Kinetische und funktionelle Studien am molekularen Chaperon ClpB aus *Thermus thermophilus*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

Sandra Schlee
aus Höchstadt a. d. Aisch

Dortmund 2003

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. 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, April 2003

Man entdeckt keine neuen Erdteile, ohne den Mut zu haben, alte Küsten aus den Augen zu verlieren.

Andre Gide, franz. Schriftsteller, 1869-1951

1. EINLEITUNG 1

1.1 Proteinfaltung in der Zelle 1

1.2 Chaperone und Hitzeschockproteine 2
1.2.1 Hsp60 oder GroEL 4
1.2.2 Hsp70 oder DnaK 5
1.2.3 Hsp100 oder Clp 8

1.3 Zielsetzung 12

2. MATERIAL UND METHODEN 14

2.1 Material 14
2.1.1 Enzyme und Chemikalien 14
2.1.2 Plasmide und PCR-Primer 14
2.1.3 Geräte 15

2.2 Molekularbiologische Methoden 15
2.2.1 Zellzucht 15
2.2.2 Analytische und präparative Agarosegele 16
2.2.3 Klonierung von ClpB/DnaK-Punktmutanten 16

2.3 Darstellung fluoreszierender Nukleotide und Proteine 17
2.3.1 Synthese von Mant-Nukleotiden 17
2.3.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen 19

2.4 Proteinchemische Methoden 20
2.4.1 Proteinreinigung 20
2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 21
2.4.3 HPLC-Gelfiltration zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades 22
2.4.4 Bestimmung des Nukleotidgehaltes von Proteinen 23
2.4.5 *Single-turnover* ATPase 23
2.4.6 Protein-Affiniätschromatographie 23
2.4.6.1 Ko-Elutionsexperimente mit DnaK und ATP-Agarose 23
2.4.6.2 Ko-Elutionsexperimente mit $DnaK_{CHis}$ und Ni-NTA-Agarose 24

2.5 Spektroskopische Methoden 24
2.5.1 Absorptionsspektroskopie 24
2.5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleotiden 24
2.5.1.2 Bestimmung der Steady state-ATPase-Aktivität (Gekoppelter Enzymtest) 25

2.5.1.3 *In vitro*-Test auf Chaperonaktivität (Substratprotein α-Glucosidase) 27
2.5.2 Zirkularer Dichroismus (CD) 27
2.5.3 Fluoreszenzspektroskopie 27
2.5.3.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Gleichgewichtstitration 28
2.5.3.2 Fluoreszenzanisotropie 29
2.5.3.3 Lichtstreuung 29
2.5.4 Messung schneller Kinetiken mittels Stopped-Flow 30
2.5.4.1 Stopped-Flow-Fluoreszenz 30
2.5.4.2 Stopped-Flow-Anisotropie 30
2.5.5 Lumineszenz 31
2.5.5.1 *In vitro*-Test auf Chaperonaktivität (Substratprotein Luziferase) 31

2.6 Auswertung kinetischer Experimente mit *global fit*-Prozeduren 31
2.6.1 Auswertung der Nukleotidbindungskinetiken mit DynaFit 31
2.6.2 Simulation des Bindungsmechanismus mit Scientist 32

3. ERGEBNISSE 34

3.1 Charakterisierung der Nukleotidbindungsdomänen von ClpB 34
3.1.1 Sekundärstruktur und Stabilität der NBD-Mutanten ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) 34
3.1.2 Chaperonaktivität der NBD-Mutanten 35
3.1.3 Die Affinität der NBDs für verschiedene Nukleotide 36
3.1.3.1 Bindung von Mant-Nukleotiden an ClpB 36
3.1.3.2 Bindung von Nukleotiden an ClpB-ANBD 39
3.1.4 ATP-Hydrolyse unter *Single-Turnover*-Bedingungen 40
3.1.5 Nukleotidabhängige Oligomerisierung der ClpB-Mutanten 42

3.2 Interdomänen-Kommunikation im ClpB-Oligomer 45
3.2.1 Kooperative Kinetik der ATP-Hydrolyse 45
3.2.2 Inhibition der Kooperativität von ClpB(wt) durch die NBD-Mutanten 46
3.2.3 Der Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und Chaperonaktivität 48

3.3 Kinetische Charakterisierung der Nukleotidbindung von ClpB(trunc) 49
3.3.1 Eigenschaften der Deletionsmutante ClpB(trunc) 49
3.3.2 Die Abhängigkeit der Nukleotidbindungsaffinität von der ClpB-Konzentration 51
3.3.3 Ermittlung eines Bindungsmechanismus der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) in *Pre-steady-state*-Messungen 55
3.3.3.1 Stopped-Flow-Messungen zur Untersuchung der Bindungskinetik 55
3.3.3.2 Ableitung eines Bindungsmechanismus aus den Stopped-Flow-Messungen 59
3.3.3.3 Verdrängung von Mant-ADP aus einem Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplex durch ADP 62

3.3.4 Simulation des Nukleotidbindungsmechanismus in Scientist 64
3.3.5 Analyse der Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) durch numerische Integration mit DynaFit 66

3.4 Kinetische Charakterisierung der Oligomerisierung von ClpB(wt) 69
3.4.1 Die Geschwindigkeit der Oligomerisierung von ClpB(wt) 69
3.4.2 Messung der Fluoreszenzanisotropie von ClpB-Oligomeren 70
3.4.3 *Stopped-Flow*-Anisotropiemessungen mit ClpB(A94C)-Alexa 73
3.4.3.1 Dissoziation von Oligomeren ausgelöst durch ADP-Bindung 73
3.4.3.2 Dissoziation von Oligomeren nach Erhöhung der Salzkonzentration 75
3.4.3.3 Oligomerisierung nach Erhöhung der ClpB-Konzentration 76
3.4.4 Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) 77
3.4.4.1 Stopped-Flow-Messungen zur Untersuchung der Bindungskinetik 77
3.4.4.2 Globale Analyse der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) mit DynaFit 80

3.5 Wechselwirkung von ClpB mit Substraten 83
3.5.1 Einfluß von Substraten auf die ATPase-Aktivität 83
3.5.2 Wechselwirkung des ClpB-DnaK-Systems mit LDH-Aggregaten 85
3.5.3 Assistenz der Luziferase-Rückfaltung durch das thermophile ClpB-DnaK-System 86
3.5.3.1 Luziferase als Modellsubstrat 86
3.5.3.2 Direkte Wechselwirkung von ClpB(wt) mit hitzedenaturierter Luziferase 87
3.5.3.3 Auswirkung der Substratinteraktion von ClpB(wt) auf die Reaktivierung durch das DnaK-System 88
3.5.3.4 Effekt von ClpB(wt) auf Substrate während der Denaturierung 89
3.5.4 α-Glucosidase als Substrat für das thermophile Chaperonsystem 90

3.6 Wechselwirkung von ClpB(wt) mit DnaK 91
3.6.1 Komplementationsstudien mit ClpB und DnaK aus *T. thermophilus* und *E.coli* 91
3.6.2 Nachweis und Charakterisierung des ClpB-DnaK-Komplexes durch Ko-Elution 93
3.6.2.1 ATP-Agarose-Bindungstest 93
3.6.2.2 Experimente mit Ni-NTA und $DnaK_{CHis}$ 95
3.6.3 Stimulation der ClpB-ATPase-Aktivität durch DnaK 96

4. DISKUSSION 99

4.1 Die Rolle der Nukleotidbindungsdomänen von ClpB 99
4.1.1 Strukturgebende und katalytische Funktion der NBDs in AAA-Proteinen 99
4.1.2 Die Nukleotidbindungseigenschaften von $ClpB_{Tth}$ 99
4.1.3 Die Selbstassoziation von $ClpB_{Tth}$ 101
4.1.4 Kooperative Kinetik der beiden ATPase-Domänen 103

4.2 Kinetik der Oligomerisierung und Nukleotidbindung und ihre Relevanz für die Chaperonaktivität 106

4.2.1 Die Nukleotidbindungskapazität der ClpB-Oligomere unterscheidet sich 106

4.2.2 Die Oligomerisierung von ClpB ist extrem dynamisch 107

4.3 Die Auflösung von Aggregaten durch das ClpB-DnaK-System 108

4.3.1 Allgemeine Modelle zur Kooperation von ClpB und DnaK 108

4.3.2 Die Interaktion von ClpB mit Proteinaggregaten ist direkt, aber kurzlebig 110

4.3.3 Die Reaktivierung durch ClpB und DnaK kann nicht in diskrete Reaktionsschritte unterteilt werden 112

4.3.4 ClpB und DnaK bilden einen spezifischen Komplex 113

4.3.5 ClpB-Oligomerisierung ist für die Komplexbildung notwendig 114

4.3.6 Mechanismus der Reaktivierung von Proteinaggregaten durch das ClpB-DnaK-System 115

4.4 Ausblick 117

5. ZUSAMMENFASSUNG 119

6. SUMMARY 121

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 123

8. LITERATURVERZEICHNIS 125

9. ANHANG 146

9.1 Auswertung von Gleichgewichtstitrationen 146

9.1.1 Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenztitrationen 146

9.1.2 Verdrängungstitrationen 147

9.2 Auswertung kinetischer Experimente mit DynaFit und Scientist 149

9.2.1 Globale Analyse der Nukleotidbindungskinetik mit DynaFit 149

9.2.2 Simulation des Amplitudenverhaltens mit Scientist 151

9.2.3 Analyse von Gleichgewichtstitrationen von ClpB(wt) mit Scientist 152

1. Einleitung

1.1 Proteinfaltung in der Zelle

Proteine übernehmen eine große Vielfalt von strukturgebenden und katalytischen Funktionen in der Zelle. Eine der bemerkenswertesten Aufgaben ist die Unterstützung von Proteinen bei der Faltung in ihre spezifische dreidimensionale Struktur.

Anfinsen zeigte bereits 1961 in seinen klassischen *in vitro*-Experimenten, dass die Rückfaltung von kleinen denaturierten Proteinen ein spontaner Prozess ist (Anfinsen *et al.*, 1961). Die gesamte zur Faltung benötigte Information ist dabei in der Primärsequenz der Aminosäuren enthalten. Ein Großteil der Proteine, besonders solche mit mehreren Domänen und hohem Molekulargewicht, falten *in vitro* jedoch nicht spontan in ihre native Struktur zurück, sondern bilden irreversibel unlösliche Aggregate (Jaenicke, 1987; Goldberg *et al.*, 1991).

Im Vergleich zu *in vitro*-Experimenten ist die Proteinfaltung in der Zelle wesentlich komplexer (Ellis und Hartl, 1999). Die Syntheserate eines Proteins (4-20 Aminosäuren pro s) ist normalerweise niedriger als die Faltungsrate (Radford, 2000). Proteinbiosynthese und Proteinfaltung sind deshalb in der Zelle eng gekoppelt. Die Proteinsynthese an den Ribosomen erfolgt vektoriell, so dass der Faltungsprozess schon co-translational beginnen kann, sobald der N-Terminus das Ribosom verläßt (Frydman und Hartl, 1996). Häufig ist die Proteinfaltung jedoch ein kooperativer Prozess, bei dem die Sequenzinformation der gesamten Proteindomäne (50-300 AS) benötigt wird. So kann es zur Ausbildung von nicht-produktiven Wechselwirkungen innerhalb der naszierenden Proteinkette kommen.

Ein weiteres Problem ist die enorme Proteinkonzentration im Cytosol der Zelle (300-400 g/l). In diesem Milieu sind intermolekulare Wechselwirkungen zwischen partiell gefalteten Proteinen begünstigt, die zur Proteinaggregation führen (van den Berg *et al.*, 1999; Minton, 2000).

Obwohl die dreidimensionale Struktur von Proteinen durch zahlreiche intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert wird, ist die Netto-Stabilisierungsenergie von gefalteten Proteinen relativ gering (30-65 kJ/mol). Der Grund hierfür ist, dass im gefalteten Protein intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Protein und dem Lösungsmittel Wasser durch intramolekulare Proteinwechselwirkungen ersetzt werden. Daher müssen nur kleine Energiebarrieren überschritten werden, um Strukturveränderungen zu bewirken (Makhatadze und Privalov, 1995; Jaenicke, 1996). Dies ist wahrscheinlich auch der Preis für Flexibilität in der Konformation, die für die Funktion der Proteine essentiell ist. Sogenannte Stressfaktoren, wie hohe Temperaturen, hohe Konzentrationen an oxidierenden Substanzen, Änderungen des pH-Wertes oder der osmotischen Bedingungen, können zu konformationeller oder kovalenter Schädigung und damit zur Inaktivierung des Proteins führen. Diese inaktiven Proteine müssen

dann entweder beseitigt oder wieder in ihre funktionelle Form überführt werden, um eine Beeinträchtigung des gesamten Stoffwechsels zu vermeiden.
Faltungsdefekte und Aggregation von Proteinen sind die Ursache einiger schwerwiegender Krankheiten. So werden beispielsweise cystische Fibrose, das Marfan Syndrom oder familiäre Hypercholesterinämie durch Proteine mit Faltungsdefekten ausgelöst (Thomas *et al.*, 1995; Choudhury *et al.*, 1997). Von besonderer Brisanz sind die Prionenkrankheiten, wie beispielsweise die BSE-Erkrankung beim Rind, sowie Amyloidosen, die z.B. symptomatisch für die Alzheimer-Krankheit sind (Sipe, 1992; Selkoe, 2002). Charakteristisch für diese Krankheiten ist die Aggregation von normalerweise löslichen Proteinen und die Bildung unlöslicher Proteinplaques, die sich in verschiedenen Organen anhäufen (Kelly, 1998; Dobson, 1999).

1.2 Chaperone und Hitzeschockproteine

Unter physiologischen Bedingungen ist die Proteinfaltung trotz der genannten Probleme eine hocheffiziente Reaktion – vor allem deshalb, weil eine Gruppe von Proteinen die Proteinfaltung in der Zelle unterstützt. Diese Proteine wurden unter dem Namen „Molekulare Chaperone" (frz. "chaperone" = Anstandsdame) zusammengefaßt, da sie illegitime Interaktionen zwischen Substratproteinen verhindern, aber nicht Bestandteil der gebildeten Strukturen sind (Ellis und van der Vies, 1991). Chaperone sind ubiquitär, d.h. sie kommen in sämtlichen Organismen und Zellkompartimenten vor und gehören außerdem zu den am stärksten konservierten Proteinen. Die Anzahl und Art der Chaperone variiert jedoch in den verschiedenen Lebewesen und korreliert mit der Komplexität des Organismus (Pahl *et al.*, 1997). Viele Chaperone werden unter Hitzeschockbedingungen verstärkt exprimiert, was häufig zu ihrer Identifizierung genutzt wurde und zu der Bezeichung „Hitzeschockproteine" (Hsp) geführt hat (Pelham, 1986). Chaperone werden jedoch auch konstitutiv produziert und sind essentiell für das Zellwachstum unter normalen Bedingungen (Georgopoulos und Welch, 1993). Anhand ihres Molekulargewichtes werden Chaperone in Gruppen unterteilt, wie kleine Hsps, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Hsp100.
Im Gegensatz zu den Faltungskatalysatoren Proteindisulfidisomerase und Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase, die intrinsisch langsame Schritte der Proteinfaltung katalysieren (Freedman *et al.*, 1995; Schmid, 2001), erhöhen klassische Chaperone die Ausbeute der Faltungsreaktion, nicht die Geschwindigkeit. Die verschiedenen Chaperone, die sich stark in Größe und Sequenz unterscheiden, scheinen dabei auf gemeinsame Funktionsprinzipien zurückzugreifen. Im Allgemeinen erkennen Chaperone exponierte hydrophobe Bereiche der Substratproteine, die im nativen Zustand im Inneren des Proteins verborgen sind, und bilden nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Substrat aus. In Zyklen von Substratbindung und Substratfreisetzung, die oft durch ATP-Hydrolyse angetrieben und von Kochaperonen

reguliert werden, wird eine produktive Faltung des Substratproteins ermöglicht. Dabei können Chaperone eine Pufferfunktion übernehmen und Substrate vor unproduktiven Wechselwirkungen schützen oder aktiv konformationelle Arbeit am Substrat verrichten (Ellis, 1994; Hartl und Martin, 1995). Häufig interagieren Proteinsubstrate mit einem Netzwerk verschiedener kooperierender Chaperonsysteme (Freeman und Morimoto, 1996; Ellis, 1999).
Mit dieser Funktionsweise können Chaperone nicht nur die Proteinfaltung nach der Biosynthese und Stress-induzierter Entfaltung unterstützen, sondern auch Proteinkonformationen beim Transport von Proteinen durch Membranen (Ryan und Pfanner, 2001) oder bei der Signaltransduktion regulieren (Buchner, 1999; Pearl und Prodromou, 2001). Ist ein Substratprotein irreversibel geschädigt, so vermitteln Chaperone den Abbau durch Proteasen (Gottesman *et al.*, 1997; Maurizi, 2002).
Die zellulär verfügbaren Chaperone bilden insgesamt ein leistungsfähiges Netzwerk zur Qualitätskontrolle von Proteinen, das auch eine Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ermöglicht (Abb. 1.1).

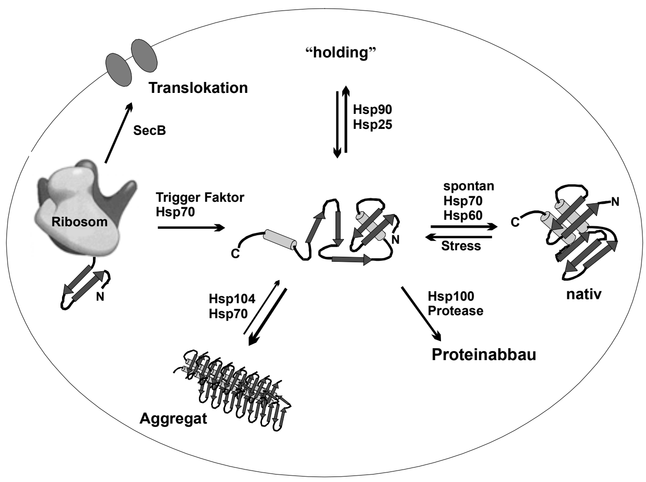


Abb. 1.1: Die Aufgaben von Chaperonen in der Zelle.
Proteine werden am Ribosom synthetisiert und sekretiert oder sie falten nach dem Loslösen vom Ribosom in ihre native Strukur. Während dieses Prozesses sind Proteine aggregationsanfällig und auch bereits native Proteine können z.B. nach Hitzeschock ihre Struktur verlieren. Wechselwirkung mit Chaperonen kann die Aggregation als Nebenreaktion begrenzen. ATP-unabhängige Chaperone (Hsp90, Hsp25) binden entfaltete Proteine und halten sie so in Lösung. Die ATP-abhängigen Chaperone Hsp70 und Hsp60 vermitteln aktiv die Rückfaltung. Gebildete Aggregate können durch ein gemeinsames Einwirken von Hsp70 und Hsp104 teilweise wieder aufgelöst werden. Ist ein Erreichen des nativen Zustands nicht möglich, so erfolgt der Abbau durch Proteasen, die oft mit Hsp100-Chaperonen assoziiert sind.

1.2.1 Hsp60 oder GroEL

Zu den Hsp60-Proteinen gehören die in Eubakterien und Organellen vorkommende GroEL-Familie, TriC im Cytosol von Eukaryonten (Frydman *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1992), sowie das Thermosom in Archaebakterien (Cowan und Lewis, 2001). Hsp60-Proteine werden auch Chaperonine genannt. Die beiden Chaperonine GroEL und GroES aus *Escherichia coli* wurden als erste auch auf molekularer Ebene untersucht, und ihre Funktionsweise gilt als Modell für die assistierte Proteinfaltung im Allgemeinen (Goloubinoff *et al.*, 1989a; Goloubinoff *et al.*, 1989b; Lorimer, 2001).

Das GroEL-Molekül besteht aus zwei Ringen mit je sieben identischen GroEL-Monomeren. Jedes Monomer umfaßt eine äquatoriale und eine apikale Domäne, die durch eine Mitteldomäne miteinander verbunden sind. Schon elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die beiden Ringe zwei getrennte Hohlzylinder bilden, die als Faltungskammern für Polypeptidsubstrate dienen (Langer *et al.*, 1992b; Chen *et al.*, 1994). Inzwischen sind mehrere Kristallstrukturen verfügbar, die ein detailliertes Bild des GroEL-Moleküls geben (Abb. 1.2) (Braig *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1997; Chen und Sigler, 1999). Übergänge zwischen den verschiedenen funktionellen Zuständen sind mit umfaßenden Strukturänderungen des Moleküls verbunden und werden durch die Bindung von ATP und dem Kochaperon GroES kontrolliert (Chen *et al.*, 1994; Roseman *et al.*, 1996; Saibil *et al.*, 2001).

Die ATP-Bindungsstellen, je eine pro Monomer, sind auf der äquatorialen Domäne im Inneren des Hohlzylinders lokalisiert. Die Untereinheiten eines Rings (cis-Ring) binden ATP mit positiver Kooperativität, die ATP-Bindung an den cis-Ring reduziert jedoch die Affinität des entgegengesetzten Rings (trans-Ring) für ATP (Yifrach und Horovitz, 1994; Burston *et al.*, 1995; Horovitz *et al.*, 2001). Hydrophobe Taschen am äußeren Rand der Ringe sind für die Substratbindung verantwortlich und wechselwirken außerdem mit GroES (Chen *et al.*, 1994; Fenton *et al.*, 1994). Das Kochaperon GroES kann als kuppelförmiges Heptamer an beide Seiten des von ADP oder ATP besetzten $GroEL_{14}$-Zylinders binden (Chandrasekhar *et al.*, 1986; Richardson *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass der $GroES_7 \cdot ADP_7 \cdot GroEL_7/GroEL_7$-Komplex die „Akzeptor-Form" von GroE verkörpert, die an entfaltete Polypeptide bindet (Weissman *et al.*, 1995). Ein potentielles Substrat wird anhand von exponierten hydrophoben Oberflächen erkannt (Lin *et al.*, 1995).

Im produktiven Chaperonzyklus werden Substrate durch die Bindung von $GroES_7$ im Inneren des $GroEL_{14}$-Zylinders eingeschlossen (Mayhew *et al.*, 1996). Die Bindung von $GroES_7$ löst eine Reihe von Konformationsänderungen aus, die zu einer Vergrößerung des Hohlraums und der Maskierung der hydrophoben Reste führt, die die Substratbindung vermitteln (Crouy-Chanel *et al.*, 1995; Roseman *et al.*, 1996). Gleichzeitig wird die Affinität für ADP und GroES im trans-Ring vermindert, was zur Dissoziation der beiden Liganden führt (Todd *et al.*, 1994; Hayer-Hartl *et al.*, 1995). Der cis-Ring bietet nun eine geschützte Mikrokammer für die Faltung des eingeschlossenen Substrats („Anfinsen-Käfig“) (Ellis, 2001). Die ATP-Hydrolyse dient als Zeitgeber der Reaktion (Rye *et al.*, 1997). Ist die ATP-Hydrolyse abgeschlossen, so ist der Zyklus beendet und der trans-Ring wird mit einem Polypeptid beladen. Die Freisetzung des eingeschlossenen Proteins erfolgt bei der nun folgenden Bindung von GroES/ATP an den trans-Ring. Freigesetzte Substrate sind einer kinetischen Partitionierung unterworfen (Todd *et al.*, 1994; Burston *et al.*, 1996). Sie können sich entweder in freier Lösung falten, erneut an GroEL binden und einen weiteren Zyklus durchlaufen oder mit anderen Chaperonen wechselwirken.

Der Umfang der Mikrokammer limitiert die Größe der Substrate auf weniger als 60 kD (Ewalt *et al.*, 1997; Sakikawa *et al.*, 1999). Studien mit denaturierten Proteinen aus Zellextrakten zeigen, dass ~ 40% der *E. coli*-Proteine an GroEL binden (Viitanen *et al.*, 1992). Man geht jedoch davon aus, dass nur 10-15% der neusynthetisierten Proteine zwingend auf die Assistenz von GroEL angewiesen sind (Lorimer, 1996; Houry *et al.*, 1999).

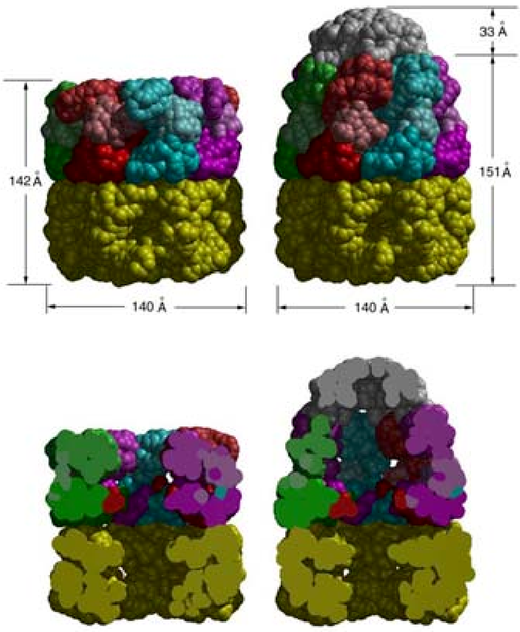


Abb. 1.2: Architektur und Dimensionen von GroEL und GroEL-GroES-(ADP)$_7$ (Sigler *et al.*, 1998)
Abgebildet sind van der Waals Sphärenmodelle von GroEL (links) und GroEL-GroES-(ADP)$_7$ (rechts). Die oberen Bilder zeigen die Außenseiten der Moleküle, die unteren Bilder geben den Blick auf die Innenseite der Moleküle frei. Verschiedene Farben kennzeichnen die sieben Untereinheiten des cis-Rings. Die drei verschiedenen Domänen einer Untereinheit (apikale, Verbindungs- und äquatoriale Domäne) werden durch verschiedene Schattierungen kenntlich gemacht. Der trans-Ring ist gelb, die GroES-Kappe grau gefärbt.

1.2.2 Hsp70 oder DnaK

Hsp70-Proteine umfassen eine große Gruppe von Chaperonen, die an einem breiten Spektrum von Faltungsprozessen beteiligt sind. Vertreter wurden in nahezu allen Organismen und Zellkompartimenten gefunden und die Konzentration einzelner Vertreter im Cytosol (~ 50 µM) übertrifft sogar die der Ribosomen (~ 30 µM) (Hartl, 1996; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Die bekanntesten Vertreter der Hsp70-Familie sind Hsc70 aus Rind, das ER-Homologe BiP und DnaK aus *E. coli* (Mayer *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu GroEL schließt DnaK sein Substrat nicht vollständig ein, sondern bindet kurze Peptidsegmente mit hydrophoben Aminosäuren, die von nicht-nativen Proteinen exponiert werden (Fourie *et al.*, 1994; Rüdiger *et al.*, 1997). Wie die Struktur der Peptidbindungsdomäne von $DnaK_{Eco}$ im Komplex mit einem Peptidsubstrat zeigt (Abb 1.3A), werden Peptide in gestreckter Konformation über hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken zum Peptidrückgrat gebunden (Landry *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1996). Neben der Substratbindungsdomäne besitzt Hsp70 eine hochkonservierte N-terminale ATPase-Domäne (Abb. 1.3B). Strukturen von diversen ATPase-Domänen (Hsc70 aus Rind, DnaK aus *E. coli* und humanes Hsp70) (Flaherty *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1997; Sriram *et al.*, 1997) haben große Ähnlichkeit mit Strukturen der nukleotidbindenden Proteine Aktin und Hexokinase (Flaherty *et al.*, 1990). Die Struktur eines vollständigen Hsp70, die Rückschlüsse auf die strukturelle Basis der funktionellen Kopplung zwischen ATPase- und Substratbindungsdomäne ermöglichen würde, ist nicht verfügbar.

Die Kommunikation zwischen den beiden Domänen ist notwendig, denn das gebundene Nukleotid bestimmt die Substratbindungseigenschaften von Hsp70 (McCarty *et al.*, 1995; Buchberger *et al.*, 1995). Im ATP-Zustand werden Substrate schnell aber mit geringer Affinität gebunden, wohingegen DnaK·ADP·P_i Substrate langsam, aber hochaffin bindet. Es ist anzunehmen, dass Substratproteine zuerst mit DnaK·ATP wechselwirken. Nach dem Prinzip des „locking in“ stabilisiert die ATP-Hydrolyse dann die Interaktion mit dem Substrat (Greene *et al.*, 1995).

ATP-Hydrolyse als auch der ADP/ATP-Austausch werden durch die beiden Kochaperone DnaJ (41 kD) und GrpE, einen Homodimer mit 20 kD-Untereinheiten, reguliert (Liberek *et al.*, 1991). Strukturelle und kinetische Aspekte der Regulierung durch Kochaperone sind an DnaK aus *E. coli* am besten untersucht (Pellecchia *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1997). Die N-terminale J-Domäne von $DnaJ_{Eco}$ interagiert mit $DnaK_{Eco}$ und beschleunigt die ATP-Hydrolyse mindestens 500-fach (Pellecchia *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1999; Laufen *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 1999). Die C-terminale Domäne von $DnaJ_{Eco}$ bindet mit ähnlicher Substratspezifität und vergleichbarer Geschwindigkeit an entfaltete Proteine wie DnaK ATP (Gamer *et al.*, 1992; Langer *et al.*, 1992a; Rüdiger *et al.*, 2001). $DnaJ_{Eco}$ wirkt folglich nicht nur als Aktivator der ATPase, sondern könnte auch Substratproteine für DnaK rekrutieren.

$GrpE_{Eco}$ hat die Aufgabe eines Nukleotidaustauschfaktors. Die Wechselwirkung des GrpE-Dimers mit $DnaK_{Eco}$ bewirkt eine Öffnung der Nukleotidbindungstasche und verringert die Affinität von $DnaK_{Eco}$ für Nukleotide um den Faktor 200 (Packschies *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 1997). Da die ATP-Konzentration in der Zelle ca. 5-fach höher ist als die ADP-Konzentration, kann $DnaK_{Eco}$ nach der Freisetzung von ADP wieder ATP binden. Dies führt zur Dissoziation des DnaK-Peptid Komplexes und der Reaktionszyklus ist somit abgeschlossen (Abb. 1.3C).

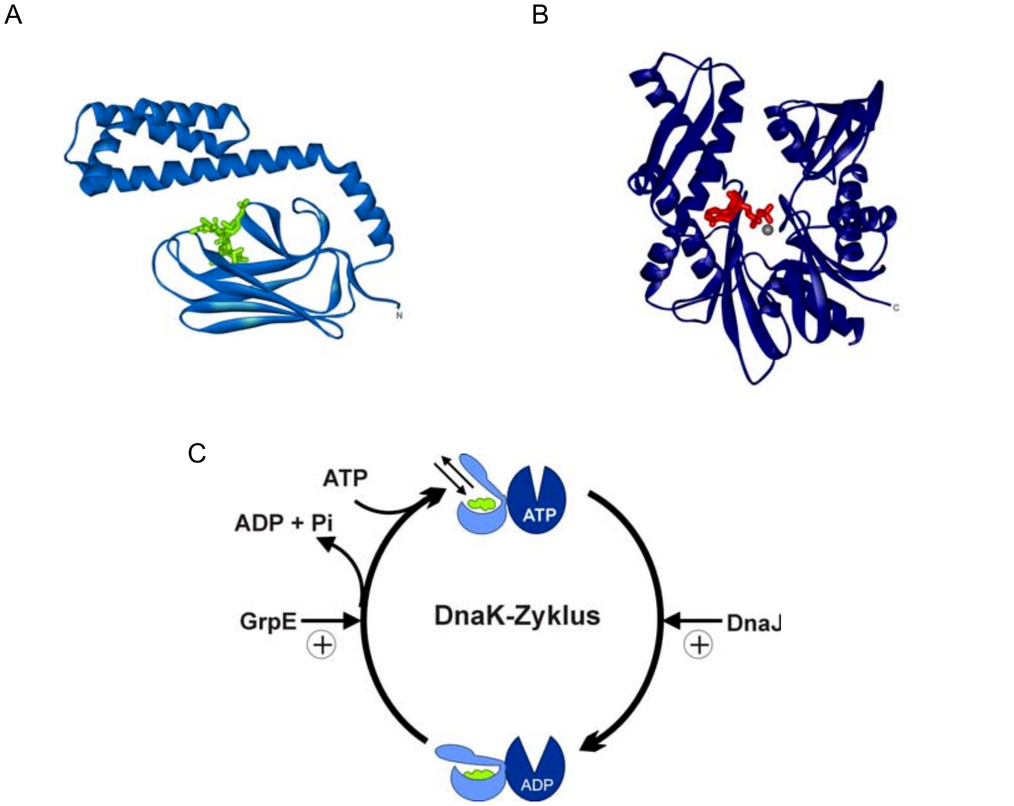


Abb. 1.3: Struktur von DnaK und Modell des ATPase-Zyklus.

(A) Abgebildet ist die Kristallstruktur der Substratbindungsdomäne von DnaK aus *E. coli* (hellblau) im Komplex mit einem Peptidsubstrat (grün) (Zhu *et al.*, 1996). (B) Hier ist die Kristallstruktur der ATPase-Domäne von Hsc70 aus Rind (dunkelblau) im Komplex mit ATP (rot) und Mg^{2+} (grau) gezeigt (Flaherty *et al.*, 1990). (C) Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von $DnaK_{Eco}$: Im ATP-Zustand erfolgt die Bindung und Dissoziation des Substrats mit hoher Geschwindigkeit. Im ADP-Zustand ist das Substrat in der Substratbindungsdomäne eingeschlossen und fest an DnaK gebunden. Der Übergang von der niedrigaffinen zur hochaffinen Konformation erfolgt durch ATP-Hydrolyse, die durch die Interaktion mit Substrat und dem DnaJ-Kochaperon ausgelöst wird. Der ADP-ATP-Austausch, der über die Dauer der Substratbindung entscheidet, wird durch das GrpE-Kochaperon reguliert.

Die Bindungs- und Freisetzungszyklen sind relativ kurz (~ ein Zyklus pro s) (Theyssen *et al.*, 1996; Packschies *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1998; Laufen *et al.*, 1999) und müssen wahrscheinlich oft wiederholt werden, bis ein Substratprotein den nativen Zustand erreicht. Der Mechanismus der von DnaK assistierten Rückfaltung ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Hypothese ist, dass DnaK im Gegensatz zu GroEL eine lokal begrenzte Entfaltung des Substratproteins bewirkt (Mayer *et al.*, 2000). Untersuchungen mit Zellextrakten zeigen, dass keine Größenlimitierung für Hsp70 Substrate vorhanden ist und Proteine >60 kD während ihrer Faltung in besonderem Maße auf die Assistenz von Hsp70 angewiesen sind (Mogk *et al.*, 1999; Deuerling *et al.*, 1999).

Die Chaperone des DnaK-Systems sind auch im thermophilen Organismus *Thermus thermophilus* vorhanden (Motohashi *et al.*, 1994). Besonders die Regulation durch Kochaperone unterscheidet sich deutlich von dem DnaK-System aus *E. coli*. So stimuliert $DnaJ_{Tth}$ die ATPase-Aktivität von $DnaK_{Tth}$ nicht und bindet auch nicht selbstständig an Peptide (Klostermeier *et al.*, 1999). $GrpE_{Tth}$ dagegen beschleunigt die Nukleotidfreisetzung von $DnaK_{Tth}$ um den Faktor 80.000 und ist somit wesentlich effektiver als $GrpE_{Eco}$ (Groemping *et al.*, 2001). Außerdem konnte ein stabiler 300 kDa-Komplex isoliert werden, der sich aus jeweils drei Molekülen DnaK, DnaJ und einem neuartigen Protein, dem DnaK-DnaJ-Assembly-Faktor Daf, zusammensetzt (Motohashi *et al.*, 1996). Dieser Komplex stellt eine inaktive Form des Chaperonsystems dar. $DafA_{Tth}$ wird durch hohe Substratkonzentrationen aus dem trimeren Komplex verdrängt und das Chaperonsystem dadurch aktiviert (Klostermeier *et al.*, 1999).

1.2.3 Hsp100 oder Clp

Eine erst vor kurzem entdeckte Chaperongruppe umfaßt die Hsp100- oder Clp-Familie (Clp: caseino lytic protease). Diese große Gruppe von homologen ATPasen ist maßgeblich an Reaktionen beteiligt, die die Auflösung von Proteinkomplexen und Aggregaten erfordern. Auch in dieser Gruppe sind die Vertreter aus Prokaryonten am besten charakterisiert; *E. coli* besitzt beispielsweise vier Clp-ATPasen: ClpA (Gottesman *et al.*, 1990), ClpB (Squires *et al.*, 1991), ClpX (Gottesman *et al.*, 1993) und HslU (Chuang *et al.*, 1993; Rohrwild *et al.*, 1997). Homologe Proteine wurden jedoch auch in einigen Archaea, in Hefe, Pflanzen, Insekten und dem Menschen identifiziert (Clarke, 1996; Gottesman *et al.*, 1997; Wickner *et al.*, 1999; Horwich *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer Domänenorganisation werden Hsp100-Proteine in zwei Klassen unterteilt: Die Mitglieder der Klasse 1, wie ClpA und ClpB aus *E. coli*, Hsp104 aus *Saccharomyces cerevisiae* und ClpC in Pflanzen, besitzen zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBDs). Die NBDs werden durch Sequenzen unterschiedlicher Länge getrennt und von amino- bzw. carboxyterminalen Regionen flankiert (Abb. 1.4A) (Schirmer *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2002). Während sich NBD1 und NBD2 stark voneinander unterscheiden, sind NBD1 bzw. NBD2 innerhalb der Klasse 1 hochkonserviert. Proteine der Klasse 2 besitzen nur eine NBD, die strukturell mit der zweiten ATP-Bindungsdomäne der Klasse 1 verwandt ist. Sequenzanalysen legen nahe, dass die Clp-ATPasen zu der AAA^+ Superfamilie der ATPasen (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) gehören (Patel und Latterich, 1998; Neuwald *et al.*, 1999). Das Hauptmerkmal dieser Familie ist ein hochkonserviertes ATP-Bindungsmodul, welches einen Kern mit einem α-β-α Nukleotidbindungsmotiv und eine C-terminale Domäne mit mindestens drei α-Helices enthält (Abb. 1.4B). Charakteristische

Bestandteile des Bindungsmoduls sind ferner das Walker A Motiv (GX_4GKT), welches an der Bindung des γ-Phosphats von ATP beteiligt ist (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990), und das Walker B Motiv (xxDE), das bei der Koordinierung des Mg-Ions in der Nukleotidbindungstasche eine Rolle spielt. Ein weiteres Kennzeichen ist eine C-terminal lokalisierte Sensordomäne (SSD, *sensor and substrate discrimination domain*), die eine Rolle bei der Substraterkennung spielen soll (Smith *et al.*, 1999; Wickner und Maurizi, 1999). Viele Mitglieder der AAA^+-ATPasen wie NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) oder das Dynein Motorprotein sind Komponenten von molekularen Maschinen, die einfache mechanische Bewegungen katalysieren und so die Bildung oder Auflösung von Makromolekülen betreiben (Maurizi und Li, 2001).

Wie biochemische Untersuchungen mit Gelfiltration und Ultrazentrifugation sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, bilden Clp-ATPasen in Gegenwart von ATP oder nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga hexamere Ringe (Abb. 1.4C) (Parsell *et al.*, 1994a; Rohrwild *et al.*, 1997; Grimaud *et al.*, 1998; Zolkiewski *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Gallie *et al.*, 2002). Die Clp-ATPasen wurden zunächst als ATPase-Komponenten von Proteasen identifiziert (Hwang *et al.*, 1988; Wawrzynow *et al.*, 1995), da sie im stabilen Komplex mit einer Serinprotease, ClpP oder HslV, vorliegen (Maurizi *et al.*, 1990). Das proteolytisch aktive Zentrum der Clp-Proteasen liegt geschützt im Zentrum zweier ClpP-Ringe und ist nur durch die von den Clp-ATPasen auf beiden Seiten gebildeten axialen Kanäle zugänglich (Beuron *et al.*, 1998). Wie Kristallstrukturen des HslUV-Komplexes aus *E. coli* (Bochtler *et al.*, 2000) und HslUV aus *H. influenzae* (Sousa *et al.*, 2000) belegen, sind die durch die Clp-Ringe gebildeten Poren an beiden Enden des proteolytischen Zentrums so klein (∅ 10 Å), dass nur entfaltete Proteine ohne größere Konformationsänderungen passieren können. Die gegenwärtige Arbeitshypothese besagt, dass die ATPase-Komponenten die Energie der ATP-Hydrolyse nutzen, um Substrate zu entfalten und dem proteolytischen Zentrum zuzuführen (Gottesman *et al.*, 1997; Larsen und Finley, 1997). So konnte anhand eines markierten fluoreszierenden Proteins (GFP) bewiesen werden, dass ClpA in Abwesenheit von ClpP Proteine in einer ATP-abhängigen Reaktion entfaltet (Weber-Ban *et al.*, 1999). Die Entfaltung verläuft prozessiv ausgehend von der Signalsequenz des Substrats, und die entstandene Peptidkette wird unidirektional von der Chaperonkomponente ins Proteasezentrum transportiert und dort abgebaut (Lee *et al.*, 2001). Substrate für den Abbau können direkt über eine Erkennungssequenz mit der N-terminalen Domäne von ClpA oder ClpX wechselwirken (Ortega *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2001). Eine wichtige Signalsequenz für den Abbau durch das ClpAP/ClpXP-System ist die SsrA-Sequenz, die an Proteine angehängt wird, wenn sie am Ribosom aufgrund eines fehlenden Stop-Codons steckenbleiben (Gottesman *et al.*, 1998). Die Substratspezifität der Clp-ATPasen kann auch durch spezifische

Adaptorproteine wie RssB (Zhou *et al.*, 2001) oder ClpS (Dougan *et al.*, 2002) moduliert werden. ClpS interagiert mit der N-terminalen Domäne von ClpA und lenkt die ClpAP-Aktivität von SsrA-markierten Proteinen um auf aggregierte Substrate um.

Im Gegensatz zu anderen AAA^+ Proteinen, interagiert ClpB nicht mit einer Protease, sondern geht eine funktionelle Kooperation mit dem DnaK-System ein, um Proteinaggregate aufzulösen (Glover und Lindquist, 1998; Mogk *et al.*, 1999; Zolkiewski, 1999). Die Auflösung von Aggregaten wird besonders bei sehr hohen Temperaturen notwendig. Unter solchen Bedingungen wird aufgrund der großen Zunahme an missgefalteten Proteinen die Kapazität der vorhandenen Chaperone überschritten, die Proteine durch ihre „Halterfunktion" vor Aggregation schützen, und es kommt vermehrt zur Proteinaggregation. Zellen können nach einem schweren Hitzeschock nur überleben, d.h. Thermotoleranz entwickeln, wenn es gelingt die aggregierten Proteine wieder zu reaktivieren. Zelllinien und Organismen wie *S. cerevisiae* oder *Arabidopsis thaliana*, die ClpB oder das Homologe Hsp104 aufgrund einer Mutation nicht produzieren, entwickeln nur sehr schwache Thermotoleranz (Squires *et al.*, 1991; Parsell *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1992; Hong und Vierling, 2000) und bilden verstärkt unlösliche Proteinaggregate (Parsell *et al.*, 1994b). *In vitro* sind Hsp104 und ClpB an der Reaktivierung von Proteinen beteiligt, die vorher denaturiert wurden und Aggregate gebildet hatten (Glover und Lindquist, 1998; Mogk *et al.*, 1999; Zolkiewski, 1999; Motohashi *et al.*, 1999; Diamant *et al.*, 2000). Diese Aktivität wird nicht von ClpB oder Hsp104 alleine, sondern nur in Kooperation mit dem DnaK/Hsp70-System durchgeführt. Das DnaK-System ist bei großem molaren Überschuss auch in der Lage kleinere Proteinaggregate aufzulösen, in Gegenwart von ClpB sind jedoch schon katalytische Mengen ausreichend, um auch größere Aggregate zu reaktivieren (Ziemienowicz *et al.*, 1993; Diamant *et al.*, 2000). Durch die selektive Inaktivierung von ClpB mit anorganischem Sulfat, einem spezifischen Inhibitor der ClpB-Aktivität, wurden zwei Phasen bei der Rückfaltung aggregierter Proteine identifiziert (Goloubinoff *et al.*, 1999; Ben Zvi und Goloubinoff, 2001). In einem ersten Schritt werden Proteinaggregate durch ein gemeinsames Einwirken von ClpB und DnaK so vorbereitet, dass in der zweiten Phase nur noch das DnaK-System für die Rückfaltung der Substrate notwendig ist. Der genaue Mechanismus der DnaK/ClpB-Kooperation und ihrer Interaktion mit dem Proteinaggregat ist nicht bekannt.

Die enge funktionelle Verbindung zwischen ClpB und dem DnaK-System spiegelt sich auch darin wieder, dass beide Chaperonsysteme in dem thermophilen Organismus *T. thermophilus* in einem Operon liegen (Motohashi *et al.*, 1999; Klostermeier *et al.*, 1999). Die Expression von ClpB als auch der Chaperone des DnaK-Systems wird in *E. coli* von dem Hitzeschockpromotor σ_{32} kontrolliert (Kitagawa *et al.*, 1991).

Neben der Funktion bei der Aggregatsauflösung spielt Hsp104 außerdem eine Rolle bei der Verbreitung von Prionen. [*PSI*+], ein cytoplasmatisch vererbtes genetisches Element in Hefe, basiert auf einem Prionen-ähnlichen Aggregat des zellulären Proteins Sup35 (Tuite, 1994). Für die Weitergabe des [*PSI*+]-Faktors ist eine definierte Konzentration an Hsp104 in der Zelle notwendig; Überexpression oder Inaktivierung von Hsp104 führen zu einem Verlust des [*PSI*+]-Faktors (Chernoff *et al.*, 1995; Patino *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass Hsp104 direkt mit Sup35 wechselwirkt und Sup35 dadurch in eine Konformation überführt, die die Aggregation begünstigt (Lindquist, 1997; Serio und Lindquist, 2001). *In vitro*-Studien belegen einen Einfluß von Hsp104 auf die Umwandlung des Prionproteins PrP^{c} aus Säugetieren in seine infektiöse Form PrP^{Sc} (DebBurman *et al.*, 1997).

