eine mögliche Bewegung der N-Domäne mittels dieses Verbindungsstücks. Eventuell assistiert die N-Domäne bei der Bindung einer besonderen Gruppe der Substrate und nur diese Untergruppe der Substrate benötigt die zusätzliche Bindestelle am N-Terminus für die Rückfaltung. Damit würden die geringeren Ausbeuten der Rückfaltungsreaktion von hitzedenaturierten Substraten durch ClpB Δ N erklärt werden. Die Untergruppe von Substraten entsteht jedoch nicht bei der Harnstoffdenaturierung von Luciferase, wie die volle Aktivität von ClpB Δ N in diesem Assay zeigt.

Bei ClpA aus *E. coli* wurde eine Interaktion der N-terminalen Domäne mit dem Adaptorprotein ClpS gezeigt und die Struktur des Komplexes aus N-Domäne und ClpS gelöst (Dougan et al., 2002; Zeth et al., 2002). ClpS moduliert die Substratauswahl von ClpA und bewirkt die bevorzugte Auswahl von Proteinaggregaten als Substrate für den Abbau durch ClpP. Daher könnte auch die N-Domäne von ClpB mit einem noch nicht identifizierten Adaptorprotein interagieren, das die Substratauswahl beeinflusst.

Insgesamt wird durch diese Ergebnisse klar, dass es deutliche Unterschiede in der Interaktion von ClpB zwischen den bisher verwendeten Modellsubstraten Casein und Poly-L-Lysin und physiologischen Substraten gibt. Daher sind Vergleiche zwischen ClpB-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen, die sich auf Interaktionen mit Casein und Poly-L-Lysin mit basieren, schwierig, so lange nicht die Relevanz durch Messungen mit physiologischen Substraten bestätigt worden sind.

4.6 Position und Funktion der Linkerdomäne

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen neue Rückschlüsse über die Position und Funktion der Linkerdomäne zwischen den beiden AAA-Kassetten von ClpB zu. Die Expression und Aufreinigung zeigte, dass die Linkerdomäne isoliert die native Struktur einnehmen kann und ein stark α -helikales Signal im CD-Spektrum aufwies. Wird die Linkerregion aus ClpB entfernt, ist das Protein (ClpB Δ L) ebenfalls noch exprimierbar und stabil gefaltet. Diese Ergebnisse deuten bereits auf eine Position der Domäne am Außenbereich des Proteins bzw. des ClpB-Hexamers hin. Anhand der bekannten Struktur von ClpA ist zudem erkennbar, dass im Innern des hexameren Rings aus ClpA Molekülen vermutlich kein ausreichender Platz für die zusätzlicher Domäne wäre (Guo et al., 2002). Die Position im Innern des Proteins widerspricht zudem der guten Löslichkeit der isolierten Linkerregion. Eine nach Außen gerichtete Position, wie hier für die Linkerregion von ClpB diskutiert, hat die I-Domäne, eine Insertion in die AAA-Kassette von HslU, in der Kristallstruktur inne (Bochtler et al., 2000).

Da ein Überschuss der Linkerregion keinen Einfluss auf die Rückfaltungsausbeuten hatte, ist die Linkerregion von ClpB jedoch vermutlich nicht die Substratbindestelle. Durch eine Konkurrenz um Substrate sollte ansonsten die Rückfaltungsausbeute abnehmen. Für die Inaktivität von ClpB Δ L in den Rückfaltungsassays muss es daher eine andere Erklärung geben.

Obwohl die Oligomerisierung des Proteins eingeschränkt war, war die ATPase-Aktivität von ClpB Δ L höher als die des Wildtypproteins und wurde bei niedrigeren ATP-Konzentrationen erreicht. ClpB Δ L aus *E. coli* hat ebenfalls eine starke ATPase-Aktivität und das Protein war aber ebenfalls inaktiv in den Aktivitätsassays. Die Oligomerisierung war jedoch nur geringfügig reduziert (Mogk et al., 2003). Die ähnlichen Ergebnisse bei den ClpB-Proteinen aus *E. coli* und *T. thermophilus* deuten auf eine konservierte Funktion der Linkerregion hin.

Die hohe ATPase-Aktivität von ClpB Δ L kann damit erklärt werden, dass durch das Entfernen der Linkerdomäne die ATPase-Aktivitäten der beiden AAA-Kassetten entkoppelt wurden und eine vorherige Regulation aufgehoben wurde. Dies wird besonders durch die hohe „single turnover“ ATPase-Aktivität deutlich. Dies spricht für eine Interaktion der Linkerregion auch mit der zweiten AAA-Kassette und eine wichtige Funktion in der Regulation des ATPase-Zyklus von ClpB.

Anhand von Sequenzvergleichen und Sekundärstrukturvorhersagen wurde eine Insertion des Linkers im C-terminalen Bereich der ersten AAA-Kassette von Hsp104 postuliert. Diese Insertion wurde zudem für ClpB aus *E. coli* kürzlich nachgewiesen (Cashikar et al., 2002; Mogk et al., 2003). Anhand eines Vergleichs der Sequenz von ClpB aus *T. thermophilus* mit der ClpA Sequenz ist eine Insertion der Linkerregion in die erste AAA-Kassette von ClpB wahrscheinlich, die kurz vor bzw. mit Beginn der zweiten AAA-Kassette aufhört. Dies wird

durch die ClpA Struktur unterstützt. Die Insertionsstelle befindet sich in einem Loop an der Außenseite des ClpA-Moleküls (Guo et al., 2002).

Diese Position der Linkerdomäne kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit für ClpB aus *T. thermophilus* durch biochemische Daten unterstützt werden. So beeinflusst die inserierte Linkerregion die Eigenschaften der ersten AAA-Kassette von ClpB. Durch die Linkerregion wird die erste AAA-Kassette stabilisiert und kann dimerisieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wird der Linker mit der ersten AAA-Kassette zu einer funktionellen Einheit zusammengefasst. Eine mögliche Position der Linkerregion von ClpB ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

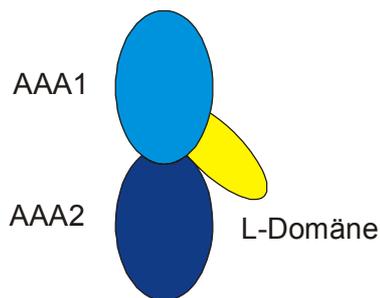


Abbildung 4.4 Position der Linkerdomäne

Die Domänenorganisation von ClpB ist schematisch dargestellt. Gezeigt sind die zwei AAA-Kassetten und der Linker. Der Linker (gelb) an der Außenseite des Proteins ist in die erste AAA-Kassette (cyan) inseriert und kontaktiert die AAA-Kassette 2 (blau). Die N-Domäne von ClpB ist nicht abgebildet.

Die Abbildung zeigt die Position des Linkers an der Außenseite von ClpB, somit ist die Oligomerisierung, ohne diese Domäne zwar eingeschränkt, aber noch möglich. Die Domäne ist in die erste AAA-Kassette inseriert, kontaktiert jedoch auch die zweite AAA-Kassette.

Diese, durch die Linkerregion vermittelte, Interaktion scheint zudem für die Regulation der ATPase-Aktivität und die Chaperonfunktion notwendig zu sein, da ClpB Δ L inaktive Rückfaltungsforschung war, aber eine hohe ATPase-Aktivität hatte. Eventuell ist die Linkerdomäne an der Kopplung der ATP-Hydrolyse mit der Disaggregation der Aggregate beteiligt.

4.7 Funktionen und Interaktion der AAA-Kassetten

Im Abschnitt 3.5.3 des Ergebnisteils wurden die Interaktionen zwischen der Linkerdomäne und den zwei AAA-Kassetten genauer bestimmt. Durch funktionelle Zusammenlegung der ersten AAA-Kassette und der Linkerregion zu einer sehr großen AAA-Kassette wurde ClpB in zwei Einheiten geteilt: In die erste AAA-Kassette mit dem Linker (Aminosäure 141-519) und in die zweite AAA-Kassette (Aminosäuren 519-854).

4.7.1 Funktionen der AAA-Kassetten

Die zwei so definierten AAA-Kassetten wiesen sehr unterschiedliche biochemische Eigenschaften auf, obwohl beide ClpB-Fragmente noch dimerisieren konnten. Diese Dimerisierung der einzelnen AAA-Kassetten wurde auch für ClpB aus *E. coli* berichtet (Mogk et al., 2003). Die AAA-Kassetten zeigten jedoch verschiedene ATP-Hydrolyseraten:

ClpB₁₄₁₋₅₁₉ hatte nur eine geringe „single turnover“ ATPase-Aktivität, die Steady State ATPase-Aktivität des Proteins war ebenfalls sehr gering.

ClpB₅₁₉₋₈₅₄ besaß eine hohe ATPase-Aktivität. Die Rate der „single turnover“ ATPase-Aktivität war mit $7-8 \text{ min}^{-1}$ um den Faktor 250 höher als die Aktivität des Wildtypproteins bzw. von ClpB Δ N. Die maximale ATPase-Geschwindigkeit unter Steady State Bedingungen von ClpB₅₁₉₋₈₅₄ liegt mit einem Wert von 6.8 min^{-1} ebenfalls in diesem Bereich und gleicht der maximalen ATPase-Aktivität des stimulierten ClpB-Hexamers von 6.2 min^{-1} .

