

Zusammenfassung

DafA ist ein Protein, das durch das *dnaK*-Operon von *Thermus thermophilus* kodiert wird und zusammen mit den Chaperonen DnaK_{Tth} und dem Cochaperon DnaJ_{Tth} einen hochaffinen Komplex bildet. Dieses 87 Aminosäuren große Protein ist das einzige Mitglied des DnaK_{Tth} Chaperonsystems, zu dem kein homologes Protein in anderen Organismen bekannt ist und dessen Funktion nur unzureichend verstanden ist.

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war es, DafA_{Tth} mit Hilfe der stabil überexprimierten Variante DafA(L2V)_{Tth} zu charakterisieren. Die vorgestellten Ergebnisse basieren auf der Anwendung unterschiedlichster biochemischer und biophysikalischer Methoden und erlauben neue Einblicke in die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von DafA_{Tth}.

Die strukturelle Analyse des freien DafA(L2V)_{Tth} ergab, dass es sich um ein wohlgefaltetes Protein mit definierten Sekundärstrukturelementen wie alpha-helikalen, beta-Faltblatt- und Coiled coil-Regionen handelt. Basierend auf diesen Ergebnissen und auf spektroskopischen Analysen von Punktmutanten von DafA(L2V)_{Tth} konnte gezeigt werden, dass die zwei Tryptophanreste von DafA(L2V)_{Tth} unterschiedlich stark zum Lösungsmittel exponiert sind.

Studien der Dynamik der DnaK_{Tth}-DnaJ_{Tth}-DafA(L2V)_{Tth}-Komplexbildung und -dissoziation mit Hilfe von fluoreszent markierten DafA(L2V)_{Tth} Cysteinmutanten zeigten, dass bei 25°C beide Ereignisse mit langsamer Geschwindigkeit stattfinden. Die Ratenkonstante für die Komplexbildung (k_{on}) beträgt $9.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die für die Dissoziation (k_{off}) ist $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Wie von früheren Studien bekannt ist die resultierende Affinität zwischen den Bindungspartner sehr hoch. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D liegt im submikromolaren Bereich (~140 nM). Zusätzlich deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Komplexbildung ein synergistischer Prozess ist, der nur in Gegenwart aller drei Spezies stattfinden kann. Komplexe aus jeweils nur zwei Spezies konnten nicht beobachtet werden.

Mit Ausnahme der essentiellen Funktion für die Assoziation von DnaK_{Tth} und DnaJ_{Tth} konnte DafA_{Tth} keine weitere, spezifische Funktion zugeordnet werden. Experimente mit Peptiden zeigten, dass DafA(L2V)_{Tth} in Gegenwart von DnaJ_{Tth} mit den Peptiden um die Bindung an DnaK_{Tth} kompetitiv konkurriert. Derselbe inhibitorische Effekt von DafA_{Tth} konnte auch in einem Testsystem für Luziferase-Rückfaltung festgestellt werden. DafA(L2V)_{Tth} inhibiert die DnaK_{Tth}-unterstützte Proteinfaltung. Diese Tatsache ist ein direkter Beleg für den DnaK_{Tth}-Chaperonzyklus, der von Klostermeier et al. vorgeschlagen worden war. Da DafA_{Tth} den Komplex DnaK_{Tth}-DnaJ_{Tth}-DafA_{Tth} verlassen muss, bevor Substratproteine binden können, hat freies DafA_{Tth} möglicherweise regulatorische Funktionen, die in einem Zusammenhang zur Hitzeschockantwort stehen könnten. In dieser Arbeit wurden 70S-Ribosomen als neuer Bindungspartner für DafA(L2V)_{Tth} gefunden. Dieses Ergebnis kann als Hinweis auf die regulatorische

Funktion gesehen werden. DafA(L2V)_{Th} bindet demnach *in vitro* an den Translationsapparat, ohne dass DnaK_{Th} und DnaJ_{Th} rekrutiert werden. Kompetitions-experimente zeigten, dass DafA(L2V)_{Th} zwischen den zwei Komplexen wechseln kann. Diese Ergebnisse liefern einen deutlichen Hinweis darauf, dass DafA_{Th} an regulatorischen Prozessen auf Translationsebene beteiligt ist, die im Zusammenhang mit einem neuen Mechanismus der Hitzeschockantwort unter erhöhter Temperatur stehen könnten.

Der zweite Teil der Untersuchungen befasste sich mit der Kooperation zwischen den DnaK_{Th} and ClpB_{Th} Chaperonsystemen bei der Reaktivierung von Proteinaggregaten. Das Ziel dieser Arbeiten war es, Bedingungen *in vitro* zu etablieren, die eine Reaktivierung von Proteinaggregaten durch Koexpression des DnaK_{Th}-ClpB_{Th} Systems ermöglichen. Das *dnaK*_{Th}-Operon mit DnaK- und ClpB-Chaperonsystemen wurde in einen Expressionsvektor kloniert und zur Überexpression der auf dem Vektor kodierten Proteine verwendet. Es ist zu beachten, dass das *dafA*-Gen zuvor erfolgreich aus dem Operon deletiert wurde, um die nötigen Voraussetzungen für ein funktionell aktives DnaK_{Th}-System zu schaffen. Während dieser Arbeiten wurde deutlich, dass *E. coli*-Lysate, in denen die überexprimierten thermophilen Proteine enthalten waren, die Reaktivierung von Proteinaggregaten nicht katalysieren können. Vielmehr hatten die Lysate einen starken inhibitorischen Effekt auf die DnaK_{Th}-ClpB_{Th}-unterstützte Rückfaltung, wenn sie einem Testsystem mit isolierten Chaperonen zugegeben wurden. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob DafA-ähnliche Proteine auch von *E. coli*-Zellen exprimiert werden.