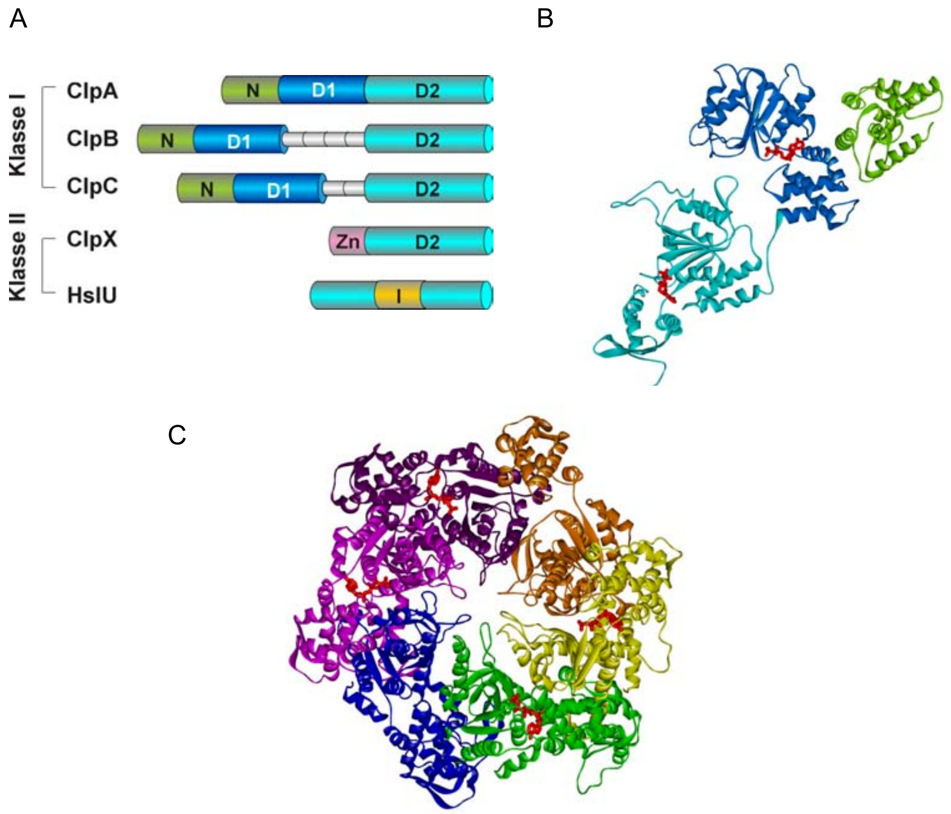


Abb. 1.4: Organisation und Struktur von Proteinen der Clp-Familie.

(A) Mitglieder der Klasse I bestehen aus einer variablen N-terminalen Domäne (N) und zwei hochkonservierten NBDs, die durch eine Verbindung mit variabler Länge getrennt werden. Proteine der Klasse II enthalten nur eine NBD. (B) Die Kristallstruktur eines Monomers von ClpA aus *E. coli* (Guo *et al.*, 2002) im Komplex mit ADP (rot) zeigt, dass die N-terminale Domäne (grün), sowie NBD1 (blau) und NBD2 (cyan) deutlich voneinander abgesetzt sind. (C) Die hexamere Ringform mit einer zentralen Pore, hier von HslU aus *E.coli* (Bochtler *et al.*, 2000), ist ein Merkmal von AAA^{+} -Proteinen.

Die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Aggregaten scheint ein einzigartiges und evolutionär konserviertes Merkmal der Hsp100-Chaperone zu sein. Untersuchungen zu Fragestellungen wie dem Modus der Wechselwirkung mit Aggregaten, dem Mechanismus der Aggregatsauflösung oder der Kinetik von Substrat- und Nukleotidbindung sollten nicht nur das Verständnis für die komplexen Vorgänge der Proteinfaltung und –aggregation erhöhen, sondern auch neue Ansatzpunkte für die Behandlung von Prionenkrankheiten und altersbedingten Krankheiten bieten.

1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Funktion und Kinetik des Chaperons ClpB aus *T. thermophilus* charakterisiert werden. ClpB besitzt zwei Nukleotidbindungsdomänen und die ATP-Hydrolyse ist für seine Chaperonaktivität, die Auflösung von Aggregaten, absolut notwendig. Außerdem unterliegt ClpB einer nukleotidabhängigen Oligomerisierung.

Mit Hilfe von P-Loop-Mutanten des ClpB, in denen selektiv eine Nukleotidbindungsdomäne inaktiviert wurde, sollte zunächst die Bedeutung der beiden NBDs für die Nukleotidbindung, ATP-Hydrolyse, Oligomerisierung und Chaperonaktivität bewertet werden. Eine funktionelle Charakterisierung der beiden NBDs war bereits für Hsp104 aus Hefe und ClpB aus *E. coli* vorgenommen worden. So beeinträchtigten Mutationen der NBD1 von Hsp104 die ATP-Hydrolyse, während Mutationen der NBD2 nur Auswirkungen auf die Oligomerbildung hatten (Schirmer *et al.*, 1998). Trotz der hohen Konservierung der beiden NBDs erfolgte die Rollenzuweisung für die NBDs von ClpB aus *E. coli* genau umgekehrt (Kim *et al.*, 1998). Die Funktion der beiden NBDs war demnach nicht eindeutig geklärt.

Nukleotidbindungsaffinitäten und Ratenkonstanten für den Nukleotidzyklus von ClpB sollten anhand von fluoreszierenden Nukleotidanaloga und fluoreszenzmarkierten ClpB-Mutanten bestimmt werden. Eine genaue Untersuchung der oligomeren Zustände von ClpB unter verschiedenen Bedingungen sowie der Dynamik der Oligomerisierung war notwendig, um zu sehen, welche oligomere Form die als Chaperon aktive darstellt. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollte die Kinetik des Nukleotidzyklus und der Oligomerisierung miteinander korreliert werden, um so eventuell Rückschlüsse auf den Mechanismus der Aggregatsauflösung zu ziehen. Ziel war die Formulierung eines Modells, das die Interdependenz von Nukleotidbindung und Oligomerisierung deutlich macht.

Von besonderem Interesse war darüberhinaus die funktionelle Kooperation zwischen ClpB und dem DnaK-System. In *in vitro*-Experimenten mit denaturierten und aggregierten Substratproteinen sollte untersucht werden, ob ClpB alleine mit Proteinaggregaten interagiert oder nur in Gegenwart von DnaK aktiv ist. Es galt zu klären, ob ein sequentieller Mechanismus vorliegt, bei dem beide Chaperone nacheinander auf das Substrat einwirken und eventuell ein Transport von Intermediaten zwischen beiden Systemen stattfindet. Oder ob die Auflösung der Aggregate durch eine kooperative Aktion beider Chaperonsysteme erreicht wird, was die Bildung eines Chaperonkomplexes wahrscheinlich macht. Deshalb sollte festgestellt werden, ob es eine wechselseitige Beeinflussung der Substratbindungs- oder Nukleotidbindungseigenschaften zwischen ClpB und DnaK gibt. Der Interaktionspartner von ClpB innerhalb des DnaK-Systems sollte identifiziert werden und schließlich vorhandene Komplexe isoliert und charakterisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil publiziert (Schlee *et al.*, 2001; Beinker *et al.*, 2002) oder werden zur Publikation vorbereitet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme und Chemikalien

Pyruvatkinase wurde von Boehringer (Mannheim), DNAseI und LDH (aus Schweinemuskel) von Roche Diagnostics (Mannheim), Luziferase von Promega (Mannheim), Taq-Polymerase von Qiagen (Hilden), α-Glucosidase und LDH_{Bst} von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und T4-DNA-Ligase, sowie die Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI und NdeI von New England Biolabs (Beverly, USA) bezogen.
Die verwendeten Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden "reinst" oder "p.A." von folgenden Herstellern bezogen:

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Lieferanten

Hersteller	Produkt
AppliChem (Darmstadt)	Acrylamid 4K-Lösung (30%), $(NH_4)_2SO_4$
J.T.Baker (Deventer, NL)	Acetonitril (HPLC-grade), Ethanol, Essigsäure, HCl, $HClO_4$, Isopropanol, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgCl_2$, $MgSO_4$, NaCl, NaOH, Na_2SO_4, Triethylamin
Fluka (Neu-Ulm)	TCA
Gerbu (Gailberg)	Borsäure, DTE, EDTA, GdnHCl, Glycerin, HEPES, IPTG, Kanamycin, MOPS
GibcoBRL (Karlsruhe)	Agar, Hefeextrakt, Trypton
Roche Diagnostics (Mannheim)	NADH, PEP, Protease Inhibitor Tabletten
Roth (Karlsruhe)	Tris, Glycin
Serva (Heidelberg)	APS, Bromphenolblau, Coomassie Blue-R250/G250, SDS, TEMED, Xylencyanol
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	ADP, ATP, ATPγS, dADP, Betaine, BSA, CoenzymA, Ethidiumbromid, β-Mercaptoethanol, Methyl-Isatosäureanhydrid, para-Nitrophenylglucosid, Sucrose

2.1.2 Plasmide und PCR-Primer

Chaperone aus *Thermus thermophilus* wurden in *E.coli* BL21(DE3) (Studier und Moffatt, 1986) überproduziert. Die Expressionsplasmide sind Derivate der pET-Serie (Novagen, Madison, USA) und tragen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Die Gene der *Thermus*-Proteine stehen unter Kontrolle eines von der T7-Polymerase abhängigen Promotors. Der defekte Prophage DE3 enthält das Gen für die T7-Polymerase, dessen

Transkription vom IPTG-induzierbaren lacUV5-Promotor kontrolliert wird. Die nach IPTG-Zugabe synthetisierte T7-Polymerase kann dann die *Thermus*-Gene transkribieren, da der Operator dereprimiert ist.

Gene der Punktmutanten ClpB(A212C), ClpB(T611C) und DnaK(E168A) wurden durch gerichtete Mutagenese in zwei PCR-Reaktionen nach der Methode von Ho *et al.* (Ho *et al.*, 1989) mit pRS-ClpB$_{Tth}$(wt) bzw pRS-DnaK$_{Tth}$(wt) als Template hergestellt. Die für die Mutagenese verwendeten Primer sind in Tab. 2.2 angegeben.

Tab. 2.2 Primersequenzen für gerichtete Mutagenese

Mutante	Primer	Sequenz
Alle Mutanten	T7promotor	5´-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA-3´
	T7terminator	5´-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG C-3´
ClpB(A212C)	ClpBA212C-for	5´-ATC GTG GAG GGC CTG TGC CAG CGC ATC-3´
	ClpBA212C-rev	5´-CTT GAC GAT GCG CTG GCA CAG GCC CTC CAC GAT-3´
ClpB(T611C)	ClpBT611C-for	5´-AAG ACC CTG GCC GCC TGC CTC TTT GAC ACC GAG-3´
	ClpBT611C-rev	5´-CTC GGT GTC AAA GAG GCA GGC GGC CAG GGT CTT-3´
DnaK(E168A)	DnaKE168A-for	5´-CGC ATC ATC AAC GCT CCC ACC GCC GCC-3´
	DnaKE168A-ref	5´-GGC GGC GGT GGG AGC GTT GAT GAT GCG-3´

2.1.3 Geräte

Für sämtliche HPLC-Applikationen wurde ein computergesteuertes System von Waters (Milford, Massachusetts, USA), bestehend aus Pumpe, Autosampler, automatischer Entgasereinheit, 2-Kanal-Absorptionsdetektor, Fluoreszenzdetektor, Fraktionssammler und der Software Millennium32 (Version 3.05) benutzt. Die einzelnen Laufprogramme sind bei der jeweiligen Anwendung (Nukleotidsynthese, ATP-Hydrolyse, Gelfiltration) beschrieben.

Die säulenchromatographischen Reinigungsschritte wurden an einer Waters FPLC 650E (Milford, Massachusetts, USA), bestehend aus Pumpe, Autosampler, Mehrfach-Wellenlängen-Detektor 490E und Analog-Schreiber durchgeführt. Die Reinigungsprotokolle sind ebenfalls bei der entsprechenden Anwendung (Proteinreinigung) beschrieben.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Zellzucht

Thermophile Chaperone wurden in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit dem entsprechenden pRS-Vektor exprimiert. 10 l 2TY-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin wurden hierzu mit einer Übernachtkultur 1:50 angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Überproduktion wurde bei einer OD_{600} von 0.5-0.6 mit 1 mM IPTG induziert. 4 h nach Induktion wurden die Bakterien zentrifugiert (Sorvall Rotor H6000A, 5000 rpm, 4°C, 15 min), das Zellpellet mit 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in flüssigem N_2 eingefroren und bei –80°C gelagert.

- 2TY-Medium: 16 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl pro Liter H_2O, pH 7.2

2.2.2 Analytische und präparative Agarosegele

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im analytischen und präparativen Maßstab erfolgte durch horizontale Agarosegelelektrophorese mit 1.0%igen Agarosegelen in TBE-Puffer. Die Färbung der DNA-Banden wurde durch Zugabe von 0.5* mg/l Ethidiumbromid erreicht. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1:5 Volumen Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese bei einer elektrischen Feldstärke von 10V/cm durchgeführt. Die Detektion der DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm.

- TBE-Puffer: 90 mM Tris, pH 8.3, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
- Probenpuffer: 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 40% Sucrose in 50 mM EDTA, pH 8.0

2.2.3 Klonierung von ClpB/DnaK-Punktmutanten

Gene der Punktmutanten $ClpB_{Tth}$(A212C), $ClpB_{Tth}$(T611C) und $DnaK_{Tth}$(E168A) wurden durch gerichtete Mutagenese in zwei PCR-Reaktionen nach der Methode von Ho *et al.* (Ho *et al.*, 1989) mit pRS-$ClpB_{Tth}$(wt) bzw. pRS-$DnaK_{Tth}$(wt) als Template hergestellt. Das über Gelextraktion gereinigte PCR-Produkt sowie der pET27b-Vektor wurden durch die Restriktionsenzyme EcoRI und NdeI, bzw. im Falle von $DnaK_{Tth}$(E168A) BamHI und NdeI verdaut. Für die Restriktion wurde ca. 0.5 µg DNA sowie 5 U Enzym/µg DNA im entsprechenden Restriktionspuffer (Reaktionsvolumen 25 µl) eingesetzt und die Proben 1.5 h bei 37°C inkubiert. Restriktionsprodukte wurden über Gelextraktion (Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) gereinigt und in einer Ligationsreaktion eingesetzt. Zur Ligation wurden 20 fmol des linearisierten Vektors mit 60 fmol des PCR-Fragments mit einer Einheit T4-DNA-Ligase in 20 µl Ligasepuffer für 3 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Ligase durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Der Ligationsansatz wurde für die Transformation von XL1 blue-Zellen durch Elektroporation eingesetzt. 70 µl einer 10%igen (v/v) Glycerinlösung kompetenter Zellen und 20 µl des 1:4 verdünnten Ligationsansatzes wurden im Eisbad schnell 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 in 1 ml 2TY-Medium verdünnt, 1 h bei 37°C geschüttelt und auf Agarplatten mit Kanamycin (30 µg/ml)

---

* Zahlen werden durchweg in der englischen Schreibweise (Punkt als Dezimalstelle) dargestellt.

ausgestrichen. Klone dieser Platten wurden in 2 ml-Kulturen mit 50 µg/ml Kanamycin kultiviert und Plasmid-DNA isoliert (Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden). Die Plasmid-DNA wurde einem analytischen Restriktionsverdau unterworfen und die eingeführten Gene sequenziert, um die Integrität der durch PCR eingeführten Sequenzen zu gewährleisten. Diese Plasmide wurden nach Überprüfung der Sequenz als Expressionsplasmide pRS-ClpB(A212C), pRS-ClpB(T611C) und pRS-DnaK(E168A) in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert.

Die Expressionplasmide pRS-ClpB(wt), pRS-ClpB(K204Q), pRS-ClpB(K601Q), pRS-ClpB(K204Q/K601Q), pRS-ClpB(trunc), pRS-ClpB(A94C) wurden von Ralf Seidel zur Verfügung gestellt.

2.3 Darstellung fluoreszierender Nukleotide und Proteine

2.3.1 Synthese von Mant-Nukleotiden

0.5 mmol Nukleotid (ADP, ATP, dADP) wurden in 7 ml Wasser gelöst, auf 38°C erwärmt und der pH-Wert mit NaOH (c = 1.0 mol/l) auf pH = 9.6 eingestellt. Unter ständigem Rühren, Temperieren und Kontrolle des pH-Wertes wurden 2.5 mmol N-Methylisatosäureanhydrid (MISA) in kleinen Portionen zugegeben (Hiratsuka, 1983). Der pH-Wert ändert sich zu Anfang der Reaktion sehr stark und muß häufig nachgeregelt werden. Nach einer Reaktionsdauer von insgesamt 2 h wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und mit dreimal 10 ml Chloroform gewaschen, das Mant-Nukleotid verbleibt in der wässrigen Phase. Eine Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC.

DC-Bedingungen:

Feste Phase: Kieselgel F_{254} (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Isopropanol/NH_3/H_2O (6:3:1) + 0.5 g EDTA/l

Detektion: A_{254}, A_{366}

Rf-Werte: Mant-ADP: 0.44; Mant-ATP: 0.21; Mant-dADP: 0.63

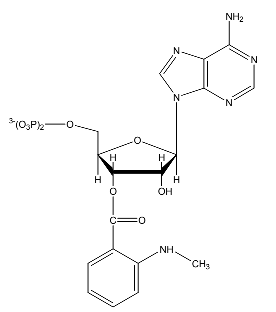


Abb. 2.1 Struktur von Mant-ADP (3´O-(N-Methylanthraniloyl)-ADP)

Die wässrige Lösung wurde mit Essigsäure (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt, das Volumen mit H_2O auf ca. 100 ml aufgefüllt und durch FPLC an Q-Sepharose gereinigt (siehe FPLC-Bedingungen). Die Reaktionsprodukte eluieren unter diesen Bedingungen in folgender Reihenfolge: überschüssiges MISA, nicht umgesetztes Nukleotid, Mant-Nukleotid. Die Retentionszeit für Mant-Nukleotide beträgt 450-500 min.

FPLC-Bedingungen:

Säule:	Q-Sepharose FF, 150 ml (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Flußrate:	5 ml/min
Detektion:	A_{260}, A_{366}
Laufmittel:	A: 50 mM Triethylammoniumbicarbonat pH 7.5
	B: 1 M Triethylammoniumbicarbonat pH 7.5
Retentionszeit:	Mant-Nukleotide, 450-500 min

Tab. 2.3: FPLC-Programm für die präparative Reinigung von Mant-Nukleotiden

Zeit (min)	Fluß (ml/min)	A (%)	B (%)
0	5	100	0
100	5	100	0
500	5	30	70
600	5	30	70

Fraktionen, die Mant-Nukleotid enthalten, wurden mittels Absorptionsprofil und DC identifiziert, vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Triethylamin wurde durch wiederholtes Einengen mit ca. 5 ml Methanol entfernt, der Rückstand dann in 1 ml H_2O aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Reinheit des Produktes (> 95%) wurde mit Hilfe der HPLC überprüft. In wässriger Lösung liegen zwei Positionsisomere (2´-Isomer, 40% und 3´-Isomer 60%) von Mant-ADP bzw. Mant-ATP vor, die sich durch Transacetylierung spontan ineinander umwandeln und deshalb nicht zu trennen sind.

HPLC-Bedingungen (Reinheitskontrolle):

Säule:	ODS Hypersil Reversed Phase C-18, 5 µm, 120 Å, 250x8 mm (Bischoff, Leonberg)
Flußrate:	1.5 ml/min
Detektion:	A_{254}, A_{350}, Fluoreszenz 360/440
Laufmittel:	A: 50 mM KP_i, pH 6.5
	B: 50 mM KP_i, pH 6.5; 50% Acetonitril

Retentionszeiten: Mant-ADP 14.5 min, Mant-ATP 13.7 min, Mant-dADP 15.8 min

Tab.2.4: HPLC-Programm für die Analyse von Mant-Nukleotiden

Zeit (min)	Fluß (ml/min)	A (%)	B (%)
0	1.5	100	0
2.0	1.5	100	0
22.0	1.5	0	100
23.0	1.5	100	0
30.0	1.5	100	0

2.3.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für die spektroskopische Untersuchung der Nukleotidbindung sowie für Fluoreszenz-anisotropiemessungen wurden an definierten Stellen in ClpB eingebaute Cysteine mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor™ 488-C_5-Maleinimid oder N-((2-Iodacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (IANBD-Ester) (Molecular Probes, Eugene, USA) kovalent modifiziert. Die Struktur der an Cystein gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe ist in Abb. 2.2 zu sehen.

A B

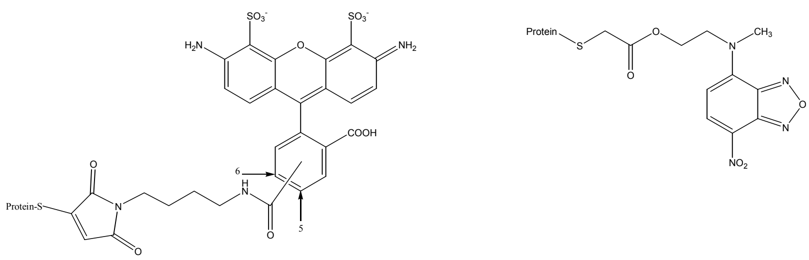


Abb. 2.2: Struktur der an Cystein gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488-Maleinimid (A) und ANBD-Ester (B)

2 ml des jeweiligen ClpB-Proteins (50 µM) wurden gegen Puffer A dialysiert und eine 20 mM Lösung des Farbstoffes (Alexa Maleinimid in H_2O, IANBD in DMF) vorbereitet. Der Proteinlösung wurden 5 mM ADP zugefügt, um das ClpB-Dimer zu stabilisieren. Bei RT und unter Lichtschutz wurde die Farbstofflösung tropfenweise zu der Proteinlösung gegeben und gut vermischt, bis der Farbstoff in ca. 15-fachem Überschuß zum Protein vorlag. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht im Dunkeln unter Rühren bei 4°C inkubiert. Danach

wurde überschüssiger reaktiver Farbstoff durch Zugabe von 20 µl β-Mercaptoethanol abgesättigt. Freier Fluoreszenzfarbstoff wurde durch Gelfiltration an Sephadex G-25 (NAP 5, Amersham Biosciences, Uppsala) entfernt und die Lösung 2 x 5 h gegen Puffer A dialysiert. Die Proteinkonzentrationen der Fluoreszenz-markierten Proteine wurde mittels Farbreaktion nach Bradford, die Konzentration der Fluorophore und somit der Anteil des markierten Proteins anhand der spezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmt (Alexa Maleinimid ε_{493} = 72 000 M^{-1} cm^{-1}, IANBD ε_{472} = 23 000 M^{-1} cm^{-1}).

- Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$,

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Proteinreinigung

$DnaK_{Tth}$, $DnaK_{Tth}$(E168A), $DnaJ_{Tth}$ und $GrpE_{Tth}$ wurden gereinigt wie beschrieben (Klostermeier *et al.*, 1998; Klostermeier *et al.*, 1999; Groemping *et al.*, 2001). DafA wurde von G. Dumitru, die Proteine $DnaK_{Eco}$, $DnaK_{Eco}$(E171A), $DnaJ_{Eco}$ und $GrpE_{Eco}$ wurden von P. Herde zur Verfügung gestellt. Die $ClpB_{Tth}$ Deletionsmutanten ClpB(Cshort), ClpB(ΔN), ClpB(ΔC) sowie ClpB(A447C) wurden von P. Beinker zur Verfügung gestellt.

ClpB (wt), die $ClpB_{Tth}$-Punktmutanten ClpB(K204Q), ClpB(K601Q), ClpB(K204Q, K601Q), ClpB(A94C), ClpB(A212C), ClpB(T611C), sowie ClpB(trunc) wurden folgendermaßen gereinigt:

Die Zellen wurden in Gegenwart von Protease-Inhibitor in Lysepuffer aufgetaut und nach Homogenisieren der Suspension mit einem Homogenisator (Novodirect GmbH, Kehl) in einem Microfluidizer (Microfluidics, Newton, Massachusetts) bei einem Druck von 600 kPa unter Kühlung der Druckzelle aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Beckman Ti-45 Rotor, 35000 rpm, 4°C, 45 min) pelletiert, der Überstand mit 5 mM $MgCl_2$ und 100 µg DNAseI versetzt und 45 min bei 4°C inkubiert.

ClpB wurde durch Zugabe von 0.23 g/ml Ammoniumsulfat (40%-Sättigung) bei 4°C gefällt und durch Zentrifugation (Beckman Ti-45 Rotor, 35000rpm, 4°C, 30 min) pelletiert. Nach Auflösen des Pellets in EMD-DEAE-Puffer A wurde das Protein für 4 h und über Nacht gegen je 2l EMD-DEAE-Puffer A dialysiert. Proteine wurden dann einer Anionenaustauscher-Chromatographie an EMD-DEAE (EMD-DEAE-Säule, 300 ml, Merck, Darmstadt) unterworfen. Das Dialysat wurde nochmals zentrifugiert (Beckman Ti-45 Rotor, 35000 rpm, 4°C, 30 min) und der Überstand mit 5 ml/min auf die in EMD-DEAE-Puffer A equilibrierte EMD-DEAE-Säule aufgetragen. ClpB(wt) und die ClpB-Punktmutanten eluierten in einem linearen Gradienten von 20-400 mM KCl zwischen 230 und 260 mM KCl, Clp(trunc) eluiert in einem linearen Gradienten von 20-600 mM KCl zwischen 310 und 370 mM KCl. ClpB-haltige Fraktionen (Überprüfung mittels SDS-PAGE) wurden vereinigt und durch 40%ige Ammoniumsulfatfällung konzentriert.

Für die nun folgende Gelfiltration wurde das Ammoniumsulfatpellet in S300-Puffer aufgenommen und mit einer Flußrate von 1.5 ml/min auf eine in S300-Puffer equilibrierte Sephacryl 300-Säule (60 ml, Merck, Darmstadt) aufgetragen. ClpB(wt) eluierte nach ca. 50 min (entspricht 300-500 kD), ClpB(trunc) bereits nach 15 min (entspricht >1000 kD). ClpB-haltige Fraktionen wurden vereinigt und in Ultrafiltrationskammern (30 kD Ausschluß-volumen, Amicon, Beverly, USA) auf eine Konzentration von ca. 10 mg/ml konzentriert.

- Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTE, 10% (v/v) Glycerin
- EMD-DEAE Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 10% (v/v) Glycerin
- EMD-DEAE Puffer B: Puffer A mit 1 M KCl
- S300-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 10% (v/v) Glycerin

2.4.2 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 0.1% SDS, das Sammelgel 4.5% Acrylamid, 0.1% Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6.8 und 0.06% SDS. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl 10% APS-Lösung und 5 µl TEMED pro 10 ml Volumen gestartet.

Vor dem Auftragen wurden Proteinproben mit 4-fach-Probenpuffer im Verhältnis 1:3 gemischt und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in Biorad Mini 2D-Gelkammern (Biorad, München) mit SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine Mischung aus Phosphorylase b (94 kD); Rinderserumalbumin (67 kD); Ovalbumin (43 kD), Carboanhydrase (30 kD); Trypsininhibitor (20.1 kD) und α-Lactalbumin (14.4 kD) (LMW Proteinmarker, Amersham, Freiburg). Nach der Elektrophorese wurden die Gele 20 min in Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung entfärbt.

- 4-fach-Probenpuffer: 130 mM Tris/HCl, pH 6.8, 200 mM DTE, 4% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerin
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.01% (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

2.4.3 HPLC-Gelfiltration zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades

Die Oligomerisierung von ClpB sowie die Komplexbildung mit DnaK wurde durch Gelfiltration an einer Superdex S200-Säule (1.5 x 30 cm; Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einem Waters-HPLC-System (siehe 2.1.3) analysiert. Die KCl-Konzentration (0.001-500 mM) sowie der Nukleotidgehalt (1 mM ADP/ATP/ATPγS) 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, BioRad, München) (siehe Abb. 2.3) wurde das Molekulargewicht von Proteinen anhand der Retentionszeiten bestimmt. Ausgehend von den aus der Eichkurve ermittelten Parametern (A = 53030 kDa, k = 0.0996 min^{-1}) wurden folgende Grenzen für die verschiedenen Oligomere von ClpB Monomer (96253 D) festgelegt (Tab. 2.5):

- Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE, 10% (v/v) Glycerin

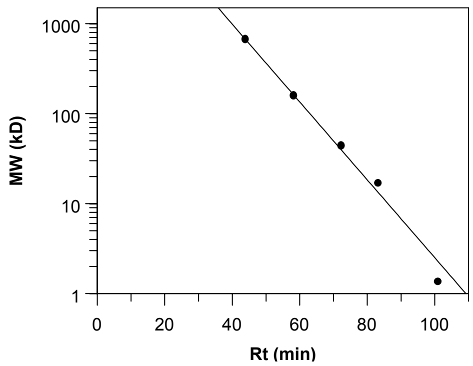


Abb. 2.3: Eichkurve für S200-Gelfiltration (Flußrate: 0.2 ml/min).
Die Retentionszeiten von Thyroglobin (670 kD, Rt = 43.9 min), Gammaglobulin (158 kD, Rt = 58.2 min), Ovalbumin (44 kD, Rt = 72.4 min), Myoglobin (17 kD, Rt = 83.3 min) und Vitamin-B12 (1.35 kD, 101.1 min) (Gelfiltrationsstandard , BioRad, München) wurden gegen das Molekulargewicht aufgetragen und an eine exponentielle Gleichung ($MW = A{*}e^{-k{*}Rt}$) angepasst. (A = 53030 kD, k = 0.0996 min^{-1})

Tab. 2.5: Retentionszeiten für ClpB-Oligomere bei der S200-Gelfiltration.
Die Retentionszeiten wurden mit den aus der Eichgerade ermittelten Konstanten berechnet ($Rt = (\ln A - \ln(MW))/k$)

	MW (kD)	Rt (min)
Monomer	96-145	63.4-59.3
Dimer	145-240	59.3-54.2
Trimer-Tetramer	240-420	54.2-48.6
Pentamer-Hexamer	420-622	48.6-44.6

2.4.4 Bestimmung des Nukleotidgehaltes von Proteinen

Kinetische Messungen der Nukleotidbindung mußten mit nukleotidfreiem Protein vorgenommen werden. Zur Bestimmung des Nukleotidgehalts wurden 16 µl der Proteinstammlösung (50-100 µM) mit 4 µl 50% (w/v) TCA-Lösung 10 Minuten auf Eis inkubiert und das gebildete Präzipitat durch Zentrifugation entfernt. 10 µl des Überstands wurden mit 20 µl einer 2 M KOAc-Lösung neutralisiert und 20 µl einer 1:10 Verdünnung auf eine mit 50 mM KP_i, pH 6.8 equilibrierte ODS Hypersil Reversed Phase C-18-Säule (5 µm, 120 x 4.6 mm, Bischoff, Leonberg) aufgetragen (Waters HPLC, siehe 2.1.3). Die Säule wurde mit 1.5 ml/min entwickelt, die Detektion erfolgte über Absorption bei 254 nm.

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

2.4.5 *Single-turnover* ATPase

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität bei einmaligem Umsatz wurden 150 µM ClpB mit 75 µM ATP in SFP-Puffer bei 25°C gemischt und nach verschiedenen Zeiten 4 µl entnommen. Die Hydrolysereaktion wurde durch Denaturieren des Proteins mit 2 µl 1 M $HClO_4$ gestoppt, 5 min auf Eis inkubiert und das gebildete Präzipitat durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde mit 40 µl 2M KOAc-Lösung neutralisiert und 20 µl des Überstands auf eine ODS Hypersil Reversed Phase C-18-Säule aufgetragen (Waters HPLC, siehe 2.1.3) und mit 1.5 ml/min in 50 mM KP_i, pH 6.8 entwickelt. 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, siehe Abb. 3.8) an eine exponentielle Funktion ermittelt ($y = A \cdot (1-e^{-kt})$).

- SFP-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE

2.4.6 Protein-Affiniätschromatographie

2.4.6.1 Ko-Elutionsexperimente mit DnaK und ATP-Agarose

70 µl ATP-Agarose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) (ATP ist mit dem C8-Atom des Adenins über ein $(CH_2)_9$-Verbindungsstück an Agarose gekoppelt) wurden dreimal mit 300 µl Agarose-Puffer durch Aufschwemmen der Matrix, Zentrifugation (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C, 2 min, 5000 rpm) und Abnehmen des Überstands gewaschen. Zur Kopplung von DnaK wurde die ATP-Agarose mit 40 µl 100 µM $DnaK_{Tth}$ oder $DnaK_{Eco}$ in Agarose-Puffer 60 min bei 30°C in Eppendorfgefäßen inkubiert. Um nicht-gebundenes DnaK zu entfernen wurde die Agarose dreimal mit 300 µl Agarose-Puffer gewaschen. Die Agarose-Matrix wurde dann mit den angegebenen Chaperonen (ClpB, DnaJ, DafA, Konzentration: 50 µM in

Gesamtvolumen von 40 µl) für 90 min bei 30°C inkubiert und danach mit dreimal 500 µl Agarose-Puffer gewaschen, um nicht-gebundenes Protein zu entfernen. Die Elution von gebundenen Proteinen erfolgte durch 90-minütige Inkubation der Agarose-Matrix mit 5 mM ATP in 30 µl Agarose-Puffer. Aliquots der Eluate (5 µl) wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Unspezifische Bindung von ClpB oder DnaJ an die Agarose-Matrix wurde durch Kontrollexperimente mit ATP-Agarose ohne gebundenes DnaK quantifiziert.

- Agarose-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$

2.4.6.2 Ko-Elutionsexperimente mit $DnaK_{CHis}$ und Ni-NTA-Agarose

200 µl Ni^{2+}-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) wurden dreimal mit 500 µl NTA-Puffer durch Aufschwemmen der Matrix, Zentrifugation (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C, 2 min, 5000 rpm) und Abnehmen des Überstands gewaschen. Zur Kopplung von DnaK wurde die Ni^{2+}-NTA-Agarose mit 40 µl 100 µM des DnaK-His_6-Fusionsproteins für 60 min bei 30°C inkubiert und danach mit dreimal 500 µl NTA-Puffer gewaschen, um nicht-gebundenes Protein zu entfernen. 2 nmol der gereinigten ClpB-Proteine wurden dann in einem Volumen von 30 µl für 120 min bei 30°C mit der Ni^{2+}-NTA-Agarose inkubiert und danach mit dreimal 500 µl NTA-Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden schließlich mit 20 µl 0.5 M Imidazol in NTA-Puffer eluiert und ein Aliquot (2 µl) der Eluate durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Bei Durchführung der Experimente in Gegenwart von Nukleotid wurde dem NTA-Puffer 1 mM ADP, ATP oder ATPγS zugefügt. Unspezifische Bindung von ClpB oder DnaJ an die Agarose-Matrix wurde durch Kontrollexperimente mit Ni^{2+}-NTA-Agarose ohne gebundenes $DnaK_{CHis}$ quantifiziert.

- NTA-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsmessungen für Konzentrationsbestimmungen wurden an einem DU 650-Einstrahlphotometer (Beckman, Palo Alto, USA) durchgeführt, für Messungen der *steady-state*-ATPase-Aktivität und Chaperonaktivität wurde ein iEMS Reader (Labsystems, Helsinki, Finnland) für Titerplatten (8 x 12) eingesetzt.

2.5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleotiden

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 1 ml Quarzküvetten bestimmt. Die Proteinkonzentration in mg/ml ergibt sich nach Gleichung 2.1:

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

$A_{228.5}$: Absorption bei 228.5 nm

$A_{234.5}$: Absorption bei 234.5 nm

c: Proteinkonzentration in mg/ml

Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe selbst zwischen 220 und 240 nm absorbieren wurde die Konzentration von Fluoreszenz-markierten Proteinen nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. 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.
Nukleotidkonzentrationen wurden photometrisch unter Verwendung der folgenden Extinktionskoeffizienten (25°C, pH 7.5) bestimmt: ε_{259} (AXP) = 15400 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{255} (Mant-AXP) = 23300 $M^{-1}cm^{-1}$ (Hiratsuka, 1983).

2.5.1.2 *Bestimmung der Steady state-ATPase-Aktivität (Gekoppelter Enzymtest)*

Die ATPase-Aktivität von ClpB unter *Steady-state*-Bedingungen wurde im gekoppelten Enzymtest nach Bergmeyer (Adam, 1962) in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems bestimmt. Die Hydrolyse von ATP durch ClpB wird dabei über die Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt (Abb. 2.4), 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, mit 20 µg/ml LDH und 50 µg/ml PK und unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (0.1-5 mM) bestimmt. Die Messung wurde durch Zugabe der Proteinprobe gestartet.

- 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, 0.4 mM NADH, 0.1 mg/ml BSA

$$\text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{ClpB}} \text{ADP} + P_i$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightleftharpoons{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH,H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Abb. 2.4: Gekoppelter Enzymtest.

Die Hydrolyse von ATP wird an die Oxidation von NADH,H^+ gekoppelt, die mit einer Absorptionsabnahme bei 340 nm verbunden ist.

Der Umsatz der ATPase (k) ergibt sich nach Gleichung 2.2:

$$k = \Delta A \,/\, (\varepsilon_{NADH} \cdot d \cdot c_p) \qquad \text{(Gl. 2.2)}$$

k: Umsatzrate in s^{-1}

ΔA: Änderung der Absorption bei 340 nm pro s

ε_{NADH}: Extinktionskoeffizient von NADH ε_{340} = 6220 M^{-1} cm^{-1}

d: Schichttiefe Titerplatte: 0.36 cm

c_p: Proteinkonzentration in M

Zeigt die Auftragung der ATPase-Aktivität (k) gegen die eingesetzte ATP-Konzentration einen sigmoidalen Kurvenverlauf, so wurden die Daten an die Hill-Gleichung (Gl. 2.3) angepasst, im Falle der ClpB-Mutanten ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) beschreibt die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 2.4) den Kurvenverlauf (n = 1).

$$k = k_{cat} \cdot S^n/(Km^n + S^n) \qquad \text{(Gl. 2.3)}$$

$$k = k_{cat} \cdot S/(Km + S) \qquad \text{(Gl. 2.4)}$$

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

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

S: ATP-Konzentration (mM)

Km: Michaelis Konstante (mM)

n: Hill-Koeffizient

Für die statistische Auswertung der ATPase-Tests mit ClpB(wt) und ClpB-Mutanten (siehe 3.2.2) wurde ein Urnenmodell zugrunde gelegt. In der Urne befinden sich aktive und inaktive ClpB-Untereinheiten einer definierten Konzentration und durch Ziehen aus dieser Urne werden willkürlich Hexamere zusammengestellt. Mit Hilfe einer Binomialverteilung (Gl. 2.5) kann für jedes Mischverhältnis die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Zusammensetzung des Hexamers (Hexamer mit 0, 1, 2, … inaktiven Untereinheiten) berechnet werden.

$$P(x) = \binom{n}{x} * p^x * (1-p)^{n-x} \text{ mit } p = \frac{M}{N} \qquad P(x \geq i) = \sum_{x \geq i} P(x) \qquad \text{(Gl. 2.5)}$$

P(x): Wahrscheinlichkeit für bestimmte Zusammensetzung des Hexamers

M: Konzentration von ClpB(K601Q)

N: gesamte Proteinkonzentration (ClpB(wt) und ClpB(K601Q)

n: Stichprobenumfang (6 für Hexamer)

x: Anzahl von inaktiven Untereinheiten in der Stichprobe

2.5.1.3 In vitro-Test auf Chaperonaktivität (Substratprotein α-Glucosidase)

Die Chaperonaktivität von ClpB wurde anhand der Renaturierung von hitzedenaturierter α-Glucosidase aus *Bacillus stearothermophilus* gemessen. α-Glucosidase katalysiert die Abspaltung von para-Nitrophenol aus dem Substrat para-Nitrophenylglucosid, die Entstehung des Nitrophenols kann bei 405 nm detektiert werden.

0.2 µM α-Glucosidase wurden 10 min bei 75°C in Denaturierungpuffer denaturiert, dann die angezeigten Chaperone (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE, 1.0 µM ClpB) zugegeben und 100 min bei 55°C inkubiert. Nach der Verdünnung des Reaktionsgemisches 1/10 in Assaypuffer wurde die α-Glucosidase-Aktivität in Titerplatten (Reaktionsvolumen 200 µl) anhand der zeitabhängigen Absorptionsabnahme bei 405 nm bestimmt. Die Aktivität der nicht-denaturierten α-Glucosidase entspricht einer Aktivität von 100%. (Der Assay wurde von P. Beinker ausgearbeitet.)

- Denaturierungspuffer: 50 mM MOPS/NaOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 2 mM DTE
- Assaypuffer: 50 mM KP_i, pH 6.8, 2 mM para-Nitrophenylglucosid, 0.1 mg/ml BSA

2.5.2 Zirkularer Dichroismus (CD)

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte an einem JASCO 710 Spektropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan). Fern-UV-Spektren wurden im Bereich von 200-250 nm in einer Küvette mit 0.1 cm Schichtdicke bei 25°C (temperierbarer Küvettenhalter) mit 50 nm/min bei einer Empfindlichkeit von 100 mGrad, einer Zeitkonstante von 1 s und einer Küvettendicke von 0.2 mm aufgenommen und 10-fach akkumuliert. Sämtliche Spektren wurden um den Pufferbeitrag korrigiert.

- CD-Puffer: 50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA

Die gemessene Elliptizität in mGrad wurde nach Gleichung 2.6 in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRE}$ umgerechnet.

$$[\Theta]_{MRE} = \Theta \cdot 100 / (c \cdot d \cdot N) \qquad \text{(Gl. 2.6)}$$

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

Θ: gemessene Elliptizität in Grad

c: Proteinkonzentration in M

d: Schichttiefe in cm

N: Anzahl der Aminosäuren des Proteins

2.5.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Aminco Bowman 8100 Fluorimeter (SLM, Urbana, USA) in Standardfluoreszenzpuffer durchgeführt.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren wurde der Fluorophor im Absorptionsmaximum angeregt (Bandbreite 1 nm) und die Emission bei einer Bandbreite von 16 nm, einer Rate von 1-2 nm/s und einer Integrationszeit von 1 s aufgenommen. Bei geringer Signalintensität wurden die Spektren mehrfach akkumuliert.

- Standardfluoreszenzpuffer (SFP): 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE

2.5.3.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Gleichgewichtstitration

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 (Bandbreite 1 –2 nm) angeregt und die Emission bei 440 nm (Bandbreite 16 nm) aufgezeichnet. Die Anregungs-/Emissionwellenlängen der ANBD-Fluoreszenz lagen bei 372/540 nm (Bandbreite n 2/16 nm). Die *Photomultiplier*-Spannung lag je nach Signalintensität bei 500-800 V, die Auflösung betrug üblicherweise 2 s bei einer Integrationszeit von 1.95 s.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) wurde das gemessene Fluoreszenzsignal in jedem Titrationsschritt nach Berücksichtigung der Volumenänderung mit der Konzentration des zutitrierten Bindungspartners in Beziehung gesetzt und eine Kurvenanpassung nach der quadratischen Gleichung (2.7) vorgenommen (zur Herleitung der Gleichung siehe Anhang, 9.1.1). 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.

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{\dfrac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\dfrac{([E]_0 + [L]_0 + K_d)^2}{4} - [E]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0} \quad \text{(Gl. 2.7)}$$

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 Protein konkurriert.

Hierzu wurde eine Mischung aus Mant-Nukleotid und ClpB vorgelegt und der nicht-fluoreszierende Ligand (Mg·ADP, Mg·ATP) 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 (kubische Gleichung (Thrall *et al.*, 1996)) und ist im Anhang (siehe 9.1.2) dargestellt. 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.

2.5.3.2 Fluoreszenzanisotropie

Fluoreszenzanisotropie wurde an einem FluoroMax 3 (Jobin Yvon, Edison, USA) mit Spex Polarisatoren in SFP gemessen. Die Alexa 488-Fluoreszenz wurde bei 495 nm angeregt (Bandpass: 2 nm) und ein Emissionspektrum zwischen 500 und 600 nm (Bandpass: 2 nm, Inkrement: 1 nm, Integration time: 2s) in SFP aufgenommen. Die Anisotropie am Spektrofluorometer ist definiert als:

$$r = \frac{F_{VV} - G \cdot F_{VH}}{F_{VV} + 2G \cdot F_{VH}} \qquad \text{(Gl. 2.8)}$$

r: Fluoreszenzanistropie

F_{VV}: Fluoreszenzintensität bei bestimmter Stellung der Polarisatoren, der erste Index charakterisiert die Stellung des Exzitationspolarisators (V: vertikal, H: horizontal), der zweite Index gibt die Stellung des Emissionspolarisators an.

G: *Grating*-Faktor

Der *Grating*-Faktor G ($G(\lambda_{EM}) = F_{HV}/F_{HH}$) wurde automatisch für jede Wellenlänge des Emissionsspektrums vom Gerät bestimmt.

2.5.3.3 Lichtstreuung

Zur Untersuchung der Auflösung von Proteinaggregaten durch das ClpB-DnaK-System (siehe 3.5.2), sowie der Geschwindigkeit der ClpB-Oligomerisierung (siehe 3.4.1) wurde die statische Lichtstreuung bei einer Wellenlänge (Anregung und Emission) von 320 nm bzw. 360 nm beobachtet.