Es gibt somit zwei funktionell grundlegend unterschiedliche AAA-Kassetten in ClpB aus *T. thermophilus*: eine katalytisch sehr aktive AAA-Kassette und eine inaktive AAA-Kassette.

Die erste AAA-Kassette mit dem inserierten Linker ist inaktiv, die zweite AAA-Kassette von ClpB ist die katalytisch aktivere Domäne. Diese funktionellen Unterschiede zwischen den AAA-Kassetten wurden nicht bei ClpB aus *E. coli* beschrieben. Dort sind beide isolierte AAA-Kassetten inaktiv in Untersuchungen zur ATPase-Aktivität (Mogk et al., 2003).

Deutliche Unterschiede in der ATPase-Aktivität der AAA-Kassetten aus einem Protein wurden zuvor von anderen AAA-Proteinen berichtet. Bei NSF ist eine AAA-Kassette (D2) für die Oligomerisierung ausreichend, besitzt allerdings nur eine schwache ATPase-Aktivität. Die andere AAA-Kassette von NSF ist nach der Oligomerisierung des Proteins für die enzymatische Funktion wichtiger (Whiteheart et al., 1994).

Bei ClpA ist wurden ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung der AAA-Kassette des vollständigen Proteins berichtet. Die erste AAA-Kassette für die Oligomerisierung wichtig, die zweite AAA Kassette besitzt eine stärkere ATPase-Aktivität (Seol et al., 1995).

Bei Hsp104 aus *S. cerevisiae* wurden die Eigenschaften der beiden nukleotidbindenden Bereiche des vollständigen Proteins als zum einen niedrigaffin, aber mit hohem ATP-Umsatz, und zum anderen als hochaffin mit niedrigem ATP-Umsatz charakterisiert, wobei die zweite AAA-Kassette wichtiger für die Oligomerisierung war (Schirmer et al., 1998).

Bei ClpB ist diese unterschiedliche Aktivität der isolierten AAA-Kassetten jedoch unerwartet. In „single turnover“ Messungen besitzt ClpB eine relativ geringe ATPase-Aktivität und die Inaktivierung einer AAA-Kassette durch Punktmutationen hat nur geringen Einfluss auf die „single turnover“ ATPase-Aktivität. Für die, im Vergleich dazu, relativ hohe Steady State ATPase-Aktivität von ClpB wurde eine gegenseitige allosterische Aktivierung der AAA-Kassetten des Wildtypproteins angenommen. Dies wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die ATPase-Aktivität von ClpB-Mutanten, bei denen eine AAA-Kassette durch Punktmutationen inaktiviert wurde, in Steady State Messungen stark reduziert war (Schlee et al., 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass für eine hohe ATPase-Aktivität nicht notwendigerweise eine allosterische Aktivierung der AAA-Kassetten erforderlich ist. Die isolierte zweite AAA-Kassette ist an sich sehr aktiv und erreicht die ATPase-Aktivität des Wildtypproteins.

Die Unterschiede in der Funktion und der Aktivität der beiden AAA-Kassetten von AAA-Proteinen aus verschiedenen Organismen verdeutlichen die große Variabilität des AAA-Moduls. Diese Vielfalt könnte eine Erklärung für das häufige Auftreten von AAA-Kassetten sein.

4.7.2 Interaktion der AAA-Kassetten

Anhand der Gelfiltrationsanalysen konnte gezeigt werden, dass es zu einer stabilen Komplexbildung aus den getrennt voneinander exprimierten AAA-Kassetten kommt. Diese Komplexbildung war unabhängig vom gebundenen Nukleotid (ADP bzw. ATP). Unter den getesteten Bedingungen wurde keine Dissoziation des Proteinkomplexes in die zwei AAA-Kassetten beobachtet. Dies deutet auf einen sehr stabilen Komplex hin, der zu keinem Zeitpunkt des ATPase-Zyklus aufgelöst wird. Die einzelnen AAA-Kassetten bilden keine hexameren Strukturen aus, sondern können nur dimerisieren. Der Proteinkomplex aus beiden AAA-Kassetten kann jedoch Oligomerisieren und bei ATP und geringer Ionenstärke Hexamere ausbilden. Der Komplex besitzt somit ein ähnliches Oligomerisierungspotential wie das Referenzprotein ClpB Δ N. Bei ADP und Hochsalzbedingungen ist zudem ein Proteinpeak zu erkennen, der ein Monomer des Komplexes darstellt. Die Oligomerisierung und Assemblierung erfolgt somit nicht über zwei hexamere Ringe der einzelnen AAA-Kassetten, die dann den Doppelring von ClpB ausbilden, sondern über ein Monomer des Proteinkomplexes. Dieses Monomer kann dann oligomerisieren. Dieser Ablauf der Oligomerisierung von ClpB ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

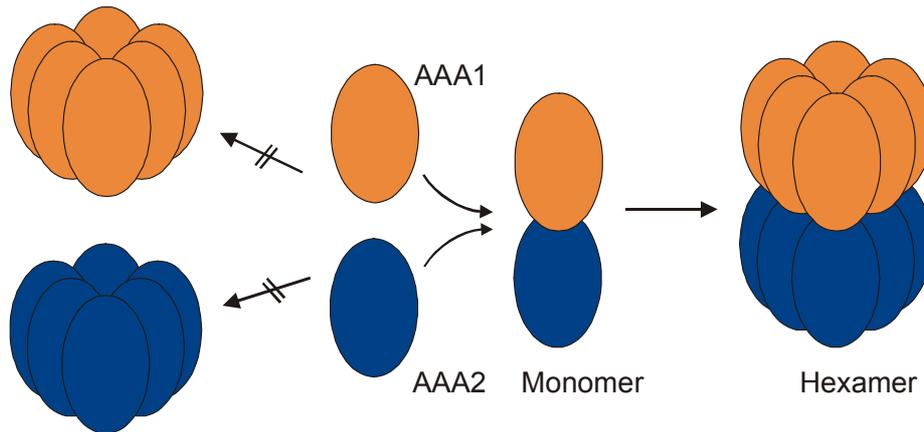


Abbildung 4.5 Oligomerisierung des Proteinkomplexes

Die beiden AAA-Kassetten von ClpB sind schematisch dargestellt. Beide Proteine können isoliert nicht stabil oligomerisieren. Erst der Proteinkomplex aus den AAA-Kassetten kann oligomerisieren. Die Oligomerisierung verläuft über ein Monomer dieses Proteinkomplexes. Die N-Domäne, die keinen Einfluss auf die Oligomerisierung hat, ist nicht dargestellt.

Die ATPase-Aktivität des Komplexes aus ClpB141-519 und ClpB519-854 unterscheidet sich deutlich von den ATPase-Aktivitäten der Einzelkomponenten. Im Vergleich zur Summe der Einzelkomponenten ist die ATP-Hydrolyse unter „single turnover“ Bedingungen reduziert. Die hohe ATPase-Aktivität von ClpB519-854 wird im Komplex nicht beobachtet, es kommt zu einer Reduzierung der ATPase-Geschwindigkeit um den Faktor 300. Eine ähnliche Tendenz ist auch bei den Messungen der Steady State ATPase-Aktivität auszumachen. ClpB141-519 ist hier fast inaktiv und ClpB519-854 zeigt eine starke ATPase-Aktivität. Der Komplex kann noch effektiv ATP hydrolysieren, die Aktivität liegt jedoch erneut zwischen den Aktivitäten der Einzelkomponenten. In Vergleich zu ClpB519-854 bzw. ClpB Δ N ist der Komplex bei niedrigen ATP-Konzentrationen weniger aktiv, erreicht bei hohen ATP-Konzentrationen jedoch fast die Aktivität der Referenzproteine. Zudem zeigt sich eine Veränderung der Allosterie durch die Komplexbildung, wie die unterschiedlichen Hill-Koeffizienten belegen. Die Kopplung der aktiven Zentren des Proteinkomplexes ist weniger stark ausgeprägt als bei ClpB519-854 oder bei ClpB Δ N. Die Veränderung im Vergleich zu ClpB Δ N lassen sich durch das Auflösen der kovalenten Verknüpfung zwischen den AAA-Kassetten erklären. Das allosterische Signal wird zwar noch weiter geleitet, allerdings ist die Kopplung vermindert. Da sich die bestimmten Affinitäten für Nukleotide zwischen ClpB519-854 und ClpB bzw. ClpB Δ N kaum unterscheiden, kann die verminderte ATPase-Aktivität des Komplexes im Vergleich zu ClpB519-854 durch eine Inhibierung der ATPase-Aktivität der zweiten AAA-Kassette durch die erste AAA-Kassette erklärt werden. Damit besitzt ClpB eine katalytisch aktive und eine regulative AAA-Kassette. Die Aktivierung der ATPase-Aktivität bei höheren ATP-Konzentrationen kann damit erklärt werden, dass erst bei diesen hohen

Konzentrationen auch die erste AAA-Kassette Nukleotide bindet und gegebenenfalls hydrolysiert. Somit würde der Nukleotidstatus der ersten AAA-Kassette die ATPase-Aktivität der zweiten AAA-Kassette kontrollieren. Warum für die Chaperonfunktion von ClpB die ATPase-Aktivität der zweiten AAA-Kassette reguliert werden muss, ist nicht bekannt. Eventuell ist die langsame ATP-Hydrolyse an der ersten AAA-Kassette der Zeitgeber für eine schnelle ATP-Hydrolyse an der zweiten AAA-Kassette, die dann mit der Chaperonfunktion verknüpft ist.