Für die Beobachtung der Aggregatsbildung und –auflösung wurde 1 µM LDH_{Bst} in Puffer L bei einer *Photomultiplier*-Spannung von 600 V (Bandbreite 2/16) in 45 min von 25°C auf 75°C in der Quarzküvette erhitzt und danach in 30 min auf 40°C abgekühlt. Nach dem Auftreten eines konstanten Signals wurden 5 mM ATP oder ADP zugegeben und 30 min bei

40°C inkubiert. Nach Zugabe des DnaK-Systems (3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE) wurde die PM-Spannung aufgrund der starken Erhöhung der Lichtstreuung neu eingestellt (80%, 530 V) und die Lichtstreuung über einen Zeitraum von 1 h bei 40 °C beobachtet.

Die Lichtstreuung des ClpB-Oligomers wurde bei 360 nm (Bandbreite 4/4) bei einer PM-Spannung von 600 V in Puffer C bei 30°C vor und nach Zugabe von 4 mM ADP bzw. ATP detektiert.

- Puffer L: 50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE
- Puffer C: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE, 10% (v/v) Glycerin

2.5.4 Messung schneller Kinetiken mittels Stopped-Flow

2.5.4.1 Stopped-Flow-Fluoreszenz

Stopped-Flow-Messungen zur Nukleotidbindung wurden an einem SF-61 *Stopped-Flow*-Gerät (Hitech Scientific, Salisbury, Großbritannien) mit Mant-ADP und ClpB(wt) oder ClpB(trunc) in SFP durchgeführt. Anregungs- und Streulicht wurden durch *Cut off*-Filter auf der Emissionsseite abgeschnitten. Die Anregung der Mant-Fluoreszenz erfolgte bei 360 nm (Filter: Emission > 418 nm). Die Transienten wurden im logarithmischen Modus mit einer Zeitkonstante von 330 µs (Oversampling) aufgenommen und 5-6 Einzelmessungen gemittelt. Für die *Stopped-flow*-Experimente wurde sowohl die Spritzen- als auch die Zellkonzentration der Edukte nach dem Beispiel 1.0/0.5 µM (Spritzen-/Zellkonzentration) angegeben.

Die Transienten wurden durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben. Für Transienten mit zunehmender Fluoreszenz gilt dabei Gleichung 2.9, für Transienten mit abnehmender Fluoreszenz Gleichung 2.10.

- Standardfluoreszenzpuffer (SFP): 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2mM EDTA, 2 mM DTE

$$y = \Sigma A_i \cdot (1-e^{(-\lambda_i \cdot t)}) + \text{offset} \qquad \text{(Gl. 2.9)}$$

$$y = \Sigma A_i \cdot e^{(-\lambda_i \cdot t)} + \text{offset} \qquad \text{(Gl. 2.10)}$$

2.5.4.2 Stopped-Flow-Anisotropie

Die ClpB-Oligomerisierung wurde durch Messungen der *Stopped-Flow*-Anisotropie von ClpB(A94C)-Alexa in SFP an einem SX.18MV-R *Stopped-Flow*-Gerät (Applied Photophysics, Leatherhead, Großbritannien) im Polarisationsmodus charakterisiert. Dabei wurde gleichzeitig mit der Fluoreszenzanisotropie die Fluoreszenzemission der Reaktion detektiert. Die Anregung der Alexa-Fluoreszenz erfolgte bei 495 nm (*Cut off*-Filter: Emission > 530 nm).

2.5.5 Lumineszenz

Lumineszenz-Assays wurden an einem Fluoroskan FL mit Quartz-Halogenlampe (Labsystems, Helsinki, Finnland) in Titerplatten durchgeführt.

2.5.5.1 In vitro-Test auf Chaperonaktivität (Substratprotein Luziferase)

Luziferase katalysiert die mit Lichtemission verbundende ATP-abhängige Oxidation des Substrates Luziferin. Die Lumineszenzausbeute ist ein Maß für die Luziferaseaktivität. Der Assay wurde in Lumineszenzpuffer bei 30°C durchgeführt, die Mikrotiterplatten (White Cliniplate, Labsystems, Helsinki, Finnland) wurden vor ihrer Benutzung 30 min mit BSA-Lösung (1 mg/ml) inkubiert.

0.8 µM Luziferase (Promega, Mannheim) wurden in Denaturierungspuffer 30 min bei 42°C denaturiert und dann 10-fach in Lumineszenzpuffer mit 3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE und 0.5 µM ClpB verdünnt. 250 µl dieses Reaktionsgemisches wurden in Mikrotiterplatten gefüllt und die Rückfaltung der Luziferase anhand der produzierten Lumineszenz kontinuierlich verfolgt. In diskontinuierlichen Assays wurden 8 µM Luziferase hitzedenaturiert (30 min, 42°C) und 10-fach in Rückfaltungspuffer in Gegenwart von Chaperonen (3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE, 0.5 µM ClpB) verdünnt. Während der Inkubation bei 30°C wurden Proben des Reaktionsgemisches zu definierten Zeitpunkten (t = 0, 5, 10, 20, 40, 60 und 80 min) entnommen, 10-fach in Rückfaltungspuffer verdünnt und die Lumineszenz vermessen. Aus der linearen Zunahme der Lumineszenz mit der Zeit wurde eine Renaturierungsaktivität in Lumineszenzeinheiten/min für das ClpB-DnaK-System berechnet.

- Denaturierungspuffer: 25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP
- Lumineszenzpuffer: 25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoenzymA, 0.1 mM Luziferin
- Rückfaltungspuffer: 25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 0-500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoenzymA

2.6 Auswertung kinetischer Experimente mit *global fit*-Prozeduren

2.6.1 Auswertung der Nukleotidbindungskinetiken mit DynaFit

Mit Hilfe des Programms DynaFit (DynaFit Version 3.25.001, BioKin Ltd., Pullman, USA) können unter Annahme eines bestimmten Bindungsmodells mehrere Bindungskurven gleichzeitig angepasst werden (globale Analyse). Im Folgenden soll das Prinzip des Verfahrens beschrieben werden. Eine ausführliche Darstellung sowie alle Gleichungsdateien befinden sich im Anhang (siehe 9.2.1).

Bindungskurven von Mant-ADP an ClpB(trunc) und ClpB(wt) wurden als Anstieg der Mant-Fluoreszenz nach ClpB-Zugabe für verschiedene Konzentrationen gemessen. Die beobachtete Fluoreszenz ergibt sich zu jedem Zeitpunkt aus der Grundfluoreszenz des freien Mant-ADP sowie dem Beitrag der ClpB·Mant-ADP-Komplexe. Unter Verwendung des Programmes DynaFit wurde ein Modell für den Mechanismus der Nukleotidbindung entwickelt (Abb. 2.5) und die zugehörigen Differentialgleichungen, die die zeitliche Änderung der Konzentrationen der verschiedenen Spezies nach dem Modell beschreiben, in einer Gleichungsdatei zusammengefaßt. Im Falle von ClpB(trunc) wurden die Ratenkonstanten (k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}, k_3, k_{-3}, k_4, k_{-4}) sowie die differentiellen molaren Fluoreszenzkoeffizienten der Komplexe als freie Parameter variiert, bis minimale Abweichung der über numerische Integration der Differentialgleichungen simulierten Daten von den Meßwerten erreicht wurde. (Fluoreszenz-Koeffizienten wurden als differentielle Koeffizienten berechnet, d.h. als Differenz zwischen der Fluoreszenz des Reaktanten (Mant-ADP) und des Produkts (ClpB·Mant-ADP). Da sämtliche Konzentrationen in µM angegeben wurden, hat der differentielle Fluoreszenzkoeffizient die Einheit μM^{-1}). Im Falle von ClpB(wt) wurden die Ratenkonstanten k_1 und k_{-1} unabhängig durch *Stopped-Flow*-Anisotropiemessungen bestimmt sowie der molare Fluoreszenzkoeffizient r(DA) aus Gleichgewichtstitrationsdaten berechnet. Diese Parameter wurden während der Minimierung konstant gehalten.

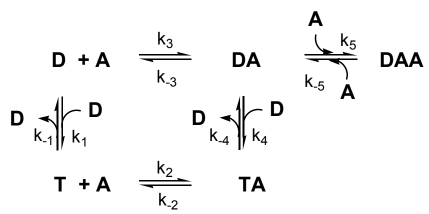


Abb. 2.5: Modell für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt).

Unter Verwendung des Programmes DynaFit wurde dieses Modell für die Beschreibung der gemessenen Stopped-Flow-Transienten eingesetzt. Das Modell für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) beeinhaltet nicht die Bindung an die NBD1 (k_5, k_{-5}). (**D**: ClpB-Dimer, **T**: ClpB-Tetramer, **A**; Mant-ADP)

2.6.2 Simulation des Bindungsmechanismus mit Scientist

Durch eine Simulation sollte überprüft werden, ob ein Bindungsmodell mit zwei bimolekularen Assoziationsschritten zu dem beobachteten Amplitudenverhalten der *Stopped-Flow*-Transienten führt (siehe 3.3.4). Da die Amplitude einer Phase häufig mit dem Auftreten einer bestimmten Spezies im Reaktionsmechanismus korreliert, wurde unter Verwendung des Programms Scientist die Konzentrationsverteilung der Produkte bei verschiedenen Edukt-Konzentrationen berechnet. Dazu wurde wie in den *Stopped-Flow*-Experimenten die Mant-ADP-Konzentration bzw. die ClpB(trunc)-Konzentration von 0-10 µM variiert und das Auftreten der Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplexe nach einem Bindungsmodell mit zwei

Assoziationsschritten berechnet. Die K_d-Werte für Oligomerisierung und Nukleotidbindung wurden unter Berücksichtigung der Informationen aus Gleichgewichtstitrationen vorgegeben. Die Gleichungsdateien für diese Simulation befinden sich im Anhang (siehe 9.2.2).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Nukleotidbindungsdomänen von ClpB

3.1.1 Sekundärstruktur und Stabilität der NBD-Mutanten ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q)

ClpB besitzt zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBDs), und das gebundene Nukleotid beeinflusst den Oligomerisierungszustand (Kim *et al.*, 1998; Zolkiewski *et al.*, 1999). Auch die ClpB-abhängige Reaktivierung von aggregierten Substratproteinen ist von ATP abhängig (Parsell *et al.*, 1994b; Zolkiewski, 1999). Um die Rolle der beiden NBDs für die Chaperonfunktion, ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und Oligomerisierung zu beurteilen, wurden zwei ClpB-Mutanten erstellt, bei denen die Lysine innerhalb der Walker A-Konsensussequenz GX_4GKT durch Glutamine ersetzt wurden (Abb. 3.1A). Diese Lysine interagieren direkt mit dem β- und γ-Phosphat des gebundenen Nukleotids und sind wichtig für die Struktur des P-Loops in anderen Nukleotid-bindenden Proteinen (Saraste *et al.*, 1990). Die Einführung einer ungeladenen und annähernd isosterischen Aminosäure an dieser Position sollte deshalb die Bindung des Nukleotids und dessen Hydrolyse stark beeinträchtigen und es somit ermöglichen, selektiv eine der beiden NBDs zu inaktivieren.

Das $ClpB_{Tth}$-Monomer aus *T. thermophilus* besitzt 854 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 96253 Da. Die ClpB-Mutanten ClpB(K204Q), ClpB(K601Q) und die Doppelmutante ClpB (K204Q/K601Q) wurden in *E. coli* überexprimiert und mit einer Reinheit von ca. 98% isoliert (Abb. 3.1B).

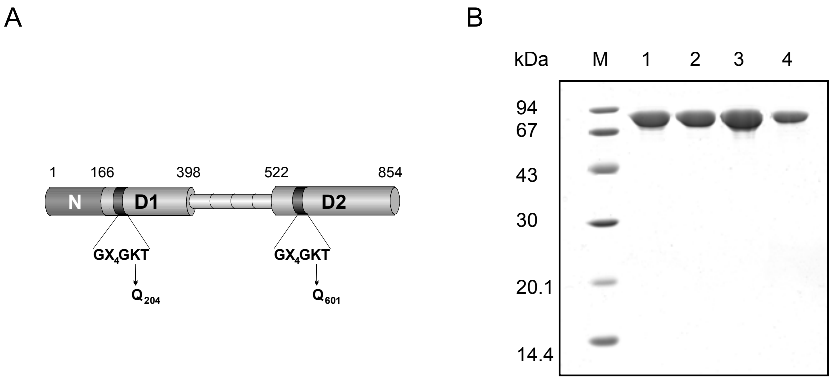


Abb. 3.1: Die strukturelle Organisation von $ClpB_{Tth}$, Position eingeführter Mutationen und Reinigung.
(A) ClpB besteht aus einer N-Domäne (N) und zwei hochkonservierten NBDs (D1 und D2), die durch einen Verbindungsteil getrennt werden. Mutationen wurden innerhalb der Walker A-Konsensusmotive GX_4GKT der beiden NBDs eingeführt und sind durch Pfeile markiert. (B) SDS-PAGE zur Reinigung von ClpB, aufgetragen sind ca. 3 µg Protein je Spur. (M) Molekulargewichtsstandard , (1) ClpB(wt), (2) ClpB(K204Q), (3) ClpB(K601Q), (4) ClpB(K204Q/K601Q).

Der zirkulare Dichroismus im fernen UV (180-250 nm) kann zur Bestimmung der Sekundärstruktur verwendet werden. Sowohl ClpB(wt) als auch die Mutanten zeigen ein für hohen α-helikalen Anteil charakteristisches CD-Spektrum, mit Minima bei 208 nm und 222 nm (Abb. 3.2A). Die Elliptizität Θ bei 222 nm in Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturierungsmittels GdnHCl gab Aufschluß über die Stabilität der Proteine. Sowohl bei ClpB(wt) als auch bei den beiden NBD-Mutanten beginnt die Entfaltung bei einer GdnHCl-Konzentration von 3.0 M. Der Entfaltungsübergang liegt etwa bei 4.0 M GdnHCl und in 5.0 M GdnHCl ist ClpB vollständig entfaltet (Abb. 3.2B). Die Einführung der Mutation in die Walker A-Konsensussequenzen hat die Domänen demnach nicht destabilisiert, Sekundär- und Tertiärstruktur der NBD-Mutanten gleichen denen von ClpB(wt).

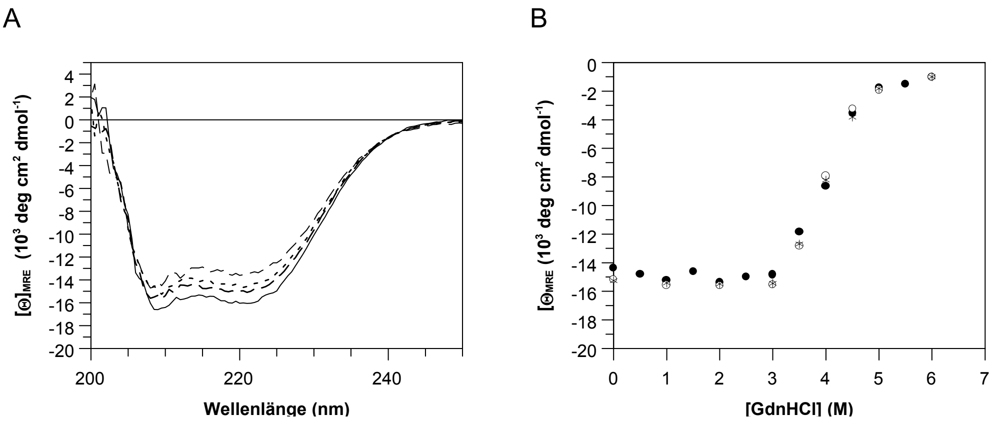


Abb. 3.2: Fern-UV-CD-Spektren und GdnHCl-induzierte Entfaltung von ClpB(wt) und NBD-Mutanten. (A) Die CD-Spektren wurden mit einer Proteinkonzentration von 20 µM, der Empfindlichkeit von 100 mdeg und der Schichtdicke von 0.02 cm aufgenommen. Alle Spektren sind 10-fach akkumuliert. Die Zuordnung von unten nach oben ist: ClpB(wt), ClpB(K204Q), ClpB(K601Q), ClpB(K204Q/K601Q). (B) 20 µM ClpB wurde mit unterschiedlichen GdnHCl-Konzentrationen 30 min inkubiert. Das CD-Signal wurde bei 220 nm mit einer Empfindlichkeit von 100 mdeg detektiert und 10-fach akkumuliert. ClpB(wt) (●), ClpB(K204Q) (○), Clp(K601Q) (*).

3.1.2 Chaperonaktivität der NBD-Mutanten

Luziferase diente als Modellsubstrat, um die Fähigkeit von ClpB zur Reaktivierung denaturierter Proteine zu testen (siehe 3.5.3). 0.8 µM Luziferase wurden dazu 30 min bei 42°C denaturiert, danach 1:10 in Rückfaltungspuffer verdünnt und die Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE und ClpB zugefügt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Chaperone, sowie ClpB oder dem DnaK-System (DnaK, DnaJ, GrpE) alleine. Die Reaktivierung der Luziferase bei 30°C wurde über 500 min kontinuierlich anhand der Oxidation von Luziferin und der damit verbundenen Lichtemission verfolgt. Den Einfluß der verschiedenen ClpB-Präparationen auf die Rückfaltung der Luziferase zeigt Abb. 3.3.

Wie die Trübung der Luziferase-Lösung nach der Hitzebehandlung belegt, aggregiert Luziferase bei Hitzedenaturierung und kann spontan nicht zurückfalten. Auch in Anwesenheit von ClpB alleine wird keine Reaktivierung der Luziferase erreicht (Abb. 3.3). In Gegenwart des DnaK-Systems ohne ClpB kann max 5% der Luziferase wieder rückgefaltet werden, allerdings beginnt die Reaktivierung erst nach einer ausgeprägten Anlaufphase von 200 min. Wenn die denaturierte Luziferase mit ClpB und dem DnaK-System inkubiert wird, beginnt die Rückfaltung der Luziferase ohne Verzögerung und mit einer höheren Ausbeute. Allerdings konnten auch unter diesen Bedingungen maximal 10% der eingesetzten Luziferase reaktiviert werden. Die Reaktivierung der Luziferase verläuft in Gegenwart der ClpB-Varianten K204Q und K601Q genauso wie mit dem DnaK-System alleine, beide Mutanten haben demnach die Fähigkeit verloren, Proteinaggregate aufzulösen. Für die Chaperonaktivität von ClpB sind folglich zwei funktionelle NBDs notwendig. Die Funktion der beiden NBDs sollte nun genauer definiert werden.

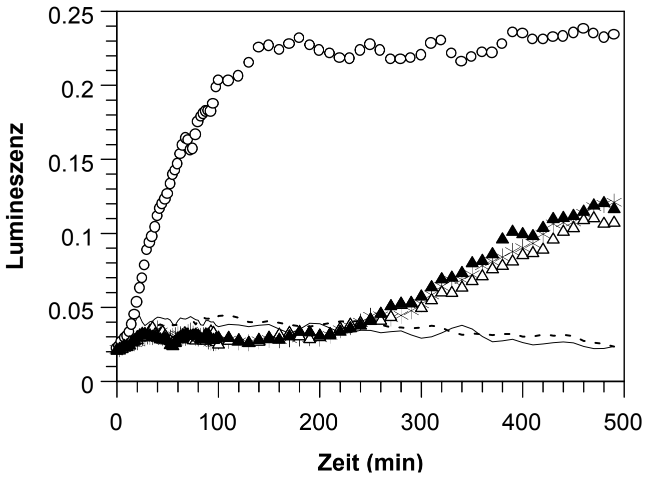


Abb. 3.3: Reaktivierung von Luziferase durch das DnaK-System und verschiedene ClpB-Mutanten.
0.08 µM hitzedenaturierte Luziferase wurde bei 30°C ohne Chaperone (——), mit 0.5 µM ClpB alleine (------), mit dem DnaK-System (3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE) (*), dem DnaK-System und ClpB(wt) (○), dem DnaK-System und ClpB(K204Q) (△), oder dem DnaK-System und ClpB(K601Q) (▲) inkubiert und die Lumineszenz kontinuierlich detektiert (siehe 2.5.5.1).

3.1.3 Die Affinität der NBDs für verschiedene Nukleotide

3.1.3.1 Bindung von Mant-Nukleotiden an ClpB

Die Nukleotidbindungseigenschaften von ClpB und seiner Punktmutanten wurde mit Hilfe der fluoreszierenden Nukleotidanaloga Mant-ADP und Mant-2´d-ADP untersucht. Mant-Nukleotide wurden bereits erfolgreich bei der Untersuchung des kinetischen Mechanismus von verschiedenen ATPasen eingesetzt und in vielen Fällen sind die kinetischen Parameter der Mant-Derivate mit den Parametern der nicht-modifizierten Nukleotide vergleichbar

(Hiratsuka, 1983; Cremo *et al.*, 1990; Woodward *et al.*, 1991; Sadhu und Taylor, 1992; Moore und Lohman, 1994). Die Bindung von Mant-ADP und Mant-ATP an ClpB ist mit einer Erhöhung der Mant-Fluoreszenz verbunden. Mant-ATP verhält sich jedoch insofern nicht als ATP-Analogon, als Mant-ATP von ClpB sehr viel langsamer hydrolysiert wird als ATP (Faktor 50-100) und nicht wie ATP die Bildung höherer ClpB-Oligomere begünstigt. In den folgenden Untersuchungen wurde deshalb nur mit Mant-ADP als ADP-Analogon gearbeitet.

Abb. 3.4 zeigt Fluoreszenzemissionsspektren von 0.5 µM Mant-ADP in Gegenwart der verschiedenen ClpB-Varianten. Die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) und ClpB(K204Q) bewirkt eine Erhöhung der Fluoreszenzemission um den Faktor 3.3 und eine Blauverschiebung des Emissionsmaximum um 8 nm. Die Wechselwirkung mit 5 µM ClpB(K601Q) führt nur zu einer 1.3-fachen Verstärkung der Fluoreszenzemission.

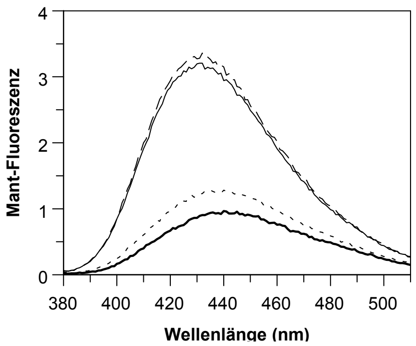


Abb. 3.4: Fluoreszenzemissionsspektrum von Mant-ADP in Gegenwart verschiedener ClpB-Mutanten. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in SFP bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 360 nm. Die Fluoreszenzemission von 5 µM Mant-ADP (▬▬) nimmt nach 30 min Inkubation mit 5 µM ClpB(wt) (——) oder ClpB(K204Q) (— —·) um den Faktor 3.3 zu. Die Wechselwirkung mit ClpB(K601Q) (··········) bewirkt eine 1.3-fache Zunahme der Fluoreszenzemission.

Die Affinitäten von Mant-ADP und Mant-2´d-ADP für die verschiedenen ClpB-Varianten wurden mittels Fluoreszenztitration von 0.5 µM Mant-Nukleotid mit zunehmender ClpB-Konzentration bestimmt (Abb. 3.5A). Die Kurvenanpassung nach der quadratischen Gleichung (Reinstein *et al.*, 1990) liefert einen K_d-Wert von 0.2 µM für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) und ClpB(K204Q). Die Affinität der ClpB-Mutante K601Q ist um zwei Größenordnungen niedriger (K_d = 15.9 µM). Die Doppelmutante ClpB(K204Q/K601Q) hat die Fähigkeit zur Nukleotidbindung verloren, die geringe Zunahme der Mant-Fluoreszenz (K_d > 100 µM) ist wahrscheinlich auf unspezifische Wechselwirkungen des Mant-Nukleotids mit dem Protein zurückzuführen. In Tabelle 3.1 sind die berechneten K_d-Werte der Mant-Nukleotide für verschiedene ClpB-Mutanten zusammengefasst. NBD1 stellt sowohl für Mant-

ADP als auch Mant-2´d-ADP eine niedrigaffine, NBD2 eine hochaffine Bindungsdomäne dar. Die Affinität für Mant-2´d-ADP ist um eine Größenordnung höher als für das Ribonukleotid.

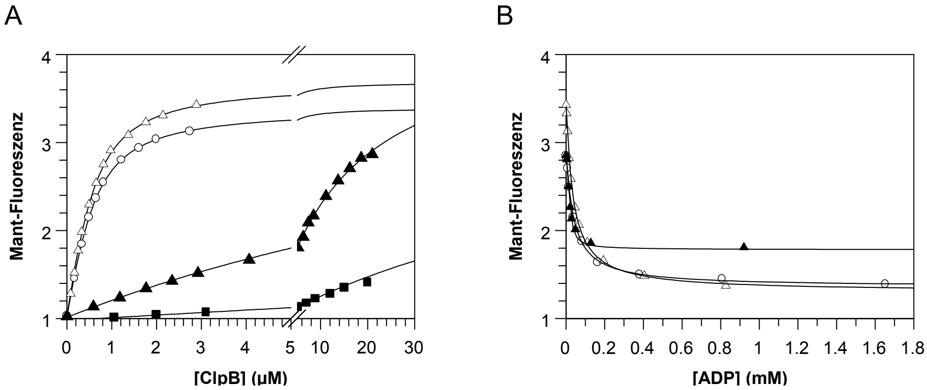


Abb. 3.5: Bindung von Mant-ADP an verschiedene ClpB-Varianten und Verdrängung mit ADP.
(A) Gleichgewichtstitration von 0.5 µM Mant-ADP mit ClpB(wt) (○) , ClpB(K204Q) (△), ClpB(K601Q) (▲) und ClpB(K204Q/K601Q) (■) bei 25°C in SFP (siehe 2.5.3.1). Die Anregungswellenlänge betrug 360 nm, die Emission wurde bei 440 nm detektiert. Für die Kurvenanpassung mit der quadratischen Gleichung wurde eine 1:1 Stöchiometrie Mant-ADP:ClpB vorausgesetzt. (B) Mant-ADP wurde aus dem vorgeformten Mant-ADP-ClpB-Komplex (0.5 µM Mant-ADP, 3-20 µM ClpB) mit ClpB(wt) (○), ClpB(K204Q) (△) und ClpB(K601Q) (▲) durch schrittweise Zugabe von ADP freigesetzt und die K_d-Werte für ADP durch Kurvenanpassung an eine kubische Gleichung berechnet.

Die Affinität der unmarkierten Nukleotide ADP, 2´d-ADP und ATP wurde über Verdrängungstitration mit einem vorgeformten ClpB-Mant-ADP-Komplex und dem entsprechenden unmarkierten Nukleotid ermittelt. Die so berechneten K_d-Werte sind ebenfalls in Tabelle 3.1 enthalten.

Wie Abb. 3.5B zeigt, ist die Verdrängung des Mant-Nukleotids aus dem Mant-ADP-ClpB(K601Q)-Komplex durch ADP unvollständig, die Fluoreszenzemission geht auch bei Sättigung mit ADP nicht auf die Ausgangsfluoreszenz des freien Mant-ADP zurück. Gleiches gilt für die Verdrängung mit dADP oder ATP (Verdrängungkurven nicht gezeigt). Da kein vollständig kompetitiver Mechanismus vorliegt, wurden die K_d-Werte für nicht-markierte Nukleotide und ClpB(K601Q) nicht in Tab. 3.1 aufgenommen.

Bemerkenswert ist, dass die Affinität der natürlichen Nukleotide etwa eine Größenordnung niedriger ist als die der Mant-Nukleotide. Die Bestimmung der K_d-Werte für ATP mittels Verdrängungtitration ist problematisch, da ATP durch ClpB hydrolsiert wird. Da die Hydrolyserate von ClpB bei 25°C und niedriger ATP-Konzentration jedoch sehr niedrig ist (siehe 3.1.4), können die ermittelten K_d-Werte als Abschätzung dienen. ATP wird von

ClpB(wt) und ClpB(K204Q) (K_d = 20-40 µM) mit im Vergleich zu ADP 10-fach schwächerer Affinität gebunden.

Tab 3.1: Vergleich der K_d-Werte von ClpB(wt) und der NBD-Mutanten für verschiedene Nukleotide. K_d-Werte (µM) der Mant-Nukleotide wurden durch Gleichgewichtstitrationen mit vorgelegten 0.5 µM Mant-Nukleotid, die der nicht-fluoreszierenden Nukleotide durch Verdrängung des Mant-Nukleotids aus einem vorgeformten ClpB·Mant-ADP-Komplex ermittelt. Angegebene Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Messungen erfolgten in SFP bei 25°C, einer Anregungswellenlänge von 360 nm und Emissionswellenlänge von 440 nm.

	Mant-ADP	Mant-2´d-ADP	ADP	2´d-ADP	ATP
ClpB(wt)	0.2	0.02	1.5	0.6	21.4
ClpB(K204Q)	0.2	0.02	2.8	1.0	43.4
ClpB(K601Q)	15.9	6.0			

3.1.3.2 Bindung von Nukleotiden an ClpB-ANBD

Da sich die Affinitäten von Mant-Nukleotiden und natürlichen Nukleotiden um den Faktor 10 unterscheiden, sollte ein direkter Signalgeber für die Bindung von Nukleotiden an ClpB gefunden werden. Dafür wurden Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der Walker A-Konsensussequenzen durch Cysteine ersetzt (ClpB(A212C), ClpB(T611C)) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff IANBD markiert (die Markierungsreaktion verlief mit einer Ausbeute von 50%). Um zu gewährleisten, dass die Einführung der Cysteine und Fluoreszenzfarbstoffe die Struktur und somit Nukleotidbindungskapazität der NBDs nicht beeinflußt, wurde zunächst die Bindung von Mant-ADP an ClpB(A212C)-ANBD und ClpB(T611C)-ANBD untersucht. Die aus der Änderung der Mant-Fluoreszenz ermittelten K_d-Werte für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(A212C)-ANBD und ClpB(T611C)-ANBD sind 0.18 µM bzw. 0.16 µM. Sie stimmen sehr gut mit dem K_d-Wert für ClpB(wt) von 0.2 µM überein (siehe Tab. 3.1), die strukturelle Integrität der NBDs wird demnach nicht durch Mutation oder Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigt.

Fluoreszenzemissionsspektren von 2.0 µM ClpB(A212C)-ANBD (Abb. 3.6A) und 2.0 µM ClpB(T611C)-ANBD (Abb. 3.6B) in Abwesenheit und Gegenwart von 1 mM ADP belegen, dass nur die ADP-Bindung an die NBD2 mit einem signifikanten Fluoreszenzsignal verbunden ist. Die ANBD-markierten Proteine sind deshalb nur für die Untersuchung der NBD2 geeignet. Die Einteilung der NBDs in hochaffine (NBD2) und niedrigaffine Bindungsstelle gilt demnach auch für nicht-modifizierte Nukleotide.

Die durch Fluoreszenztitration von 4 µM ClpB(T611C)-ANBD mit ADP oder ATP ermittelten K_d-Werte für die NBD2 liegen bei 55 µM für ADP und 250 µM für ATP (Abb. 3.7) und unterscheiden sich damit deutlich von den durch Verdrängungstitrationen bestimmten Werten (siehe Tab. 3.1). Allerdings zeigte sich, dass die Affinität von ClpB(T611C)-ANBD für ADP stark von der anfänglich vorgelegten Proteinkonzentration abhängig ist (siehe auch 3.3.2), und die Dissoziationskonstante Werte von 8 µM bei vorgelegten 0.5 µM ClpB(T611C)-ANBD bis 55 µM bei 4.0 µM Protein annehmen kann.

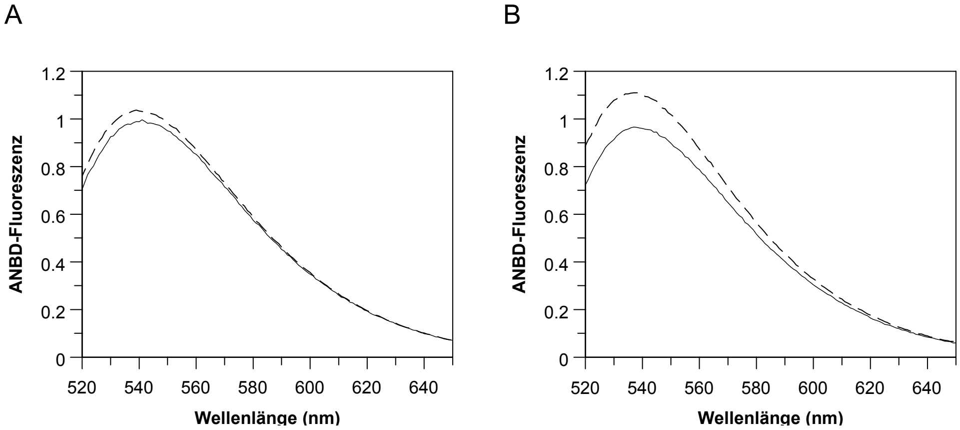


Abb. 3.6: Fluoreszenzemissionsspektrum von ClpB(A212C)-ANBD und ClpB(T611C)-ANBD in An- und Abwesenheit von ADP.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in SFP bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 495 nm. (A) Die Zugabe von 1 mM ADP (---) zu 4 µM ClpB(A212C)-ANBD (——) bewirkt keine signifikante Änderung der ANBD-Emission. (B) Bei Zugabe von 1 mM ADP (---) zu 4 µM ClpB(T611C)-ANBD (——) nimmt die ANBD-Fluoreszenz um 20% zu.

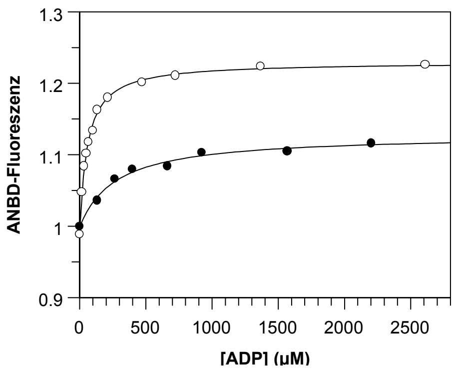


Abb. 3.7: Bindung von ADP und ATP an ClpB(T611C)-ANBD.

(A) Gleichgewichtstitration von 4 µM ClpB(T611C)-ANBD mit ADP (○) oder ATP (●) bei 25°C in SFP (siehe 2.5.3.1). Die Anregungswellenlänge betrug 472 nm, die Emission wurde bei 540 nm detektiert. Für die Kurvenanpassung mit der quadratischen Gleichung wurde eine 1:1 Stöchiometrie Mant-ADP:ClpB vorausgesetzt.

3.1.4 ATP-Hydrolyse unter *Single-Turnover*-Bedingungen

Beide NBDs unterscheiden sich stark in ihrer Affinität für Nukleotide. Aber nicht nur die Bindung von Nukleotiden, sondern die Hydrolyse von ATP ist essentiell für die ClpB-Chaperonfunktion (Kim *et al.*, 1998). Deshalb sollte ermittelt werden, ob die beiden NBDs auch Unterschiede in der ATPase-Aktivität aufweisen. 150 µM ClpB wurden hierzu mit 75 µM ATP bei 25°C inkubiert, so dass nur ein Umsatz pro ClpB-Molekül stattfinden kann. Stoppt man die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten ab und bestimmt den Anteil an ADP und ATP über HPLC-Analyse so erhält man den in Abb. 3.8 dargestellten Verlauf. Die Abnahme des ATP-Anteils folgt einer einfachen exponentiellen Funktion, die Kurvenanpassung liefert Hydrolyseraten von $3.0 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ für ClpB(wt), $1.4 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ für ClpB(K204Q) und $1.1 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ für ClpB(K601Q). Die Hydrolyserate von ClpB unter *Single-turnover*-Bedingungen ist demnach sehr gering und gleicht der unstimulierten ATPase-Aktivität von $DnaK_{Tth}$ mit einem Wert von $3.1 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ (Klostermeier *et al.*, 1998). Die ATPase-Aktivität der beiden NBD-Mutanten ist im Vergleich zu ClpB(wt) um 50% bzw. 65% reduziert, erstaunlicherweise zeigt jedoch auch die ClpB-Mutante K601Q ATPase-Aktivität. Dieses Experiment belegt, dass beide NBDs grundsätzlich in der Lage sind, ATP zu hydrolysieren. Da die ADP-Dissoziation schnell ist im Vergleich zur ATP-Hydrolyse (siehe 4.2.2), ADP mit höherer Affinität gebunden wird als ATP (siehe 4.2.1) und außerdem den Zerfall des ClpB-Oligomers induziert, könnte Produkthemmung durch ADP auftreten und der tatsächliche Wert der *Single-turnover* Rate höher als der hier bestimmte Wert liegen.

Da ClpB aus einem thermophilen Organismus stammt, sollte das Aktivitätsoptimum bei ca. 70°C zu erwarten sein. Die ATP-Hydrolyserate von ClpB(wt) bei 60°C von $1.55 \cdot 10^{-3}\ s^{-1}$ unterscheidet sich jedoch nur um Faktor fünf von der Hydrolyserate bei 25°C. Es ist deshalb anzunehmen, dass $ClpB_{Tth}$ auch bei 25°C funktionsfähig ist.

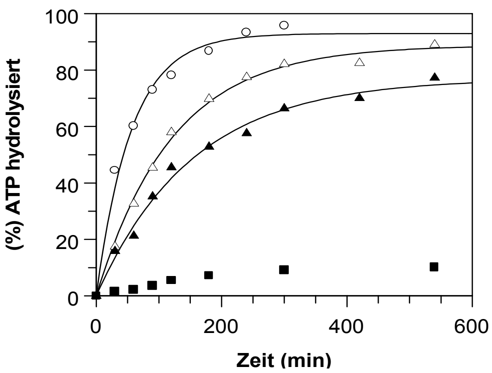


Abb. 3.8: Hydrolyse von ATP durch ClpB(wt) und NBD-Mutanten.

150 µM ClpB(wt) (○), ClpB(K204Q) (△), ClpB(K601Q) (▲) oder ClpB(K204Q/K601Q) (■) wurden mit 75 µM ATP inkubiert, die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die Menge an ATP und ADP durch HPLC bestimmt. Die Hydrolyse von ATP läßt sich mit einer einfachen Exponentialfunktion beschreiben. Die Ratenkonstanten betragen $3.0 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ für ClpB(wt), $1.4 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ für ClpB(K204Q) und $1.1 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ für ClpB(K601Q).

3.1.5 Nukleotidabhängige Oligomerisierung der ClpB-Mutanten

Elektronenmikroskopische Untersuchungen offenbaren, das Hsp104 aus Hefe ringförmige Hexamere bildet und ATP für diese Oligomerbildung benötigt wird (Parsell *et al.*, 1994a). Wie bei anderen Mitgliedern der Clp-Familie, wird die Hexamerisierung durch Mutationen gehemmt, die die ATP-Bindung beeinträchtigen (Parsell *et al.*, 1994a; Schirmer *et al.*, 1998; Schirmer *et al.*, 2001). Obwohl die Domänenorganisation in Clp-Proteinen aus *E.coli* und Hsp104 aus Hefe konserviert ist, unterscheiden sie sich in mindestens zwei wichtigen Punkten. Mutationen innerhalb der NBD1, aber nicht der NBD2 vermindern die Hexamerbildung von ClpA und ClpB aus *E. coli* (Seol *et al.*, 1995; Pak *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000), während nur Mutationen der NBD2 die Oligomerisierung von Hsp104 beeinträchtigen (Parsell *et al.*, 1994a; Schirmer *et al.*, 1998; Schirmer *et al.*, 2001). Zweitens inhibiert ADP die Oligomerisierung von bakteriellem ClpB (Zolkiewski *et al.*, 1999), dagegen scheint ADP die hexamere Konformation von Hsp104 und Hsp101 (ClpB-Homologe aus Pflanzen) zu stabilisieren (Parsell *et al.*, 1994a; Gallie *et al.*, 2002). Diese Unterschiede sind überraschend, da beide NBDs hochkonserviert sind und Hsp104 eine Sequenzhomologie von 58% mit bakteriellem ClpB aufweist. In elektronenmikroskopischen Studien wurde ClpB aus *E.coli* außerdem als heptameres Ringsystem beschrieben (Kim *et al.*, 2000).

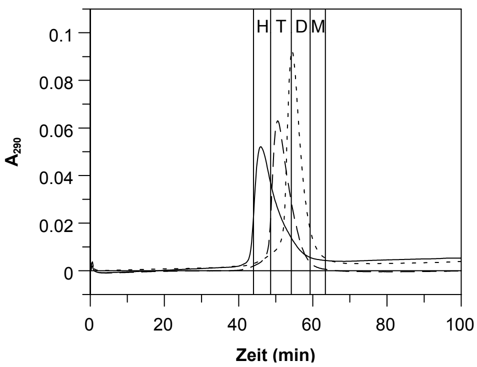


Abb. 3.9: Abhängigkeit des Oligomerisierungszustandes von ClpB(wt) von der Salzkonzentration.
50 µl 5 mg/ml ClpB(wt) wurde einer Gelfiltration an Sephadex S200 bei 25°C unterzogen (siehe 2.4.3). Dargestellt sind die Elutionsprofile (A_{290}) und in Gegenwart von 0.0 M KCl (—), 0.1 M KCl (– –) und 0.5 M KCl (·······) in Abwesenheit von Nukleotiden. Vertikale Linien definieren die Bereiche, in denen ClpB als Hexamer oder Pentamer (H), Tetramer oder Trimer (T), Dimer (D) und Monomer (M) vorliegt.

Die Oligomerisierung von ClpB(wt) und NBD-Mutanten aus *T. thermophilus* wurde mittels Gelfiltration an einer Sephadex S200HR-Säule mit 50 µl 5 mg/ml Protein bei 25°C untersucht und dabei Ionenstärke und Nukleotidgehalt des Laufpuffers variiert. ClpB unterliegt einem dynamischen Oligomerisierungsgleichgewicht und bildet unter den verschiedenen Bedingungen Konformere vom Monomer bis zum Hexamer aus. Die Oligomerisierung von

ClpB ist stark von der Ionenkonzentration abhängig, hohe Salzkonzentrationen (KCl, NaCl, NaOAc) verschieben das Gleichgewicht zum Monomer. Wie Abb. 3.9 zeigt, liegt in Abwesenheit von Nukleotiden ClpB bei 0 mM KCl als Hexamer, bei einer KCl-Konzentration von 0.5 M vor allem als Dimer vor.

Die Zugabe von 1 mM ADP führt zu einer Anreicherung von Monomeren und Dimeren, während die Anwesenheit von 1 mM ATP das Gleichgewicht zu höheren Oligomeren verschiebt (Abb. 3.10). Bemerkenswert ist, dass in Abwesenheit von Nukleotid der Anteil an höheren Oligomeren überwiegt. Im nukleotidfreien Zustand gleicht der Oligomerisierungsgrad eher dem ATP-Zustand, ADP bewirkt dagegen die Auflösung höherer Oligomere. In Gegenwart des fluoreszierenden Nukleotidanalogons Mant-ATP verhält sich ClpB in der Gelfiltration wie in Gegenwart von ADP.

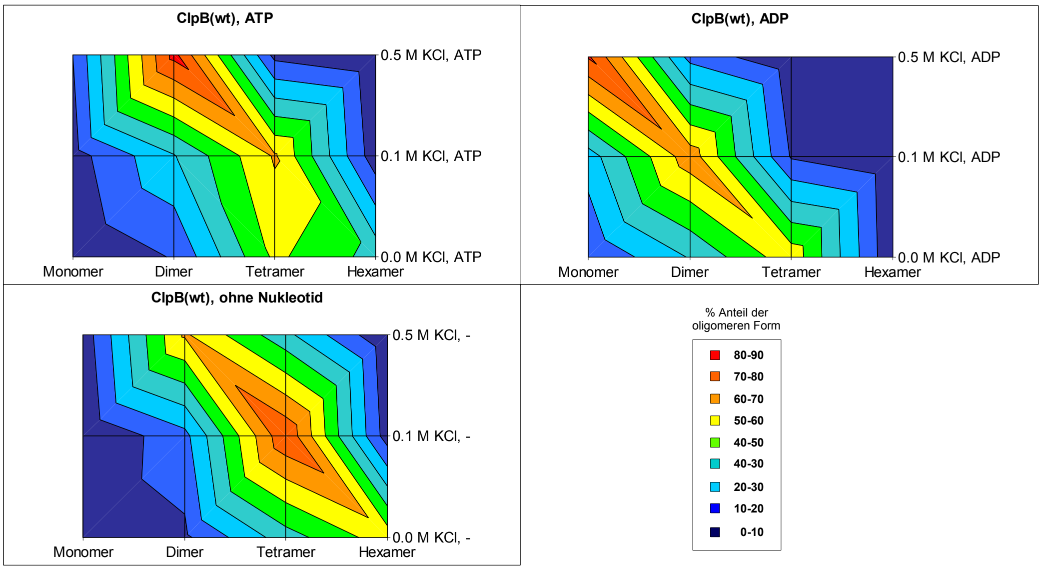
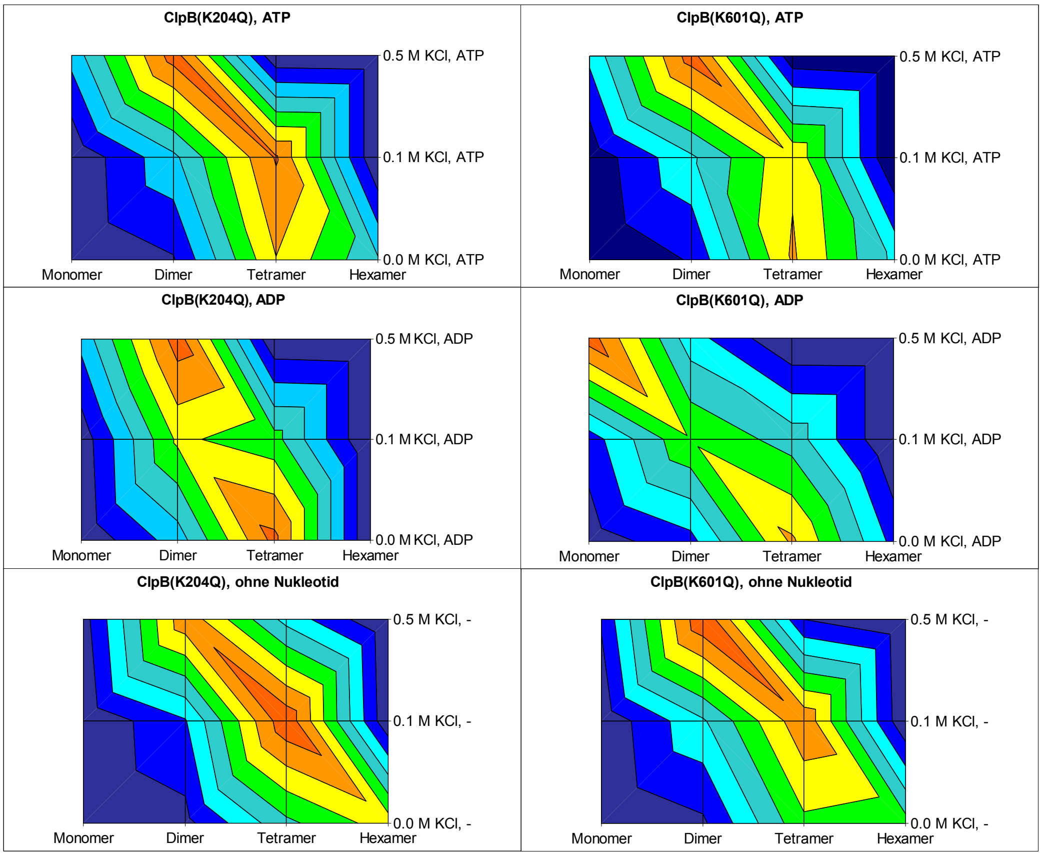


Abb. 3.10: Der Oligomerisierungszustand von ClpB(wt) in Abhängigkeit von gebundenem Nukleotid und Salzkonzentration.