Für diese Regulation und Inhibierung sind sowohl die erste AAA-Kassette bis zur Insertionsstelle, als auch der inserierte Linker essentiell. Fehlt ein Teil von den zwei notwendigen Proteinfragmenten ist die Regulation vermindert. So unterscheidet sich die hohe ATPase-Aktivität von ClpB Δ L deutlich von der ATPase-Aktivität des Proteinkomplexes aus den zwei AAA-Kassetten und von der ATPase-Aktivität von ClpB und gleicht der enthemmten ATPase-Aktivität von ClpB519-854. Die ATPase-Aktivität von ClpB394-854 ist trotz des Linkers im Vergleich zu ClpB519-854 jedoch unverändert. Diese Ergebnisse belegen, dass die Inhibierung nur auftritt, wenn das Fragment der ersten AAA-Kassette bis zur Insertion und die inserierte Linkerregion vorhanden sind.

Bei diesen Ergebnissen muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich durch die Hexamerbildung von ClpB die Anzahl der möglichen Interaktionen erhöht. Die Interaktionen zwischen den AAA-Kassetten beschränken sich nicht notwendigerweise auf ein Protomer innerhalb des Hexamers.

Die nukleotidabhängige Inhibierung der zweiten AAA-Kassette erklärt auch die Beobachtung, dass bei einer Mutation in dem P-Loop der ersten AAA-Kassette (K204Q) die ATPase-Aktivität des Proteins unter Steady State Bedingungen stark reduziert wird (Schlee et al., 2001). Durch die reduzierte Nukleotidbindung und Hydrolyse der ersten AAA-Kassette kann der Interaktionszyklus, der die Inhibierung der zweiten AAA-Kassette aufhebt, nicht wie im Wildtypprotein ablaufen.

Der gebildete Komplex aus ClpB141-519 und ClpB19-854 hatte zudem Chaperonaktivität bei allen getesteten Substraten. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Funktionalität von ClpB die kovalente Verknüpfung der AAA-Kassetten nicht notwendig ist. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Assoziation eines AAA+-Proteins aus zwei AAA-Kassetten gezeigt. Diese Komplexbildung, die einhergeht mit der Funktionalität, deutet auf eine Genfusion als Ursache für die Entstehung des ClpB-Gens hin. Die Gene zweier AAA-Kassetten mit unterschiedlichen Eigenschaften fusionierten und bildeten das ClpB-Gen.

4.8 Ausblick

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zusätzliche Substratproteine für ClpB etabliert und Aktivitätsassays für das Chaperonsystem ausgearbeitet. Die Verwendung von Substraten aus *B. stearothermophilus* erlaubte Reaktionen im physiologischen Temperaturbereich von *T. thermophilus* mit hitzedenaturierten Substraten, die den natürlichen Substraten des thermophilen Chaperonsystems nahe kommen. Da die verwendeten Substrate mit ähnlichen Ausbeuten durch die Chaperone zurückgefaltet wurden, muss es gemeinsame Erkennungsmerkmale der Proteinaggregate geben. Die Interaktion von ClpB mit Aggregaten sollte daher noch genauer charakterisiert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proteinaggregaten sollten helfen die Struktur der Substrate zu untersuchen und gegebenenfalls gemeinsame Strukturen z.B. amyloide Fibrillen zu erkennen. Eine direkte Interaktion von ClpB mit Aggregaten könnte ebenfalls durch elektronenmikroskopische Techniken gezeigt werden.

Da das Arbeiten mit Proteinaggregaten aufgrund der Größe und der schlechten Löslichkeit schwierig ist, sollten zusätzlich neue Modellsubstrate für die biochemische Charakterisierung von ClpB identifiziert werden. Diese sollten jedoch, im Gegensatz zu den bisher eingesetzten Modellsubstraten Casein und Poly-L-Lysin, den natürlichen Substraten gleichen.

Die N-terminale Domäne war nicht essentiell für Chaperonfunktion von ClpB aus *T. thermophilus* und interagiert nur mit einer Untergruppe von Substraten. Die N-Domäne könnte eine regulative Funktion für die ATPase-Aktivität von ClpB besitzen oder mit einem potentiellen Regulatorprotein interagieren, wie es bei ClpA aus *E. coli* der Fall ist. Durch biochemische Untersuchungen z.B. *Yeast Two Hybrid Assays* könnte daher ein potentielles Regulatorprotein von ClpB identifiziert werden.

Die hohe Effizienz der Rückfaltungsreaktion durch das DnaK-ClpB-System zeigt, dass die Energie der ATP-Hydrolyse sehr effektiv für die Chaperonfunktion eingesetzt wird. Wie die ATP-Hydrolyse mit der Rückfaltung gekoppelt ist, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden. Die postulierte Disaggregation von Aggregaten durch ClpB konnte zudem nur indirekt gezeigt werden.

Eventuell helfen hier Messungen mit ClpB weiter, die Veränderungen des Abstands zwischen ClpB-Domänen durch die ATP-Hydrolyse des Proteins anzuzeigen. Dieses „Domänenrearrangement“ wäre dann die Voraussetzung für die Arbeit von ClpB an Substraten. Diese Abstandsveränderungen könnten durch Fluoreszenzmessungen mit zwei spezifischen Fluoreszenzmarkierungen untersucht werden (FRET-Messungen). Dieser Versuchsaufbau könnte auch eine mögliche Veränderung der Position der Linkerregion während des ATP-Hydrolysezyklus detektieren.

Die Substratbindestelle von ClpB konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Nur eine Untergruppe der Substrate interagiert mit der N-terminalen Domäne von ClpB, so dass

dieser Bereich nicht die Hauptsubstratbindestelle ist. Da auch die isolierte Linkerregion nur einen geringen Effekt auf die Rückfaltungsreaktion von ClpB hatte, ist auch diese Domäne vermutlich nicht die Substratbindestelle. Vielleicht sind ClpB-Hexamere für die funktionelle Interaktion mit Substraten notwendig und die Substratbindestelle wird von mehreren ClpB-Protomeren gebildet. Eine Möglichkeit der Identifizierung der Bindestelle könnte in Crosslinking-Experimenten liegen. Ein spezifischer, an einer ClpB-Domäne angebrachter, Crosslinker könnte den instabilen ClpB-Substrat-Komplex quervernetzen und somit eine Identifizierung ermöglichen.

Die Charakterisierung der beiden AAA-Kassetten von ClpB zeigte, dass sich die Eigenschaften der isolierten AAA-Kassetten grundlegend unterscheiden. Durch die Komplexbildung kommt es zu einer Inhibierung der zweiten AAA-Kassette durch die erste AAA-Kassette. Es ist jedoch unklar, wie diese Regulation der ATPase-Aktivität mit der beobachteten Funktionalität des Proteinkomplexes verknüpft ist. Hier könnten weitere kinetische Untersuchungen neue Einsichten in die komplexe Interaktionen der AAA-Kassetten bringen. Ein Verständnis der Interaktionen der einzelnen Domänen von ClpB kann helfen den Mechanismus der Chaperonfunktion noch besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur und Funktion des molekularen Chaperons ClpB aus *T. thermophilus* untersucht. ClpB reaktiviert zuvor aggregierte Proteine in Kooperation mit dem DnaK-System.

Durch die Etablierung neuer Substratproteine und die Entwicklung von Aktivitätsassays konnte eine breite Substratspezifität von ClpB *in vitro* gezeigt werden. Die hohen Rückfaltungsausbeuten ermöglichten zudem eine Quantifizierung der Aktivität verschiedener ClpB-Fragmente.

Die Analyse des ATP-Verbrauchs der Chaperone während der Rückfaltung zeigte, dass durch physiologische Substrate die ATPase-Aktivität von ClpB und DnaK nur geringfügig stimuliert wird, im Gegensatz zu den bisher eingesetzten Modellsubstraten Casein und Poly-L-Lysin. ClpB hydrolysiert somit permanent ATP mit fast gleich bleibender Geschwindigkeit. Wird der ATP-Verbrauch für die Rückfaltungsreaktion in Korrelation mit der Menge des rückgefalteten Proteins gesetzt, zeigt sich dass ClpB ein effizientes Chaperon ist. Der Verbrauch von ca. 2 Molekülen ATP pro rückgefalteter Aminosäure liegt deutlich unterhalb der Energie, die für eine Neusynthese benötigt wird.

Die Funktion der N-terminalen Domäne von ClpB wurde eingehend untersucht. Die N-terminale Verkürzung beeinflusst nicht die Stabilität von ClpB. Die N-Domäne ist nicht notwendig für die Oligomerisierung, ATPase-Aktivität und Chaperonfunktion von ClpB. Der N-Terminus ist wichtig für die Caseinbindung von ClpB und hat eventuell einen regulativen Einfluss auf die ATPase-Aktivität des Proteins.

Die helikale Domäne der zweiten AAA-Kassette, am C-Terminus des Proteins, ist essentiell für die Oligomerisierung von ClpB. Fehlt dieser Bereich des Proteins kann ClpB nur noch schwach an Nukleotide binden, besitzt nur sehr geringe ATPase-Aktivität und ist inaktiv in den Chaperonaktivitätstests. Dies zeigt die enge Kopplung zwischen Oligomerisierung, ATPase-Aktivität und Chaperonfunktion.

Die zwei AAA-Kassetten von ClpB werden von einer Linkerregion miteinander verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass die Linkerdomäne nicht die Substratbindestelle ist und in die erste AAA-Kassette inseriert ist. Ist dieser Linker nicht vorhanden, ist ClpB inaktiv in den Chaperonaktivitätstests, kann jedoch noch ATP hydrolysieren. Die ATPase-Aktivität ist im Vergleich zum Wildtypprotein erhöht, was auf eine regulative Funktion des Linkers hindeutet.

Die zwei AAA-Kassetten von ClpB weisen unterschiedliche biochemische Eigenschaften auf. Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die erste AAA-Kassette mit der Linkerdomäne inaktiv in den Messungen der ATPase-Aktivität ist und Nukleotide nur sehr schwach bindet. Im Gegensatz dazu bindet die zweite AAA-Kassette Nukleotide sehr stark und besitzt noch ATPase-Aktivität.

Es konnte gezeigt werden, dass die getrennt voneinander exprimierten AAA-Kassetten einen Proteinkomplex bilden, der wie ClpB oligomerisieren kann, obwohl die isolierten AAA-Kassetten nur dimerisieren können.

Durch die Komplexbildung ändert sich die ATPase-Aktivität der einzelnen Proteine: Die ATPase-Aktivität des Komplexes ist bei Untersuchungen niedriger, als die der isolierten zweiten AAA-Kassette. Die Aktivität der zweiten AAA-Kassette wird somit durch die erste AAA-Kassette reguliert.

Der aus den zwei AAA-Kassetten gebildete Proteinkomplex besitzt außerdem Chaperonaktivität. Diese Daten belegen, dass funktionelles ClpB aus den AAA-Kassetten assoziieren kann. Für die Chaperonaktivität müssen die AAA-Kassetten somit nicht kovalent verknüpft sein.

6. Abkürzungen

| | |
|---|--|
| A | Absorption |
| AAA | <i>ATPases Associated with a variety of cellular Activities</i> |
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ADP, ATP | Adenosin-5'-diphosphat, Adenosin-5'-triphosphat |
| a.u. | arbitrary units |
| <i>B. stearothermophilus</i> , <i>Bst</i> | <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| BSA | <i>Bovines Serum Albumin</i> |
| C | Celsius |
| CD | Zirkularer Dichroismus |
| Clp | <i>Caseinolytic Protease</i> |
| DEAE | Diethylammoniummethyl- |
| DTE | Dithioerythritol |
| <i>E. coli</i> , <i>Eco</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| F | Fluoreszenz |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FPLC | <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> |
| GdnHCl | Guanidiniumhydrochlorid |
| Gl. | Gleichung |
| GPDH | Glucose-6-Phosphatdehydrogenase |
| h | Stunde |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| Hsp | Hitzeschockprotein |
| IPTG | Isopropylthiogalaktosid |
| k | Ratenkonstante allgemein |
| k_{cat} | maximale Ratenkonstante bei mit Substrat gesättigtem Enzym |
| K_d | Dissoziationskonstante |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| min | Minute |
| MALDI-MS | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry</i> |
| Mant- | N-Methylantraniloyl- |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| NADH | Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form |
| NADP | Nicotinamadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form |
| NBD | Nukleotidbindungsdomäne |
| NSF | <i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i> |
| <i>N. tabacum</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| OD | optische Dichte bei 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> Polymerasekettenreaktion |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PK | Pyruvatkinase |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| <i>P. pyralis</i> | <i>Photinus pyralis</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Substrat |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| sek | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SFP | Standardfluoreszenzpuffer |

Abkürzungen

| | |
|--|-------------------------------------|
| Tab. | Tabelle |
| <i>T. thermophilus</i> , T th | <i>Thermus thermophilus</i> |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | <i>Unit</i> (Aktivitätseinheit) |
| UZ | Ultrazentrifugation |
| wt | Wildtyp |

7. Literaturverzeichnis

- Adam, H. (1962). Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat. In Methoden der enzymatischen Analyse, H.U.Bergmeyer, ed. (Weinheim: pp. 573-577).
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H. (1961) The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease during Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **47**, 1309-1314.
- Azem, A., Diamant, S., Kessel, M., Weiss, C., and Goloubinoff, P. (1995) The protein-folding activity of chaperonins correlates with the symmetric GroEL14(GroES)2 heterooligomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 12021-12025.
- Banecki, B., Liberek, K., Wall, D., Wawrzynow, A., Georgopoulos, C., Bertoli, E., Tanfani, F., and Zyllicz, M. (1996) Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14840-14848.
- Barnett, M.E., Zolkiewska, A., and Zolkiewski, M. (2000) Structure and activity of ClpB from Escherichia coli. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 37565-37571.
- Becher, M.W., Kotzuk, J.A., Sharp, A.H., Davies, S.W., Bates, G.P., Price, D.L., and Ross, C.A. (1998) Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol. Dis.* **4**, 387-397.
- Ben Zvi, A.P. and Goloubinoff, P. (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* **135**, 84-93.
- Berger, B., Wilson, D.B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M., and Kim, P.S. (1995) Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 8259-8263.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., and Huber, R. (2000) The structures of HslU and ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature* **403**, 800-805, 2000.
- Bonini, N.M. (2002) Chaperoning brain degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99 Suppl 4**, 16407-16411.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-586.
- Buchberger, A., Theyssen, H., Schröder, H., McCarty, J.S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995) Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 16903-16910.
- Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136-141.

Bukau,B., Deuerling,E., Pfund,C., and Craig,E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119-122.

Carmichael,J., Chatellier,J., Woolfson,A., Milstein,C., Fersht,A.R., and Rubinsztein,D.C. (2000) Bacterial and yeast chaperones reduce both aggregate formation and cell death in mammalian cell models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 9701-9705.

Cashikar,A.G., Schirmer,E.C., Hattendorf,D.A., Glover,J.R., Ramakrishnan,M.S., Ware,D.M., and Lindquist,S.L. (2002) Defining a Pathway of Communication from the C-Terminal Peptide Binding Domain to the N-Terminal ATPase Domain in a AAA Protein. *Mol. Cell* **9**, 751-760.

Chen,S., Roseman,A.M., Hunter,A.S., Wood,S.P., Burston,S.G., Ranson,N.A., Clarke,A.R., and Saibil,H.R. (1994) Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* **371**, 261-264.

Chuang,S.E., Burland,V., Plunkett,G., III, Daniels,D.L., and Blattner,F.R. (1993) Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in Escherichia coli. *Gene* **134**, 1-6.

Clarke, A. Variations on a theme: Combined molecular chaperone and proteolysis functions in Clp/Hsp100 proteins. *J.Biosci.* **21**, 161-177. 1-4-1996.

Conti,E., Franks,N.P., and Brick,P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**, 287-298.

Copeland,C.S., Doms,R.W., Bolzau,E.M., Webster,R.G., and Helenius,A. (1986) Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *Journal of Bacteriology* **103**, 1179-1191.

Cowan,N.J. and Lewis,S.A. (2001) Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones. *Adv. Protein Chem.* **59**, 73-104.

Crouy-Chanel,A., el Yaagoubi,A., Kohiyama,M., and Richarme,G. (1995) Reversal by GroES of the GroEL preference from hydrophobic amino acids toward hydrophilic amino acids. *J. Biol. Chem.* **270**, 10571-10575.

Cummings,C.J., Mancini,M.A., Antalffy,B., DeFranco,D.B., Orr,H.T., and Zoghbi,H.Y. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.* **19**, 148-154.

Cummings,C.J., Sun,Y., Opal,P., Antalffy,B., Mestriil,R., Orr,H.T., Dillmann,W.H., and Zoghbi,H.Y. (2001) Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1511-1518.

Davies,S.W., Turmaine,M., Cozens,B.A., DiFiglia,M., Sharp,A.H., Ross,C.A., Scherzinger,E., Wanker,E.E., Mangiarini,L., and Bates,G.P. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-548.

Deuerling,E., Patzelt,H., Vorderwulbecke,S., Rauch,T., Kramer,G., Schaffitzel,E., Mogk,A., Schulze-Specking,A., Langen,H., and Bukau,B. (2003) Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Mol. Microbiol.* **47**, 1317-1328.

Deuerling,E., Schulze-Specking,A., Tomoyasu,T., Mogk,A., and Bukau,B. (1999) Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**, 693-696.

Diamant,S., Ben-Zvi,A.P., Bukau,B., and Goloubinoff,P. (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* **275**, 21107-21113, 2000.

Dougan,D.A., Reid,B.G., Horwich,A.L., and Bukau,B. (2002) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol. Cell* **9**, 673-683.