50 µl 5 mg/ml ClpB wurden in Gegenwart verschiedener Nukleotide und KCl-Konzentrationen auf eine S200-Gelfiltrationssäule injiziert und anhand der Retentionszeiten der Peaks die oligomere Form bestimmt (siehe 2.4.3). Die Graphiken geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Oligomere unter verschiedenen Bedingungen durch einen Farbcode wieder (z.B. ClpB(wt) in Gegenwart von ATP bei 0.1 M KCl: 0-10% Monomer, 20-30% Dimer, 60-70% Tetramer, 0-10% Hexamer).

Beide NBD-Mutanten unterliegen wie ClpB(wt) einer von der Ionenkonzentration abhängigen Oligomerisierung, wobei hohe Salzkonzentrationen die Auflösung hocholigomerer Konformere bewirken (Abb. 3.11). Im ATP-Zustand und im nukleotidfreiem Zustand ähnelt die Verteilung der oligomeren Formen von ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) der Verteilung des Wildtyps, deutliche Unterschiede zwischen ClpB(wt) und NBD-Mutanten treten nur in der ADP-Form auf. So vermittelt ADP die Auflösung der Oligomere bei der K204Q-Mutante nicht vollständig, der kleinste Oligomer in Gegenwart von 0.5 M KCl und ADP ist hier der Dimer, während ClpB(wt) und ClpB(K601Q) unter diesen Bedingungen als Monomer vorliegen.



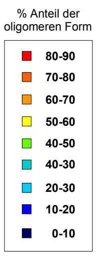


Abb. 3.11: Der Oligomerisierungszustand von ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) in Abhängigkeit von gebundenem Nukleotid und Salzkonzentration.
50 µl 5 mg/ml der ClpB-Mutanten wurden in Gegenwart verschiedener Nukleotide und KCl-Konzentrationen einer Gelfiltration an S200 unterworfen und anhand der Retentionszeiten der Peaks der oligomere Zustand bestimmt (siehe 2.4.3). Die Graphiken geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Oligomere unter verschiedenen Bedingungen durch einen Farbcode wieder. (z.B. ClpB(K204Q) in Gegenwart von ATP bei 0.1 M KCl: 0-10% Monomer, 20-30% Dimer, 70-80% Tetramer, 0-10% Hexamer).

Die Oligomerbildung der Doppelmutante ClpB(K204Q/K601Q) ist völlig unabhängig vom anwesenden Nukleotid (Daten nicht gezeigt) und ist identisch mit der Oligomerverteilung von ClpB(wt) in Abwesenheit von Nukleotid (Abb. 3.10). ADP bewirkt bei der Doppelmutante nicht die Auflösung von Oligomeren.

Bemerkenswert ist, dass die Bindung von ADP, nicht ATP eine Änderung des Oligomerisierungszustandes im Vergleich zum nukleotidfreiem Zustand bewirkt.

3.2 Interdomänen-Kommunikation im ClpB-Oligomer

3.2.1 Kooperative Kinetik der ATP-Hydrolyse

Um eine Kommunikation zwischen den beiden Nukleotidbindungsdomänen und verschiedener Domänen im ClpB-Oligomer nachzuweisen, wurde die ATPase-Aktivität unter *steady-state*-Bedingungen mittels gekoppelten Enzymtest bei 25°C untersucht (siehe 2.5.1.2). Wenn die beiden NBDs gleichermaßen aber unabhängig voneinander zur ATP-Hydrolyse beitragen, sollte die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration eine zweiphasige Kinetik ergeben. Andererseits würde man eine sigmoidale Abhängigkeit erwarten, wenn sich die beiden Bindungsdomänen auf einem Monomer oder innerhalb des Oligomers gegenseitig beeinflussen. Tatsächlich zeigt die *steady-state* ATPase-Aktivität von ClpB(wt) eine sigmoidale Abhängigkeit von der ATP-Konzentration im Bereich von 0.02-1 mM (Abb. 3.12). ClpB(wt) hydrolysiert ATP mit einem k_{cat} von 0.044 s^{-1}, das entspricht einer Umsatzrate von ~ 15 ATP-Molekülen pro ClpB-Hexamer pro Minute. Die Analyse der Daten mit der Hill-Gleichung ergibt einen Hill-Koeffizient von 3.1. Dies bedeutet, dass ClpB mindestens drei Moleküle ATP pro Oligomer mit hoher Kooperativität bindet, oder mehr als drei Moleküle mit niedrigerer Kooperativität.

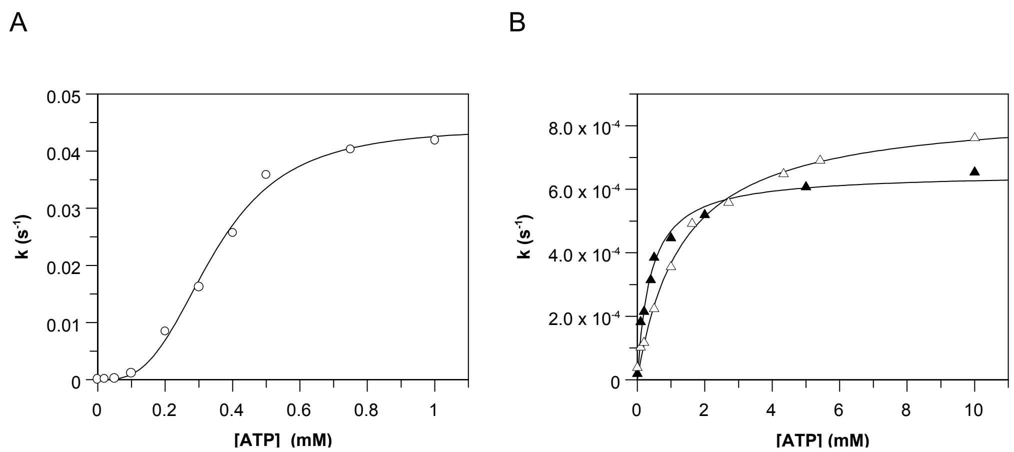


Abb. 3.12: Analyse der *steady-state*-ATPase-Aktivität von ClpB(wt) und NBD-Mutanten.

(A) 5 µM ClpB(wt) wurden mit unterschiedlichen Mengen Mg·ATP inkubiert und die ATP-Hydrolyserate im gekoppelten Enzymtest bei 25°C bestimmt (siehe 2.5.1.2). Die Auftragung der Hydrolyserate k (s^{-1}) gegen die ATP-Konzentration zeigt eine sigmoidale Abhängigkeit. Die Analyse mit der Hill-Gleichung ergibt folgende Werte: k_{cat} = 0.044 s^{-1}, Km = 0.34 mM, n = 3.1.

(B) 10 µM ClpB(K204Q) (△) und ClpB(K601Q) (▲) wurden mit unterschiedlichen Mengen Mg·ATP inkubiert und die ATP-Hydrolyserate im gekoppelten Enzymtest bei 25°C bestimmt. Die Auftragung der Hydrolyserate k (s^{-1}) gegen die ATP-Konzentration wurde an eine Michaelis-Menten-Kinetik angeglichen und ergibt folgende Werte: ClpB(K204Q): $k_{cat} = 8.5 \cdot 10^{-4}$ s^{-1}, Km = 1.3 mM, ClpB(K601Q): $k_{cat} = 6.5 \cdot 10^{-4}$ s^{-1}, Km = 0.4 mM.

Die beiden NBD-Mutanten ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) folgen der einfachen Michaelis-Menten-Kinetik und die Auftragung der ATPase-Aktivität gegen die ATP-Konzentration ergibt charakteristische hyperbolische Sättigungskurven. Bemerkenswert ist, dass die Hydrolyseraten der Mutanten bei Substratsättigung (k_{cat} ClpB(K204Q) = 8.5 · 10^{-4} s^{-1}, k_{cat} ClpB(K601Q) = 6.5 · 10^{-4} s^{-1}) um zwei Größenordnungen niedriger sind als der k_{cat}-Wert von ClpB(wt) (4.4 · 10^{-2} s^{-1}). Ein Vergleich des Hydrolyseraten bei niedriger ATP-Konzentration (100 µM) verdeutlicht jedoch, dass ClpB(wt) (k = 3.3 · 10^{-4} s^{-1}) ATP nur unwesentlich langsamer hydrolysiert als ClpB(K204Q) (k = 0.7 · 10^{-4} s^{-1}) oder ClpB(K601Q) (k = 1.2 · 10^{-4} s^{-1}). Diese Beobachtung stimmt mit den gemessenen *Single-Turnover*-Kinetiken (siehe 3.1.4) überein, die auch bei extrem niedrigen ATP-Konzentrationen durchgeführt wurden und nur kleine Unterschiede zwischen der ATPase-Aktivität von ClpB(wt) und ClpB-Mutanten zeigten. Bei ATP-Konzentrationen im mM-Bereich führt die Kooperativität des ClpB(wt) jedoch zu einer enormen Beschleunigung der ATPase-Aktivität.

3.2.2 Inhibition der Kooperativität von ClpB(wt) durch die NBD-Mutanten

Um zu beurteilen, ob die Kooperativität der ATP-Hydrolyse auf intramolekularen Wechselwirkungen der beiden NBDs eines Monomers oder auf intermolekularer Kommunikation verschiedener NBDs innerhalb des ClpB-Rings beruht, wurde die ATPase-Aktivität von 5 µM ClpB(wt) bei 0.4 mM ATP in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der NBD-Mutanten gemessen. Im Falle von intramolekularen Wechselwirkungen sollte die Anwesenheit der NBD-Mutanten keinen Einfluß auf die ATPase-Aktivität des Wildtyps haben. Basiert die Kooperativität auf intermolekularen Wechselwirkungen, sollte die Zugabe der NBD-Mutanten eine Inhibition der ClpB-ATPase zur Folge haben, da inaktive gemischte Oligomere ausgebildet werden. Den Einfluß der K204Q- und der K601Q-Mutante auf die ATPase-Aktivität von ClpB(wt) zeigt Abb. 3.13.

Beide Mutanten inhibieren die ClpB-ATPase-Aktivität gleichermaßen. Diese Hemmung der ATPase könnte darauf beruhen, dass die NBD-Mutanten die Wildtyp-Untereinheiten in inaktiven gemischten Dimeren festsetzen oder gemischte Hexamere gebildet werden, in denen ClpB(wt) inaktiviert wird. Da die NBD-Mutanten zusammen mit ClpB(wt) in der Gelfiltration jedoch Komplexe gleicher Mobilität wie ClpB(wt) bilden, ist die Bildung gemischter Hexamere wahrscheinlich. Die Dissoziationskonstante dieser Oligomere liegt im Bereich von 2 µM. Beide Nukleotidbindungsdomänen müssen intakt sein, um eine Kooperativität in der ATP-Hydrolyse zu gewährleisten.

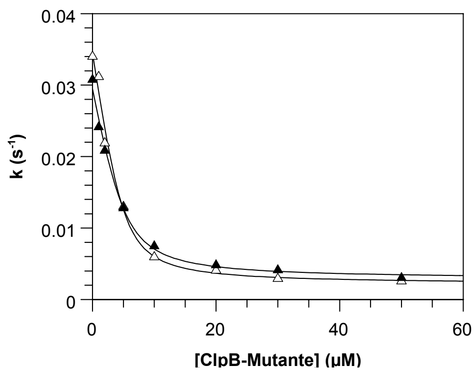


Abb. 3.13: Einfluß der NBD-Mutanten auf die *steady-state*-ATPase von ClpB(wt).
Die ATPase-Aktivität k von 5 µM ClpB wurde bei einer ATP-Konzentration von 0.4 mM in Gegenwart verschiedener Mengen von ClpB(K204Q) (△) und ClpB(K601Q) (▲) im gekoppelten Enzymtest bei 25°C bestimmt. Eine Angleichung der gemessenen Werte an die quadratische Gleichung (2.5.3.1) ergibt mit L_0 = 5 µM (ClpB(wt)-Monomer) K_d-Werte von 0.8 µM (ClpB(K204Q)) und 1.9 µM (ClpB(K601Q)).

Die Frage, wieviele inaktive Untereinheiten notwendig sind, um die Kooperativität des ClpB-Hexamers vollständig zu unterdrücken, wurde mit Hilfe einer statistischen Auswertung beantwortet. Unter der Annahme, dass sich das Oligomerisationsverhalten von aktiven und inaktiven Untereinheiten nicht unterscheidet, also die mikroskopischen Dissoziationskonstanten der Untereinheiten unabhängig vom Typ sind, wurde nach der binomischen Formel (siehe 2.5.1.2) eine statistische Verteilung der Hexamer-Spezies (Hexamer mit 0 inaktiven Untereinheiten, Hexamer mit 1 inaktiver Untereinheit, …) bei verschiedenen ClpB(K601Q)-Konzentrationen berechnet. Mit dieser Verteilung wurden dann Inhibitionskurven simuliert und diese mit der tatsächlich gemessenen ATPase-Aktivität verglichen (Abb. 3.14). Die gemessene Inhibition wird am besten durch eine 2:1 Stöchiometrie beschrieben, d.h. wenn der ClpB-Hexamer drei oder mehr inaktive Untereinheiten enthält, wird die Kooperativität der ATPase-Aktivität vollständig inhibiert. Wahrscheinlich ist, dass auch schon beim Einsatz von ein oder zwei inaktiven Untereinheiten eine teilweise Hemmung auftritt, diese wurde in der Simulation jedoch nicht berücksichtigt.

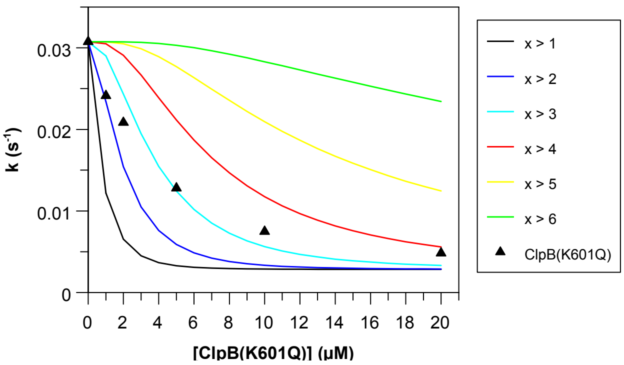


Abb. 3.14: Inhibierung der ATPase-Aktivität durch ClpB(K601Q) und Simulation mit statistischer Oligomerverteilung.

Mit Hilfe der binomischen Formel wurde die Wahrscheinlichkeit für x Moleküle ClpB(K601Q) (x = 1, 2, 3, 4, 5, 6) in einem ClpB-Hexamer für die verschiedenen Konzentrationsverhältnisse von ClpB(K601Q) zu ClpB(wt) berechnet. Mit der berechneten Verteilung wurden Inhibitionskurven simuliert, unter der Annahme, dass ≥ x inaktive Untereinheiten innerhalb des ClpB-Hexamers zu einer vollständigen Inhibition der ATPase-Aktivität führen. Die beste Annäherung an die gemessene Inhibition durch ClpB(K601Q) (▲) wird erreicht, wenn drei oder mehr inaktive Untereinheiten im Hexamer die Aktivität vollständig hemmen.

3.2.3 Der Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und Chaperonaktivität

Um direkt zu zeigen, dass Oligomerisierung und Chaperonaktivität von ClpB(wt) gekoppelt sind, wurde die Reaktivierung von hitzedenaturierter Luziferase in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen untersucht. Hohe Salzkonzentrationen behindern die Oligomerisierung, deshalb sollte die Chaperonaktivität mit steigender Ionenkonzentration abnehmen, wenn der ClpB-Hexamer die aktive Chaperonkonformation darstellt. Da die Lumineszenz der Luziferase selbst durch die Salzkonzentration beeinflußt wird, wurde die Rückfaltungsaktivität von ClpB(wt) in einem diskontinuierlichen Assay bestimmt (siehe 2.5.5.1). Die Geschwindigkeit der Reaktivierung durch das ClpB-DnaK-System wurde durch die Salzkonzentration stark beeinflußt (Abb 3.15). Korreliert man die Chaperonaktivität des ClpB-DnaK-Systems mit dem Anteil von höheren Oligomeren (Trimer-Hexamer) bei verschiedenen Salzkonzentrationen, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Auch wenn das Oligomerisierungsgleichgewicht von ClpB durch Wechselwirkungen mit dem Substrat Luziferase oder mit anderen Chaperonen zusätzlich beeinflußt werden kann, zeigen diese Experimente, dass die Bildung höherer Oligomere für die Chaperonfunktion von ClpB essentiell ist.

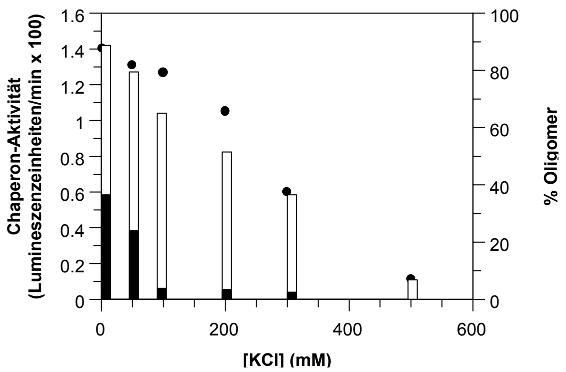


Abb. 3.15: Korrelation von ClpB-Chaperonaktivität und Oligomerisierung bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

0.8 µM hitzedenaturierte Luziferase wurden in Gegenwart von 1, 50, 100, 200, 300 und 500 mM KCl bei 30°C in Rückfaltungspuffer mit Chaperonen (3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE, 0.5 µM ClpB) für 80 min inkubiert und die Luziferaseaktivität diskontinuierlich nach Probenentnahme bestimmt (siehe 2.5.5.1). Aus der linearen Zunahme der Lumineszenz über diesen Zeitraum wurde die Chaperonaktivität des ClpB-DnaK-Systems (in Lumineszenz-Einheiten/min) berechnet (●) und gegen die KCl-Konzentration aufgetragen. Das Histogramm zeigt den prozentualen Anteil der Oligomere (gefüllte Säule: Pentamer-Hexamer, offene Säule: Trimer-Tetramer) bei definierten KCl-Konzentrationen, wie er mittels Gelfiltration bestimmt wurde.

3.3 Kinetische Charakterisierung der Nukleotidbindung von ClpB(trunc)

3.3.1 Eigenschaften der Deletionsmutante ClpB(trunc)

Erste *Pre-steady-state*-Messungen zur Untersuchung der Bindung von mant-ADP an ClpB(wt) zeigten, dass die Nukleotidbindung ein sehr komplexer Prozess ist, der neben der Wechselwirkung zwischen Nukleotid und Protein auch Konformationsänderungen sowie Änderungen des oligomeren Zustandes von ClpB beinhaltet. Um das System zu vereinfachen und die eigentliche Nukleotidbindung von der damit verbundenen Umoligomerisierung zu trennen, wurde zunächst eine verkürzte ClpB-Variante, ClpB(trunc) eingesetzt. Dieses Fragment wurde als stabiles Produkt bei partieller Proteolyse von ClpB(wt) mit Trypsin identifiziert. ClpB(trunc) fehlen die Aminosäuren 1-238, es besitzt daher nur eine funktionsfähige NBD (NBD2), die Verbindungsdomäne und ein kurzes Fragment der NBD1 (Abb. 3.16A). Nach der Überexpression und Reinigung von ClpB(trunc) offenbarte die Untersuchung mittels Massenspektroskopie und Peptidsequenzierung, dass auch am C-Terminus 61 Aminosäuren fehlen (durch MS bestimmtes Molekulargewicht: 63.4 kD).

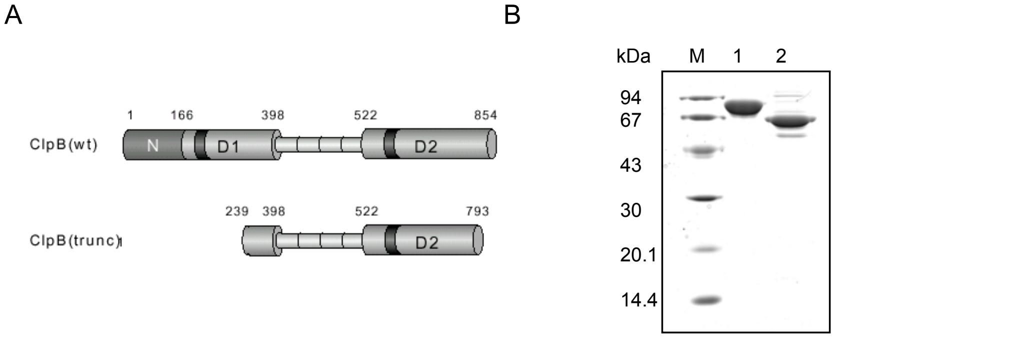


Abb. 3.16: Strukturelle Organisation und Reinigung von ClpB(trunc).
(A) ClpB(trunc) besitzt eine funktionelle NBD (D2), die Verbindungsdomäne und ein kurzes Fragment der NBD1 (B) SDS-PAGE zum Endprodukt der Reinigung von ClpB(wt) und ClpB(trunc), aufgetragen sind ca. 3 µg Protein je Spur. (M) Molekulargewichtsstandard , (1) ClpB(wt), (2) ClpB(trunc).

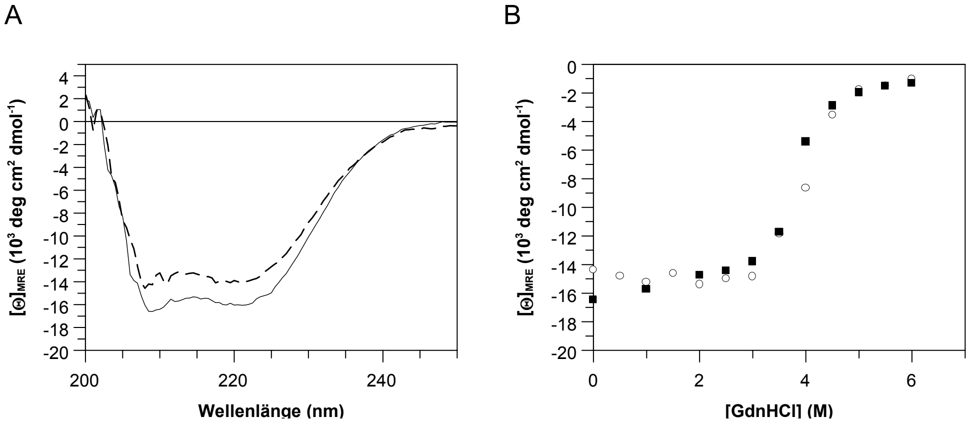


Abb. 3.17: Fern-UV-CD-Spektren und GdnHCl-induzierte Entfaltung von ClpB(wt) und ClpB(trunc).
(A) Die CD-Spektren wurden mit einer Proteinkonzentration von 20 µM, der Empfindlichkeit von 100 mdeg und der Schichtdicke von 0.02 cm aufgenommen. Alle Spektren sind 10-fach akkumuliert. ClpB(wt) (—), ClpB(trunc) (---), (B) 20 µM ClpB wurde mit unterschiedlichen GdnHCl-Konzentrationen 30 min inkubiert. Das CD-Signal wurde bei 220 nm mit einer Empfindlichkeit von 100 mdeg detektiert und 10-fach akkumuliert. ClpB(wt) (○), ClpB(trunc) (■).

CD-Messungen belegen, dass ClpB(trunc) wie ClpB(wt) hauptsächlich α-helikale Anteile besitzt (Abb. 3.17A). Wie die Denaturierung mit GdnHCl zeigt, unterscheiden sich die Stabilität von ClpB(trunc) und ClpB(wt) kaum (Abb. 3.17B). ClpB(trunc) bildet demnach eine stabile native Tertiärstruktur, allerdings neigt ClpB(trunc) zur Aggregation.

In Gelfiltrations-Experimenten an der S200-Säule erscheint es als Peak bei 38 min, unabhängig von der ClpB(trunc)-Konzentration, der Ionenkonzentration oder der Anwesenheit von Nukleotiden. Dies entspricht einem Molekulargewicht von ca. 1200 kDa (15-20-mer). ClpB(trunc) unterliegt keiner nukleotidabhängigen Oligomerisierung, zeigt aber ähnliche Nukleotidbindungsaffinitäten wie ClpB(wt) (siehe 3.3.2). Eine von der Oligomerisierung entkoppelte Nukleotidbindung sollte deshalb mit Clp(trunc) gut zu beobachten sein.

3.3.2 Die Abhängigkeit der Nukleotidbindungsaffinität von der ClpB-Konzentration

Die Anwesenheit von ADP und Mant-ADP bewirkt die Auflösung von Oligomeren bei ClpB(wt), hat aber keine Auswirkung auf den oligomeren Zustand von ClpB(trunc). Wenn Mant-ADP nur an eine bestimmte oligomere Form wie Monomer oder Dimer binden kann, sollte die vorgelegte ClpB-Konzentration in Titrationsexperimenten Einfluß auf die Affinität für Mant-ADP haben, da bei höheren Konzentrationen der Anteil von nicht-bindungsfähigen hohen Oligomeren zunimmt. Um die ClpB-Konzentration während des Experiments konstant zu halten, wurde in Gleichgewichtstitrationen ClpB(wt) bzw. ClpB(trunc) vorgelegt und schrittweise Mant-ADP zugegeben. Diese Titrationen mit Zugabe des Fluorophors wurden bei verschiedenen ClpB-Konzentrationen wiederholt.

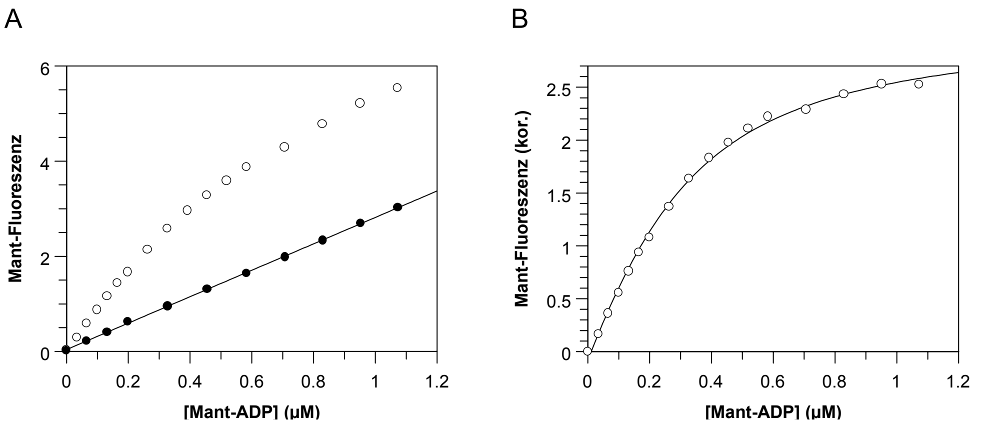


Abb. 3.18: Gleichgewichtstitration von ClpB(wt) mit Mant-ADP (gemessene und korrigierte Titrationskurve).

(A) Standardfluoreszenzpuffer (●) oder 0.5 µM ClpB(wt) (○) wurde mit Mant-ADP bei 25°C titriert und die Mant-Fluoreszenz bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 360 nm, die Emission wurde bei 440 nm detektiert. (B) Die Titrationskurve wurde um den Beitrag der Fluoreszenzemission des freien Fluorophors (lineare Zunahme in A) korrigiert und eine Kurvenanpassung an die quadratische Gleichung vorgenommen (siehe Anhang). Geht man von einer Bindungsstöchiometrie von 1:2 aus (ein Mant-ADP bindet pro ClpB(wt)-Dimer), so errechnet sich ein K_d-Wert von 0.17 µM für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt).

Das in solchen Titrationen erhaltene Emissionssignal setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen: Die Fluoreszenzerhöhung aufgrund der Konzentrationszunahme des freien Fluorophors und der Emissionsänderung durch die Wechselwirkung von Mant-ADP mit ClpB (Abb. 3.18A). Um den Beitrag des freien Fluorophors zu eliminieren, wurde die Bindungskurve aus dem Differenzsignal der Titration von Mant-ADP gegen ClpB und einer

Referenztitration von Mant-ADP gegen Puffer ermittelt. Dissoziationskonstanten wurden dann durch Angleichung der Bindungskurve an die quadratische Gleichung berechnet (Abb. 3.18B).

Betrachtet man die verschiedenen Titrationen mit ClpB(wt), so sinkt die Affinität für Mant-ADP mit steigender Proteinkonzentration von K_d = 0.17 µM bei 0.5 µM ClpB(wt) bis zu K_d = 7.0 µM bei 50 µM ClpB(wt) (Abb. 3.19A). Auch die Mutante ClpB(K204Q) zeigt dieses Verhalten, bei ihr steigt die Dissoziationskonstante sogar von K_d = 0.2 µM bei 0.5 µM ClpB(K204Q) bis zu K_d ~ 150 µM bei 50 µM ClpB(K204Q) (siehe Tab. 3.2). Die Affinität der Mutante ClpB(K601Q) für Mant-ADP ist zu niedrig für diese Art der Untersuchung, da bei den notwendigen hohen Nukleotidkonzentrationen starke Lichtstreuungseffekte auftreten. Im Gegensatz dazu wird die Bindungsaffinität von ClpB(trunc) für Mant-ADP nicht durch die Proteinkonzentration beeinflußt und der K_d liegt konstant unabhängig von der vorgelegten Proteinkonzentration bei 0.1-0.2 µM (Abb. 3.19B). Die Nukleotidbindung an ClpB(trunc) ist demnach nicht mit einer Verschiebung der Oligomerverteilung gekoppelt. Abbildung 3.20 zeigt mit einer Auftragung der berechneten K_d-Werte gegen die eingesetzte Proteinkonzentration eine Zusammenfassung der Titrationsexperimente.

Das Verhalten von ClpB(wt) läßt sich durch einen Zwei-Schritt-Bindungsprozess beschreiben. Wie in der Gelfiltration gezeigt liegt ClpB(wt) im nukleotidfreiem Zustand bei einer Salzkonzentration von 100 mM KCl und einer ClpB-Konzentration von 1-2 µM überwiegend als Tetramer vor (siehe Abb. 3.10), bei höheren ClpB-Konzentrationen möglicherweise auch als Hexamer. Dieser Tetramer bindet Mant-ADP nicht oder nur mit niedriger Affinität. Er muß dissoziieren, bevor Mant-ADP mit hoher Affinität gebunden wird. Die Titrationskurven können, besonders im Falle von ClpB(trunc) wesentlich besser mit einer 1:2-Stöchiometrie beschrieben werden. Dies würde bedeuten, dass der ClpB-Dimer die ADP-bindende Spezies darstellt.

Tab. 3.2: Vergleich der K_d-Werte von ClpB(wt), ClpB(trunc), ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) für Mant-ADP bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

Die K_d-Werte wurden in Fluoreszenztitrationen durch Angleichung der Meßwerte an die quadratische Gleichung ermittelt. In der Gleichung wurde vorausgesetzt, dass ein Molekül Mant-ADP an einen ClpB-Dimer bindet.

ClpB(wt)		ClpB(trunc)		ClpB(K204Q)		ClpB(K601Q)	
Dimer (µM)	K_d (µM)	Dimer (µM)	K_d (µM)	Dimer (µM)	K_d (µM)	Dimer (µM)	K_d (µM)
0.25	0.17	0.25	0.09	0.25	0.49	0.25	26.7
1.0	0.35	1.0	0.33	1.0	2.03	2	19.2
4.85	3.30	5.0	0.12	5.0	8.5		
21.5	6.93	12.5	0.12	25.0	~150		

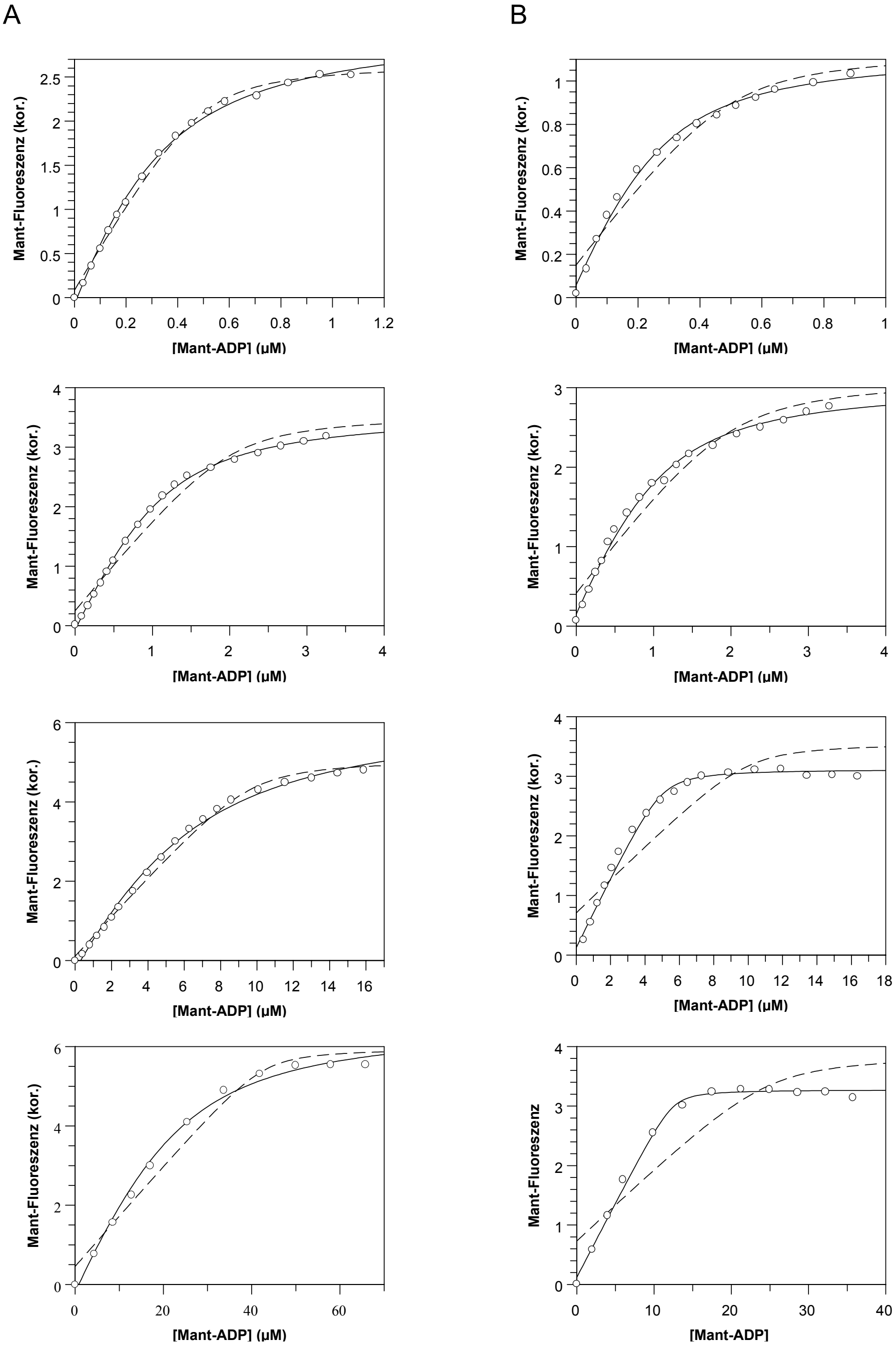


Abb. 3.19: Gleichgewichtstitration von ClpB(wt) und ClpB(trunc) mit Mant-ADP.

(A) 0.5 µM, 2.0 µM, 10.0 µM und 50.0 µM ClpB(wt) (Reihenfolge von oben nach unten) wurden mit Mant-ADP bei 25°C in SFP titriert und die Mant-Fluoreszenz bestimmt (Ex. 360 nm/Em. 440 nm).

(B) 0.5 µM, 2.0 µM, 10.0 µM und 25.0 µM ClpB(trunc) (Reihenfolge von oben nach unten) wurden mit Mant-ADP titriert. Die Titrationskurven wurden nach Berücksichtigung der Fluoreszenz des freien Fluorophors durch eine quadratische Gleichung beschrieben (siehe 2.5.3.1). Dabei wurde entweder eine 1:1-Stöchiometrie (1 Mant-ADP pro Monomer ClpB) (gestrichelte Linie) oder eine 1:2 Stöchiometrie (1 Mant-ADP pro Dimer ClpB) (durchgezogene Linie) zugrunde gelegt. Die ermittelten K_d-Werte für die Bindung an den ClpB(wt)-Dimer (A) betragen (von oben nach unten): 0.17 µM, 0.34 µM, 3.3 µM und 7.0 µM, die K_d-Werte für die Bindung an ClpB(trunc)-Dimer: 0.09 µM, 0.13 µM, 0.22 µM und 0.12 µM.

Allerdings sind in der Gelfiltration bei hohen Salzkonzentrationen in Gegenwart von ADP auch Monomere vorhanden. Außerdem belegen Bindungsstudien der Bindung von ADP, dADP und ATP an ClpB(wt) durch isotherme Titration, dass das molare Verhältnis von Nukleotid zu ClpB zwischen 0.5 und 0.8 liegt. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass auch der ClpB-Monomer Nukleotid bindet oder ein Dimer zwei Nukleotide.

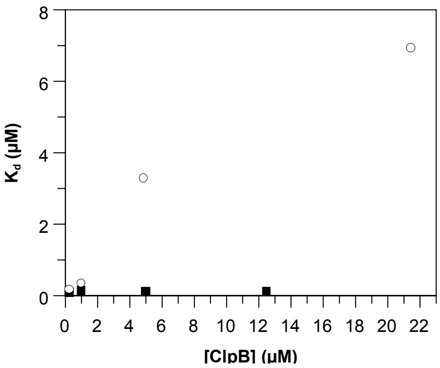
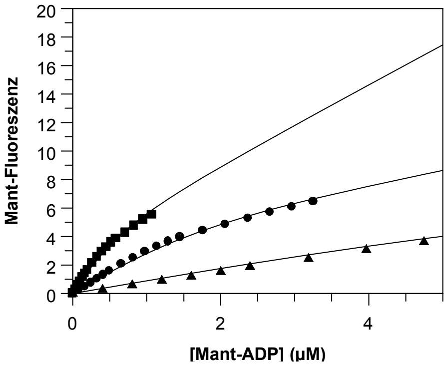


Abb. 3.20: Abhängigkeit der durch Gleichgewichtstitration ermittelten K_d-Werte von der im Titrationsexperiment vorgelegten ClpB-Konzentration. Die ClpB-Konzentration ist auf die Dimer-Konzentration bezogen (ClpB(wt) (○), ClpB(trunc) (■)).

Dass ein solcher Zwei-Schritt-Bindungsprozess wirklich die Titrationsdaten erklären kann, zeigt eine Anpassung der Daten an eine solche Reaktion mit dem Programm Scientist in Abb. 3.21. Der in der Berechnung ermittelte K_d-Wert für die Oligomerdissoziation liegt bei 36 nM. Dies würde die Bildung eines sehr stabilen Oligomers voraussetzen. Wahrscheinlich ist jedoch, dass auch das Tetramer Mant-Nukleotid mit schwacher Affinität binden kann.



$D + D \rightleftharpoons T \quad K_dA$

$D + A \rightleftharpoons DA \quad K_dB$

$K_dA = 0.036\ \mu M$

$K_dB = 0.1\ \mu M$

Abb. 3.21: Analyse der Gleichgewichtstitrationen von ClpB(wt) mit Scientist (MicroMath).
0.25 µM (■), 1.0 µM (●) und 5.0 µM ClpB(wt) (▲) (Dimer-Konzentration) wurden mit Mant-ADP titriert und die Mant-Fluoreszenz gegen die Konzentration des Fluorophors aufgetragen. Diese Datenpunkte wurden einer Kurvenanpassung nach einem Zwei-Schritt-Bindungsschema unterworfen, wobei die Fluoreszenz des freien Fluorophors und K_dB = 0.1 µM fest vorgegeben und die Fluoreszenz des gebundenen Mant-ADP und K_dA frei variiert wurden. Die Kurvenanpassung liefert einen K_dA von 0.036 µM für die Dissoziation des ClpB-Oligomers. (**D**: ClpB-Dimer, **T**: ClpB-Tetramer, **A**: Mant-ADP, **DA**: ClpB-Dimer-Mant-ADP-Komplex).

3.3.3 Ermittlung eines Bindungsmechanismus der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) in *Pre-steady-state*-Messungen

3.3.3.1 Stopped-Flow-Messungen zur Untersuchung der Bindungskinetik

Die Geschwindigkeit der Nukleotidbindung und Freisetzung sowie der genaue Mechanismus der Nukleotidbindung kann durch Messungen der *Pre-steady-state*-Kinetik ermittelt werden. In *Stopped-Flow*-Experimenten wurde die Mant-Fluoreszenz während der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) bei 25°C in zwei verschiedenen Meßreihen aufgenommen, wobei jeweils die Konzentration eines Bindungspartners variiert wurde (Abb. 3.22):

1.0/0.5 µM ClpB(trunc) + 1.0/0.5 – 18.0/9.0 µM Mant-ADP*

1.0/0.5 µM Mant-ADP + 1.0/0.5 – 20.0/10.0 µM ClpB(trunc)

In der ersten Meßreihe wurde die Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die Nukleotidkonzentration untersucht, d.h. ClpB(trunc) wurde in der *Stopped-Flow*-Apparatur mit einem großen Überschuss an Mant-ADP gemischt. Die *Stopped-Flow*-Transiente der Mischung von 1.0/0.5 µM ClpB(trunc) mit 7.0/3.5 µM Mant-ADP in SFP (pH 7.5, 25°C, 100 mM KCl) ist in Abb. 3.23

* **Anmerkung**: Die Probenkonzentrationen in der Spritze werden durch Mischen im *Stopped-flow*-Gerät auf die Hälfte verdünnt: Aus diesem Grund wurden für die *Stopped-flow*-Experimente sowohl Spritzen- als auch Zellkonzentrationen nach dem Beispiel 1.0/0.5 µM (Spritzen-/Zellkonzentration) angegeben

gezeigt. Der kinetische Verlauf wurde über einen Zeitraum von 25 s im logarithmischen Modus aufgenommen. Eine nicht-lineare *least-square* Angleichung des Kurvenverlaufs an eine exponentielle Gleichung deutet an, dass die Bindung nach einem komplexen Mechanismus verläuft. Wie die Abweichung der roten Linie von der experimentellen Kurve andeutet, ist eine zweifach exponentielle Funktion nicht ausreichend, um den Kurvenverlauf adäquat zu beschreiben. Die blaue Linie in Abb. 3.23 zeigt die Angleichung der experimentellen Kurve an eine dreifach-exponentielle Gleichung. Die Einbeziehung höherer exponentieller Ordnungen verbessert die Angleichung an die gemessene Kinetik nicht signifikant. Dieses Verhalten zeigt an, dass unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die Mant-ADP-Konzentration die Bindung des Nukleotids an ClpB(trunc) ein Prozess ist, der mindestens 3 Schritte umfaßt. Dies ist insofern erstaunlich, als Clp(trunc) nur eine Nukleotidbindungsdomäne besitzt und auch nicht einer nukleotidabhängigen Oligomerisierung unterliegt.