Ehresmann,B., Imbault,P., and Weil,J.H. (1973) Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* **54**, 454-463.

Ellis,R.J. (1999) Molecular chaperones: pathways and networks. *Curr. Biol.* **9**, R137-R139.

Ellis,R.J. (2001) Molecular chaperones: inside and outside the Anfinsen cage. *Curr. Biol.* **11**, R1038-R1040.

Ellis,R.J. and Hartl,F.U. (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 102-110.

Eriksson,M.J. and Clarke,A.K. (2000) The Escherichia coli heat shock protein ClpB restores acquired thermotolerance to a cyanobacterial clpB deletion mutant. *Cell Stress Chaperones* **5**, 255-264.

Ewalt,K.L., Hendrick,J.P., Houry,W.A., and Hartl,F.U. (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90**, 491-500.

Fenton,W.A., Kashi,Y., Furtak,K., and Horwich,A.L. (1994) Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **371**, 614-619.

Flaherty,K.M., DeLuca-Flaherty,C., and McKay,D.B. (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**, 623-628.

Flynn,J.M., Levchenko,I., Seidel,M., Wickner,S.H., Sauer,R.T., and Baker,T.A. (2001) Overlapping recognition determinants within the ssrA degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10584-10589.

Freedman,R.B., Hawkins,H.C., and Mclaughlin,S.H. (1995) Protein disulfide-isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Methods in Enzymology* **251**, 397-406.

Frydman,J. and Hartl,F.U. (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* **272**, 1497-1502.

Frydman,J., Nimmegern,E., Erdjument-Bromage,H., Wall,J.S., Tempst,P., and Hartl,F.U. (1992) Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J.* **11**, 4767-4778.

Gallie,D.R., Fortner,D., Peng,J., and Puthoff,D. (2002) ATP-dependent hexameric assembly of the heat shock protein Hsp101 involves multiple interaction domains and a functional C-proximal nucleotide-binding domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 39617-39626.

Georgopoulos,C. and Welch,W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cell Biology* **9**, 601-634.

Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73-82.

Goloubinoff, P., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337**, 44-47.

Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **23**, 13732-13737.

Gottesman, S., Clark, W.P., Crecy-Lagard, V., and Maurizi, M.R. (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J. Biol. Chem.* **268**, 22618-22626.

Gottesman, S., Clark, W.P., and Maurizi, M.R. (1990) The ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence of *clpA* and identification of a Clp-specific substrate. *J. Biol. Chem.* **265**, 7886-7893.

Gottesman, S., Maurizi, M.R., and Wickner, S. (1997) Regulatory subunits of energy-dependent proteases [comment] [see comments]. *Cell* **91**, 435-438.

Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., and Sauer, R.T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**, 1338-1347.

Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A.C., and Maurizi, M.R. (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* **273**, 12476-12481.

Groemping, Y. Kinetische und funktionelle Untersuchungen des DnaK-Systems aus *Thermus thermophilus* und heterogener Komplexe aus *T. thermophilus* und *E.coli*. 12-12-2000.

Groemping, Y., Klostermeier, D., Herrmann, C., Veit, T., Seidel, R., and Reinstein, J. (2001) Regulation of ATPase and chaperone cycle of DnaK from *Thermus thermophilus* by the nucleotide exchange factor GrpE. *J. Mol. Biol.* **305**, 1173-1183, 2001.

Guo, F., Maurizi, M.R., Esser, L., and Xia, D. (2002) Crystal Structure of ClpA, an Hsp100 Chaperone and Regulator of ClpAP Protease. *J. Biol. Chem.* **277**, 46743-46752.

Halliwell, C.M., Morgan, G., Ou, C.P., and Cass, A.E. (2001) Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Anal. Biochem.* **295**, 257-261.

Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.

Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., and Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**, 431-435.

Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.

Hartl, F.U. and Martin, J. (1995) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 92-102.

- Hattendorf,D.A. and Lindquist,S.L. (2002) Analysis of the AAA sensor-2 motif in the C-terminal ATPase domain of Hsp104 with a site-specific fluorescent probe of nucleotide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 2732-2737.
- Herbst,R., Gast,K., and Seckler,R. (1998) Folding of Firefly (*Photinus pyralis*) luciferase - aggregation and reactivation of unfolding intermediates. *Biochemistry* **37**, 6586-6597.
- Herbst,R., Schafer,U., and Seckler,R. (1997) Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 7099-7105.
- Hiratsuka, T. New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim. et Biophys. Acta* **742**, 496-508. 1983.
- Horovitz,A., Fridmann,Y., Kafri,G., and Yifrach,O. (2001) Review: allostery in chaperonins. *J. Struct. Biol.* **135**, 104-114.
- Hoskins,J.R., Singh,S.K., Maurizi,M.R., and Wickner,S. (2000) Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8892-8897.
- Houry,W.A., Frishman,D., Eckerskorn,C., Lottspeich,F., and Hartl,F.U. (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**, 147-154.
- Hubbard,T.J. and Sander,C. (1991) The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng* **4**, 711-717.
- Jackson,G.S., Hosszu,L.L., Power,A., Hill,A.F., Kenney,J., Saibil,H., Craven,C.J., Waltho,J.P., Clarke,A.R., and Collinge,J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* **283**, 1935-1937.
- Jaenicke,R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
- Kazemi-Esfarjani,P. and Benzer,S. (2000) Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* **287**, 1837-1840.
- Kelley,W.L. and Georgopoulos,C. (1997) Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **25**, 913-931.
- Kessel,M., Maurizi,M.R., Kim,B., Kocsis,E., Trus,B.L., Singh,S.K., and Steven,A.C. (1995) Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J. Mol. Biol.* **250**, 587-594.
- Kim,K.I., Cheong,G.W., Park,S.C., Ha,J.S., Woo,K.M., Choi,S.J., and Chung,C.H. (2000) Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **305**, 655-666, 2000.
- Kitagawa,M., Wada,C., Yoshioka,S., and Yura,T. (1991) Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock sigma factor (sigma 32). *J. Bacteriol.* **173**, 4247-4253.
- Klostermeier,D., Seidel,R., and Reinstein,J. (1998) Functional properties of the molecular chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *Journal of Molecular Biology* **279**, 841-853.

- Klostermeier,D., Seidel,R., and Reinstein,J. (1999) The functional cycle and regulation of the *Thermus thermophilus* DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **287**, 511-525.
- Krobitch,S. and Lindquist,S. (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 1589-1594.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landry,S.J., Jordan,R., McMacken,R., and Gierasch,L.M. (1992) Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature* **355**, 455-457.
- Laufen,T., Mayer,M.P., Beisel,C., Klostermeier,D., Mogk,A., Reinstein,J., and Bukau,B. (1999) Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**, 5452-5457.
- Lee,C., Schwartz,M.P., Prakash,S., Iwakura,M., and Matouschek,A. (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol. Cell* **7**, 627-637.
- Lenzen,C.U., Steinmann,D., Whiteheart,S.W., and Weis,W.I. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide- sensitive fusion protein [published erratum appears in *Cell* 1998 Oct 16;95(2):following 289]. *Cell* **94**, 525-536.
- Li,J. and Sha,B. (2002) Crystal structure of *E. coli* Hsp100 ClpB nucleotide-binding domain 1 (NBD1) and mechanistic studies on ClpB ATPase activity. *J. Mol. Biol.* **318**, 1127-1137.
- Li,J. and Sha,B. (2003) Crystal Structure of the *E. coli* Hsp100 ClpB N-Terminal Domain. *Structure. (Camb.)* **11**, 323-328.
- Liberek,K., Marszalek,J., Ang,D., Georgopoulos,C., and Zylicz,M. (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2874-2878.
- Lin,Z., Schwartz,F.P., and Eisenstein,E. (1995) The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 1011-1014.
- Lindquist,S., Patino,M.M., Chernoff,Y.O., Kowal,A.S., Singer,M.A., Liebman,S.W., Lee,K.H., and Blake,T. (1995) The role of Hsp104 in stress tolerance and [PSI⁺] propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60**, 451-460.
- Liu,Z., Tek,V., Akoev,V., and Zolkiewski,M. (2002) Conserved Amino Acid Residues within the Amino-terminal Domain of ClpB are Essential for the Chaperone Activity. *J. Mol. Biol.* **321**, 111-120.
- Lo,J.H., Baker,T.A., and Sauer,R.T. (2001) Characterization of the N-terminal repeat domain of *Escherichia coli* ClpA-A class I Clp/HSP100 ATPase. *Protein Sci.* **10**, 551-559.
- Lorimer,G.H. (2001) A personal account of chaperonin history. *Plant Physiol* **125**, 38-41.
- Martin,J., Langer,T., Boteva,R., Schramel,A., Horwich,A.L., and Hartl,F.U. (1991) Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* **352**, 36-42.
- Martin,J., Mayhew,M., Langer,T., and Hartl,F.U. (1993) The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature* **366**, 228-233.

- Maurizi, M.R. and Li, C.C. (2001) AAA proteins: in search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins. *EMBO Rep.* **2**, 980-985.
- Mayer, M.P., Rudiger, S., and Bukau, B. (2000) Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol. Chem.* **381**, 877-885.
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995) The Role of ATP in the Functional Cycle of the DnaK Chaperone System. *J. Mol. Biol.* **249**, 126-137.
- Mehl, A.F., Heskett, L.D., and Neal, K.M. (2001) A GrpE mutant containing the NH(2)-terminal "tail" region is able to displace bound polypeptide substrate from DnaK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 562-569.
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J., and Bukau, B. (2003) Roles of Individual Domains and Conserved Motifs of the AAA+ Chaperone ClpB in Oligomerization, ATP Hydrolysis, and Chaperone Activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 17615-17624.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., and Bukau, B. (1999) Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**, 6934-6949.
- Motohashi, K., Taguchi, H., Ishii, N., and Yoshida, M. (1994) Isolation of the stable hexameric DnaK.DnaJ complex from Thermus thermophilus. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27074-27079.
- Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., and Yoshida, M. (1999) Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 7184-7189.
- Motohashi, K., Yohda, M., Endo, I., and Yoshida, M. (1996) A novel factor required for the assembly of the DnaK and DnaJ chaperones of Thermus thermophilus. *J. Biol. Chem.* **271**, 17343-17348.
- Narain, Y., Wyttenbach, A., Rankin, J., Furlong, R.A., and Rubinsztein, D.C. (1999) A molecular investigation of true dominance in Huntington's disease. *J. Med. Genet.* **36**, 739-746.
- Netzer, W.J. and Hartl, F.U. (1998) Protein folding in the cytosol - chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 68-73.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27-43.
- Okuno, H., Nagata, K., and Nakajima, H. (1985) Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. *J. Appl. Biochem.* **7**, 192-201.
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R.S., and Reinstein, J. (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**, 3417-3422.
- Park, S.K., Kim, K.I., Woo, K.M., Seol, J.H., Tanaka, K., Ichihara, A., Ha, D.B., and Chung, C.H. (1993) Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the clpB gene of Escherichia coli and characterization of its gene products. *J. Biol. Chem.* **268**, 20170-20174.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., and Lindquist, S. (1994a) Saccharomyces cerevisiae Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J. Biol. Chem.* **269**, 4480-4487.

- Parsell,D.A., Kowal,A.S., Singer,M.A., and Lindquist,S. (1994b) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**, 475-478.
- Parsell,D.A., Sanchez,Y., Stitzel,J.D., and Lindquist,S. (1991) Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* **353**, 270-273.
- Patel,S. and Latterich,M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8**, 65-71.
- Paynter,S. and Russell,D.A. (2002) Surface plasmon resonance measurement of pH-induced responses of immobilized biomolecules: conformational change or electrostatic interaction effects? *Anal. Biochem.* **309**, 85-95.
- Pelham,H.R. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**, 959-961.
- Perutz,M.F., Finch,J.T., Berriman,J., and Lesk,A. (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5591-5595.
- Perutz,M.F., Johnson,T., Suzuki,M., and Finch,J.T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 5355-5358.
- Pierpaoli,E.V., Sandmeier,E., Schönfeld,H.J., and Christen,P. (1998) Control of the DnaK chaperone cycle by substoichiometric concentrations of the co-chaperones DnaJ and GrpE. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 6643-6649.
- Prusiner,S.B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **278**, 245-251.
- Prusiner,S.B., Scott,M.R., DeArmond,S.J., and Cohen,F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**, 337-348.
- Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Billeter,M., Glockshuber,R., and Wuthrich,K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-182.
- Rohrwild,M., Pfeifer,G., Santarius,U., Muller,S.A., Huang,H.C., Engel,A., Baumeister,W., and Goldberg,A.L. (1997) The ATP-dependent HsIVU protease from Escherichia coli is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 133-139.
- Roseman,A.M., Chen,S., White,H., Braig,K., and Saibil,H.R. (1996) The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**, 241-251.
- Rubinsztein,D.C., Wyttenbach,A., and Rankin,J. (1999) Intracellular inclusions, pathological markers in diseases caused by expanded polyglutamine tracts? *J. Med. Genet.* **36**, 265-270.
- Rüdiger,S., Schneider-Mergener,J., and Bukau,B. (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* **20**, 1042-1050.
- Ryan,M.T. and Pfanner,N. (2001) Hsp70 proteins in protein translocation. *Adv. Protein Chem.* **59**, 223-242.
- Rye,H.S., Burston,S.G., Fenton,W.A., Beechem,J.M., Xu,Z., Sigler,P.B., and Horwich,A.L. (1997) Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature* **388**, 792-798.

- Saibil,H.R., Horwich,A.L., and Fenton,W.A. (2001) Allostery and protein substrate conformational change during GroEL/GroES-mediated protein folding. *Adv. Protein Chem.* **59**, 45-72.
- Sambrook,J., Fritsch E.F., and Maniatis T (1982). *Molecular Cloning A Laboratory Guide*. Cold Spring Harbour Press.
- Sanchez,Y. and Lindquist,S.L. (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**, 1112-1115.
- Saraste,M., Sibbald,P.R., and Wittinghofer,A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.
- Scherzinger,E., Lurz,R., Turmaine,M., Mangiarini,L., Hollenbach,B., Hasenbank,R., Bates,G.P., Davies,S.W., Lehrach,H., and Wanker,E.E. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549-558.
- Schirmer,E.C., Glover,J.R., Singer,M.A., and Lindquist,S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289-296.
- Schirmer,E.C. and Lindquist,S. (1997) Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13932-13937.
- Schirmer,E.C., Queitsch,C., Kowal,A.S., Parsell,D.A., and Lindquist,S. (1998) The ATPase activity of Hsp104, effects of environmental conditions and mutations [published erratum appears in J Biol Chem 1998 Jul 31;273(31):19922]. *J. Biol. Chem.* **273**, 15546-15552.
- Schirmer,E.C., Ware,D.M., Queitsch,C., Kowal,A.S., and Lindquist,S.L. (2001) Subunit interactions influence the biochemical and biological properties of Hsp104. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 914-919.
- Schlee,S., Groemping,Y., Herde,P., Seidel,R., and Reinstein,J. (2001) The chaperone function of ClpB from *Thermus thermophilus* depends on allosteric interactions of its two ATP-binding sites. *J. Mol. Biol.* **306**, 889-899, 2001.
- Schmid,D., Baici,A., Gehring,H., and Christen,P. (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science* **263**, 971-973.
- Schmid,F.X. (2001) Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* **59**, 243-282.
- Seol,J.H., Baek,S.H., Kang,M.S., Ha,D.B., and Chung,C.H. (1995) Distinctive roles of the two ATP-binding sites in ClpA, the ATPase component of protease Ti in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 8087-8092.
- Singh,S.K., Guo,F., and Maurizi,M.R. (1999) ClpA and ClpP remain associated during multiple rounds of ATP-dependent protein degradation by ClpAP protease. *Biochemistry* **38**, 14906-14915.
- Smith,C.K., Baker,T.A., and Sauer,R.T. (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate- recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6678-6682.
- Sousa,M.C., Trame,C.B., Tsuruta,H., Wilbanks,S.M., Reddy,V.S., and McKay,D.B. (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* **103**, 633-643.

Squires,C.L., Pedersen,S., Ross,B.M., and Squires,C. (1991) ClpB is the Escherichia coli heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**, 4254-4262.

Studier,F.W. and Moffatt,B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

Takii,Y., Daimon,K., and Suzuki,Y. (1992) Cloning and expression of a thermostable exo-alpha-1,4-glucosidase gene from Bacillus stearothermophilus ATCC12016 in Escherichia coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 243-247.

Taylor,J.P., Hardy,J., and Fischbeck,K.H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**, 1991-1995.

Tek,V. and Zolkiewski,M. (2002) Stability and interactions of the amino-terminal domain of ClpB from Escherichia coli. *Protein Sci.* **11**, 1192-1198.

Theysen,H., Schuster,H.P., Packschies,L., Bukau,B., and Reinstein,J. (1996) The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* **263**, 657-670.

Thrall,S.H., Reinstein,J., Wohrl,B.M., and Goody,R.S. (1996) Evaluation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase primer tRNA binding by fluorescence spectroscopy: specificity and comparison to primer/template binding. *Biochemistry* **35**, 4609-4618.

Todd,M.J. and Lorimer,G.H. (1995) Stability of the asymmetric Escherichia coli chaperonin complex. Guanidine chloride causes rapid dissociation. *J. Biol. Chem.* **270**, 5388-5394.

Todd,M.J., Viitanen,P.V., and Lorimer,G.H. (1994) Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* **265**, 659-666.

Tomoyasu,T., Gamer,J., Bukau,B., Kanemori,M., Mori,H., Rutman,A.J., Oppenheim,A.B., Yura,T., Yamanaka,K., and Niki,H. (1995) Escherichia coli FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J.* **14**, 2551-2560.

van den Berg, B., Ellis, R. J., und Dobson, C. M. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* **18**, 6927-6933. 1999.

Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.

Walter,S. and Buchner,J. (2002) Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**, 1098-1113.

Wang,J.D., Herman,C., Tipton,K.A., Gross,C.A., and Weissman,J.S. (2002) Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. *Cell* **111**, 1027-1039.