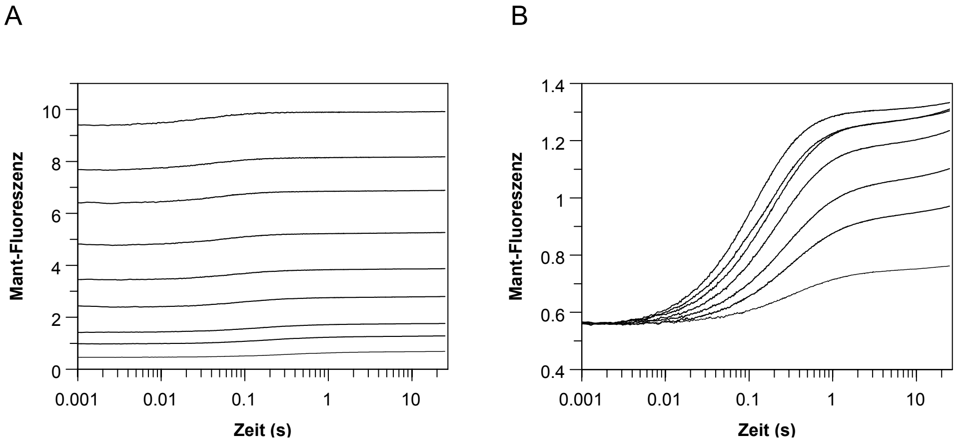


Abb. 3.22: ***Stopped-Flow*-Transienten der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc).**

(A) Bindungskurven von 1.0/0.5 µM ClpB(trunc) an verschiedene Konzentrationen von Mant-ADP (1.0/0.5, 2.0/1.0, 3.0/1.5, 5.0/2.5, 7.0/3.5, 10.0/5.0, 12.0/6.0, 18.0/9.0 µM, von unten nach oben). Die Mant-Fluoreszenz wurde bei 360 nm angeregt und mit einem *Cut-off*-Filter von 418 nm in SFP (pH 7.5, 25°C) gemessen. Die Zeitachse ist logarithmisch skaliert (siehe 2.5.4.1).

(B) Bindungskurven von 1.0/0.5 µM Mant-ADP an verschiedene Konzentrationen von ClpB(trunc) (1.0/0.5, 2.0/1.0, 3.0/1.5, 5.0/2.5, 7.0/3.5, 10.0/5.0, 15.0/7.5, 20.0/10.0 µM, von unten nach oben). Die Meßbedingungen sind wie in (A). Für beide Meßreihen wurde die gleiche Verstärkung am *Photomultiplier* gewählt, absolute Amplituden sind daher vergleichbar.

Die beobachteten Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3 charakterisieren die drei Bindungsschritte und sind als Funktion der Mant-ADP-Konzentration in Abb. 3.24A gezeigt (λ bezeichnet apparente Ratenkonstanten, die durch Angleichung der Transienten an exponentielle Gleichungen erhalten werden, k bezeichnet tatsächliche Ratenkonstanten im Reaktionsmechanismus). Die ersten beiden Ratenkonstanten λ_1 und λ_2 nehmen linear mit der Mant-ADP-Konzentration zu. Ein solches Verhalten ist kennzeichnend für bimolekulare Bindungsschritte (Bernasconi, 1976; Fierke und Hammes, 1995). λ_3 liegt, soweit die experimentelle Genauigkeit eine Aussage zuläßt, relativ unabhängig von der Mant-ADP-Konzentration bei ca. 0.1 s^{-1}.

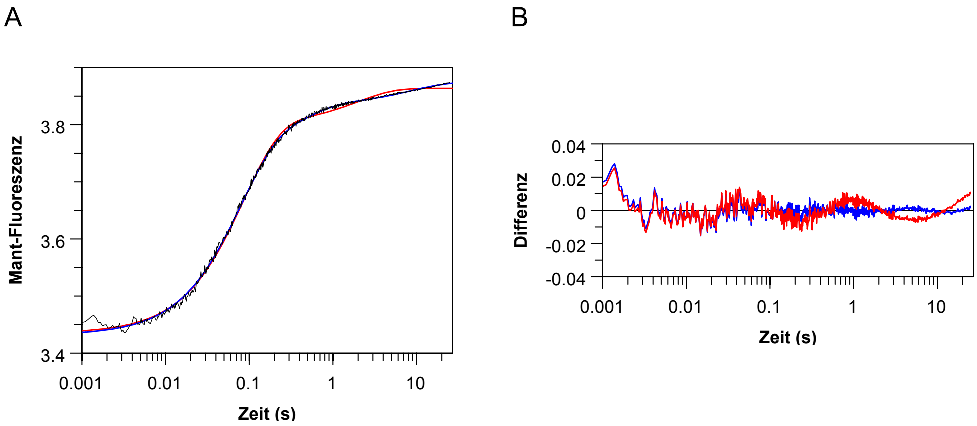
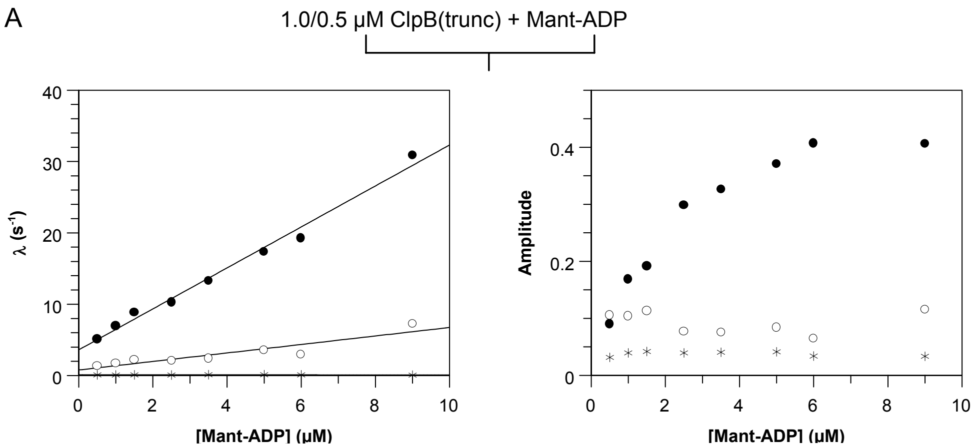


Abb. 3.23: Kinetik der Bindung von ClpB(trunc) an Mant-ADP unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf Mant-ADP.

(A) Der zeitliche Verlauf der Mant-Fluoreszenz der Bindung von 1.0/0.5 µM ClpB(trunc) an 7.0/3.5 µM Mant-ADP wurde bei 25°C in SFP aufgenommen und die Kurve durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rote Linie) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blaue Linie) beschrieben. (B) Das Differenzspektrum zwischen gemessener und berechneter Mant-Fluoreszenz zeigt deutliche systematische Abweichungen bei Angleichung an eine doppelt-exponentielle Gleichung (rote Linie), die dreifach-exponentielle Gleichung (blaue Linie) ist ausreichend für die Beschreibung der Transienten.



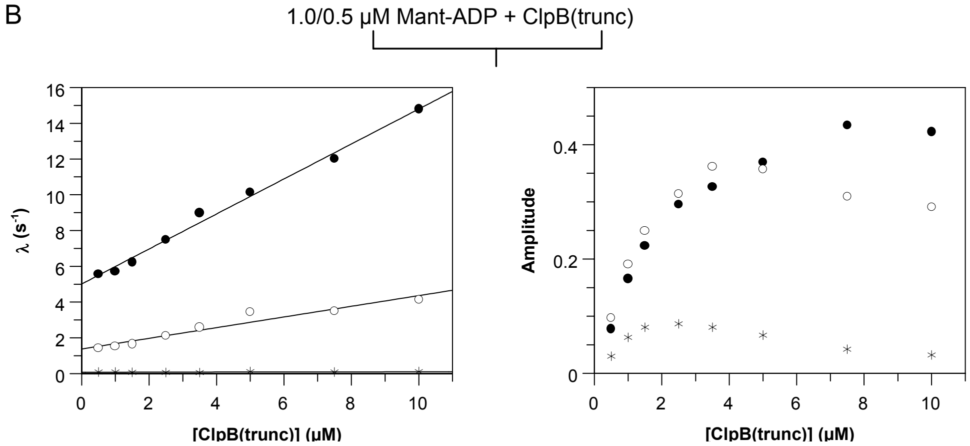


Abb. 3.24: Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc): Raten- und Amplitudensekundärdiagramme.
(A) Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Angleichung der Transienten (siehe 3.22A) an eine dreifach-exponentielle Gleichung berechnet. Die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3 sowie der Amplituden A_1, A_2 und A_3 von der Mant-ADP-Konzentration in der Meßzelle unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die Mant-ADP-Konzentration ist gezeigt: (●) λ_1 bzw. A_1, (○) λ_2 bzw. A_2, (*) λ_3 bzw. A_3.
(B) Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Angleichung der Transienten (siehe 3.22B) an eine dreifach-exponentielle Gleichung berechnet. Die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3 sowie der Amplituden A_1, A_2 und A_3 von der ClpB(trunc)-Konzentration in der Meßzelle unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die ClpB(trunc)-Konzentration ist gezeigt: (●) λ_1 bzw. A_1, (○) λ_2 bzw. A_2, (*) λ_3 bzw. A_3.

Abb. 3.24A zeigt die Abhängigkeit der einzelnen Amplituden von der Mant-ADP-Konzentration. A_1 zeigt eine hyperbolische Abhängigkeit von der Mant-ADP-Konzentration und dominiert den Relaxationsprozeß. A_2 scheint unabhängig von der Mant-ADP-Konzentration zu sein, während A_3 erst zunimmt, dann wieder abnimmt.
Dieselbe Reaktion wurde dann unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die ClpB(trunc)-Konzentration beobachtet. Eine *Stopped-Flow*-Transiente der Mant-ADP-Fluoreszenz nach Mischung von 1.0/0.5 µM Mant-ADP mit 10.0/5.0 µM ClpB(trunc) in SFP (pH 7.5, 25°C, 100 mM KCl) ist in Abb. 3.25 gezeigt. Der Kurvenverlauf wurde über 25 s im logarithmischen Modus aufgenommen. Auch für die adäquate Beschreibung dieser Kurve ist mindestens eine dreifach-exponentielle Funktion notwendig, bei Beschreibung mit einer zweifach exponentiellen Funktion treten signifikante systematische Abweichungen auf. Dies bedeutet, dass auch unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die ClpB(trunc)-Konzentration die Reaktion nur mit einem Mechanismus beschrieben werden kann, der mindestens drei Schritte umfaßt. Die Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3, die mit diesen Schritten assoziiert sind, sowie die korrespondierenden Amplituden wurden in Abb. 3.24B als Funktion der ClpB(trunc)-Konzentration aufgetragen.

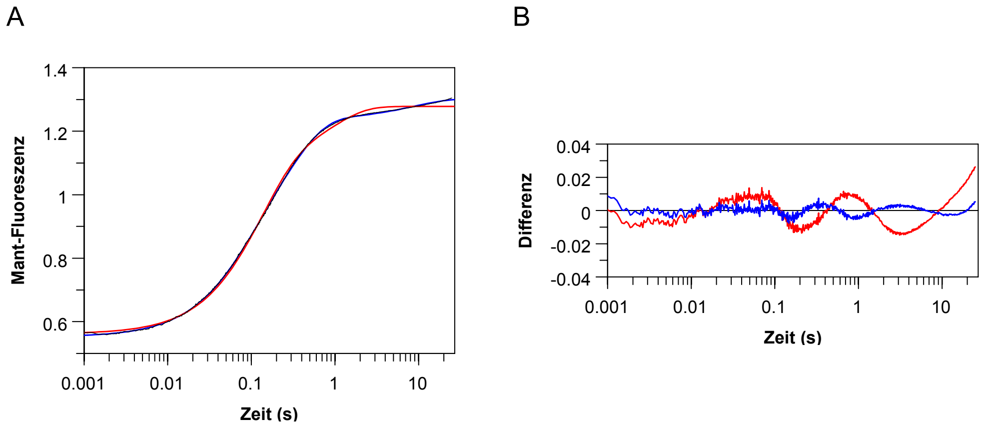


Abb. 3.25: Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf ClpB(trunc).

(A) Die Bindung von 1.0/0.5 µM Mant-ADP an 10.0/5.0 µM ClpB(trunc) wurde bei 25°C in SFP anhand der Mant-Fluoreszenz aufgenommen und die Daten durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rote Linie) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blaue Linie) beschrieben. (B) Das Differenzspektrum zwischen gemessener und berechneter Mant-Fluoreszenz zeigt deutliche systematische Abweichungen bei Angleichung an eine doppelt-exponentielle Gleichung (rote Linie), die dreifach-exponentielle Gleichung (blaue Linie) ist ausreichend für die Beschreibung der Transienten.

Die beiden größten Ratenkonstanten λ_1 und λ_2 nehmen linear mit der ClpB(trunc)-Konzentration zu, λ_3 liegt wie in der ersten Meßreihe im Bereich von 0.1 s^{-1} und ist relativ unabhängig von der ClpB(trunc)-Konzentration.

Während sich die Ratenkonstanten ähnlich verhalten, unabhängig davon welche der beiden Komponenten im Überschuß vorliegt, treten im Amplitudenverlauf größere Unterschiede auf (Abb. 3.24B). Die Auftragung von A_1 in Abhängigkeit von der ClpB(trunc)-Konzentration ergibt wiederum eine Hyperbel. A_2 nimmt dagegen zunächst wie A_1 mit der ClpB(trunc)-Konzentration zu, erreicht ein Maximum bei ~ 4 µM ClpB(trunc) und nimmt dann mit weiter steigender ClpB(trunc)-Konzentration ab. A_3 verhält sich ähnlich, erreicht den Maximalwert bei ~ 2 µM ClpB(trunc), ist aber insgesamt deutlich kleiner als A_2.

3.3.3.2 Ableitung eines Bindungsmechanismus aus den Stopped-Flow-Messungen

Welche Rückschlüsse lassen sich aus den Sekundärdiagrammen der Ratenkonstanten und Amplituden in den *Stopped-Flow* Messungen für den Bindungsmechanismus ziehen? Das einfachste Modell eines Drei-Schritt-Bindungsmechanismus ist eine einfache sequentielle Abfolge, in dem auf das erste Zusammentreffen von Protein und Nukleotid zwei Isomerisierungsschritte folgen (Abb. 3.26).

$$N + P_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} NP_1 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} NP_2 \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} NP_3$$

Abb. 3.26: Einfacher sequentieller Drei-Schritt-Bindungsmechanismus für die Bindung von Nukleotid an Protein.
Auf die bimolekulare Assoziation folgen zwei Isomerisierungen des Proteins (**N**: Nukleotid, $\mathbf{P_i}$: Protein in verschiedenen Konformationen).

Die lineare Abhängigkeit der beiden ersten Ratenkonstanten von der Mant-ADP-Konzentration als auch von der ClpB(trunc) Konzentration legt jedoch nahe, dass es mindestens zwei bimolekulare Assoziationsreaktionen geben muß (Bernasconi, 1976; Fierke und Hammes, 1995). Tatsache ist außerdem, dass unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung immer drei Elementarschritte beobachtet werden, unabhängig davon, ob Mant-ADP oder ClpB(trunc) im Überschuss vorliegen. Es läßt sich deshalb ausschließen, dass ClpB(trunc) einem Konformationsübergang vor der Nukleotidbindung unterliegt, und nur eine Konformation Nukleotid bindet (Abb. 3.27). Im Falle eines solchen Vorgleichgewichts würde man bei großem Überschuß von ClpB(trunc) nur zwei Phasen beobachten (Galletto und Bujalowski, 2002).

$$P_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P_2$$

$$P_2 + N \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} NP_2 \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} NP_3$$

Abb. 3.27: Drei-Schritt-Bindungsmechanismus mit Vorgleichgewicht für die Bindung von Nukleotid an Protein.
Das Protein unterliegt einem Oligomerisierungsgleichgewicht, nur ein Isomer kann Nukleotid binden. Auf die bimolekulare Assoziation folgt eine weitere Isomerisierung des Proteins (**N**: Nukleotid, $\mathbf{P_i}$: Protein in verschiedenen Konformationen).

Für einen Mechanismus mit zwei bimolekularen Assoziationsschritten gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Einerseits kann das Nukleotid in unterschiedlichen Konformationen binden, andererseits könnte das Protein unterschiedliche nukleotidbindende Isomere ausbilden. Die 2´ und 3´-Isomere des Mant-ADP liegen in wässriger Lösung im Gleichgewicht vor (60% 3´-Isomer, 40 % 2´-Isomer) und befinden sich in einem langsamen Austausch ($t_{1/2}$ = 10 min bei pH 75, 25°C) (Cremo *et al.*, 1990; Woodward *et al.*, 1991; Eccleston *et al.*, 1991; Rensland *et al.*, 1991; Moore und Lohman, 1994). Der 3´-Isomer des Mant-Nukleotids hat die zweifache Fluoreszenzintensität des 2´-Isomers, und dieser Unterschied spiegelt sich direkt in der Fluoreszenzlebensdauer wider.

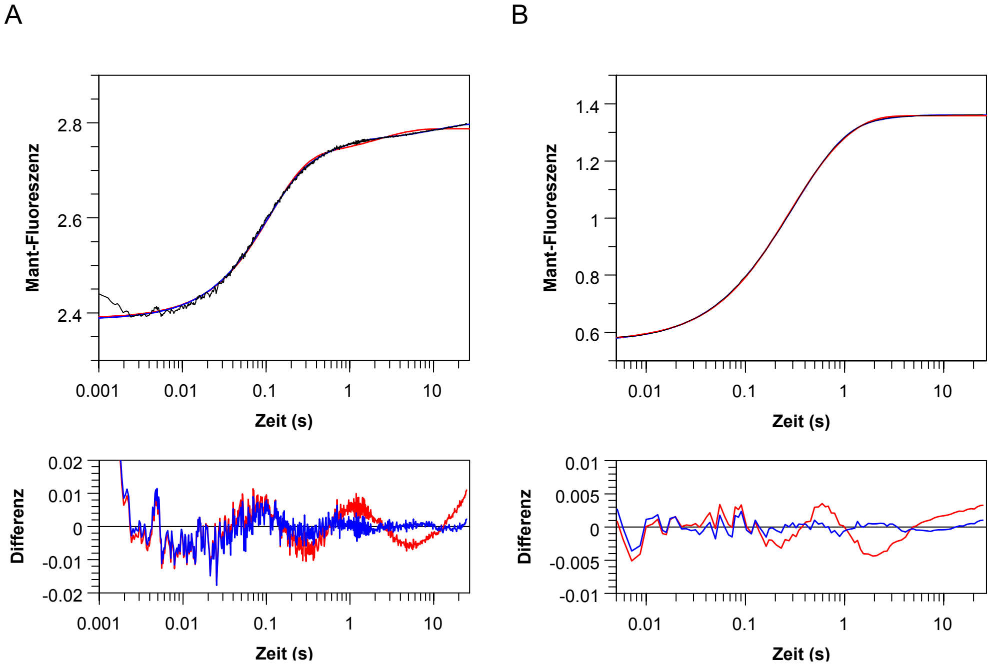


Abb. 3.28: Kinetik der Bindung von Mant-2´d-ADP an ClpB(trunc).
(A) Die Bindung von 1.0/0.5 µM ClpB(trunc) an 5.0/2.5 µM Mant-2´d-ADP wurde bei 25°C in SFP aufgenommen und die Daten durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rote Linie) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blaue Linie) beschrieben. Das Differenzspektrum zwischen gemessener und berechneter Mant-Fluoreszenz zeigt eine Verbesserung der Angleichung bei Verwendung einer dreifach exponentiellen Gleichung. (B) Die Bindung von 1.0/0.5 µM Mant-2´d-ADP an 5.0/2.5 µM ClpB(trunc) wurde bei 25°C in SFP aufgenommen und die Daten durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rote Linie) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blaue Linie). Das Differenzspektrum zwischen gemessener und berechneter Mant-Fluoreszenz zeigt eine Verbesserung der Angleichung bei Verwendung einer dreifach exponentiellen Gleichung.

Da die Acyl-Migration potentiell für eine der beobachteten Phasen in den *Stopped-Flow*-Messungen verantwortlich sein könnte, wurde die Bindung von Mant-2´d-ADP an ClpB(trunc) untersucht. Der Fluorophor ist in dieser Verbindung spezifisch mit der 3´-OH-Gruppe der Ribose verknüpft, eine Acyl-Migration oder die preferentielle Bindung eines der beiden Isomere an ClpB(trunc) ist mit Mant-2´d-ADP nicht möglich.

Die Kinetik der Mant-2´d-ADP-Bindung an ClpB(trunc) ist der mit Mant-(2´, 3´)-ADP beobachteten Bindung qualitätiv ähnlich, obwohl die dritte Phase in den Transienten mit Mant-2´d-ADP schwächer ausgeprägt ist (Abb. 3.28). Die Summe von drei Exponentialfunktionen wird benötigt um die Bindung von 1.0/0.5 µM ClpB(trunc) an 5.0/2.5 µM Mant-2´dADP, oder die Bindung von 1.0/0.5 µM Mant-2´dADP an 5.0/2.5 µM ClpB(trunc) zu beschreiben.

Wir schließen daraus, dass die komplexe Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) nicht auf Acyl-Migration oder die bevorzugte Bindung eines Isomers zurückzuführen ist, sondern auf intrinsischen Eigenschaften des ClpB(trunc)-Nukleotidkomplexes beruht.
Eine andere Möglichkeit ist, dass ClpB(trunc) verschiedene bindungsfähige Isomere besitzt. Die starke Abhängigkeit der Amplituden von der ClpB(trunc)-Konzentration läßt vermuten, dass es sich bei den Isomeren um verschiedene ClpB(trunc)-Oligomere handelt. Aufgrund dieser Überlegungen wurde folgendes Schema des Bindungsmechanismus formuliert, welches als Basismodell für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) dienen soll.

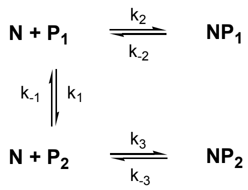


Abb. 3.29: Modell des Drei-Schritt-Bindungsmechanismus der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc). ClpB(trunc) liegt in zwei isomeren Formen vor, die sich ineinander umwandeln und beide Nukleotid binden (**N**: Nukleotid, $\mathbf{P_i}$: Protein in verschiedenen Konformationen).

3.3.3.3 Verdrängung von Mant-ADP aus einem Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplex durch ADP

Die Ratenkonstanten der Dissoziation k_{-i} können unabhängig in Verdrängungsexperimenten bestimmt werden. Besitzt ClpB(trunc) zwei nukleotidbindende Konformationen, so sollten auch in Verdrängungsexperimenten mindestens zwei verschiedene Phasen zu beobachten sein. Hierzu wurde ein Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplex durch Mischen von 1.0/0.5 µM ClpB(trunc) und 5.0/2.5 µM Mant-ADP vorgeformt und die Freisetzung von Mant-ADP bei Zugabe eines Überschusses ADP im *Stopped-Flow*-Experiment als Abnahme der Fluoreszenz verfolgt (Abb. 3.30A). Die ADP-Konzentration wurde dabei zwischen 20/10 µM und 800/400 µM ADP variiert. Die Fluoreszenzabnahme läßt sich erwartungsgemäß nur durch eine komplexe Exponentialfunktion beschreiben, für die adäquate Beschreibung einer Transiente wird die Summe von drei Exponentialfunktion benötigt (Abb. 3.30B). Wie die Raten- und Amplitudensekundärdiagramme dieser Angleichung zeigen (Abb. 3.31), sind sowohl die beobachteten Raten λ_1, λ_2 und λ_3 als auch die Amplituden A_1, A_2 und A_3 von der eingesetzten ADP-Konzentration abhängig.

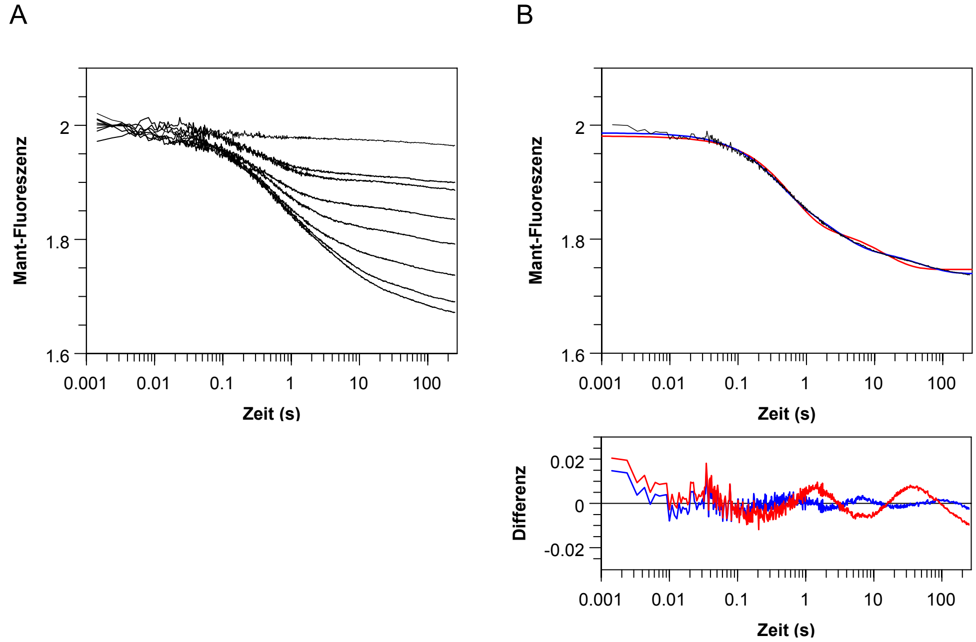


Abb. 3.30: Dissoziation von Mant-ADP von ClpB(trunc) nach Zugabe eines ADP-Überschusses.
(A) Verdrängung von Mant-ADP aus einem Komplex von 1.0/0.5 µM ClpB und 5.0/2.5 µM Mant-ADP durch verschiedene Konzentrationen von ADP (0, 30/15, 50/25, 100/50, 200/100, 500/250, 800/400 µM, von oben nach unten). Die Mant-Fluoreszenz wurde bei 360 nm angeregt und mit einem *Cut-off*-Filter von 418 nm in SFP bei 25°C über 250 s gemessen. Die Zeitachse ist logarithmisch skaliert.
(B) 5.0/2.5 µM Mant-ADP wurde aus dem vorgeformten Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplex durch die Zugabe von 200/100 µM ADP verdrängt. Der zeitliche Verlauf der Mant-Fluoreszenz wurde durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rote Linie) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blaue Linie) beschrieben.

Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten λ_1 und λ_2 von der ADP-Konzentration beschreibt eine abfallende Hyperbel, $\lambda 3$ liegt unabhängig von der ADP-Konzentration bei ~ 0.02 s^{-1}. Mit steigender ADP-Konzentration wird die Menge des verdrängten Mant-ADP größer, deshalb steigen auch die Amplituden A_1 und A_2 mit steigender ADP-Konzentration bis zu einem Sättigungswert an. Auch die Amplitude der langsamsten Phase A_3 zeigt dieses Verhalten. Raten- und Amplitudensekundärdiagramme stehen im Einklang mit einem Bindungsmechanismus der zwei bimolekulare Assoziationsschritte, beschrieben durch λ_1 und λ_2, beinhaltet, wobei sich die Quantenausbeute der Mant-Fluoreszenz in beiden Komplexen unterscheidet. Die dritte Phase könnte ihren Ursprung in einem im Vergleich zur Nukleotidassoziation langsamen Oligomerisierungsgleichgewicht haben.

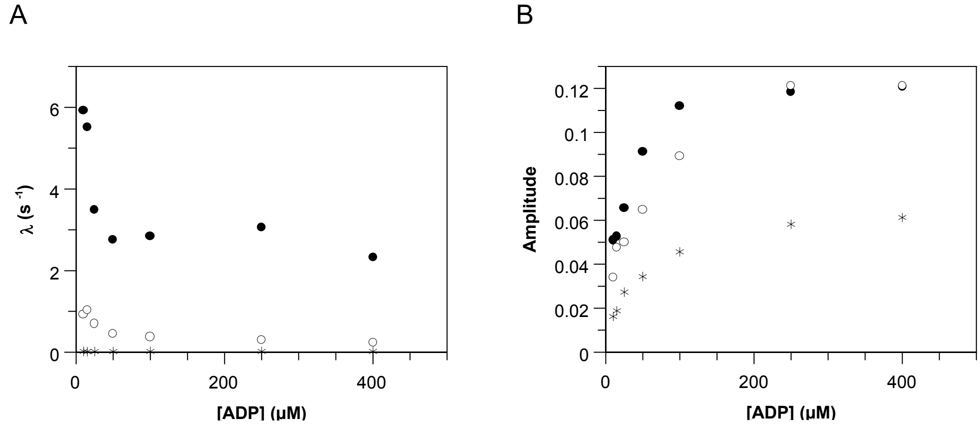


Abb. 3.31: Verdrängung von Mant-ADP aus einem Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplex durch ADP: Raten- und Amplitudensekundärdiagramme.

(A) Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Angleichung der Transienten (siehe 3.30) an eine dreifach-exponentielle Gleichung berechnet. Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3 sowie der Amplituden A_1, A_2 und A_3 von der ADP-Konzentration in der Meßzelle ist gezeigt. (●) λ_1 bzw. A_1, (○) λ_2 bzw A_2, (*) λ_3 bzw. A_3.

3.3.4 Simulation des Nukleotidbindungsmechanismus in Scientist

Bisherige Überlegungen führen zu einem Bindungsmechanismus, in dem ClpB(trunc) in zwei oligomeren Formen vorliegt, die beide mit unterschiedlichen Ratenkonstanten und Einfluß auf die Mant-Fluoreszenz Mant-ADP binden. Die Amplitude einer Phase in *Stopped-Flow*-Transienten korreliert häufig mit dem Auftreten einer bestimmten Spezies im Reaktionsmechanismus. Es wurde deshalb überprüft, ob sich die Konzentrationsverteilung bestimmter fluoreszierender Spezies in einem solchen Bindungsmechanismus mit der Abhängigkeit der Amplituden von der ClpB(trunc)- bzw. Mant-ADP-Konzentration vergleichen läßt. Für das Isomerengleichgewicht wurde zunächst ein einfaches Monomer-Dimer-Gleichgewicht zugrunde gelegt. Anhand des Bindungsmechanismus (Abb. 3.32) wurde die Konzentrationsverteilung der ClpB(trunc)·Mant-ADP-Komplexe in einer Simulation mit Scientist für bestimmte K_d-Werte berechnet.

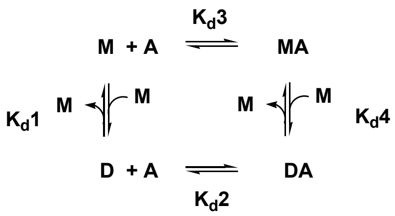
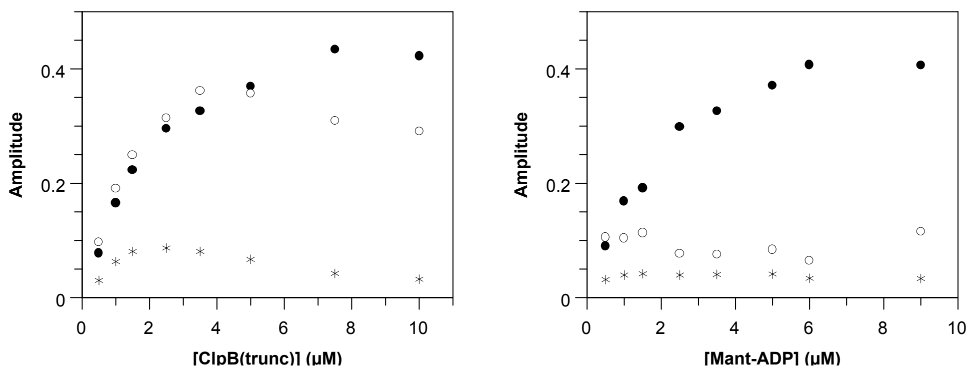


Abb. 3.32: Modell der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc).
Anhand dieses Schemas wurde in einer Simulation mit Scientist die Konzentrationsverteilung der Reaktionsprodukte bei verschiedenen Konzentrationen von Mant-ADP und ClpB(trunc) berechnet. Die in der Simulation eingesetzten K_d-Werte sind: K_d1 = 1.0 µM, K_d2 = 0.5 µM, K_d3 = 0.5 µM, K_d4 = 1.0 µM (**M**: ClpB(trunc)-Monomer, **D**: ClpB(trunc)-Dimer, **A**: Mant-ADP, **MA, DA**: Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplex).

A



B

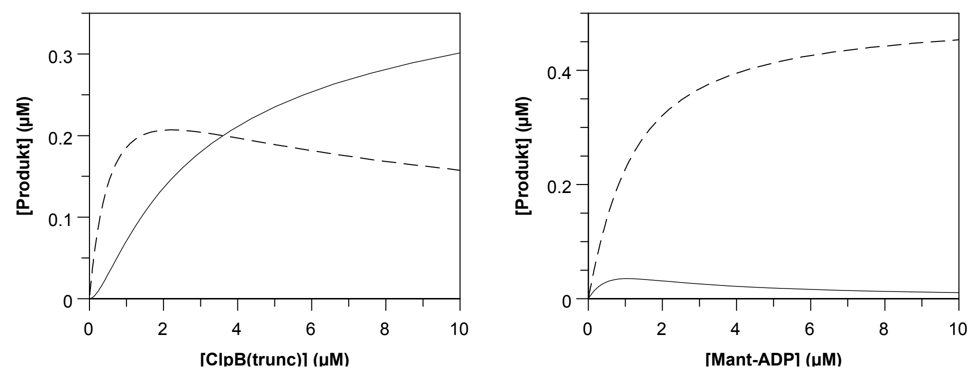


Abb. 3.33: Vergleich des in *Stopped-Flow*-Experimenten beobachteten Amplitudenverhaltens mit der nach dem Bindungsmechanismus berechneten Konzentrationsverteilung fluoreszierender Produkte.
(A) Amplitudensekundärplots aus *Stopped-Flow*-Experimenten (vgl. Abb. 3.24) zur Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die ClpB(trunc)-Konzentration (links) und in Bezug auf die Mant-ADP-Konzentration (rechts). (●) A_1, (○) A_2, (∗) A_3.
(B) In einer Computersimulation mit Scientist wurde die Verteilung der fluoreszierenden Produkte MA (——) und DA (---) nach dem Bindungsmechanismus in Abb. 3.32 bei Variation der ClpB(trunc)-Konzentration (links)

bzw. der Mant-ADP-Konzentration (rechts) berechnet. Die in der Simulation eingesetzten K_d-Werte sind: K_d1 = 1.0 µM, K_d2 = 0.5 µM, K_d3 = 0.5 µM, K_d4 = 1.0 µM.

Bei Verwendung dieses Bindungsmodells (Abb. 3.32) korreliert die Konzentration der fluoreszierenden Produkte (Mant-ADP·ClpB(trunc)-Komplexe) in Abhängigkeit der eingesetzten Edukte (Mant-ADP und ClpB(trunc)) relativ gut mit dem Amplitudenverlauf zweier Phasen in den *Stopped-Flow*-Experimenten (Abb. 3.33).

3.3.5 Analyse der Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) durch numerische Integration mit DynaFit

Für die Bestimmung der Ratenkonstanten k_i und k_{-i} der einzelnen Reaktionsschritte sowie der molaren Fluoreszenzparameter der verschiedenen Intermediate ist die gleichzeitige Analyse der in den *Stopped-Flow*-Experimenten beobachteten Konstanten λ_i und Amplituden notwendig. Eine globale Analyse der *Stopped-Flow*-Transienten wurde genutzt, um den kinetischen Mechanismus der Mant-ADP-Bindung zu verifizieren und die elementaren Ratenkonstanten durch numerische Integration zu bestimmen. Die globale Analyse umfaßt die Angleichung von acht Ratenkonstanten und zwei molaren Fluoreszenzkoeffizienten der ClpB(trunc)·Mant-ADP-Komplexe. Die Anfangswerte für die Berechnung der Ratenkonstanten der Nukleotidassoziation und –dissoziation wurden anhand der Sekundärdiagramme (Auftragung λ gegen Mant-ADP, Abb. 3.24A) abgeschätzt: k_2 = 3.0 µM s^{-1}, k_3 = 0.6 µM s^{-1} aus der Steigung der Geraden, k_{-2} = 3.6 s^{-1}, k_{-3} = 0.8 s^{-1} aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse. Außerdem wurde ein langsames Oligomerisierungsgleichgewicht angenommen: $k_1 = k_4$ = 0.01 µM s^{-1}, $k_{-1} = k_{-4}$ = 0.01 s^{-1}. Die Verstärkung des Signals in den *Stopped-Flow*-Messungen wurde so gewählt, dass der molare Fluoreszenzkoeffizient für ungebundenes Mant-ADP $r_{Mant\text{-}ADP}$ ~ 1 µM^{-1} beträgt. Aus den Gleichgewichtstitrationen ist bekannt, dass sich die Fluoreszenz des Mant-Nukleotids bei Bindung an ClpB(trunc) um den Faktor 3.3 erhöht. Als Ausgangswert für die differentiellen molaren Fluoreszenzkoeffizienten der beiden ClpB(trunc)·Mant-ADP-Komplexe wurde deshalb r = 2.3 gesetzt.

Zunächst wurde in der globalen Analyse mit DynaFit ein Bindungsmechanismus mit einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht von ClpB(trunc) und zwei Assoziationsreaktionen des Nukleotids zugrunde gelegt (Abb. 3.32). Die globale Analyse ergibt jedoch stark unterschiedliche Affinitäten für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc)-Monomer und ClpB(trunc)-Dimer (K_d2 = 2.0 µM, K_d3 = 0.02 µM). Dies widerspricht jedoch dem Verhalten von ClpB(trunc) in der Gleichgewichtstitration, die eindeutig belegt, dass die Nukleotidaffinität nicht von der ClpB(trunc)-Konzentration abhängig ist. Die beiden Oligomere sollten deshalb Nukleotide mit ähnlicher Affinität binden. Auch die Einbeziehung weiterer Reaktionsschritte bei der globalen Analyse, wie beispielsweise eine an die Bindung anschließende Konformationsänderung, konnten dieses Problem nicht lösen.

Die Gleichgewichtstitrationen deuten sehr klar auf eine Bindungsstöchiometrie von 1:2, also ein Mant-ADP pro ClpB(trunc)-Dimer hin, der ClpB(trunc)-Dimer scheint demnach eine funktionelle Einheit darzustellen. Auch die Gelfiltrationsanalysen mit ClpB(wt) bei physiologischer Salzkonzentration (~ 100 mM KCl) zeigen, dass in Abwesenheit von Nukleotid der Tetramer, in Gegenwart von ADP der Dimer die vorherrschende Spezies ist (Abb. 3.10). Für die globale Analyse wurde deshalb in einem zweiten Versuch ein Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von ClpB(trunc) angenommen. Mit diesem Bindungsmodell (Abb. 3.34) lassen sich die *Stopped-Flow*-Transienten sehr gut beschreiben und auch die durch numerische Integration berechneten Ratenkonstanten und K_d-Werte sind sinnvoll. Abb. 3.35 zeigt einen Vergleich der gemessenen *Stopped-Flow*-Transienten mit dem Ergebnis der globalen Analyse. Die berechneten Ratenkonstanten und Fluoreszenzkoeffizienten sind in Tab. 3.3 aufgelistet.

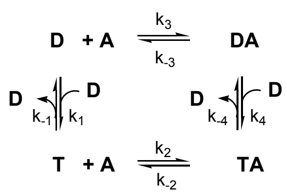


Abb. 3.34: Modell der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc).
Dieser Bindungsmechanismus ergibt in der globalen Analyse mit DynaFit die beste Übereinstimmung mit den *Stopped-Flow*-Messungen und erfüllt außerdem thermodynamische Bedingungen sowie die Vorgaben aus den Gleichgewichtstitrationen. (**D**: ClpB(trunc)-Dimer, **T**: ClpB(trunc)-Tetramer, **A**: Mant-ADP, **DA, TA**: Mant-ADP-gebunden an ClpB(trunc)-Dimer oder –Tetramer).

Die Nukleotidaffinitäten der ClpB-Oligomere $K_d2 = k_{-2}/k_2 = 0.48$ µM für den Tetramer und $K_d3 = k_{-3}/k_3 = 0.58$ µM für den Dimer sind sehr ähnlich, die Bindung von Mant-ADP ist deshalb, wie auch die Gleichgewichtstitrationen zeigen, nicht von der ClpB(trunc)-Konzentration abhängig. Auch die Vorgaben der Thermodynamik im Zyklus $K_d1 * K_d = K_d3 * K_d4$ werden im Rahmen der Fehlerabweichungen eingehalten ($K_d1 * K_d2 = 1.58\ \mu M^2$, $K_d3 * K_d4 = 1.28\ \mu M^2$). Nach diesem Mechanismus befinden sich ClpB(trunc)-Dimer und -Tetramer in einem im Vergleich zur Nukleotidbindung langsamen Austausch, wobei das Gleichgewicht auf der Seite des Dimers liegt. Die Nukleotidbindung an beide Isomere verläuft mit annähernd gleichen Assoziations- und Dissoziationsraten. Die Nukleotidbindung an den ClpB(trunc)-Dimer ist nach den Ergebnissen der globalen Analyse mit ca. 3-facher Zunahme, die Bindung an den Tetramer mit 2-facher Zunahme der Mant-Fluoreszenz verbunden.

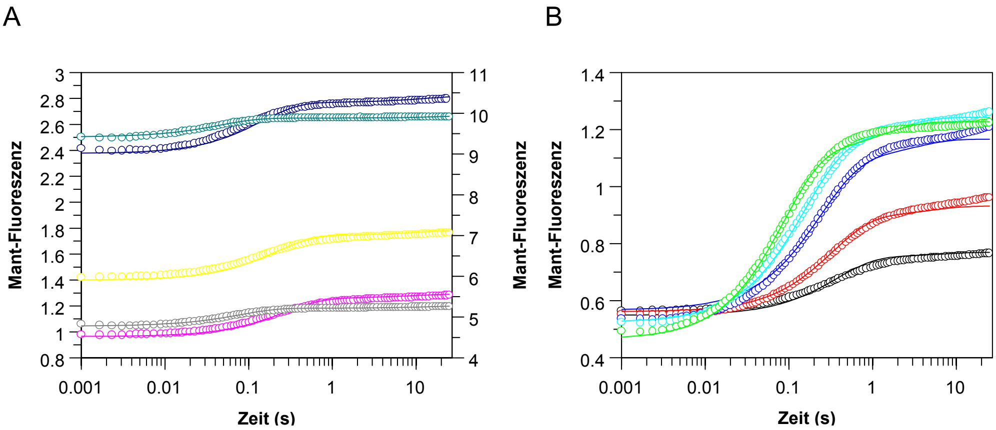


Abb. 3.35: Globale Analyse der Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) durch numerische Integration mit DynaFit.

(A) Zeitverlauf der *Stopped-Flow*-Transienten bei Mischung von 2.0/1.0 µM (○), 3.0/1.5 µM (○), 5.0/2.5 µM (○), 10.0/5.0 µM (○) (zweite y-Achse), 18.0/9.0 µM Mant-ADP (○) (zweite y-Achse) mit 1.0/0.5 µM ClpB(trunc)

(B) Zeitverlauf der *Stopped-Flow*-Transienten bei Mischung von 1.0/0.5 µM (○), 2.0/1.0 µM (○), 5.0/2.5 µM (○), 10.0/5.0 µM (○) und 20.0/10.0 µM ClpB(trunc) (○) mit 1.0/0.5 µM Mant-ADP. Die durchgezogenen Linien zeigen die Kurvenanpassung der globalen Analyse nach dem Mechanismus in Abb. 3.34.

Tab. 3.3: Ratenkonstanten und differentielle molare Fluoreszenzkoeffizienten (siehe Anhang), wie sie in der globalen Analyse nach dem Bindungsmechanismus in Abb. 3.34 durch numerische Integration mit dem Programm DynaFit bestimmt wurden.

Parameter	Fit	K_d
k_1	0.075 $\mu M^{-1}\ s^{-1} \pm 0.011$	3.3 µM
k_{-1}	0.25 $s^{-1} \pm 0.032$	
k_2	3.95 $\mu M^{-1}\ s^{-1} \pm 0.23$	0.48 µM
k_{-2}	1.89 $s^{-1} \pm 0.13$	
k_3	2.22 $\mu M^{-1}\ s^{-1} \pm 0.03$	0.58 µM
k_{-3}	1.29 $s^{-1} \pm 0.03$	
k_4	0.013 $\mu M^{-1}\ s^{-1} \pm 0.005$	2.2 µM
k_{-4}	0.028 $s^{-1} \pm 0.006$	
r (DA)	2.3 ± 0.03	
r (TA)	1.1 ± 0.04	

3.4 Kinetische Charakterisierung der Oligomerisierung von ClpB(wt)

3.4.1 Die Geschwindigkeit der Oligomerisierung von ClpB(wt)

ClpB liegt in Gegenwart von ADP als Mischung von Monomeren und Dimeren vor, in Gegenwart von ATP oder in Abwesenheit von Nukleotiden dominieren höhere Oligomere bis hin zum Hexamer die Gleichgewichtsverteilung. Die Bildung höherer Oligomere (Tetramer-Hexamer) ist für die Chaperonfunktion von ClpB essentiell (siehe 3.2.3). Wie bereits erwähnt, hemmen NBD-Mutanten die Kooperativität der ATP-Hydrolyse von ClpB(wt) (siehe 3.2.2) und setzen aktive ClpB-Untereinheiten durch die Bildung gemischter Oligomere in einer inaktiven Form fest. Um die Stabilität der ClpB-Oligomere unter Reaktionsbedingungen zu testen, wurde der Fortgang der ATP-Hydrolyse untersucht, wenn ein Überschuß von ClpB(K204Q) oder ClpB(K601Q) drei Minuten nach Start des ATPase-Assays mit ClpB(wt) bei 25°C zugegeben wurde (Abb. 3.36).

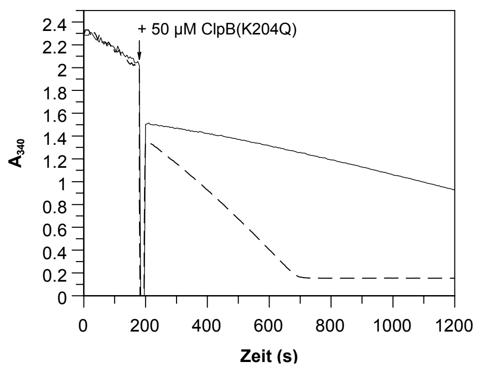


Abb. 3.36: Geschwindigkeit des Verlusts der ATPase-Aktivität nach Austausch von aktiven Untereinheiten im ClpB-Oligomer durch inaktive NBD-Mutanten.