Watanabe,Y.H., Motohashi,K., Taguchi,H., and Yoshida,M. (2000) Heat-inactivated proteins managed by DnaKJ-GrpE-ClpB chaperones are released as a chaperonin-recognizable non-native form. *J. Biol. Chem.* **275**, 12388-12392.

Watanabe,Y.H., Motohashi,K., and Yoshida,M. (2002) Roles of the two ATP binding sites of ClpB from Thermus thermophilus. *J. Biol. Chem.* **277**, 5804-5809.

Wawrzynow,A. and Zylicz,M. (1995) Divergent effects of ATP on the binding of the DnaK and DnaJ chaperones to each other, or to their various native and denatured protein substrates. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 19300-19306.

Weber-Ban,E.U., Reid,B.G., Miranker,A.D., and Horwich,A.L. (1999) Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401**, 90-93.

Whiteheart,S.W., Rossnagel,K., Buhrow,S.A., Brunner,M., Jaenicke,R., and Rothman,J.E. (1994) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* **126**, 945-954.

Wickner,S., Maurizi,M.R., and Gottesman,S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.

Xu,Z., Horwich,A.L., and Sigler,P.B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex [see comments]. *Nature* **388**, 741-750.

Yifrach,O. and Horovitz,A. (1994) Two lines of allosteric communication in the oligomeric chaperonin GroEL are revealed by the single mutation Arg196-->Ala. *J. Mol. Biol.* **243**, 397-401.

Zeth,K., Ravelli,R.B., Paal,K., Cusack,S., Bukau,B., and Dougan,D.A. (2002) Structural analysis of the adaptor protein ClpS in complex with the N-terminal domain of ClpA. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 906-911.

Zhou,Y., Gottesman,S., Hoskins,J.R., Maurizi,M.R., and Wickner,S. (2001) The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* **15**, 627-637.

Zhu,X., Zhao,X., Burkholder,W.F., Gragerov,A., Ogata,C.M., Gottesman,M.E., and Hendrickson,W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-1614.

Zimmerman,S.B. and Trach,S.O. (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **222**, 599-620.

Zolkiewski,M. (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation - A novel multi-chaperone system from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **274**, 28083-28086.

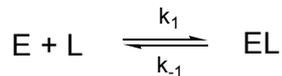
Zolkiewski,M., Kessel,M., Ginsburg,A., and Maurizi,M.R. (1999) Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from Escherichia coli. *Protein Sci.* **8**, 1899-1903.

8. Anhang

8.1 Auswertung von Gleichgewichtstitrationen

8.1.1 Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenztitrationen

Die Bindung eines Liganden L an ein Enzym E lässt sich folgendermaßen beschreiben:



Die Dissoziationskonstante K_d ist der Quotient der Dissoziationsrate k_{-1} und der Assoziationsrate k_1 . Die Dissoziationskonstante kann durch Angleichung der über Fluoreszenztitration gemessenen Bindungskurve an eine quadratische Gleichung ermittelt werden.

Es gilt nach der Massenerhaltung:

$$[E]_0 = [E] + [EL]$$

und

$$[L]_0 = [L] + [EL] \quad (\text{Gl. 8.1})$$

[E]: Konzentration an freiem Enzym

[E]₀: Gesamtkonzentration an Enzym

[L]: Konzentration an freiem Liganden

[L]₀: Gesamtkonzentration an Ligand

[EL]: Konzentration des Enzym-Liganden-Komplexes

Die Gleichgewichtskonstante K_d ergibt sich zu:

$$K_d = \frac{[E] \cdot [L]}{[EL]} \quad (\text{Gl. 8.2})$$

Kombination von Massenwirkungsgesetz (Gl. 8.2) und Massenerhaltung (Gl. 8.1) liefert:

$$K_d = \frac{([E]_0 - [EL]) \cdot ([L]_0 - [EL])}{[EL]} \quad (\text{Gl. 8.3})$$

Durch Auflösen nach [EL] erhält man die beiden Lösungen

$$[EL] = \frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \cdot [L]_0} \quad (\text{Gl. 8.4})$$

von denen nur die Lösung mit negativem Vorzeichen vor der Wurzel physikalisch sinnvoll ist.

Die Zunahme der Fluoreszenzemission des fluoreszierenden Liganden ist die Messgröße. Diese Zunahme ist proportional zum Bindungsgrad $[EL]/[L]_0$. Die Proportionalitätskonstante ist die Fluoreszenzzunahme ΔF_{\max} , die man bei Sättigung (Bindungsgrad = 1) erhält:

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[EL]}{[L]_0} \quad (\text{Gl. 8.5})$$

ΔF : partielle Fluoreszenzänderung des Titrationsschritts

ΔF_{\max} : maximale Fluoreszenzänderung bei Sättigung

Die gemessene Gesamtfluoreszenz F in jedem Titrationsschritt setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz F_0 des freien fluoreszierenden Liganden und der Fluoreszenzzunahme ΔF durch Zugabe von Enzym. Zusammen mit Gleichung 8.5 ergibt sich:

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{[EL]}{[L]_0} \quad (\text{Gl. 8.6})$$

Einsetzen des Ausdrucks für $[EL]$ aus Gleichung 8.4 liefert für die Gesamtfluoreszenz F :

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0} \quad (\text{Gl. 8.7})$$

F : Fluoreszenzintensität

F_0 : Grundfluoreszenz des vorgelegten Liganden

F_{\max} : maximale Fluoreszenzintensität bei Sättigung

$[E]_0$: Gesamtkonzentration des Enzyms in M

$[L]_0$: Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Liganden in M

K_d : Gleichgewichtsdissoziationskonstante in M

Die über Fluoreszenztitration gemessene Bindungskurve besteht aus Werten für F in Abhängigkeit von $[E]_0$ oder $[L]_0$. Mit $[L]_0$ oder $[E]_0$ als Konstante und F_0 , ΔF_{\max} und K_d als Fitparameter lässt sich durch Anpassung einer Kurve an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gleichung 8.7 der jeweilige K_d -Wert bestimmen.

8.1.2 Verdrängungstitrationen

Verdrängungstitrationen erlauben die Messung der Affinität eines nichtfluoreszierenden Liganden zum Enzym, wenn dieser mit einem fluoreszierenden Liganden um die gleiche Bindungsstelle am Enzym konkurriert. Die Auswertung von Verdrängungstitrationen erfolgte wie bei Thrall *et al.* (1996) beschrieben und ist im Folgenden skizziert.

Die Dissoziationskonstanten für die beiden Bindungsgleichgewichte lauten:

$$K_{d1} = \frac{[E] \cdot [L_1]}{[EL_1]} \quad \text{und} \quad K_{d2} = \frac{[E] \cdot [L_2]}{[EL_2]} \quad (\text{Gl. 8.8})$$

Sei L_1 der fluoreszierende und damit signalgebende Ligand. Zur Auswertung der experimentellen Daten wird analog zu Gl. 8.4 ein expliziter Ausdruck für $[EL_1]$ benötigt. Dies ist unter Berücksichtigung der Massenerhaltung möglich:

$$[E]_0 = [E] + [EL_1] + [EL_2] \quad (\text{Gl. 8.9})$$

$$[L_1]_0 = [L_1] + [EL_1] \quad (\text{Gl. 8.10})$$

$$[L_2]_0 = [L_2] + [EL_2] \quad (\text{Gl. 8.11})$$

Kombination der Gleichungen 8.8 – 8.11 führt auf ein Polynom 3. Grades der Form

$$[EL_1]^3 + a \cdot [EL_1]^2 + b \cdot [EL_1] + c = 0 \quad (\text{Gl. 8.12})$$

mit den Koeffizienten a, b und c: (Gl. 8.13 – 8.15)

$$a = \frac{[E]_0 \cdot (K_{d2} - K_{d1}) + [L_1]_0 \cdot (2 \cdot K_{d2} - K_{d1}) + [L_2]_0 \cdot K_{d1} - K_{d1}^2 + K_{d1} \cdot K_{d2}}{K_{d1} - K_{d2}}$$

$$b = \frac{[E]_0 \cdot [L_1]_0 \cdot (K_{d1} - 2 \cdot K_{d2}) - [L_1]_0^2 \cdot K_{d2} - [L_1]_0 \cdot K_{d1} \cdot ([L_2]_0 + K_{d2})}{K_{d1} - K_{d2}}$$

$$c = \frac{[E]_0 \cdot [L_1]_0^2 \cdot K_{d2}}{K_{d1} - K_{d2}}$$

Dieses Polynom dritten Grades besitzt drei Lösungen. Mit

$$Q \equiv \frac{a^2 + 3b}{9} \quad \text{und} \quad R \equiv \frac{2a^3 - 9ab + 27c}{54} \quad (\text{Gl. 8.16})$$

ergeben sich für $Q^3 - R^2 \geq 0$ die drei Lösungen der Gleichung mit

$$\Theta = \arccos\left(\frac{R}{\sqrt{Q^3}}\right) \quad (\text{Gl. 8.17})$$

zu

$$[EL_1]_1 = -2\sqrt{Q} \cdot \cos\left(\frac{\Theta}{3}\right) - \frac{a}{3} \quad (\text{Gl. 8.18})$$

$$[EL_1]_2 = -2\sqrt{Q} \cdot \cos\left(\frac{\Theta + 2\pi}{3}\right) - \frac{a}{3} \quad (\text{Gl. 8.19})$$

$$[EL_1]_3 = -2\sqrt{Q} \cdot \cos\left(\frac{\Theta + 4\pi}{3}\right) - \frac{a}{3} \quad (\text{Gl. 8.20})$$

Für den Fall $Q^3 - R^2 < 0$ existiert nur eine Lösung:

$$[EL_1] = -\text{sgn}(R) \left(\left(\sqrt{R^2 - Q^3} + |R| \right)^{1/3} + \frac{Q}{\left(\sqrt{R^2 - Q^3} + |R| \right)^{1/3}} \right) - \frac{a}{3} \quad (\text{Gl. 8.21})$$

Gleichungen 8.13 – 8.21 wurden in ein TurboPascal-Programm aufgenommen (Jochen Reinstein, unveröffentlicht), das anhand dieser Gleichungen eine Kurvenanpassung an die experimentellen Daten durchführt, indem nach einem nichtlinearen Nelder-Mead-Algorithmus die quadratische Abweichung zwischen experimentellen und berechneten Datenpunkten minimiert wird.