Die ATPase-Reaktion wurde im gekoppelten Enzymtest durch die Zugabe von 5 µM ClpB(wt) gestartet (2 mM ATP, 25°C). Nach 3 min (Pfeil) wurde ein 10-facher Überschuss von ClpB(K204Q) (——) bzw Puffer als Kontrolle (---) zugefügt. Die maximale Inhibition der ATPase-Aktivität durch ClpB(K204Q) wird bereits innerhalb der Mischzeit von 30 s erreicht.

Die Inhibierung der ATP-Hydrolyse durch ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) läuft vollständig innerhalb der 30-sekündigen Mischzeit ab, die Dissoziation der ClpB(wt)-Oligomere und die Bildung der gemischten Oligomere erfolgt demnach unmittelbar (in 30 s ist die Reaktion zu mindestens 94% abgelaufen, $4t_{1/2} \leq 30$ s, $k \geq 0.09$ s^{-1}). In diesem Zusammenhang unterscheidet sich ClpB stark von ClpA, welches bei ATP-Sättigung mit einer Ratenkonstante von $5.3 \cdot 10^{-4}$ s^{-1} ($t_{1/2} = 22$ min) dissoziiert (Singh *et al.*, 1999).

Statische Lichtstreuungsmessungen bieten eine Möglichkeit die Oligomerbildung von ClpB direkt zu beobachten. Die Zugabe von 4 mM ADP zu 1 µM ClpB(wt) bei 25°C führt zu einer ca. 40%igen Abnahme der Lichtstreuung, die mit der Auflösung von Hexameren und

Tetrameren zu Dimeren und Monomeren verbunden ist. Die Dissoziation der Oligomere bei Zugabe von ADP findet innerhalb der Mischzeit (~ 15 s) statt.

Die Zugabe von 4 mM ATP oder ATPγS zu 1 µM ClpB(wt) hat keinen Einfluß auf die Lichtstreuung und somit auf die Größe der vorhanden Oligomere. Diese Beobachtungen stimmen gut mit den Gelfiltrationsexperimenten überein, die besagen, dass die Bindung von ADP nicht aber ATP eine Änderung des oligomeren Zustandes von ClpB bewirkt.

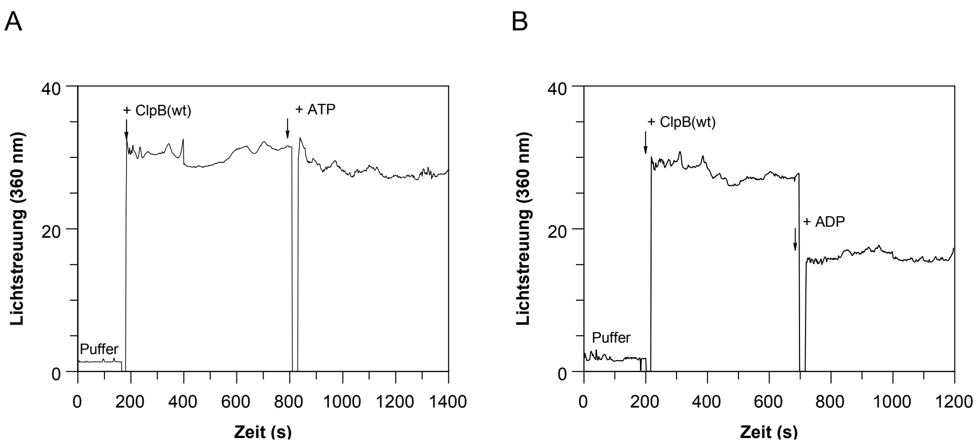


Abb. 3.37: Änderung der Lichtstreuung bei Auflösung der ClpB-Oligomere.

Die statische Lichtstreuung von 1 µM ClpB(wt) wurde bei der Monochromatorstellung von 360 nm (Anregung und Emission) und 30°C in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE und 10% (v/v) Glycerin vor und nach Zugabe von 4 mM ADP (A) bzw. ATP (B) gemessen (siehe 2.5.3.3). Die abgebildeten Meßwerte stellen den Mittelwert aus 2-4 unabhängigen Messungen dar.

3.4.2 Messung der Fluoreszenzanisotropie von ClpB-Oligomeren

Für die kinetische Charakterisierung der Oligomerisierung von ClpB(wt) sollte ein an die Oligomerbildung gekoppeltes Fluoreszenzsignal generiert werden. Deshalb wurden Cysteine an verschiedenen Positionen in ClpB eingeführt (A94C, L302C, A447C, S783C) und kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488- C5-Maleinimid (Molecular Probes, Eugene, USA) modifiziert (siehe 2.3.2). Zugabe von ADP oder ClpB(wt) zu einer 2 µM-Lösung der fluoreszierenden Proteine führte nicht zu der erhofften Änderung der Fluoreszenzemission, ist jedoch mit einer Änderung der Fluoreszenzanisotropie verbunden. Besonders ausgeprägt sind die Änderungen der Fluoreszenzanisotropie im Falle von ClpB(A94C)-Alexa.

Die Messung der Fluoreszenzanisotropie gibt Auskunft über die Mobilität und somit über das molekulare Volumen des fluoreszierenden Moleküls. Grundlage dieser Technik ist die photoselektive Anregung von Fluorophoren, deren Übergangsdipolmoment parallel zum elektrischen Feldvektor eines linear polarisierten Lichtstrahls ausgerichtet ist. Bei kleinen, schnell rotierenden Molekülen geht die anfängliche photoselektive Orientierung noch vor der

Fluoreszenzemission verloren, die gemessene Polarisation ist deshalb gering. Fluorophore, die mit langsam rotierenden Molekülen verbunden sind, ändern ihre Orientierung zwischen Anregung und Emission nur wenig, eine hoher Polarisationsgrad des emittierten Lichts ist die Folge. Im Experiment wird der Polarisationsgrad durch Messung der Fluoreszenzintensität parallel und senkrecht zur Ebene des linear polarisierten anregenden Lichtstrahls bestimmt und die Anisotropie (r) nach folgender Gleichung berechnet:

$$r = \frac{(F_{\parallel} - F_{\perp})}{(F_{\parallel} + 2F_{\perp})} \qquad (1)$$

$F_{\parallel}$: Fluoreszenzintensität parallel zur Polarisationsebene

$F_{\perp}$: Fluoreszenzintensität senkrecht zur Polarisationsebene des eingestrahlten Lichts

$F_{\parallel} + 2\,F_{\perp}$: totale Fluoreszenzintensität

Den Zusammenhang zwischen Fluoreszenzanisotropie r und molekularer Mobilität beschreibt die Perrin-Gleichung:

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \qquad (2)$$

r_0 : fundamentale Anisotropie in Abwesenheit von Rotationsdiffusion

τ : Lebensdauer des angeregten Zustandes

θ : Rotationskorrelationszeit (~ 10 ns für ein 25 kD Protein)

Für globuläre Proteine gilt folgende Beziehung für die Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeit θ von dem Molekulargewicht M:

$$\theta = \frac{\eta M}{RT}(\bar{\nu} + h) \qquad (3)$$

η : Viskosität des Lösungsmittels (0.9 cP bei 25°C)

R : allgemeine Gaskonstante (8.31 J K^{-1} mol^{-1})

T : Temperatur (in K)

ν : spezifisches Volumen des Proteins

h : Hydration

Abb. 3.38 zeigt eine Simulation der Abhängigkeit der Anisotropie (r) vom Molekulargewicht für ClpB gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (τ = 4 ns) unter der Annahme, dass sich ClpB wie ein globuläres Protein verhält. Da bereits der ClpB-Monomer ein Molekulargewicht von 90 kDa besitzt, befindet sich die Anisotropie bereits in der Nähe der Asymptote und bei Oligomerisierung sind nur noch kleine Zunahmen zu erwarten.

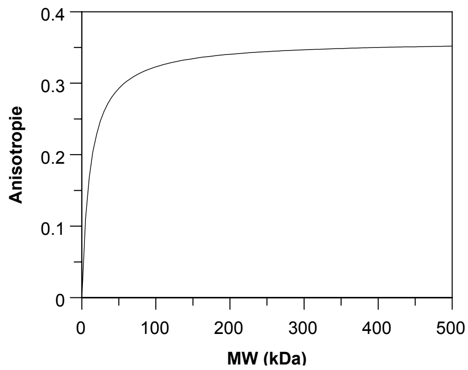


Abb. 3.38: Simulation der Abhängigkeit der Anisotropie (r) vom Molekulargewicht des fluoreszierenden Moleküls (Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488).

Für die Berechnung nach Gleichung (2) und (3) wurde vorausgesetzt, dass sich ClpB wie ein globuläres Protein verhält und folgende Parameter eingesetzt: r_0(Alexa) = 0.36, τ_{Alexa} = 4 ns, R = 8.31 $JK^{-1}mol^{-1}$, T = 298 K, $\eta = 9.0 \cdot 10^{-4}$ Nsm^{-2}, $\nu = 0.75 \cdot 10^{-6}$ m^3g^{-1}, $h = 0.23 \cdot 10^{-6}$ m^3g^{-1} (Lakowicz, 1986).

Die Zugabe von 8 µM ClpB(wt) zu einer 2 µM Lösung von ClpB(A94C)-Alexa führt zu einer 6%igen Erhöhung der Anisotropie (Abb. 3.39). Inkubiert man dieses Gemisch in Gegenwart von 1 mM ADP, so nimmt die Anisotropie bis auf den Ausgangswert ab, während die Inkubation mit 1 mM ATPγS kaum Einfluß auf das Anisotropiesignal hat. Diese Beobachtungen stimmen mit der erwarteten Oligomerverteilung überein: Zugabe von ClpB verschiebt das Gleichgewicht hin zu höheren Oligomeren, bewirkt also eine Zunahme der Anisotropie, ADP führt zur Dissoziation von höheren Oligomeren und somit zur Abnahme der Polarisation, ATPγS hat keinen Einfluß auf die oligomere Form. Die Bestimmung der Markierungseffizienz ergab, dass nur ca. 30% der eingesetzten ClpB(A94C)-Moleküle durch Alexa markiert wurden, eine Trennung von markierten und nicht-markierten Proteinen durch chromatographische Methoden war nicht möglich. Die Chaperonaktivität von ClpB(A94C) und ClpB(A94C)-Alexa im Glucosidase-Assay entspricht der Aktivität von ClpB(wt).

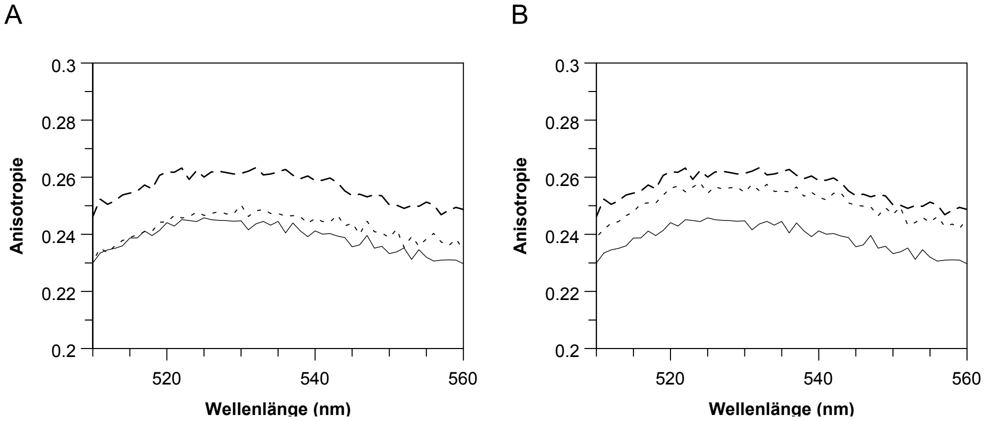


Abb. 3.39: Anisotropie (Emissionsspektrum) von ClpB(A94C)-Alexa.
Die Alexa-Fluoreszenz wurde bei 495 nm (Bandpass: 2 nm) bei 25°C in SFP (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE) angeregt. (A) Anisotropie von 2 µM ClpB(A94C)-Alexa (——) in Gegenwart von 8 µM ClpB(wt) (– – ·) und 8 µM ClpB(wt), 1 mM ADP (········). (B) Anisotropie von 2 µM ClpB(A94C)-Alexa (——) in Gegenwart von 8 µM ClpB(wt) (– – ·) und 8 µM ClpB(wt), 1 mM ATPγS (········).

3.4.3 *Stopped-Flow*-Anisotropiemessungen mit ClpB(A94C)-Alexa

3.4.3.1 Dissoziation von Oligomeren ausgelöst durch ADP-Bindung

Wie Lichtstreuungsexperimente und die Untersuchung der ATPase-Aktivität von ClpB(wt) zeigen (siehe 3.4.1) ist die Auflösung und Bildung von ClpB-Oligomeren ein schneller Prozess ($t_{1/2} \leq 15$ s). Die exakten Ratenkonstanten für Assoziation und Dissoziation mußten deshalb in *Stopped-Flow*-Anisotropiemessungen ermittelt werden. Zunächst wurde überprüft, ob die durch ADP ausgelöste Dissoziation von höheren Oligomeren mit einem meßbaren Anisotropiesignal verbunden ist. 2.0/1.0 µM ClpB(A94C)-Alexa wurden dazu mit 5.0/2.5 mM ADP gemischt und die Anisotropie über 5 s verfolgt. Die Anisotropie von ClpB(A94C)-Alexa nimmt nach Mischung mit ADP mit einer Rate von $\lambda_r = 1.65$ s^{-1} ab (Abb. 3.40A), die Bindung von ADP und die damit verbundene Dissoziation des Oligomers ist auch mit einer Zunahme der Alexa-Fluoreszenz ($\lambda_F = 1.29$ s^{-1}) verbunden (Abb. 3.40B).

Da sich die effektive Quantenausbeute q^{eff} der Alexa-Emission von Reaktanten und Produkten unterscheidet, gibt der Zeitverlauf der Anisotropie nicht direkt die Änderung einer Population mit der Zeit wieder. (Otto *et al.*, 1994; Galletto und Bujalowski, 2002). In Reaktionen, die wie in diesem Fall mit einer Zunahme von q^{eff} verbunden sind, ist die Rate der Anisotropieänderung schneller als die tätsächliche Dissoziationsrate, die durch den Zeitverlauf der Emission ($\lambda_F = 1.29$ s^{-1}) beschrieben wird.

In der Kontrollreaktion, der Mischung von ClpB(A94C)-Alexa mit ATP, wird weder eine Abnahme der Anisotropie noch eine Zunahme der Fluoreszenzemission beobachtet

(Abb. 3.41), womit bewiesen wird, dass beide Signale auf der Dissoziation des ClpB-Oligomers basieren.

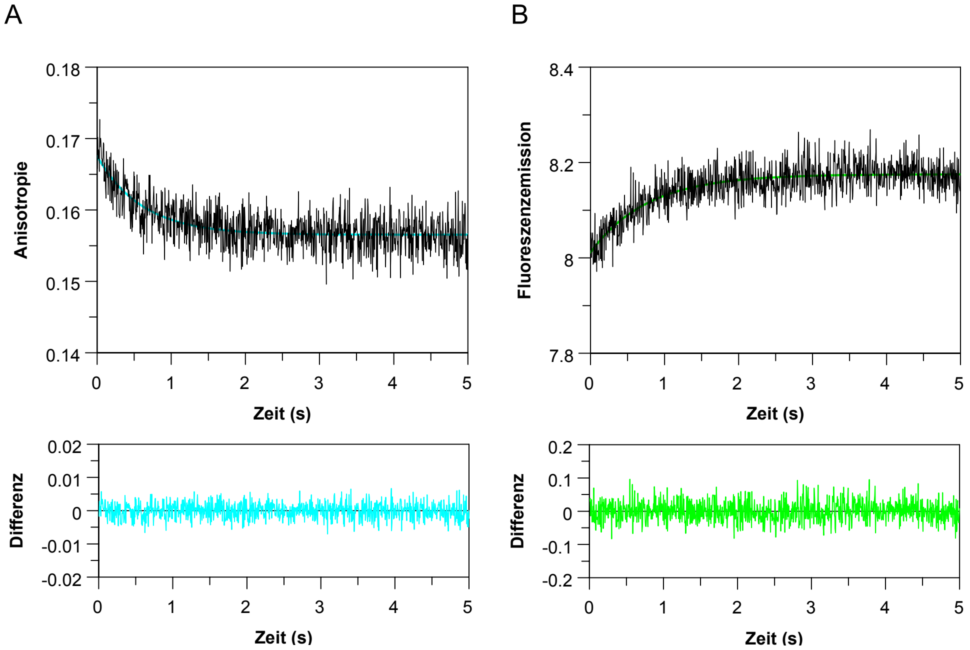


Abb. 3.40: *Stopped-Flow*-Messungen zur Dissoziation von ClpB(A94C)-Alexa nach ADP-Zugabe.
(A) 2.0/1.0 µM ClpB(A94C)-Alexa wurden mit 5.0/2.5 mM ADP gemischt und die Anisotropie über 5 s bei 25°C in SFP (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE) aufgenommen (siehe 2.5.4.1). Folgende Einstellungen wurden verwendet: Anregungswellenlänge: 495 nm, *Cut-off*-Filter: 530 nm, Blende: 1 mm, Zeitkonstante: direkt. Die gezeigten Kurven sind Mittelwerte aus 5-6 Messungen. Die blaue Linie zeigt die Angleichung der Transienten an eine monoexponentielle Funktion (λ_r = 1.65 s^{-1}, A = 0.010), die Abweichung der berechneten von der gemessenen Kurve ist im unteren Graphen abgebildet. (B) Der Zeitverlauf der Fluoreszenzemission wurde gleichzeitig mit der Anisotropie aufgenommen. Die grüne Linie beschreibt die Angleichung der Transienten an eine monoexponentielle Funktion (λ_F = 1.29 s^{-1}, A = 0.164).

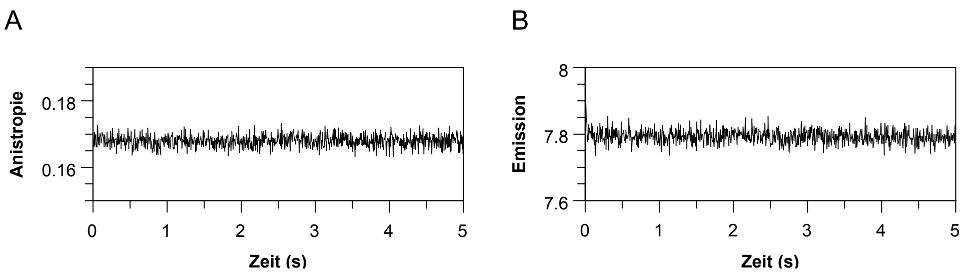


Abb. 3.41: *Stopped-Flow*-Transiente von ClpB(A94C)-Alexa nach Zugabe von ATP.
(A) 2.0/1.0 µM ClpB(A94C)-Alexa wurden mit 5.0/2.5 mM ATP gemischt und die Anisotropie über 5 s bei 25°C in SFP (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE) aufgenommen. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Anregungswellenlänge: 495 nm, *Cut-off*-Filter: 530 nm, Blende: 1 mm, Zeitkonstante: direkt. Die gezeigten Kurven sind Mittelwerte aus 5-6 Messungen. (B) Der Zeitverlauf der Fluoreszenzemission wurde gleichzeitig mit der Anisotropie aufgenommen.

3.4.3.2 Dissoziation von Oligomeren nach Erhöhung der Salzkonzentration

Gelfiltrationsexperimente zeigen, dass hohe Ionenkonzentrationen (0.5 M KCl) das Oligomergleichgewicht von ClpB(wt) hin zu Monomeren und Dimeren verschieben (siehe Abb. 3.10). Ist das Anisotropiesignal spezifisch an die oligomere Form von ClpB(A94C)-Alexa gekoppelt, sollte auch eine plötzliche Erhöhung der Salzkonzentration im *Stopped-Flow*-Experiment eine Anisotropieabnahme hervorrufen. 5.0/2.5 µM ClpB(A94C)-Alexa in SFP ohne KCl wurde deshalb in der *Stopped-Flow*-Apparatur schnell mit 1.0/0.5 M KCl vermischt und der Zeitverlauf von Anisotropie und Fluoreszenzintensität über 5 s verfolgt. Die Anisotropie nimmt mit einer Rate von $\lambda_r = 2.95\ s^{-1}$ leicht ab (Abb. 3.42A), die Änderung der Fluoreszenzintensität ist deutlicher ausgeprägt und nimmt mit einer Rate von $\lambda_F = 1.38\ s^{-1}$ zu (Abb. 3.42B). Auch in diesem Falle gilt, dass die Anisotropieänderung aufgrund der gleichzeitigen Zunahme der Quantenausbeute q^{eff} von Reaktanten und Produkten schneller erfolgt, als die eigentliche Oligomerdissoziation mit $\lambda_F = 1.38\ s^{-1}$. Dass die gemessenen Signale von Anisotropie und Fluoreszenzintensität trotz der kleinen Amplituden mit der Änderung der oligomeren Form von ClpB(A94C)-Alexa korrelieren, belegen Kontrollmessungen ohne KCl. Die bloße Verdünnung von 5.0/2.5 µM ClpB(A94C)-Alexa mit SFP ohne KCl ist nicht mit einem Anisotropie- oder Emissionssignal verbunden.

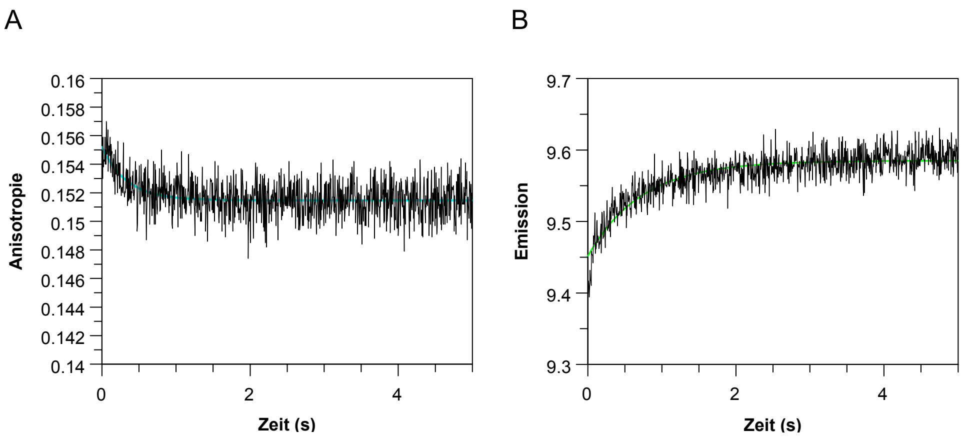


Abb. 3.42: ***Stopped-Flow*-Messungen zur Dissoziation von ClpB(A94C)-Alexa in 0.5 M KCl**

(A) 5.0/2.5 µM ClpB(A94C)-Alexa in SFP ohne KCl (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE) wurden mit 1.0/0.5 M KCl in SFP gemischt und die Anisotropie über 5 s bei 25°C aufgenommen. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Anregungswellenlänge 495 nm, *Cut-off*-Filter: 530 nm, Blende: 1 mm, Zeitkonstante: direkt. Die gezeigten Kurven sind Mittelwerte aus 5-6 Messungen. Die blaue Linie zeigt die Angleichung der Transienten an eine monoexponentielle Funktion ($\lambda_r = 2.98\ s^{-1}$, A = 0.004). (B) Der Zeitverlauf der Fluoreszenzemission wurde gleichzeitig mit der Anisotropie aufgenommen. Die grüne Linie beschreibt die Angleichung der Transienten an eine monoexponentielle Funktion ($\lambda_F = 1.38\ s^{-1}$, A = 0.133).

3.4.3.3 Oligomerisierung nach Erhöhung der ClpB-Konzentration

Neben der Dissoziation sollte nun auch die Assoziation von ClpB-Untereinheiten im *Stopped-Flow*-Experiment untersucht werden. Dazu wurde 1.0/0.5 µM ClpB(A94C)-Alexa mit verschiedenen Konzentrationen an ClpB(wt) gemischt und Anisotropie sowie Fluoreszenzemission über 5 s aufgenommen.

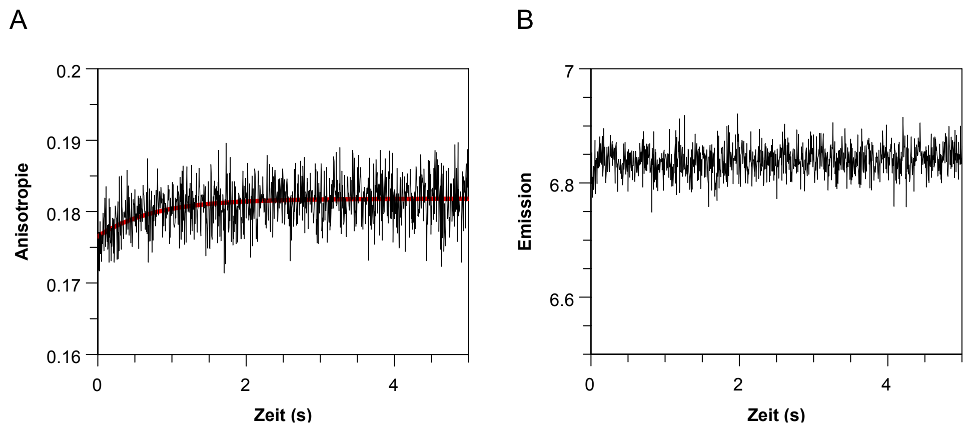


Abb. 3.43: *Stopped-Flow*-Messungen zur Oligomerbildung von ClpB(A94C)-Alexa mit ClpB(wt).
(A) 1.0/0.5 µM ClpB(A94C)-Alexa in SFP (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE) wurden mit 20.0/10.0 µM ClpB(wt) gemischt und die Anisotropie über 5 s bei 25°C aufgenommen. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Anregungswellenlänge: 495 nm, *Cut-off*-Filter: 530 nm, Blende: 1 mm, Zeitkonstante: direkt. Die gezeigten Kurven sind Mittelwerte aus 6 Messungen. Die rote Linie zeigt die Angleichung der Transienten an eine monoexponentielle Funktion (λ_r = 1.33 s^{-1}, A = 0.005). (B) Der Zeitverlauf der Fluoreszenzemission wurde gleichzeitig mit der Anisotropie aufgenommen, eine Fluoreszenzänderung ist nicht meßbar.

Eine Transiente (1.0/0.5 µM ClpB(A94C)-Alexa + 20.0/10.0 µM ClpB(wt)) zeigt Abb. 3.43. Die Anisotropie nimmt mit einer Rate von λ_r = 1.33 zu, eine Fluoreszenzänderung ist nicht messbar. Die beobachteten Ratenkonstanten der Oligomerisierung unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung weisen, bei Auftrag gegen die ClpB(wt)-Konzentration, eine lineare Abhängigkeit auf (Abb. 3.44). Bei einer Einschrittbindung stellt der Achsenabschnitt k_{off} dar, während k_{on} durch die Steigung der Geraden beschrieben wird (Bernasconi, 1976). Die lineare Regression liefert eine Assoziationsrate von 0.05 μM^{-1} s^{-1} und eine Dissoziationsrate von 0.8 s^{-1}. Innerhalb der Fehlergrenzen stimmt diese Dissoziationsrate mit den durch ADP-Zugabe (λ_F = 1.29 s^{-1}, siehe 3.4.3.1) oder KCl-Zugabe (λ_F = 1.38 s^{-1}; siehe 3.4.3.2) ermittelten Dissoziationsraten überein. Daraus ist zu schließen, dass entweder immer das gleiche Oligomerisierungsgleichgewicht beobachtet (Tetramer-Dimer) wird oder verschiedene Oligomerisierungen gleich schnell ablaufen.

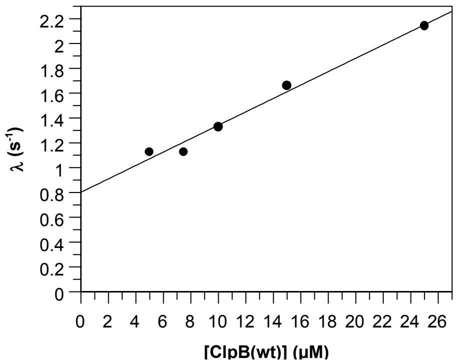


Abb. 3.44: Auftragung der Ratenkonstanten gegen die ClpB(wt)-Konzentration.

Die beobachteten Ratenkonstanten der Bindung von 1.0/0.5 µM ClpB(A94C)-Alexa an 10.0/5.0, 15.0/7.5, 20.0/10.0, 30.0/15.0 und 50.0/25.0 µM ClpB(wt) wurden gegen die ClpB(wt)-Konzentration aufgetragen. Die lineare Regression liefert Werte für k_{on} (0.05 µM^{-1} s^{-1}) und k_{off} (0.8 s^{-1}).

3.4.4 Kinetik der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt)

3.4.4.1 Stopped-Flow-Messungen zur Untersuchung der Bindungskinetik

Analog zu den Experimenten mit ClpB(trunc) (siehe 3.3.3.1) wurde die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) unter Variation der Mant-ADP-Konzentration (Abb. 3.45A) und ClpB(wt)-Konzentration (Abb. 3.45B) in *Stopped-Flow*-Experimenten anhand der Zunahme der Mant-ADP-Fluoreszenz untersucht. Obwohl ClpB(wt) im Gegensatz zu ClpB(trunc) eine intakte NBD1 enthält, also zwei NBDs pro Monomer und die Nukleotidaffinität von der Clp-Konzentration abhängig ist (vgl. 3.3.2), lassen sich die Bindungskurven wie im Falle von ClpB(trunc) durch die Summe dreier Exponentialfunktionen beschreiben (Abb. 3.46).

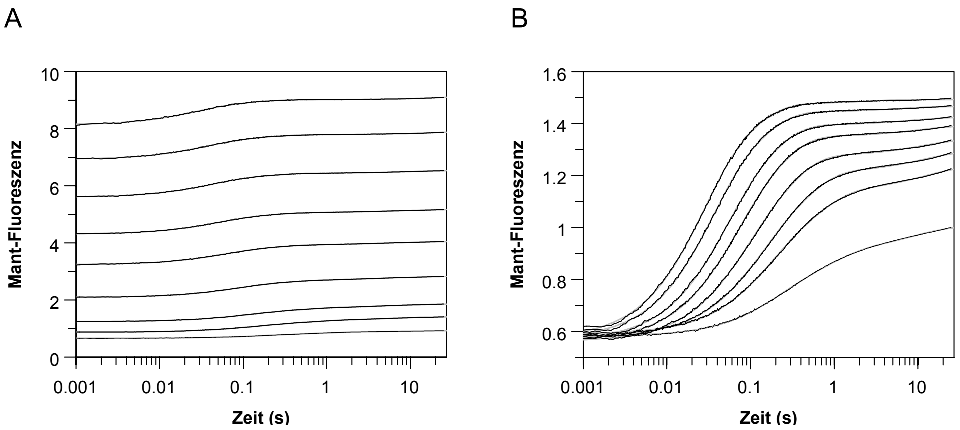


Abb. 3.45: *Stopped-Flow*-Transienten der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt).

(A) Bindungskurven von 1.0/0.5 µM ClpB(wt) an verschiedene Konzentrationen von Mant-ADP (1.0/0.5, 2.0/1.0, 3.0/1.5, 5.0/2.5, 7.5/3.75, 10.0/5.0, 12.0/6.0, 15.0/7.5, 18.0/9.0 µM, von unten nach oben). Die Mant-Fluoreszenz wurde bei 360 nm angeregt und mit einem *Cut-off*-Filter von 418 nm in SFP (pH 7.5, 25°C) gemessen. Die Zeitachse ist logarithmisch skaliert.

(B) Bindungskurven von 1.0/0.5 µM Mant-ADP an verschiedene Konzentrationen von ClpB(wt) (1.0/0.5, 2.0/1.0, 3.0/1.5, 5.0/2.5, 7.5/3.75, 10.0/5.0, 15.0/7.5, 20.0/10.0 µM, von unten nach oben). Die Meßbedingungen sind wie in (A). Für beide Meßreihen wurde die gleiche Verstärkung am Photomultiplier gewählt, absolute Amplituden sind daher vergleichbar.

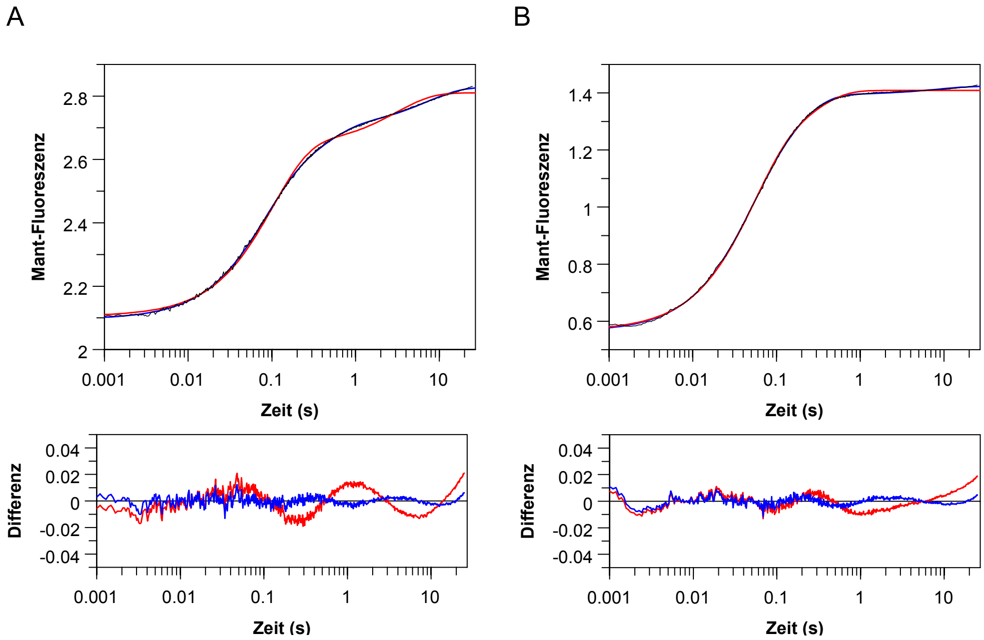


Abb. 3.46: Beschreibung der *Stopped-Flow*-Transienten durch exponentielle Gleichungen.

(A) Der zeitliche Verlauf der Mant-Fluoreszenz der Bindung von 1.0/0.5 µM ClpB(wt) an 5.0/2.5 µM Mant-ADP wurde bei 25°C in SFP aufgenommen und die Kurve durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rote Linie) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blaue Linie) beschrieben. (B) Hier ist der Zeitverlauf der Mant-Fluoreszenz bei Bindung von 1.0/0.5 µM Mant-ADP an 10.0/5.0 µM ClpB(wt) gezeigt. In beiden Fällen zeigt das Differenzspektrum zwischen gemessener und berechneter Mant-Fluoreszenz deutliche systematische Abweichungen bei Angleichung an eine doppelt-exponentielle Gleichung (rote Linie), die dreifach-exponentielle Gleichung (blaue Linie) ist ausreichend für die Beschreibung der Transienten.

Auch die Auftragung der observierten Ratenkonstanten und Amplituden gegen die Mant-ADP-Konzentration bzw. die Konzentration von ClpB(wt) (Abb. 3.47) ergibt ein Bild, welches dem Verhalten von ClpB(trunc) sehr ähnlich ist (vgl. Abb. 3.24).

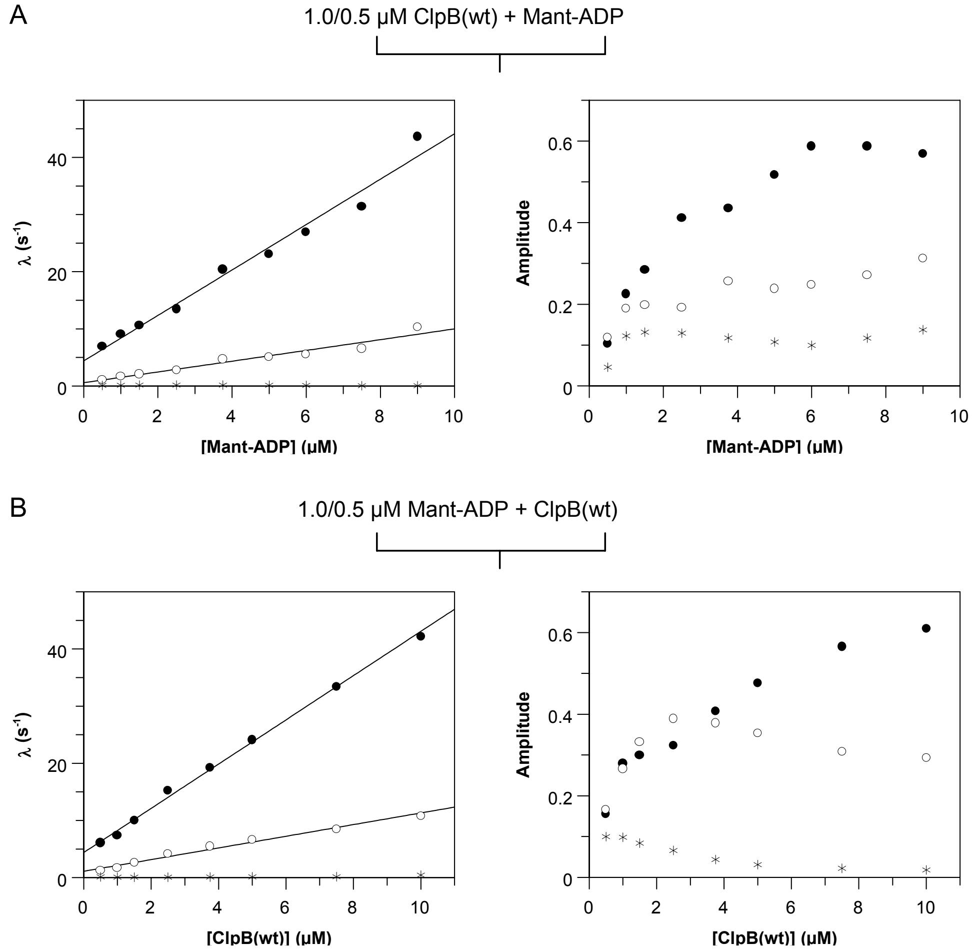


Abb. 3.47 Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt): Raten- und Amplitudensekundärdiagramme.

(A) Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Angleichung der Transienten (siehe 3.45A) an eine dreifach-exponentielle Gleichung berechnet. Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3 sowie der Amplituden A_1, A_2 und A_3 von der Mant-ADP-Konzentration in der Meßzelle unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die Mant-ADP-Konzentration ist gezeigt. (●) λ_1 bzw. A_1, (○) λ_2 bzw A_2, (*) λ_3 bzw. A_3.

(B) Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Angleichung der Transienten (siehe 3.45B) an eine dreifach-exponentielle Gleichung berechnet. Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten λ_1, λ_2 und λ_3 sowie der Amplituden A_1, A_2 und A_3 von der ClpB(wt)-Konzentration unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung in Bezug auf die ClpB(wt)-Konzentration in der Meßzelle ist gezeigt. (●) λ_1 bzw. A_1, (○) λ_2 bzw A_2, (*) λ_3 bzw. A_3.

Sowohl bei einem Überschuß von Mant-ADP über ClpB(wt) als auch bei einem Überschuß von ClpB(wt) über Mant-ADP sind zwei der observierten Ratenkonstanten linear von der Eduktkonzentration abhängig. Das Amplitudenverhalten der Transienten bei einem Überschuß von Mant-ADP unterscheidet sich von den Bindungskurven mit ClpB(trunc). Hier dominiert die mit dem ClpB-Dimer assoziierte Kurve (●) nicht so stark, was für einen Einfluß des Nukleotids auf die Oligomerverteilung und somit unterschiedliche Affinitäten von Dimer und Tetramer für Nukleotide spricht.

3.4.4.2 Globale Analyse der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) mit DynaFit

Auch für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) sollte ein Bindungsmodell definiert und die zugehörigen Ratenkonstanten in einer globalen Analyse durch numerische Integration bestimmt werden. Als Bindungsmodell wurde zunächst das mit ClpB(trunc) ermittelte Bindungsschema (Abb. 3.34) verwendet, wobei ClpB einem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht unterliegt und sowohl Dimer als auch Tetramer Mant-ADP binden. Bei der globalen Analyse vorgegeben wurden die Ratenkonstanten für die Oligomerisierung ($k_1 = 0.05\ \mu M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1} = 0.8\ s^{-1}$), die in Anisotropiemessungen ermittelt wurden (vgl. Abb. 3.44). Außerdem wurde der differentielle molare Fluoreszenzkoeffizient des Dimer·Mant-ATP-Komplexes aufgrund der Erhöhung der Mant-Fluoreszenz in Gleichgewichtstitrationsexperimenten auf rDA = 2.0 gesetzt. Die globale Analyse mit DynaFit zeigte jedoch, dass die Beschreibung der Transienten durch dieses Bindungsmodell nicht zufriedenstellend ist. Die Abweichung von gemessenen und berechneten Transienten (sum of squares = 0.9), sowie die Fehler bei Bestimmung der Ratenkonstanten sind relativ hoch. Das Modell für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) mußte deshalb durch einen weiteren Reaktionsschritt erweitert werden.

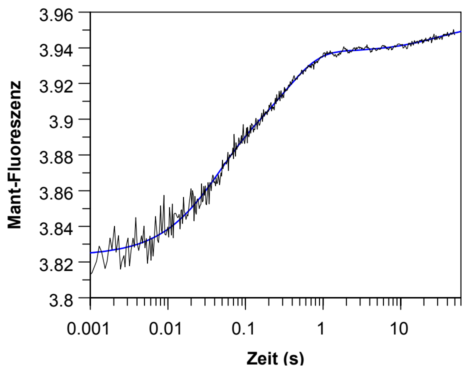


Abb. 3.48: Bindung von Mant-ADP an ClpB(K601Q): Beitrag der NBD1 zur Gesamtamplitude.
Die Bindung von 1.0/0.5 µM ClpB(K601Q) an 10.0/5.0 µM Mant-ADP wurde in SFP (pH 7.5, 25°C) anhand der Mant-Fluoreszenz (Anregung: 360 nm, *Cut-off*-Filter: 418 nm) verfolgt. Die blaue Linie zeigt die Angleichung an eine dreifach-exponentielle Gleichung.

ClpB(wt) enthält im Gegensatz zu ClpB(trunc) eine weitere funktionsfähige NBD. Die NBD1 trägt zwar aufgrund der niedrigen Nukleotidaffinität (siehe 3.1.3.1) in Gleichgewichtstitrationen kaum zur Fluoreszenzamplitude bei, dies könnte jedoch in *Stopped-Flow*-Experimenten besonders mit hohen Mant-ADP-Konzentrationen dennoch der Fall sein. Zur Überprüfung wurde die Mant-Fluoreszenz der Bindung von 10.0/5.0 µM Mant-ADP an 1.0/0.5 µM ClpB(K601Q), die NBD-Mutante, welche nur noch die funktionsfähige NBD1 besitzt, aufgenommen (Abb. 3.48). Die Gesamtamplitude dieser Reaktion macht ca. 20% der unter gleichen Bedingungen aufgenommen Amplitude von ClpB(wt) aus und muß deshalb in der globalen Analyse berücksichtigt werden.

Integriert man die Bindung von Mant-ADP an die NBD1 in das Bindungsmodell (Abb. 3.49), so führt die globale Analyse zu einer guten Beschreibung der *Stopped-Flow*-Transienten (sum of squares: 0.044) (Abb. 3.50). Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 3.4 zusammengefaßt. Da in der globalen Analyse zehn Parameter gleichzeitig angeglichen wurden, sind allerdings Zweifel an der Zuverlässigkeit der Anpassung angebracht. Die Analyse ergibt stark unterschiedliche K_d-Werte für die Bindung des Nukleotids an Dimer (K_d3 = 0.004 µM) und Tetramer (K_d2 = 0.044 µM). Dies ist aufgrund der Abhängigkeit der Nukleotidaffinität von der ClpB-Konzentration in der Gleichgewichtstitration zu erwarten (siehe 3.3.2). Die globale Analyse bestätigt außerdem, dass es eine hochaffine (NBD2) und eine niedrigaffine Bindungsstelle (NBD1) gibt. Allerdings ist der absolute Wert der in der globalen Analyse berechneten K_d-Werte K_d2, K_d3 und K_d4 viel niedriger als erwartet (aus Fluoreszenztitration K_d3 ~ 0.05 µM, K_d2 ~ 10 µM, siehe Abb. 3.20). Außerdem werden die Vorgaben der Thermodynamik im Zyklus ($K_d1 \cdot K_d2 = K_d3 \cdot K_d4$) nicht eingehalten. Es ist möglich, dass für eine korrekte Beschreibung noch weitere Schritte in das Modell integriert werden müssen. Ohne zusätzliche unabhängige Informationen zu Ratenkonstanten und vorliegenden Spezies ist eine zuverlässige Berechnung in der globalen Analyse jedoch nicht möglich.

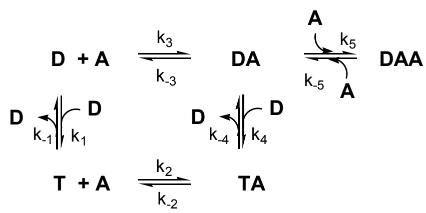


Abb. 3.49: Modell der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt).

Dieser Bindungsmechanismus wurde in der globalen Analyse der *Stopped-Flow*-Transienten mit DynaFit eingesetzt und die Parameter durch numerische Integration berechnet. (**D**: ClpB(wt)-Dimer, **T**: ClpB(wt)-Tetramer, **A**: Mant-ADP, **DA, TA**: Mant-ADP·ClpB-Komplex, NBD2 besetzt, **DAA**: Mant-ADP·ClpB-Komplex, NBD1 und NBD2 besetzt).