8.2. Sequenzvergleich

Die Sequenz von ClpB aus *T. thermophilus* wurde mit der Sequenz von ClpA aus *E. coli* verglichen. Dazu wurde das Computerprogramm SIM verwendet (Matrix: Blosum 62, Gap open Penalty: 2, Gap extension Penalty: 2). Die Sequenzen wiesen eine Identität von 40.2 % auf.

```

ClpB          12 E-ALAAQVLAQRMKHQAIDLPHLWAVLLKDEKSLAWR-LLEKAGADPKALK-ELQ---E
CLPA_ECOLI    7  ELSLNMAFARAREHRHEFMTVEHLLLALLSNP-S-A-REALEACSVDLVALRQELEAFIE
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ClpB          66 RELARLPKVEGAEVGQYLTSRLSGALNRAEGLMEEL-KDRYVAVDTLVLAL-AEATPGLP
CLPA_ECOLI    64 QTTPVLPASE-EERDTQPTLSFQRVLQRAVFHVQSSGRNEVTGANVLV-AIFSEQESQAA
               ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ClpB          124 GL----EALK-GALKEL-RGGRTVQ-TEHAE--STYNALEQYG----ID-----LTRLAA
CLPA_ECOLI    122 YLLRKHEVSRLDVVNFISHGTRKDEPTQSSDPGSQPNSEEQAGGEERMENFTTNLNLAR
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ClpB          166 EGKLDPVIGRDEEIRRVIQILLRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIVEGLAQIRIVKGDVPEGLK
CLPA_ECOLI    182 VGGIDPLIGREKELERAIQVLCRRRKNPNLLVGESGVGKTAIAEGLAWRIVQGDVPEVMA
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ClpB          226 GKRVLSLQMGSLLAGAKYRGEFEERLKAVIQEVVQSQGEVILFIDELHTVVGAGKAEGA-
CLPA_ECOLI    242 DCTIYSLDIGSLLAGTKYRGDFEKRFKALKQLEQDTNS-ILFIDEIHTIIGAGAASGGQ
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ClpB          285 VDAGNMLKPALARGE LRLIGATTLDEYREI-EKDPALERRFPVYVDEPTVEETISILRG
CLPA_ECOLI    301 VDAANLIKPLSSGKIRVIGSTTYQEFNSIFEKDRALARRFQKIDITEPSIEETVQIING
               *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


Anhang

RVIQILLRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIVEGLAQRIVKGDVPEGLKGRIVSLQMGSLLAG
hhhhhhhhccccceeeccccchhhhhhhhhhhccccccccceeeehhhhhhh
250 260 270 280 290 300
| | | | | |
AKYRGEFEERLKAVIQEVVQSQGEVILFIDELHTVVGAGKAEGAVDAGNMLKPALARGEL
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccceeeechhhhhhhcchhhhhhhhhhhhhhhhhhh
310 320 330 340 350 360
| | | | | |
RLIGATTLDEYREIEKDPALERRFQPVYVDEPTVEETISILRGLKEKEYEVHHGVRISDSA
hhccccchhhhhhhcchhhhhccccceccccchhhhhhhhhhhcchhhccccceechhh
370 380 390 400 410 420
| | | | | |
IIAAATLSHRYITERRLPDKAIDLIDEAAARLRMALESAPEEIDALERKKLQLEITEREAL
hhhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhcchhhhhhhhhhhhhhhhhhh
430 440 450 460 470 480
| | | | | |
KKEKDPDSQERLKAIEAEIAKLTEEIAKLRAEWEREREILRKLREAQHRLEVRREIELA
hhccccchhh
490 500 510 520 530 540
| | | | | |
ERQYDLNRAAELRYGELPKLEAEVEALSEKLRGARFVRLEVTEEDIAEIVSRWTGIPVSK
hhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcchhhhhhhccccccchhh
550 560 570 580 590 600
| | | | | |
LLEGEREKLLRLEELHKRVVVGQDEAIRAVADAIRRARAGLKDPNRPIGSFLFLGPTGVG
hh
610 620 630 640 650 660
| | | | | |
KTELAKTLAATLFDTEAMIRIDMTEYMEKHAVSRLIGAPPGYVGYEEGGQLTEAVRRRP
hh
670 680 690 700 710 720
| | | | | |
YSVILFDEIEKAHPDVFNILLQILDDGRLTDSHGRTVDFRNTVVIILTSNLGSPLILEGLQ
ccccchhhhhhhccccchhh
730 740 750 760 770 780
| | | | | |
KGWPYERIRDEVFKVLQQHFRPEFLNRLDEIVVFRPLTKEQIRQIVEIQLSYLRARLAEK
ccccccccchhhhhhhhhcchhhhhccccchhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
790 800 810 820 830 840
| | | | | |
RISLELTEAAKDFLAERGYDPVFGARPLRRVIQRELETPLAQKILAGEVKEGDRVQVDVG
hh
850
|
PAGLVFAVPAVEA
ccccceeecccccec

Anhang

GOR4 :

| | | | | | |
|-----------------------|------|---|-----|----|--------|
| Alpha helix | (Hh) | : | 570 | is | 66.74% |
| 3 ₁₀ helix | (Gg) | : | 0 | is | 0.00% |
| Pi helix | (Ii) | : | 0 | is | 0.00% |
| Beta bridge | (Bb) | : | 0 | is | 0.00% |
| Extended strand | (Ee) | : | 59 | is | 6.91% |
| Beta turn | (Tt) | : | 0 | is | 0.00% |
| Bend region | (Ss) | : | 0 | is | 0.00% |
| Random coil | (Cc) | : | 225 | is | 26.35% |
| Ambiguous states (?) | | : | 0 | is | 0.00% |
| Other states | | : | 0 | is | 0.00% |

8.4 Lebenslauf

| | |
|----------------------------------|---|
| Name | Philipp Beinker |
| geboren | 27.08.1973 |
| Nationalität | deutsch |
| Familienstand | ledig |
| Juni 1993 | Abitur am Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasium, Münster |
| Juli 1993 - Juni 1994 | Ableistung des Grundwehrdienstes |
| Oktober 1994 - September 1996 | Grundstudium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum |
| Oktober 1996 | Diplomvorprüfung Biochemie |
| Oktober 1996 - Juni 1997 | Studium an der University of Sussex, Falmer, Großbritannien |
| Juli 1997 - Juni 2000 | Hauptstudium der Biochemie an der Universität Witten/Herdecke |
| September 1999 | Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie, Molekularbiologie, Virologie und Pharmakologie |
| Oktober 1999 - Juni 2000 | Diplomarbeit: Studien über die Struktur und Funktion des Signalerkennungspartikels (SRP) von <i>Escherichia coli</i> Betreuer: Prof. Dr. W. Wintermeyer |
| Juli 2000 - August 2003 | Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, Gutachter: Prof. Dr. R. Goody, Prof. Dr. R. Winter |

Danksagungen

Ich danke

Prof. Dr. Roger S. Goody für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. R. Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Jochen Reinstein für die exzellente Betreuung, die vielen Erklärungen in Sachen Kinetik und für Unterstützung bei der Veröffentlichung der interessantesten Ergebnisse.

Dr. Ilme Schlichting für ihre Geduld bei ihren Erklärungen zur Kristallisation von Proteinen.

den aktuellen und ehemaligen Gruppenkollegen Alena, Gina, Sandra, Simone, Thomas und Yvonne für die Hilfe im Labor und die gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Petra Herde für ihre Erklärungen der Funktionsweise der diversen Laborgeräte und für ihr Labormanagement.

Dr. Ralf Seidel und Elisabeth Hartmann für die Bereitstellung von Plasmiden und kompetenten Zellen.

Dr. Wulf Blankenfeldt für die kompetenten Zellen und die Hilfe bei der Erstellung von Abbildungen für diese Arbeit.

Simone und Sandra zusätzlich für das Korrekturlesen der Arbeit.

den Praktikantinnen Charlotte Guddat, Anne Krampe, Christina Rabe und Martina Brückert für die Hilfe bei Proteinexpressionen und Proteinreinigungen.

meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Nadja für ihre Unterstützung und Geduld während der Promotion.