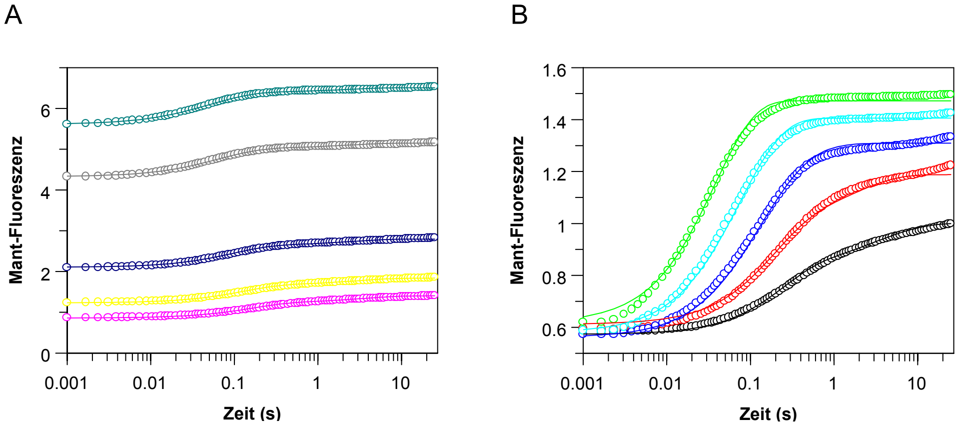


Abb. 3.50: Globale Analyse der Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) durch numerische Integration mit DynaFit.

(A) Zeitverlauf der *Stopped-Flow*-Transienten bei Mischung von 2.0/1.0 µM (○), 3.0/1.5 µM (○), 5.0/2.5 µM (○), 10.0/5.0 µM (○) (zweite y-Achse), 15.0/7.5 µM Mant-ADP (○) (zweite y-Achse) mit 1.0/0.5 µM ClpB(trunc)

(B) Zeitverlauf der *Stopped-Flow*-Transienten bei Mischung von 1.0/0.5 µM (○), 2.0/1.0 µM (○), 5.0/2.5 µM (○), 10.0/5.0 µM (○) und 20.0/10.0 µM ClpB(trunc) (○) mit 1.0/0.5 µM Mant-ADP. Die durchgezogenen Linien zeigen die Kurvenanpassung der globalen Analyse nach dem Mechanismus in Abb. 3.49.

Tab. 3.4: Ratenkonstanten und differentielle molare Fluoreszenzkoeffizienten, wie sie in der globalen Analyse nach dem Bindungsmechanismus in Abb. 3.49 durch numerische Integration mit dem Programm DynaFit bestimmt wurden.

Parameter	Fit	K_d
k_1	0.05 µM^{-1} s^{-1} (fix)	K_d1 = 16 µM
k_{-1}	0.8 s^{-1} (fix)	
k_2	12 µM^{-1} s^{-1} ± 0.4	K_d2 = 0.044 µM
k_{-2}	0.53 s^{-1} ± 0.3	
k_3	4.6 µM^{-1} s^{-1} ± 0.06	K_d3 = 0.004 µM
k_{-3}	0.02 s^{-1} ± 0.002	
k_4	22.6 µM^{-1} s^{-1} ± 0.8	K_d4 = 0.02 µM
k_{-4}	0.48 s^{-1} ± 0.02	
k_5	1.1 µM^{-1} s^{-1} ± 0.04	K_d5 = 5.2 µM
k_{-5}	5.5 s^{-1} ± 0.3	
r (TA)	1.75 ± 0.01	
r (DA)	2.0 (fix)	
r (DAA)	4.74 ± 0.08	

3.5 Wechselwirkung von ClpB mit Substraten

3.5.1 Einfluß von Substraten auf die ATPase-Aktivität

ClpB wird für Organismen wichtig, wenn die Kapazität der anderen Chaperone unter extremen Stressbedingungen überschritten wird und eine Proteinaggregation nicht mehr verhindert werden kann (Sanchez *et al.*, 1992). Mit Hilfe von ClpB können bereits aggregierte Proteine wieder in eine lösliche Form überführt und zumindest teilweise reaktiviert werden (Parsell *et al.*, 1994a; Glover und Lindquist, 1998; Goloubinoff *et al.*, 1999). Über den Mechanismus dieser Aggregatsauflösung gibt es nur sehr wenige Erkenntnisse. So ist unklar, ob ClpB überhaupt direkt mit Proteinaggregaten wechselwirkt oder die Eigenschaften des DnaK-Systems modifiziert und dessen Spezifität auch auf Proteinaggregate erweitert. Ein erster Hinweis für die direkte Wechselwirkung von ClpB mit Substratproteinen, war die Beobachtung, dass Casein die ATPase-Aktivität von ClpB aus *E. coli* 10-15-fach stimuliert (Woo *et al.*, 1992; Zolkiewski, 1999). Casein bildet heterogene Oligomere und Aggregate und könnte deshalb als Pseudosubstrat mit ClpB wechselwirken.

Die Geschwindigkeit der ATPase von ClpB(wt) bei 25°C wurde mit Hilfe der zeitabhängigen Änderung der Absorption bei 340 nm im gekoppelten Enzymtest bestimmt. 5 bzw. 10 µM ClpB wurden dabei mit verschiedenen Konzentrationen ATP (0.1 – 3 mM) in An- und Abwesenheit von 0.1 mg/ml Casein inkubiert und die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse gemessen (Abb. 3.51). Casein bewirkt eine Beschleunigung der ATPase von ClpB aus *T. thermophilus* um den Faktor 3.5 (5 µM ClpB) bzw. 2.5 (10 µM ClpB).

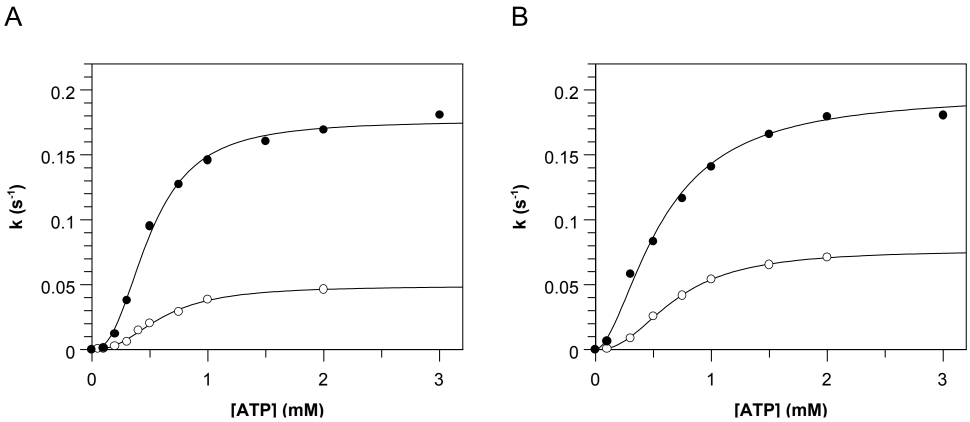


Abb. 3.51: Einfluß von Casein auf die *Steady-State*-ATPase von ClpB.

(A) 5 µM ClpB(wt) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Mg·ATP in 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; 0,2 mM NADH) in Abwesenheit (○) und in Gegenwart von 0.1 mg/ml Casein (●) inkubiert und die ATP-Hydrolyserate im gekoppelten Enzymtest bestimmt. Die Meßwerte wurden durch die Hill-Gleichung beschrieben. (B) ATPase-Aktivität von 10 µM ClpB in Ab- (○) und Anwesenheit (●) von 0.1 mg/ml Casein.

Tab. 3.5: Einfluß von Casein auf die *Steady-state*-ATPase von ClpB(wt).
Die ATPase-Aktivität von 5 und 10 µM ClpB(wt) in Ab- und Anwesenheit von 0.1 mg/ml Casein wurde durch die Hill-Gleichung beschrieben. Aufgelistet sind die Parameter der Hill-Gleichung (k_{cat}, Km, n).

	5 µM ClpB(wt)	5 µM ClpB(wt) + Casein	10 µM ClpB(wt)	10 µM ClpB(wt) + Casein
k_{cat} (s^{-1})	0.049	0.176	0.077	0.197
Km (mM)	0.69	0.57	0.60	0.50
n	2.3	1.8	2.4	2.4

Bei einer Casein-Konzentration von 0.1 mg/ml erreicht die Beschleunigung der ATPase einen Maximalwert, die weitere Zugabe von Casein bewirkt keine Erhöhung der ClpB-ATPase-Aktivität.

Nur k_{cat} wird durch Casein erhöht, Nukleotidaffinität (Km) und Kooperativität (n) der ATP-Hydrolyse werden durch Casein nicht verändert (Tab. 3.5). Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der ATPase-Aktivität eine allgemeine Eigenschaft von Substratproteinen ist, wurde die ATPase-Aktivität von ClpB in Gegenwart verschiedener Substrate untersucht. Als Substrate wurden hitzedenaturierte Lactatdehydrogenase (LDH) und α-Glucosidase von *Bacillus stearothermophilus* eingesetzt. Diese Proteine werden *in vitro* nach Hitzeinaktivierung durch Inkubation mit $ClpB_{Tth}$ und dem DnaK-System wieder reaktiviert (siehe 3.5.3 und (Motohashi *et al.*, 1999)), sind also Substrate von ClpB. Sie stimulieren die ATPase-Aktivität von ClpB(wt) jedoch nicht, weder im nativen Zustand noch nach einer Hitzedenaturierung (Abb. 3.52). Die Erhöhung der ATPase-Aktivität ist demnach keine allgemeine Eigenschaft von Substratproteinen und kann deshalb nicht als Nachweis für eine direkte Wechselwirkung von ClpB mit aggregierten Substraten dienen.

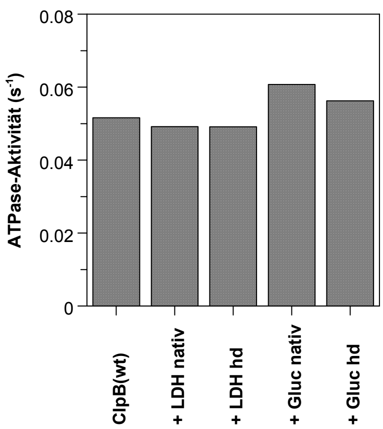


Abb. 3.52: Einfluß von Substratproteinen auf die ATPase-Aktivität von ClpB(wt).
5 µM ClpB(wt) wurden mit 0.5 mM Mg·ATP in Gegenwart von 1.0 µM LDH_{Bst} (nativ oder hitzedenaturiert (hd), 30 min 80°C) oder 5.0 α-$Glucosidase_{Bst}$ (GluC) (nativ oder hitzedenaturiert (hd), 10 min 75°C) inkubiert und die ATPase-Aktivität im gekoppelten Enzymtest bestimmt.

3.5.2 Wechselwirkung des ClpB-DnaK-Systems mit LDH-Aggregaten

Ein gängiges Modell für den Mechanismus der Aggregatsauflösung durch das ClpB-DnaK-System ist eine sequentielle Reaktion, wobei ClpB zuerst aggregierte Substratproteine erkennt und mit ihnen interagiert (Ben Zvi und Goloubinoff, 2001; Diamant *et al.*, 2001). In Analogie zu ClpA (Grimaud *et al.*, 1998) soll ClpB durch ATP-induzierte Konformationsänderungen gebundene Aggregate partiell entfalten und dadurch transient neue hydrophobe Angriffsflächen für DnaK an der Oberfläche der Aggregate zur Verfügung stellen (Goloubinoff *et al.*, 1999). Die Wechselwirkung von ClpB und DnaK mit Aggregaten wurde mit statischer Lichtstreuung untersucht. LDH aus *B. stearothermophilus* wurde dazu 45 min bei 75°C erhitzt, auf 40°C abgekühlt und 30 min inkubiert (Abb. 3.53).

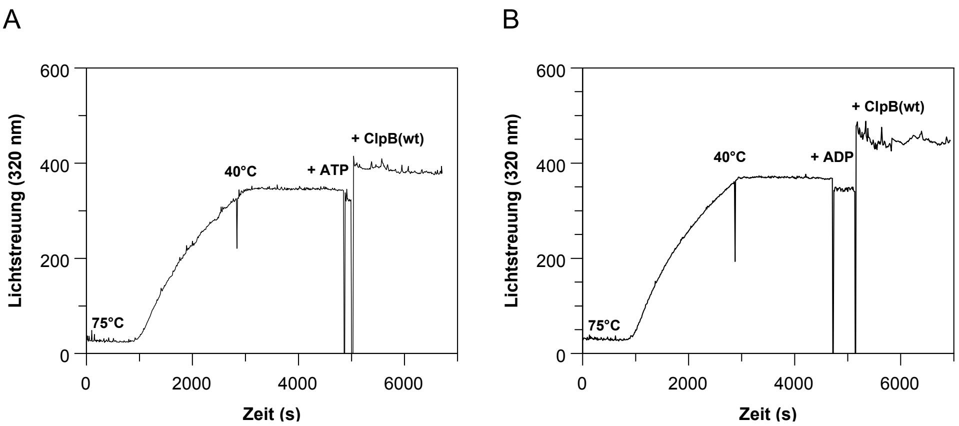


Abb. 3.53: Statische Lichtstreuung zur Untersuchung der Wechselwirkung von ClpB(wt) mit LDH.
1 µM LDH_{Bst} wurde 45 min bei 75°C in Puffer (50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5; 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE) erhitzt, die Lösung auf 40°C abgekühlt und 5 mM ATP (A) oder ADP (B) sowie 1 µM ClpB(wt) zugefügt, und die Lichtstreuung der Lösung bei einer Anregungs- (Bandbreite 2 nm) und Emissionswellenlänge (Bandbreite 16 nm) von 320 nm aufgenommen.

Die starke Erhöhung der Lichtstreuung während der Hitzedenaturierung deutet auf eine irreversible Aggregation der LDH hin, welche auch nach Abkühlung der Lösung auf 40°C bestehen bleibt. LDH-Aggregate wurden dann mit ClpB in Gegenwart von ATP oder ADP für 40 min bei 40°C inkubiert. Eine ATP-abhängige Veränderung des Aggregatszustandes durch Einwirkung von ClpB, wie sie bei einer teilweisen Fragmentierung der Aggregate oder der Bildung größerer Aggregate aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auftreten würde, konnte in diesen Experimenten nicht beobachtet werden. Eine Auflösung von Aggregaten in einer ATP-abhängigen Reaktion findet statt, wenn ClpB und die Chaperone des DnaK-Systems gleichzeitig auf Aggregate einwirken (Abb. 3.54).

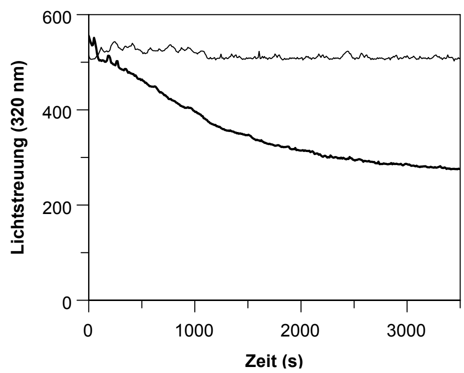


Abb. 3.54: Statische Lichtstreuung zur Untersuchung der Auflösung von LDH-Aggregaten durch das ClpB-DnaK-System.

1 µM hitzedenaturierte LDH_{Bst} wurde bei 40°C in Puffer (50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5; 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE) mit 1 µM ClpB, 3.2 µM DnaK, 0.8 µM DnaJ, 0.4 µM GrpE in Gegenwart von 5 mM ATP (**—**) oder ADP (—) inkubiert und die Lichtstreuung bei einer Anregungs- (Bandbreite 2 nm) und Emissionswellenlänge (Bandbreite 16 nm) von 320 nm aufgenommen.

3.5.3 Assistenz der Luziferase-Rückfaltung durch das thermophile ClpB-DnaK-System

3.5.3.1 Luziferase als Modellsubstrat

Luziferase ist ein häufig verwendetes Substratprotein für die Untersuchung der Chaperonfunktion des DnaK-Systems aus *E. coli* (Buchberger *et al.*, 1996; Lu und Cyr, 1998; Souren *et al.*, 1999). Im nativen Zustand setzt die Luziferase das Substrat Luziferin unter ATP-Verbrauch um. Die Lumineszenz ist dabei ein Maß für die Renaturierung (DeLuca, 1976). Allerdings ist die Luziferase sehr temperaturempfindlich und die Effizienz der Rückfaltung nimmt bei Erhöhung der Temperatur oder der Proteinkonzentration signifikant ab. Auch bei einer Assay-Temperatur von 30°C wird die Luziferase bei längeren Inkubationszeiten teilweise denaturiert. Außerdem nimmt die Lumineszenz infolge von Produktinhibierung durch das Oxidationsprodukt Oxylluziferin im Lauf der Inkubation ab (Abb. 3.55). Diese Faktoren erklären die Abnahme der Lumineszenz bei hoher Luziferasekonzentration und längeren Inkubationszeiten.

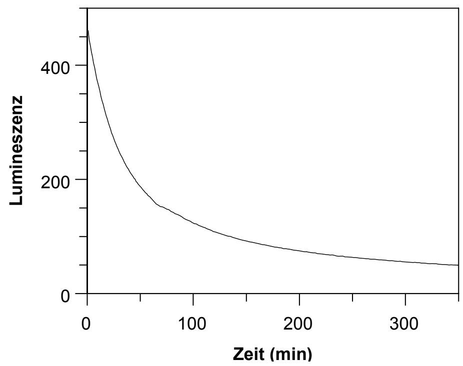


Abb. 3.55: Luziferin-Umsatz durch native Luziferase im kontinuierlichen Assay.
0.8 µM Luziferase wurden 30 min in Puffer L (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP) bei 25°C inkubiert und 1:10 in Lumineszenzpuffer (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoA, 0.1 mM Luziferin) verdünnt und die Lumineszenz im kontinuierlichen Assay verfolgt (vgl. 2.5.4.1).

3.5.3.2 Direkte Wechselwirkung von ClpB(wt) mit hitzedenaturierter Luziferase

Die Reaktivierung von hitzedenaturierter Luziferase wird durch das thermophile DnaK-System und mit höheren Ausbeuten durch ClpB in Zusammenarbeit mit dem DnaK-System erreicht (Abb. 3.3). Die Inkubation mit ClpB ohne das DnaK-System führte nicht zu einer meßbaren Reaktivierung der Luziferase. Betrachtet man die Wechselwirkung von ClpB mit Luziferase genauer, so fällt auf, dass ClpB doch eine sehr geringe Erhöhung der Luziferase-Aktivität bewirkt (Abb. 3.56). Diese Beobachtung unterstützt eine direkte Wechselwirkung von ClpB mit hitzedenaturierter Luziferase.

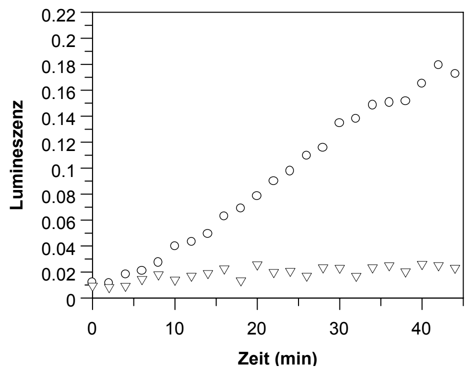


Abb. 3.56: ClpB(wt) wechselwirkt direkt mit hitzedenaturierter Luziferase.
0.8 µM Luziferase wurden 30 min bei 42°C in Puffer L (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP) denaturiert und 1:10 in Lumineszenzpuffer (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoA, 0.1 mM Luziferin) ohne (▽) oder mit 0.5 µM ClpB(wt) (○) verdünnt und die Lumineszenz gemessen.

3.5.3.3 Auswirkung der Substratinteraktion von ClpB(wt) auf die Reaktivierung durch das DnaK-System

In einem weiteren Experiment sollte festgestellt werden, ob die Inkubationsdauer mit ClpB Einfluß auf die Luziferaserückfaltung hat. Hitzedenaturierte Luziferase wurde hierfür 45 min oder 110 min mit ClpB inkubiert, bevor mit Zugabe des thermophilen DnaK-Systems die Rückfaltung gestartet wurde. Wie in Abb. 3.57 zu sehen ist, vermindert eine längere Inkubation mit ClpB(wt) Rate und Ausbeute der Rückfaltung. Auch dieses Experiment deutet an, dass ClpB direkt mit dem Substrat Luziferase wechselwirkt. ClpB wirkt jedoch kontraproduktiv und ist nicht in der Lage, die Luziferase dauerhaft zu stabilisieren und in einem für DnaK zugänglichen Zustand zu halten.

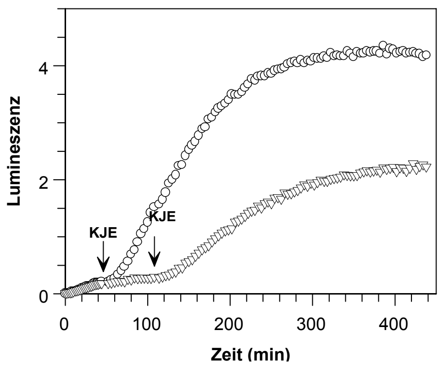


Abb. 3.57: ClpB kann Luziferase nicht längerfristig stabilisieren.

0.8 µM Luziferase wurden 30 min bei 42°C in Puffer L (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP) denaturiert und 1:10 in Lumineszenzpuffer (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoA, 0.1 mM Luziferin) mit 0.5 µM ClpB(wt) verdünnt und die Lumineszenz aufgenommen. Das KJE-System wurde 45 min (○) oder 110 min (▽) nach Zugabe von ClpB hinzugefügt (DnaK: 3.2 µM, DnaJ: 0.8 µM, GrpE: 0.4 µM).

Eine Arbeitshypothese ist, dass Aggregate durch ClpB für das DnaK-System "vorbereitet", z. B. in kleinere, leichter zugängliche Aggregate überführt werden. Die Protein-reaktivierung durch das DnaK-System sollte dann nach einer Vorinkubation mit ClpB schneller erfolgen als ohne Vorinkubation. Abb. 3.58 zeigt einen Vergleich der Reaktivierung von hitzedenaturierter Luziferase durch das DnaK-System ohne und mit Vorinkubation mit 0.5 µM ClpB. Die Vorinkubation mit ClpB führt nicht zu einer Beschleunigung der Luziferaserückfaltung nach Zugabe des DnaK-Systems. Entweder kann ClpB nur in Gegenwart von DnaK eine produktive Wechselwirkung mit dem Proteinaggregat eingehen oder in einer sequentiellen Reaktion, bei der zuerst ClpB und dann das DnaK-System auf das Aggregat einwirken, wobei die Reaktion mit DnaK der ratenlimitierende Schritt ist.

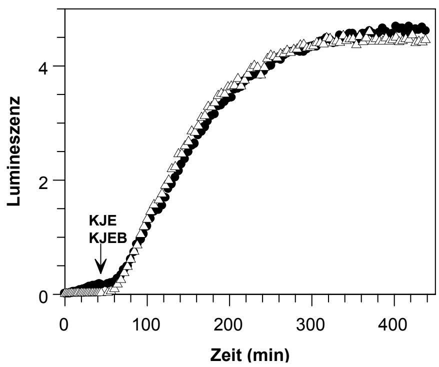


Abb. 3.58: Vorinkubation mit ClpB(wt) bewirkt keine Beschleunigung der Luziferasereaktivierung.
0.8 µM Luziferase wurden 30 min bei 42°C in Puffer L (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP) denaturiert und 1:10 in Lumineszenzpuffer (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoA, 0.1 mM Luziferin) mit 0.5 µM ClpB(wt) verdünnt (vgl. 2.5.4.1). Zum Zeitpunkt t = 0 wurde entweder 0.5 µM ClpB(wt) zugefügt und nach 45 min das KJE-System ergänzt (●) oder die Luziferase erst ohne Chaperone und nach 45 min mit dem gesamten Chaperonsystem reaktiviert (△). (Chaperonkonzentrationen: DnaK: 3.2 µM, DnaJ: 0.8 µM, GrpE: 0.4 µM).

3.5.3.4 Effekt von ClpB(wt) auf Substrate während der Denaturierung

Wie bereits von Motohashi *et al.* (Motohashi *et al.*, 1999) gezeigt wurde, kann ClpB im Gegensatz zum DnaK-System die Denaturierung und Aggregation von Substratproteinen während der Hitzeinkubation nicht verhindern. Die Frage ist, ob ClpB dennoch schon während der Hitzedenaturierung mit Substratproteinen interagiert oder das DnaK-System beeinflußt. Deshalb wurde die Luziferase in Gegenwart von ClpB, dem DnaK-System oder dem gesamten Chaperonsystem denaturiert und das gesamte Chaperonsystem in der darauffolgenden Renaturierungsphase ergänzt (Abb. 3.59). ClpB kann selbst die Aggregate nicht in einem für DnaK zugänglichen Zustand halten. Das DnaK-System unterdrückt die Aggregation in einer ATP-abhängigen Reaktion, wird jedoch von ClpB bei dieser Aktivität gehemmt. Dies könnte darauf beruhen, dass ClpB und DnaK um die Bindung an Luziferase konkurrieren, die Bindung von ClpB aber unproduktiv ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass ClpB selbst die Substratbindungsstelle von DnaK blockiert.

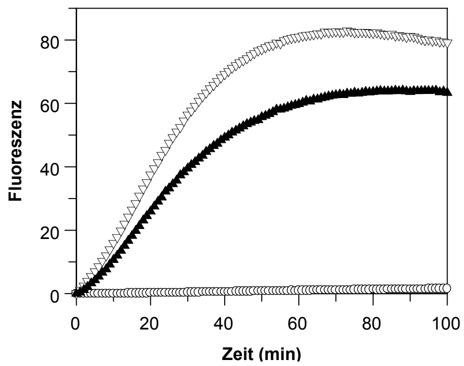


Abb. 3.59: Interaktion von ClpB(wt) mit Luziferase während der Denaturierung.
0.8 µM Luziferase wurden in Gegenwart der angezeigten Chaperone 30 min bei 42°C in Puffer L (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP) denaturiert und 1:10 in Lumineszenzpuffer (25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 240 µM CoA, 0.1 mM Luziferin) verdünnt. Zum Zeitpunkt t = 0 wurde in der Reaktivierungsphase das gesamte Chaperonsystem bei der permissiven Temperatur von 30°C ergänzt. Die Konzentration der Chaperone betrug: DnaK: 3.2 µM, DnaJ: 0.8 µM, GrpE: 0.4 µM, ClpB: 0.5 µM.

	Denaturierung (42°C)	Reaktivierung (30°C)
(○)	ClpB	DnaK, DnaJ, GrpE
(▽)	DnaK, DnaJ, GrpE	ClpB
(▲)	DnaK, DnaJ, GrpE, ClpB	-

3.5.4 α-Glucosidase als Substrat für das thermophile Chaperonsystem

Um zu erkennen, ob die ClpB-abhängige Reaktivierung von Substraten aus thermophilen Organismen und bei für *T. thermophilus* physiologischer Temperatur in gleicher Weise wie mit Luziferase abläuft, wurde die thermophile α-Glucosidase aus *B. stearothermophilus* (ein Monomer mit 65 kDa) untersucht (Motohashi *et al.*, 1999; Beinker *et al.*, 2002) (Der Glucosidase-Assay wurde von P. Beinker entwickelt und für ClpB optimiert). Das Protein verliert seine enzymatische Aktivität nach einer 10-minütigen Inkubation bei 75°C und gewinnt diese spontan nicht mehr zurück. Auch eine Inkubation mit $ClpB_{Tth}$ oder dem thermophilen DnaK-System bei 55°C führt nicht zu einer signifikanten Reaktivierung. Bei einer gemeinsamen Einwirkung von ClpB und dem DnaK-System können jedoch bis zu 40% der α-Glucosidase wieder reaktiviert werden (Abb. 3.60A). Um die Beiträge von ClpB und DnaK bei der Auflösung von Aggregaten zu charakterisieren und Intermediate im Reaktionsmechanismus aufzuspüren, wurde die hitzedenaturierte α-Glucosidase zunächst mit einzelnen Komponenten des Chaperonsystems inkubiert, bevor das gesamte System (ClpB, DnaK, DnaJ und GrpE) ergänzt wurde (Abb. 3.60B).

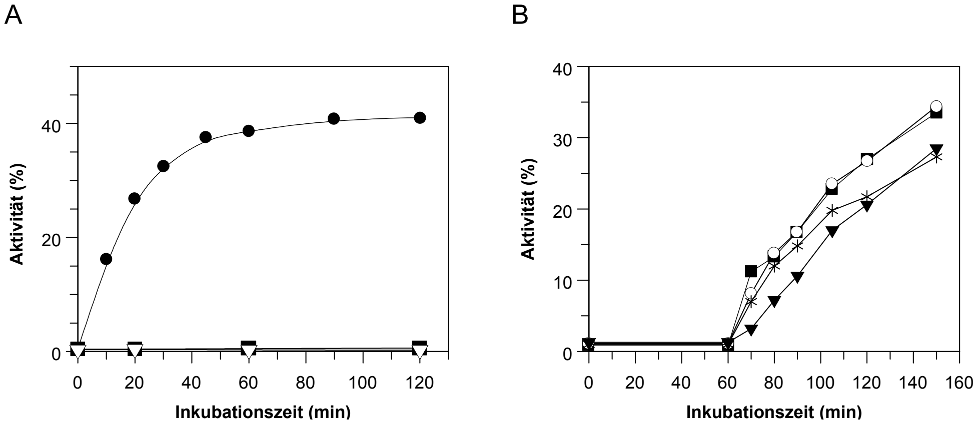


Abb. 3.60: Renaturierung von hitzedenaturierter α-Glucosidase durch das thermophile ClpB-DnaK-System.

(A) 0.2 µM α-Glucosidase wurden 10 min bei 75°C denaturiert und nach Zugabe von 1.0 µM ClpB (▽), dem DnaK-System (1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE) (■) oder dem ClpB-DnaK-System (●) in bei 55°C in Renaturierungspuffer (50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 1 mM DTE) inkubiert. Aliquots wurden zu den angezeigten Zeitpunkten entnommen und die α-Glucosidase-Aktiviät bestimmt.
(B) Hitzedenaturierte α-Glucosidase wurde über 60 min in Puffer (*), in Gegenwart von 1.6 µM DnaK (■), 1.6 µM DnaK, 0.4 µM DnaJ, 0.2 µM GrpE (○), oder 1.0 µM ClpB (▼) inkubiert, dann mit dem kompletten Chaperonsystem vervollständigt und die Aktivität über weitere 100 min gemessen. Die Aktivität der reaktivierten α-Glucosidase wurde in % der nativen Kontrolle (100%) angegeben.

Wie im Falle der Luziferase führt eine Vorinkubation mit thermophilem ClpB nicht zu einer Beschleunigung der Rückfaltung, sondern hemmt die Rückfaltung in kleinem Ausmaß. Die Reaktivierung der Proben, die mit DnaK oder dem gesamten DnaK-System vorinkubiert wurden, verläuft mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei Vorinkubation mit Puffer. Diese Experimente geben keinen Hinweis darauf, dass ClpB oder DnaK Intermediate mit einer längeren Lebensdauer erzeugen, die in einer sequentiellen Reaktion als Zwischenprodukte auftreten.

3.6 Wechselwirkung von ClpB(wt) mit DnaK

3.6.1 Komplementationsstudien mit ClpB und DnaK aus *T. thermophilus* und *E.coli*

ClpB entfaltet seine Chaperonaktivität nur in Kooperation mit dem DnaK-System. Experimente belegen, dass beide Chaperonkomponenten direkt mit Substraten interagieren können (siehe 3.5.2.2). Unklar ist jedoch, ob die verschiedenen Chaperone nacheinander, also in einem sequentiellen Mechanismus, mit dem Substrat interagieren oder gleichzeitig in einer kooperativen Reaktion auf aggregierte Substratproteine einwirken. ClpB könnte dabei mit DnaK oder den Kochaperonen DnaJ und GrpE einen stabilen Chaperonkomplex bilden oder nur kurzzeitig für den Transfer von Intermediaten mit den Chaperonen des DnaK-Systems wechselwirken. Ob ClpB während der Aggregatsauflösung direkt mit Chaperonen des DnaK-Systems interagiert, sollte durch Komplementationsstudien des thermophilen Chaperonsystems mit DnaK, DnaJ und GrpE aus *E. coli* ($DnaK_{Eco}$, $DnaJ_{Eco}$, $GrpE_{Eco}$) ermittelt werden. Die Assay-Bedingungen wurden so gewählt, dass eine signifikante Reaktivierung von hitzedenaturierter α-Glucosidase nur stattfindet, wenn alle vier thermophilen Chaperone, ClpB, DnaK, DnaJ und GrpE, zusammenwirken (Abb. 3.61).

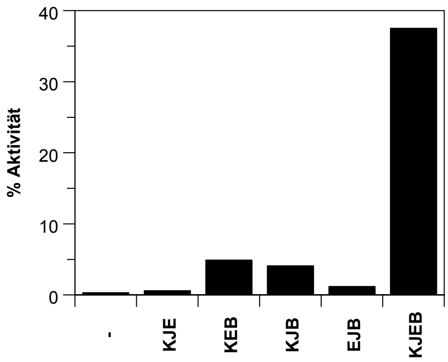


Abb. 3.61: Thermophile Chaperone bei der Reaktivierung von hitzedenaturierter α-Glucosidase.
0.2 µM α-Glucosidase wurden 10 min bei 75°C denaturiert und nach Zugabe der angegebenen thermophilen Chaperone (K: 1.6 µM DnaK, J: 0.4 µM DnaJ, E: 0.2 µM GrpE, B: 1.0 µM ClpB) bei 55°C inkubiert. Die α-Glucosidase-Aktiviät wurde nach einer Inkubationszeit von 100 min in Assaypuffer (50 mM KPi, pH 6.8, 2 mM para-Nitrophenylglucosid, 0.1 mg/ml BSA) gemessen. Die Aktivität der reaktivierten α-Glucosidase wurde in % der nativen Kontrolle (100%) angegeben.

Die Chaperone des DnaK-Systems wurden dann systematisch gegen ihre *E.coli*-Homologe ausgetauscht und die Reaktivierungsaktivität der heterologen Chaperonsysteme bestimmt. Da $DnaK_{Eco}$ in Gegenwart von Nukleotiden bereits bei 59°C (Palleros *et al.*, 1991; Palleros *et al.*, 1993; Schlee und Reinstein, 2002) und $DnaJ_{Eco}$ bei 58°C (Grimshaw *et al.*, 2001) denaturieren, wurde die hitzedenaturierte α-Glucosidase nicht nur bei der sonst im Assay verwendeten Temperatur von 55°C (Abb. 3.62A) sondern auch bei der permissiven Temperatur von 40°C (Abb. 3.62B) inkubiert.

Der Austausch von DnaJ und GrpE wird vom thermophilen ClpB bei der Inkubationstemperatur von 55°C toleriert. Bei 40°C ist das thermophile Chaperonsystem insgesamt weniger aktiv, die maximale Ausbeute liegt nur bei 20% der α-Glucosidase im Vergleich zu 40% bei 55°C. Der Austausch von DnaJ und GrpE gegen ihre *E. coli*-Homologe führt zu einer Verminderung der Chaperonaktivität, was jedoch auf eine verminderte Effizienz des heterologen DnaK-Systems zurückzuführen ist (Groemping, 2000). Auffällig ist jedoch, das die Aktivität des Chaperonsystems bei Austausch des thermophilen DnaK in beiden Fällen vollständig verloren geht. Dies ist bemerkenswert, da das DnaK-Protein aus

T. thermophilus ($DnaK_{Tth}$) eine Sequenzidentität von 56% und eine Homologie von 73% zu $DnaK_{Eco}$ aufweist. Die Reaktivierung von aggregierten Proteinen benötigt also eine spezifische Wechselwirkung von $ClpB_{Tth}$ mit $DnaK_{Tth}$.

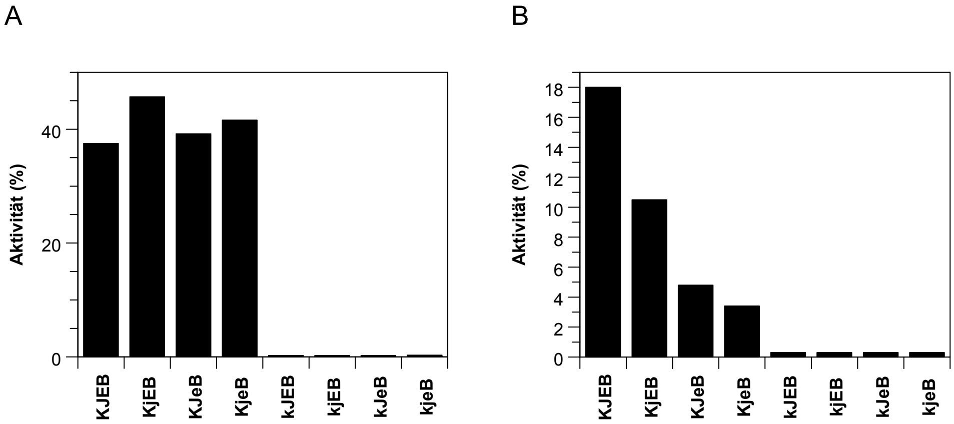


Abb. 3.62: Rückfaltung von α-Glucosidase: Komplementation mit Chaperonen aus *E.coli*.
0.2 µM α-Glucosidase wurden 10 min bei 75°C denaturiert und nach Zugabe der angegebenen Chaperone bei 55°C (A) oder bei 40°C (B) inkubiert (K: 1.6 µM DnaK, J: 0.4 µM DnaJ, E: 0.2 µM GrpE, B: 1.0 µM ClpB, Großbuchstaben bezeichnen Chaperone *aus T. thermophilus*, Kleinbuchstaben bezeichnen Chaperone aus *E.coli*). Die α-Glucosidase-Aktivität wurde nach einer Inkubationszeit von 100 min (A) bzw. 120 min (B) bestimmt. Die Aktivität der reaktivierten α-Glucosidase wurde in % der nativen Kontrolle angegeben.

3.6.2 Nachweis und Charakterisierung des ClpB-DnaK-Komplexes durch Ko-Elution

3.6.2.1 ATP-Agarose-Bindungstest

Eine Methode zum Nachweis der Komplexbildung nutzt die Bindung von $DnaK_{Tth}$ an C8-gekoppelte ATP-Agarose. ClpB besitzt zwar selbst zwei ATP-Bindungsstellen, die C8-Kopplung von ATP verhindert jedoch eine Bindung von $ClpB_{Tth}$ an ATP-Agarose. Allerdings treten schwache unspezifische Wechselwirkungen von ClpB mit der Agarose-Matrix auf. Koppelt man jedoch $DnaK_{Tth}$ an ATP-Agarose und inkubiert diese mit $ClpB_{Tth}$ so ko-eluiert ClpB zusammen mit $DnaK_{Tth}$ (Abb. 3.63, Bahn 4). Diese Ko-elution tritt nicht auf, wenn $DnaK_{Eco}$ an ATP-Agarose gebunden und mit $ClpB_{Tth}$ inkubiert wird (Abb. 3.63, Bahn 2). Dies stimmt überein mit der Erkenntnis aus den Komplementationsstudien, dass die Komplexbildung auf die spezifischen Wechselwirkungen zwischen homologem ClpB und DnaK aus *T. thermophilus* angewiesen ist. In Abwesenheit von Kofaktoren ist bei 25°C die Nukleotidbindung und –freisetzung der ratenlimitierende Schritt im Zyklus von $DnaK_{Tth}$, während die ATP-Hydrolyse bei $DnaK_{Eco}$ ratenlimitierend ist. Um auszuschließen, dass die Komplexbildung durch die unterschiedliche Nukleotidbindungskinetik von $DnaK_{Eco}$ und $DnaK_{Tth}$ beeinflußt wird, wurden DnaK-Mutanten verwendet, die ATP binden, aber nicht hydrolysieren ($DnaK_{Eco}$(E171A) und $DnaK_{Tth}$(E168A)). Das Elutionsmuster dieser Mutanten mit $ClpB_{Tth}$ kommt dem der nativen Proteine gleich, $ClpB_{Tth}$ ko-eluiert mit $DnaK_{Tth}$(E168A) aber nicht mit dem Gegenstück aus *E.coli*.

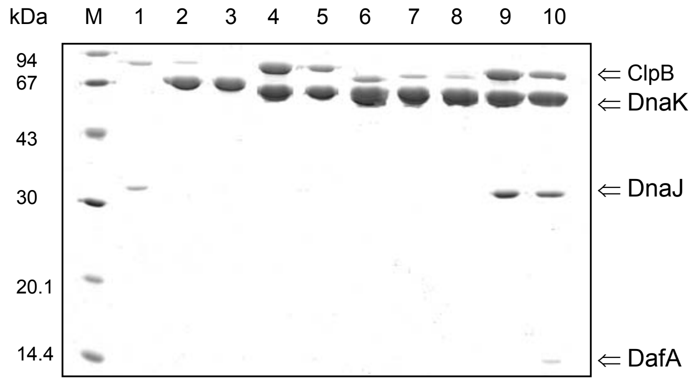


Abb. 3.63: SDS-Page zu Ko-Elutionsexperimenten mit ATP-Agarose

4 nmol DnaK wurden an ATP-Agarose immobilisiert und mit 2 nmol der angezeigten Chaperone inkubiert. Nach intensivem Waschen der Agarose-Matrix wurden gebundene Chaperone mit 5 mM ATP eluiert und Aliquots der Eluate durch SDS-PAGE analysiert. (M) Molekulargewichtsstandard (1) Kontrolle ohne DnaK, mit $ClpB_{Tth}$, $DnaJ_{Tth}$ und Daf_{Tth} (2) $DnaK_{Eco}$, $ClpB_{Tth}$ (3) DnaK $_{Eco}$ (E171A), ClpB (4) $DnaK_{Tth}$, $ClpB_{Tth}$ (5) DnaK $_{Tth}$ (E168A) (6) $DnaK_{Tth}$, $ClpB_{Tth}$(ΔN) (7) $DnaK_{Tth}$, $ClpB_{Tth}$(ΔC) (8) $DnaK_{Tth}$, $ClpB_{Tth}$(Cshort) (9) $DnaK_{Tth}$, $ClpB_{Tth}$, $DnaJ_{Tth}$ (10) $DnaK_{Tth}$, $ClpB_{Tth}$, $DnaJ_{Tth}$, $DafA_{Tth}$.

Um einzugrenzen, welche Region von $ClpB_{Tth}$ die Kontaktfläche für die Bindung an DnaK bereitstellt, wurden verschiedene ClpB-Konstrukte auf ihre Ko-Elution mit $DnaK_{Tth}$ untersucht (Abb. 3.64). $ClpB_{Tth}$(ΔN) fehlen die N-terminalen Aminosäuren 1-139, bei $ClpB_{Tth}$(ΔC) sind die C-terminalen Aminosäuren 762-854 und bei $ClpB_{Tth}$(Cshort) die C-terminalen Aminosäuren 828-854 deletiert (die ClpB-Deletionsmutanten wurden freundlicherweise von Philipp Beinker zur Verfügung gestellt). $ClpB_{Tth}$(ΔN) ist in der Lage eine schwache Wechselwirkung mit $DnaK_{Tth}$ einzugehen (Abb. 3.63, Bahn 6), während $ClpB_{Tth}$(ΔC) nicht mit $DnaK_{Tth}$ ko-eluiert (Abb. 3.63, Bahn 7). Bemerkenswert ist, dass auch $ClpB_{Tth}$(Cshort), dem nur 26 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, nicht mit $DnaK_{Tth}$ interagiert (Abb. 3.63, Bahn 8). Es scheint, als ob ein intakter C-Terminus für die Wechselwirkung mit DnaK essentiell ist.

Die Wechselwirkung von $DnaK_{Tth}$ mit $ClpB_{Tth}$ wird durch die Anwesenheit von $DnaJ_{Tth}$ nicht gestört (Abb. 3.63, Bahn 9). Allerdings ist $DnaJ_{Tth}$ hydrophob und bindet unspezifisch an ATP-Agarose, so dass nicht eindeutig ist, ob es spezifischer Bestandteil des gebildeten Chaperonkomplexes ist. Die Ausbildung des für *T. thermophilus* spezifischen DnaK-DnaJ-DafA-Komplexes scheint mit der Bindung von $DnaK_{Tth}$ an $ClpB_{Tth}$ zu konkurrieren (Abb. 3.63, Bahn 10).

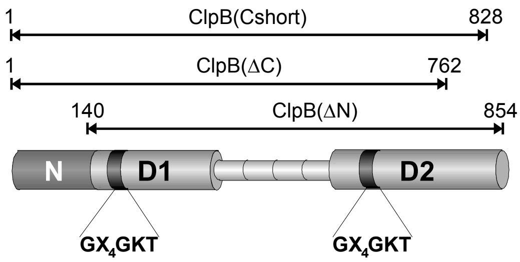


Abb. 3.64: ClpB$_{Tth}$-Deletionsmutanten in Ko-Elutionsexperimenten.
N: N-Terminus, **D1** und **D2**: Nukleotidbindungsdomänen 1 und 2. Die Zahlen geben die Aminosäuren von ClpB(wt) an, welche die Deletionsmutanten umfassen.

3.6.2.2 *Experimente mit Ni-NTA und DnaK$_{CHis}$*

Das gebundene Nukleotid bestimmt die oligomere Form von ClpB. Der Einfluß von Nukleotiden und somit die Bedeutung der oligomoren Form von ClpB bei der Wechselwirkung mit DnaK wurde mit Hilfe von thermophilen DnaK$_{CHis}$ untersucht. Dieses DnaK-Protein kann über sechs am C-Terminus angehängte His-Reste an Ni-NTA-Agarose immobilisiert werden.

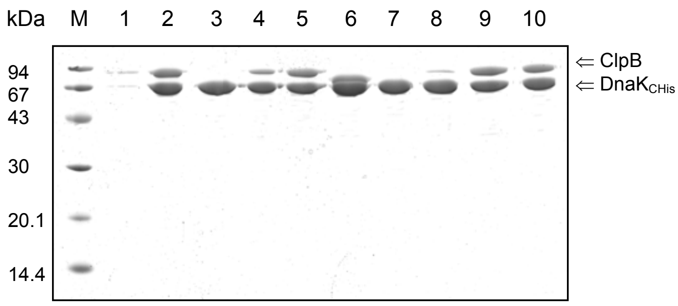


Abb. 3.65: SDS-Page zu Ko-Elutionsexperimenten mit Ni-NTA: Einfluß des Nukleotids und Bindung von ClpB-Deletionsmutanten.
4 nmol DnaK$_{CHis}$ wurden an Ni-NTA-Agarose immobilisiert und mit 2 nmol ClpB in Gegenwart von 1 mM ADP, ATP, ATPγS oder in Abwesenheit von Nukleotiden inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden gebundene Chaperone mit 0.5 M Imidazol eluiert und Aliquots der Eluate durch SDS-Page analysiert. (M) Molekulargewichtsstandard (1) Kontrolle: DnaK, ClpB (2) DnaK$_{CHis}$, ClpB (3) DnaK$_{CHis}$, ClpB, ADP (4) DnaK $_{CHis}$, ClpB, ATP (5) DnaK$_{CHis}$, ClpB, ATPγS (6) DnaK$_{CHis}$, ClpB(ΔN) (7) DnaK$_{CHis}$, ClpB(ΔC) (8) DnaK$_{CHis}$, ClpB(Cshort) (9) DnaK$_{CHis}$, ClpB(K204Q) (10) DnaK$_{CHis}$, ClpB(K601Q).

ClpB$_{Tth}$ wurde in Abwesenheit von Nukleotiden und in Gegenwart des nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanalogons ATPγS mit DnaK$_{CHis}$ zusammen eluiert (Abb. 3.65, Bahn 2 und 5). In

Gegenwart von ADP hingegen, welches die Auflösung von höheren ClpB-Oligomeren induziert, ist keine Interaktion festzustellen (Abb. 3.65, Bahn 3). ATP wird während der Inkubationszeit (90 min) teilweise hydrolysiert, deshalb wird in Gegenwart von ATP weniger ClpB mit $\mathrm{DnaK_{CHis}}$ ko-eluiert als in Abwesenheit von Nukleotid (Abb. 3.65, Bahn 4).

Die ClpB-Deletionsmutanten verhalten sich bei der Ko-Elution mit $\mathrm{DnaK_{CHis}}$ genauso wie in den Experimenten mit ATP-Agarose. ClpB(ΔN) wechselwirkt mit $\mathrm{DnaK_{CHis}}$, ClpB(ΔC) und ClpB(Cshort) mit Deletionen am C-Terminus interagieren nicht mit $\mathrm{DnaK_{CHis}}$ (Abb. 3.65, Bahn 6-8). Die beiden NBD-Mutanten ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) werden auch zusammen mit $\mathrm{DnaK_{CHis}}$ eluiert (Abb. 3.65, Bahn 9, 10).

Es sollte außerdem versucht werden mit dieser Methode einen Chaperon-Substrat-Komplex zu isolieren. Hitzedenaturierte Luziferase oder α-Glucosidase wurden deshalb zusammen mit dem immobilisierten $\mathrm{DnaK_{CHis}}$ und ClpB inkubiert. Ein Chaperon-Substrat-Komplex konnte in diesen Ansätzen jedoch nicht isoliert werden, ein kleiner Bruchteil der Substratproteine bindet an das immobilisierte $\mathrm{DnaK_{CHis}}$, der überwiegende Teil wird jedoch in den Waschschritten entfernt. Eine Ko-Elution von ClpB mit $\mathrm{DnaK_{CHis}}$ wird in Gegenwart von denaturierten Substratproteinen nicht beobachtet.

3.6.3 Stimulation der ClpB-ATPase-Aktivität durch DnaK

DnaK bindet an ClpB in Abwesenheit von Nukleotid und in Gegenwart von ATP, aber nicht in Gegenwart von ADP. Für die Wechselwirkung scheint demnach die aktive hocholigomere Form von ClpB notwendig zu sein. Aufgrund von allosterischen intermolekularen Wechselwirkungen ist die ATPase-Aktivität des ClpB-Oligomers deutlich erhöht (siehe 3.2.1). Bindet DnaK an den Oligomer und wird diese Form dadurch stabilisiert, so sollte eine Erhöhung der ATPase-Aktivität von ClpB(wt) mit der Bindung von $\mathrm{DnaK_{Tth}}$ verbunden sein. Die ATPase-Aktivität von ClpB(wt) wurde deshalb bei verschiedenen ATP-Konzentrationen in Gegenwart von $\mathrm{DnaK_{Tth}}$(E168A) bestimmt und mit der Aktivität in Abwesenheit von DnaK verglichen. $\mathrm{DnaK_{Tth}}$(E168A) ist selbst nicht in der Lage ATP zu hydrolysieren, bindet aber an ClpB (siehe Abb. 3.63), so dass nur die ATP-Hydrolyse durch ClpB beobachtet werden kann. $\mathrm{DnaK_{Tth}}$(E168A) bewirkt eine 2.6-fache Zunahme der *Steady-state*-ATPase-Aktivität von ClpB(wt) im gekoppelten Enzymtest (Abb. 3.66).

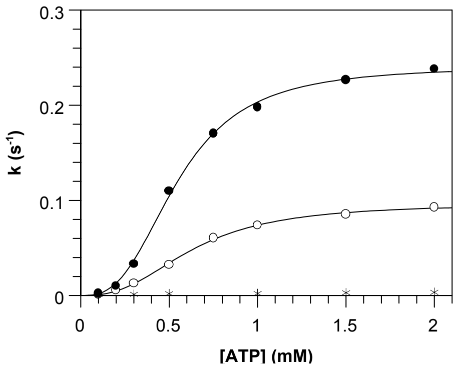


Abb. 3.66: Einfluß von DnaK$_{Tth}$(E168A) auf die ATPase-Aktivität von ClpB$_{Tth}$(wt).
10 µM ClpB$_{Tth}$(wt) wurde mit verschiedenen Konzentrationen von ATP in NADH-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 0.4 mM PEP; 0.2 mM NADH) in Abwesenheit (○) und in Gegenwart von 10 µM DnaK$_{Tth}$(E168A) (●) inkubiert und die ATP-Hydrolyserate k im gekoppelten Enzymtest bestimmt. Die Daten wurden an die Hill-Gleichung angepasst. (*) zeigt die Hydrolyse-Aktivität von 10 µM DnaK$_{Tth}$(E168A) ohne ClpB.

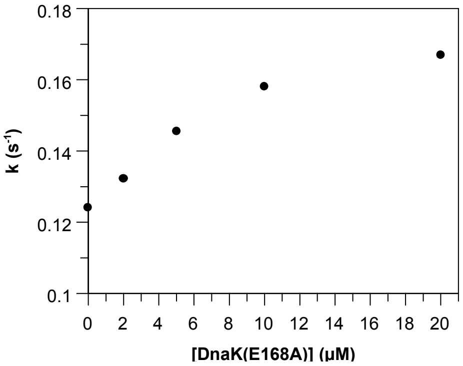


Abb. 3.67: Beschleunigung der ATPase-Aktivität von ClpB$_{Tth}$(wt) durch DnaK$_{Tth}$(E168A) in Gegenwart von Casein.
5 µM ClpB$_{Tth}$(wt) wurden mit 1 mM ATP in NADH-Puffer (50 mM Tris/HCl pH7,5; 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 0.4 mM PEP; 0.2 mM NADH) in Gegenwart von 0.1 mg/ml Casein und verschiedenen Konzentrationen an DnaK$_{Tth}$(E168A) (●) inkubiert und die ATP-Hydrolyserate k im gekoppelten Enzymtest bestimmt.

Die Stimulation der ATPase von ClpB könnte darauf beruhen, dass DnaK wie Casein als Pseudosubstrat von ClpB gebunden wird. Um dies auszuschließen, wurde ClpB zusammen mit 0.1 mg/ml Casein und verschiedenen Konzentrationen von DnaK$_{Tth}$(E168A) inkubiert und die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse bestimmt (Abb. 3.67). Während die Zugabe von Casein über 0.1 mg/ml hinaus keine weitere Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit zur Folge hat, bewirkt die Zugabe von DnaK$_{Tth}$(E168A) eine weitere Erhöhung um 35%.

DnaK$_{Tth}$(E168A) scheint zumindest nicht mit Casein um die gleiche Bindungsstelle am ClpB zu konkurrieren. Es ist jedoch noch unklar, ob Casein wirklich ein Substrat für ClpB imitiert und die eigentliche Substratbindungsstelle besetzt.

Ob die Stimulation der ATPase-Aktivität von ClpB durch DnaK wirklich ein spezifischer Effekt ist, kann durch das *E.coli*-Analogon DnaK$_{Eco}$(E171A) überprüft werden. Die Komplementationsstudien (siehe 3.6.1) als auch die Ko-Elutionsexperimente (siehe 3.6.2.1) zeigen, dass DnaK$_{Eco}$ nicht in der Lage ist, mit ClpB$_{Tth}$ einen Komplex zu bilden. Dennoch wird die ATPase-Aktivität von ClpB$_{Tth}$ durch DnaK$_{Eco}$(E171A) genauso stimuliert wie durch DnaK$_{Tth}$(E168A) (Abb. 3.68). Die Erhöhung der ClpB-ATPase-Aktivität durch DnaK scheint ein unspezifischer Effekt zu sein, und kein Indikator für eine Komplexbildung zwischen beiden Proteinen.

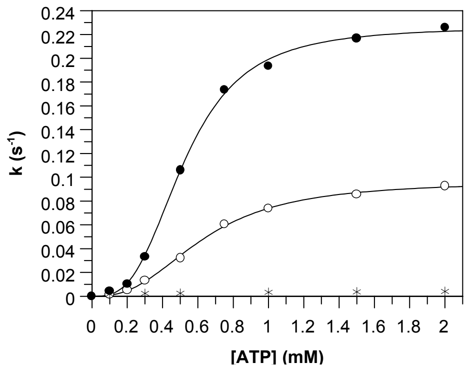


Abb. 3.68: Einfluß von DnaK$_{Tth}$(E168A) auf die ATPase-Aktivität von ClpB$_{Tth}$(wt).

10 µM ClpB$_{Tth}$(wt) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ATP in NADH-Puffer (50 mM Tris/HCl pH7,5; 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 0.4 mM PEP; 0.2 mM NADH) in Abwesenheit (○) und in Gegenwart von 10 µM DnaK$_{Tth}$(E168A) (●) inkubiert und die ATP-Hydrolyserate k im gekoppelten Enzymtest bestimmt. Die Daten wurden an die Hill-Gleichung angepasst. (*) zeigt die Hydrolyse-Aktivität von 10 µM DnaK$_{Tth}$(E168A) ohne ClpB.

4. Diskussion

4.1 Die Rolle der Nukleotidbindungsdomänen von ClpB

4.1.1 Strukturgebende und katalytische Funktion der NBDs in AAA-Proteinen

ClpB, sowie das homologe Chaperon Hsp104 aus Hefe, gehören zu der AAA^+-Superfamilie von Proteinen, die an einer großen Vielfalt von zellulären Prozessen wie der Membranfusion, der Biogenese von Organellen, der DNA-Replikation oder der Proteinfaltung beteiligt sind (Neuwald *et al.*, 1999). Aktuelle Modelle für die Funktion der AAA-Proteine gehen davon aus, dass durch ATP-Bindung oder ATP-Hydrolyse induzierte Konformationsänderungen für die Entfaltung von Proteinen oder die Auflösung von Proteinkomplexen genutzt werden (Vale, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001). Über den Mechanismus, der ATP-Bindung oder -Hydrolyse mit der Umorganisation von Proteinkomplexen verbindet, ist jedoch wenig bekannt. Besonders schwierig ist die Aufklärung des Mechanismus bei Proteinen mit mehreren AAA-Modulen, da sowohl die katalytischen Eigenschaften der einzelnen Module, als auch das Ausmaß der gegenseitigen Beeinflussung bewertet werden müssen.

NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*), welches die Fusion von Transportvesikeln mit der Zielmembran vermittelt, ist eines der am besten charakterisierten AAA-Proteine mit zwei AAA-Modulen. Die Aufgabe der beiden Module ist bei NSF klar definiert: NBD1 (NBD: Nukleotidbindungsdomäne) hat eine hohe ATPase-Aktivität und kontrolliert die enzymatische Aktivität, während NBD2 keine detektierbare ATPase-Aktivität zeigt, die ATP-Bindung jedoch für die Stabilität des katalytisch aktiven Hexamers notwendig ist, also nur strukturgebende Funktion hat (Whiteheart *et al.*, 1994; Nagiec *et al.*, 1995). Auch für die Chaperone $ClpB_{Eco}$ bzw. Hsp104 aus Hefe wurde eine klare Rollenverteilung der NBDs postuliert. Trotz der hohen Sequenzkonservierung der NBDs von Hsp104 und $ClpB_{Eco}$ erfolgte die Zuordnung von katalytischer und strukturgebender Funktion unterschiedlich (Parsell *et al.*, 1994a; Schirmer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). Unser Ziel war es, mit Hilfe von ClpB aus *T. thermophilus*, eine kinetische Charakterisierung von Nukleotidbindung, ATP-Hydrolyse und Oligomerisierung vorzunehmen und dadurch Informationen über die Kopplung der ATP-Hydrolyse durch ClpB mit der Auflösung von Substratkomplexen zu gewinnen.

4.1.2 Die Nukleotidbindungseigenschaften von $ClpB_{Tth}$

Wir nutzten die gerichtete Mutagenese der WalkerA-Konsensussequenzen, um selektiv einzelne NBDs von ClpB aus *T. thermophilus* zu inaktivieren (ClpB(K204Q), ClpB(K601Q)) und ihren Beitrag zu ATP-Hydrolyse und Oligomerisierung zu definieren. Wie die ClpB-Doppelmutante (ClpB(K204Q, K601Q)) zeigt, wird die Nukleotidbindung durch diese

Mutation vollständig unterdrückt, die strukturelle Integrität des Proteins bleibt jedoch erhalten.

Die beiden Nukleotidbindungsdomänen von ClpB unterscheiden sich deutlich in ihren Nukleotidbindungseigenschaften. ClpB besitzt, vergleichbar mit NSF (Matveeva *et al.*, 1997), eine hochaffine Bindungsstelle, die NBD2, und eine niedrigaffine Bindungsstelle, die NBD1. Erst sehr detaillierte Untersuchungen mit reversen Fluoreszenztitrationen zeigten, dass die Affinität der hochaffinen NBD2 für Mant-ADP sich je nach oligomerem Zustand von ClpB stark verändert. (Bei der reversen Titration wurde ClpB vorgelegt und der Fluorophor Mant-ADP zutitriert, um die Konzentration von ClpB während der Titration konstant zu halten, siehe 3.3.2). Die isolierte NBD2, wie sie im verkürzten ClpB-Fragment ClpB(trunc) vorliegt, bindet Mant-ADP unabhängig von der Chaperonkonzentration mit einem K_d von 0.1 - 0.2 µM (siehe 3.3.2, Abb. 3.19). Die globale Analyse mit ClpB(trunc) ergibt einen K_d-Wert von 0.5 µM (siehe 3.3.5, Tab. 3.3). Dabei scheint eine NBD2 pro ClpB-Dimer mit Mant-ADP besetzt zu werden.

Ganz anders sehen die Bindungsparameter aus, wenn beide Nukleotidbindungsdomänen wie bei ClpB(wt) intakt sind. ClpB(wt) bindet Mant-ADP zwar auch mit einem K_d von 0.2 µM, wenn es in niedriger Konzentration (0.5 µM) vorliegt. Der K_d der NBD2 für Mant-ADP steigt jedoch bis auf 7 µM in Gegenwart von 50 µM ClpB(wt). Verkompliziert wird das System außerdem dadurch, dass auch die NBD1 die Bindungseigenschaften der NBD2 beeinflußt. Dies zeigt sich darin, dass bei inaktivierter NBD1 im Falle von ClpB(K204Q) die Affinität der NBD2 noch viel stärker von der ClpB-Konzentration abhängt als bei ClpB(wt). (K_d = 0.5 µM mit 0.5 µM ClpB(K204Q), K_d ~ 150 µM mit 50 µM ClpB(K204Q)) (siehe 3.3.2, Tab. 3.2). Dies könnte auf einer direkten Kommunikation zwischen NBD1 und NBD2 beruhen, wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Mant-ADP-Bindung an die NBD1 die Dissoziation des ClpB-Tetramers und somit eine Erhöhung der Dimer-Konzentration zur Folge hat. Die Dimer-Form korreliert im Gegensatz zum Tetramer mit einer hochaffinen NBD2.

Die niedrigaffine Bindungsstelle von $ClpB_{Tth}$, NBD1, bindet Mant-ADP mit ca. 100-fach reduzierter Affinität (K_d = 10-20 µM). Im Bereich von 0.5-4.0 µM ClpB(K601Q) ist die Affinität der NBD1 nicht von der Chaperonkonzentration und somit dem Oligomerisierungszustand abhängig. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass Effekte auf die Affinität der NBD1 erst bei höheren ClpB-Konzentrationen sichtbar werden.

Im Vergleich zu Mant-ADP bindet ADP mit ca. 10-fach niedrigerer Affinität. Eine festere Bindung der Mant-Nukleotide tritt bei mehreren Proteinen auf und ist wahrscheinlich auf eine Wechselwirkung der Mant-Einheit mit hydrophoben Resten in der Nukleotidbindungstasche zurückzuführen (Woodward *et al.*, 1991). Fluoreszenztitrationen mit markiertem

ClpB(T611C)-ΔNBD (siehe 3.1.3.2) belegen, dass auch die Affinität des nicht-fluoreszierenden Nukleotids vom oligomeren Zustand des Chaperons reguliert wird.
Eine Besonderheit von ClpB ist, dass ATP sehr viel schwächer an die NBD2 von ClpB bindet als ADP (K_d(ATP) ~ 30 µM, K_d(ADP) ~ 2 µM in Verdrängungstitrationen, siehe Tab. 3.1). Viele nukleotidbindende Proteine binden ATP ca. 100-fach stärker als ADP, so auch NSF (Matveeva *et al.*, 1997) und andere AAA-Proteine (Klemm *et al.*, 1997). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Bindung von ADP, nicht ATP, mit einer Konformationsänderung verbunden ist, nämlich der Dissoziation des ClpB-Oligomers.
Vergleichbare Untersuchungen der Nukleotidbindungseigenschaften von AAA-Proteinen sind bisher nur mit Hsp104 aus Hefe durchgeführt worden (Hattendorf und Lindquist, 2002a; Hattendorf und Lindquist, 2002b). Hsp104 besitzt wie $ClpB_{Tth}$ eine hochaffine (NBD2) und eine niedrigaffine (NBD1) Bindungsstelle, wobei die Nukleotidbindung an beide Domänen homotypische Kooperativität aufweist. Außerdem besteht eine Kommunikation zwischen beiden Domänen, da Mutationen der NBD2 die ATPase-Aktivität der NBD1 von Hsp104 beeinflussen. Die ermittelten K_d-Werte der hochaffinen NBD2 liegen bei 9.1 µM für ADP und 69 µM für ATP und bestätigen somit die Tendenz, die wir bei $ClpB_{Tth}$ beobachtet haben.

4.1.3 Die Selbstassoziation von $ClpB_{Tth}$

Veröffentlichungen zum Verhalten des ClpB- bzw. Hsp104-Oligomers sind vielfältig und teilweise widersprüchlich. Als vorherrschende und katalytisch aktive oligomere Form von $ClpB_{Eco}$ wurde der Tetramer, der Hexamer oder der ClpB-Heptamer identifiziert (Woo *et al.*, 1992; Zolkiewski *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). In unseren Gelfiltrationsexperimenten wird deutlich, dass $ClpB_{Tth}$ einem dynamischen Oligomerisierungsgleichgewicht unterliegt, welches durch die ClpB-Konzentration, die Salzkonzentration und durch das gebundene Nukleotid gesteuert wird (siehe 3.1.5). Wie bei $ClpB_{Eco}$ und Hsp104 aus Hefe verschiebt eine Erhöhung der Salzkonzentration das Gleichgewicht hin zu niedrigeren Oligomeren (siehe Abb. 3.10) (Schirmer *et al.*, 1998; Zolkiewski *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Hsp104, bei dem die Nukleotidbindung (ADP und ATP) generell eine Stabilisierung höherer Oligomere zur Folge hat (Parsell *et al.*, 1994a), bewirkt ADP im Falle von $ClpB_{Eco}$ (Zolkiewski *et al.*, 1999) wie auch $ClpB_{Tth}$ die Auflösung von hocholigomeren Formen. $ClpB_{Tth}$ liegt bei 25°C und physiologischer Salzkonzentration (~ 100 mM KCl) in Anwesenheit von ADP hauptsächlich als Dimer, in Gegenwart von ATP und in Abwesenheit von Nukleotid dagegen überwiegend als Tetramer vor (siehe 3.1.5, Abb. 3.10). Die Selbstassoziation von $ClpB_{Tth}$ scheint außerdem temperaturabhängig zu sein, denn die dominierende Spezies in Gelfiltrationsexperimenten bei 55°C in der nukleotidfreien und ATP-gebundenen Form ist der Hexamer (Watanabe *et al.*, 2002). Auch bei 55°C bewirkt die ADP-Bindung die Dissoziation von ClpB-Oligomeren.

Als gesichert gilt, dass für die Selbstassoziation von ClpB ein intakter C-Terminus (Aminosäuren 769-857 in $ClpB_{Eco}$) notwendig ist (Barnett *et al.*, 2000). Die Bedeutung der Nukleotidbindungsdomänen ist dagegen nicht eindeutig. Bei $ClpB_{Eco}$ verhindern Mutationen von konservierten Aminosäuren der NBD1 die Selbstassoziation (Kim *et al.*, 2000; Mogk *et al.*, 2003). Trotz der hohen Sequenzkonservierung der NBDs vermindern im Gegensatz dazu bei Hsp104 und mitochondrialem ClpB (Hsp78) aus Hefe Mutationen der NBD2 die Fähigkeit zur Selbstassoziation (Schirmer *et al.*, 1998; Krzewska *et al.*, 2001a). Die Gelfiltrationsexperimente mit $ClpB_{Tth}$ zeigen (siehe 3.1.5, Abb. 3.11), dass die Oligomerbildung von keiner der beiden NBD-Mutanten beeinträchtigt wird. Eine Inaktivierung der NBD1 beeinträchtigt jedoch die Auflösung des Oligomers bei ADP-Bindung.
Zusammenfassend ist zu sagen, dass bei $ClpB_{Tth}$ keine NBD existiert, die nur für die Oligomerbildung zuständig ist und ausschließlich strukturgebende Funktion hat. Die Oligomerbildung scheint vielmehr eine intrinsische Eigenschaft des Moleküls zu sein, die nicht auf ATP-Bindung angewiesen ist. Da ATP von beiden Domänen mit sehr niedriger Affinität gebunden wird (K_d(NBD1) für ATP > 80 µM, K_d(NBD2) für ATP ~ 30 µM), ist es unwahrscheinlich, dass ATP eine Klammerfunktion zwischen zwei Untereinheiten ausüben kann. Relevant für den Mechanismus von ClpB ist die Dissoziation des Oligomers nach ADP-Bindung, und diese hängt eindeutig von der NBD1 ab.

Die besondere Rolle der NBD1 bei der Oligomerisierung macht auch die Kristallstruktur des mit ClpB nahe verwandten Chaperons $ClpA_{Eco}$ deutlich (Guo *et al.*, 2002). Von $ClpB_{Eco}$ ist derzeit nur die Struktur der nukleotidfreien monomeren NBD1 und die Struktur der N-Domäne bekannt (Li und Sha, 2002; Li und Sha, 2003). In der Kristallstruktur von $ClpA_{Eco}$ liegt die Nukleotidbindungstasche der NBD1 zwischen zwei benachbarten Untereinheiten und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren beider Untereinheiten tragen direkt zur Stabilisierung der Nukleotidbindungstasche bei (siehe Abb. 4.1A). Diese intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen erklären auch die oligomer-auflösende Wirkung hoher Salzkonzentrationen. Die am NBD1-NBD1-Kontakt beteiligten Aminosäuren sind zwischen $ClpA_{Eco}$ und $ClpB_{Eco}$ konserviert. Die NBD2 von $ClpA_{Eco}$ wird dagegen fast ausschließlich von Aminosäuren einer Untereinheit gebildet (siehe Abb. 4.1B).

A B

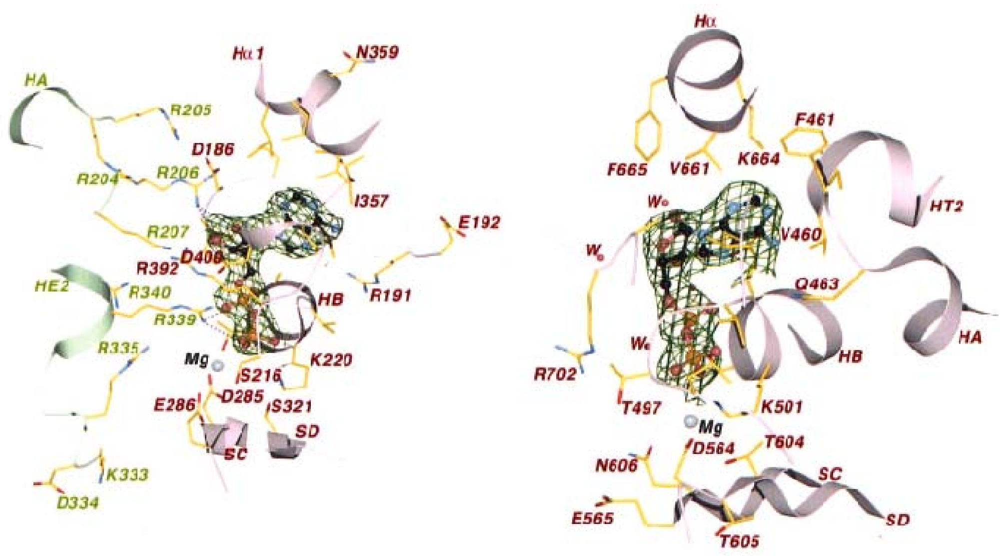


Abb. 4.1: Berührungsflächen der Untereinheiten und Proteinumgebung der Nukleotidbindungstaschen 1 und 2 von $ClpA_{Eco}$ (aus (Guo *et al.*, 2002)).
Das ADP-Molekül ist als Ball-und-Stab-Modell mit umgebender Elektronendichte dargestellt. Aminosäurereste die mit ADP interagieren sind als Stab-Modell abgebildet. Sekundärstrukturelemente der nukleotidbindenden Untereinheit sind purpur, die der benachbarten Untereinheit grün gefärbt und Aminosäurereste entsprechend gekennzeichnet. (A) ADP-Bindungstasche der NBD1: Acht positiv-geladene Reste der benachbarten NBD1 interagieren mit ADP oder der direkten Umgebung. (B) ADP-Bindungstasche der NBD2: Aminosäuren der benachbarten NBD tragen nicht zur ADP-Bindung bei.

4.1.4 Kooperative Kinetik der beiden ATPase-Domänen

Der Reaktionsmechanismus von ATPasen beruht oft darauf, dass ATP und ADP verschiedene Konformationen des Proteins mit unterschiedlichen Affinitäten für Substratproteine oder Kofaktoren stabilisieren. Der Hydrolyse-Zyklus des Nukleotids ist der Zeitgeber für das Umschalten zwischen diesen Konformationen.

Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse von $ClpB_{Tth}$ zeigt eine ausgeprägte sigmoidale Abhängigkeit von der ATP-Konzentration (Km = 0.34 mM, $k_{cat} = 0.044\ s^{-1}$, n = 3.1) (siehe 3.2.1, Abb. 3.12A). Dies ist gleichbedeutend mit positiver Kooperativität bei der ATP-Hydrolyse, d.h. die Bindung eines ATP-Moleküls fördert die Bindung eines anderen ATP-Moleküls durch Erhöhung der Affinität einer benachbarten Bindungsstelle. Da ClpB zwei Bindungsstellen pro Monomer besitzt und außerdem Oligomere ausbildet, könnte homotypische (zwischen identischen Stellen auf verschiedenen Untereinheiten) oder heterotypische (zwischen NBD1 und NBD2) Kooperativität auftreten (Abb. 4.2).

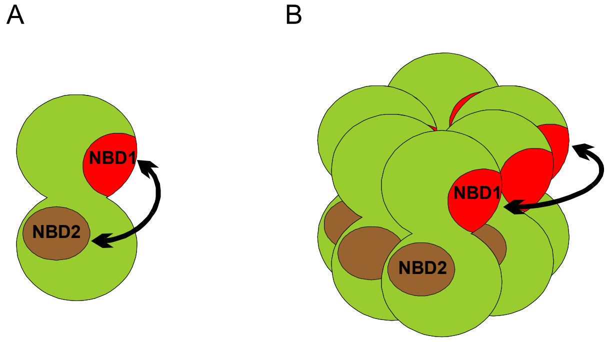


Abb. 4.2: Kooperativität von Nukleotidbindungsdomänen im ClpB-Molekül.
ClpB besitzt zwei NBDs pro Untereinheit und bildet Oligomere aus. Die bei der ATP-Hydrolyse beobachtete Kooperativität könnte auf intramolekularen heterotypischen Wechselwirkungen zwischen NBD1 und NBD2 einer Untereinheit (A) oder intermolekularer homotypischer Kommunikation identischer NBDs innerhalb des Rings (B) beruhen. Das Verhalten von ClpB(wt) und NBD-Mutanten deutet auf komplexe homo- und heterotypische Kooperativität hin (C).

Wie *Single-Turnover*-Experimente mit ClpB-NBD-Mutanten belegen (siehe 3.1.4), sind beide NBDs prinzipiell in der Lage ATP zu hydrolysieren. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Kooperativität ausschließlich auf Wechselwirkungen zwischen NBD1 und NBD2 auf einer Untereinheit beruht, da die ATPase-Aktivität von ClpB(wt) durch Mischen mit inaktiven Untereinheiten inhibiert wird (siehe 3.2.2). Dies bedeutet, dass die Bildung gemischter Oligomere kooperative Wechselwirkungen unterbindet. Deshalb ist von einer Kommunikation der Domänen innerhalb des Oligomers auszugehen. Obwohl die beiden NBD-Mutanten ClpB(K204Q) und ClpB(K601Q) genauso wie ClpB(wt) oligomerisieren, folgen beide der einfachen Michaelis-Menten-Kinetik (siehe 3.2.1, Abb. 3.12B). Demnach kann die beobachtete Kooperativität auch nicht ausschließlich auf homotypische Kooperativität der isolierten NBD1 oder NBD2 im ClpB-Ring zurückzuführen sein. Das Verhalten von ClpB(wt) und ClpB-Mutanten weist vielmehr auf eine komplexe gegenseitige Beeinflussung von NBD1 und NBD2 mit Kooperativität innerhalb des Rings hin. Eine Interaktion zwischen NBD1 und NBD2 wurde auch schon in den Nukleotidbindungsstudien deutlich (siehe 4.1.2). Eine Möglichkeit für die Einbeziehung beider NBDs ist, dass die hochaffine Bindungsstelle (NBD2 bei $ClpB_{Tth}$) besetzt sein muß, damit eine kooperative ATP-Hydrolyse an der NBD1 ablaufen kann oder umgekehrt.
Eine genaue Quantifizierung der katalytischen Aktivität der beiden NBDs wurde auch mit Hsp104 aus Hefe durchgeführt (Hattendorf und Lindquist, 2002a; Hattendorf und Lindquist, 2002b). Die Analyse der ATP-Hydrolyse zeigt, dass sich ein AAA-Modul (NBD1) durch eine niedrige Nukleotidaffinität aber hohe Umsatzrate (Km = 170 µM, k_{cat} = 1.3 s^{-1}), die andere Bindungsdomäne (NBD2) durch eine viel höhere Affinität, aber 300-fach langsamere

Umsatzrate (Km = 5 µM, k_{cat} = 0.005 s^{-1}) auszeichnet. Die ATP-Hydrolyse an beiden NBDs weist positive Kooperativität auf, und es besteht zusätzlich eine Kommunikation zwischen NBD1 und NBD2.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass das am besten untersuchte Chaperon GroEL auch ein ringförmiger Oligomer mit multiplen ATP-Bindungsstellen ist. GroEL und ClpB sind sich in mancher Hinsicht ähnlich (Abb. 4.3). So wurde für GroEL positive Kooperativität der ATP-Hydrolyse innerhalb des cis-Rings und Kommunikation zwischen beiden Ringen nachgewiesen (Yifrach und Horovitz, 1995; Horovitz *et al.*, 2001). Im Detail unterscheiden sich beide Proteine deutlich. Die beiden Ringe des GroEL sind aus identischen Untereinheiten zusammengesetzt, die Eigenschaften der Nukleotidbindungsmodule werden jedoch durch das Chaperonin GroES moduliert. Die beiden AAA-Module von ClpB teilen dagegen nur geringe Sequenzhomologie und besitzen sehr verschiedene kinetische Eigenschaften. Es stellt sich die Frage, ob beide Proteine grundsätzlich verschiedene Mechanismen anwenden oder die Unterschiede Variationen eines gemeinsamen Themas sind.

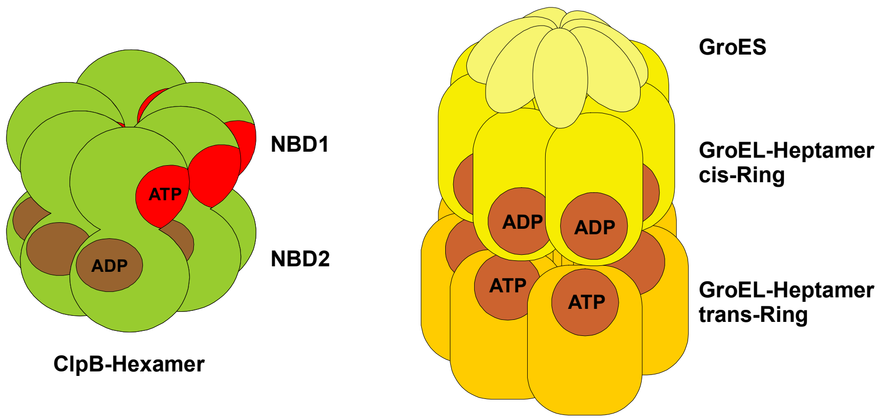


Abb. 4.3: Vergleich der Architektur und Domänenorganisation von ClpB und GroEL.
ClpB besitzt eine Doppelringstruktur, wobei die beiden Nukleotidbindungsdomänen strukturelle Einheiten bilden. Die beiden Domänen liegen auf einem Monomer, unterscheiden sich jedoch deutlich in der Sequenz und den Nukleotidbindungseigenschaften (gekennzeichnet durch unterschiedliche Färbung der NBDs). Das GroEL-Molekül besteht aus zwei heptameren Ringen, die mit ihren äquatorialen Nukleotidbindungsdomänen Seite an Seite angeordnet sind. Die Bindung des Chaperonins GroES reguliert Substrat- und Nukleotidbindungseigenschaften der GroEL-Ringe (Sigler *et al.*, 1998).

4.2 Kinetik der Oligomerisierung und Nukleotidbindung und ihre Relevanz für die Chaperonaktivität

4.2.1 Die Nukleotidbindungskapazität der ClpB-Oligomere unterscheidet sich

Die genaue Untersuchung des kinetischen Mechanismus des ATPase-Zyklus von ClpB sollte Aufschluß darüber geben, wie die ATP-Hydrolyse mit Konformationsänderungen von ClpB und letztlich der Chaperonaktivität, der Reorganisation von Proteinaggregaten gekoppelt wird.

Als fluoreszierende Reportergruppe in *Stopped-Flow*-Experimenten wurde das Mant-Nukleotid (Mant: N-Methylanthraniloyl) eingesetzt. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen der Mant-Einheit mit Resten der Nukleotidbindungstasche wird Mant-ADP ca. 10-fach fester gebunden als ADP (Woodward *et al.*, 1991). Entgegen der Erfahrung mit anderen Proteinen ist Mant-ATP in Bezug auf ClpB jedoch kein ATP-Analogon. Mant-ATP wird von ClpB in *Steady-state* Assays 100-fach langsamer hydrolysiert und bewirkt wie ADP eine Auflösung des Oligomers, während ATP die hoch-oligomere Form stabilisiert. Die Bestimmung von Mechanismus und Ratenkonstanten der Nukleotidbindung wurde deshalb nur mit Mant-ADP durchgeführt.

Der ClpB-Tetramer besitzt acht Nukleotidbindungsstellen, die sich gegenseitig stark beeinflussen. Es kann deshalb nicht verwundern, dass *Stopped-Flow*-Experimente mit Mant-ADP und ClpB(wt) eine komplexe Nukleotidbindungsreaktion mit mindestens drei Reaktionsschritten andeuten. Um die Nukleotidbindungskinetik zu vereinfachen wurde zunächst das ClpB-Konstrukt ClpB(trunc) untersucht, welches nur die NBD2 umfaßt und keine nukleotidabhängige Oligomerisierung zeigt. Erstaunlicherweise unterscheidet sich jedoch die Nukleotidbindungskinetik von ClpB(trunc) in der Komplexität kaum von ClpB(wt).

Bei der Interpretation der Bindungskinetik ist hilfreich, dass in *Stopped-Flow*-Experimenten bei sämtlichen Konzentrationsverhältnissen zwei beobachtete Ratenkonstanten (λ_1, λ_2) linear von der Eduktkonzentration (Mant-ADP oder ClpB, siehe Abb. 3.24 bzw. 3.47) abhängig sind. Dieses Verhalten der Ratenkonstanten wird bei bimolekularen Assoziationsschritten beobachtet (z.B. Bindung von Nukleotid an Protein). Außerdem deuten auch die *Stopped-Flow*-Transienten der Verdrängung von Mant-ADP aus dem Mant-ADP-ClpB-Komplex durch ADP auf die Existenz von verschiedenen Nukleotid-Protein-Komplexen hin (Abb. 3.31). Da Messungen mit Mant-2´d-ADP nicht zu einer Vereinfachung der Kinetik führen (Abb. 3.28) und der Amplitudenverlauf der Transienten gut mit einem Oligomergleichgewicht angenähert werden kann (siehe 3.3.4), schlossen wir daraus, dass es zwei ClpB-Oligomere gibt, die Mant-ADP auf unterschiedliche Weise binden. Der

Unterschied zwischen ClpB(trunc) und ClpB(wt) liegt darin, dass sich im Falle von ClpB(wt) neben der unterschiedlichen Umgebung des Fluorophors auch die Nukleotidbindungsaffinitäten der beiden Oligomere deutlich (~ Faktor 10) unterscheiden, während die Nukleotidbindungsaffinitäten im Falle von ClpB(trunc) identisch sind. Der niedrige Oligomer von ClpB(wt) wird durch die Bindung von Mant-ADP stabilisiert.

Mehrere Fakten sprechen dafür, dass der ClpB-Dimer eine funktionelle Einheit und die niedrig-oligomere Form von ClpB darstellt:

1) Der Dimer ist neben dem Tetramer die am häufigsten vorkommende ClpB-Form in Gelfiltrationsexperimenten bei 25°C, vor allem bei physiologischer Salzkonzentration (siehe Abb. 3.10)
2) *Active-site*-Titrationen von Mant-ADP mit ClpB(wt) als auch ClpB(trunc) haben eine Stöchiometrie ClpB:Mant-ADP von 2:1 zum Ergebnis (siehe Abb. 3.19).
3) Inhibierung der ClpB-ATPase-Aktivität durch ClpB-NBD-Mutanten ist vollständig, wenn eine Untereinheit pro Dimer ausgetauscht wird (siehe Abb. 3.14). Dies ist unabhängig davon, ob man von einem Tetramer oder Hexamer als aktive Oligomerform ausgeht.

In der globalen Analyse wurde der Tetramer als die hocholigomere Form angenommen, da dieser auch in Gelfiltrationsexperimenten bei 0.1 M KCl in Abwesenheit von Nukleotid vorliegt (siehe Abb. 3.10). Der $ClpB_{Tth}$-Hexamer wird bei hoher Temperatur oder extrem niedrigen Salzkonzentrationen beobachtet. Wir können nicht vollständig ausschließen, dass die hoch-oligomere nukleotidbindende Form ein Hexamer ist, die Form, die charakteristisch für viele AAA-Proteine ist.

4.2.2 Die Oligomerisierung von ClpB ist extrem dynamisch

Das Schema in Abb. 3.34 ist das einfachste Modell, welches die Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) beschreibt, mit den kinetischen Daten vereinbar ist und die Vorgaben der Thermodynamik einhält. Es beinhaltet zwei bimolekulare Assoziationsschritte (Assoziation von Nukleotid und ClpB) und die ClpB-Oligomerisierungsgleichgewichte in Gegenwart und Abwesenheit von Mant-ADP.

Bimolekulare Assoziationsratenkonstanten für die Nukleotidbindung liegen typischerweise zwischen 10-100 $\mu M^{-1}s^{-1}$ (Moore und Lohman, 1994). Die mit ClpB(trunc) ermittelten Werte von 3.9 $\mu M^{-1}s^{-1}$ und 2.2 $\mu M^{-1}s^{-1}$ (siehe Tab. 3.3) sind eher niedrig und weisen darauf hin, dass es sich nicht um eine rein diffusions-kontrollierte Bindung handelt. Berücksichtigt man die Komplexität des ClpB-Systems, so sind die Assoziations- und Dissoziationsraten des ClpB-Oligomers erstaunlich schnell. So liegen die Dissoziationsratenkonstanten von ClpB(trunc)

bei $2.5 \cdot 10^{-1}$ s^{-1} in Abwesenheit von Nukleotid und $2.8 \cdot 10^{-2}$ s^{-1} in Gegenwart von ADP (siehe Tab. 3.3). Der k_{cat} der ATP-Hydrolyse von $4.4 \cdot 10^{-2}$ s^{-1} liegt in der gleichen Größenordnung (vgl. Abb. 3.12). Die Nukleotidbindung und -dissozation ist demnach schneller als die ATP-Hydrolyse, die Geschwindigkeit der Oligomerisierung mit der ATP-Hydrolyserate vergleichbar. Eine direkte Kopplung der ATP-Hydrolyse mit Änderungen des oligomeren Zustands von ClpB(trunc) ist so nur schwer vorstellbar. Möglicherweise wird die Dynamik der ClpB-Oligomerisierung durch Wechselwirkung mit weiteren Reaktionspartnern verlangsamt, Kandidaten hierfür sind aggregierte Substratproteine (siehe 3.5.1) oder andere Chaperonkomponenten wie DnaK (siehe 3.6.3 und 4.3.6).
Über die Geschwindigkeit der Oligomerisierung oder Nukleotidbindung von anderen AAA-Proteinen ist wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der ClpA-Komplex über mehrere Runden der ATP-Hydrolyse als stabiler Komplex bestehen bleibt (ATP-Hydrolyse: k_{cat} ~ 2.3 s^{-1}, Dissoziation ClpA-Hexamer: $k_{off} = 5.3 \cdot 10^{-4}$ s^{-1} (Singh *et al.*, 1999)). Im Vergleich dazu ist der ClpB-Oligomer wesentlich instabiler, jede ATP-Hydrolyse geht mit der Dissoziation des ClpB-Oligomers einher.

Die kinetischen Daten für die Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt) lassen sich mit dem erweiterten Schema in Abb. 3.49 gut beschreiben. Einige Beobachtungen wurden in der globalen Analyse auch bestätigt. So bindet der ClpB-Dimer Mant-ADP mit ca. 10-fach höherer Affinität als der Tetramer ($K_d2 = 0.04$ µM, $K_d3 = 0.004$ µM, siehe Tab. 3.4) und die NBD1 ist eine niedrigaffine Bindungsstelle ($K_d5 = 5.2$ µM). Multipliziert man die K_d-Werte im Zyklus, so zeigt sich jedoch, dass die Gesetze der Thermodynamik ($K_d1 \cdot K_d2 = K_d3 \cdot K_d4$) nicht eingehalten werden. Außerdem liegt das Oligomergleichgewicht in Abwesenheit von Nukleotid stark auf der Seite des Dimers ($K_d1 = 16$ µM), in Anwesenheit von Mant-ADP aber auf der Seite des Tetramers ($K_d4 = 0.02$ µM), also genau anders als es die Gelfiltrationsexperimente vorhersagen. Für eine vollständige Definition des Nukleotid-bindungsmechanismus von ClpB(wt) sind also offensichtlich zusätzliche Informationen über Ratenkonstanten und vorliegende Spezies notwendig.

4.3 Die Auflösung von Aggregaten durch das ClpB-DnaK-System

4.3.1 Allgemeine Modelle zur Kooperation von ClpB und DnaK

In der Zelle kontrolliert ein Netzwerk molekularer Chaperone die Faltung von naszierenden und translokalisierten Polypeptiden, die Stabilität von nativen Proteinen und die Rückfaltung von denaturierten Proteinen unter Stressbedingungen (Ellis, 1999). Probleme treten auf, wenn unter Stressbedingungen die Kapazität der Chaperone, die entfaltete Proteine vor unproduktiven Wechselwirkungen schützen, überschritten wird. Entfaltete Proteine in konzentrierter Lösung tendieren dazu, alternative stabile Konformationen in Form von unlöslichen Aggregaten einzunehmen. Kennzeichnend für Aggregate ist die Anreicherung von β-Faltblattstrukturen sowie das gehäufte Auftreten von hydrophoben Oberflächen (Kelly, 1998; Dobson, 1999). Die intermolekularen Wechselwirkungen sind vielfältig und stark, so dass große Energiebarrieren bei der Trennung der einzelnen Moleküle überwunden werden müssen. Der Aggregationsvorgang und die damit verbundene Inaktivierung von Proteinen ist deshalb in Abwesenheit von Chaperonen irreversibel.

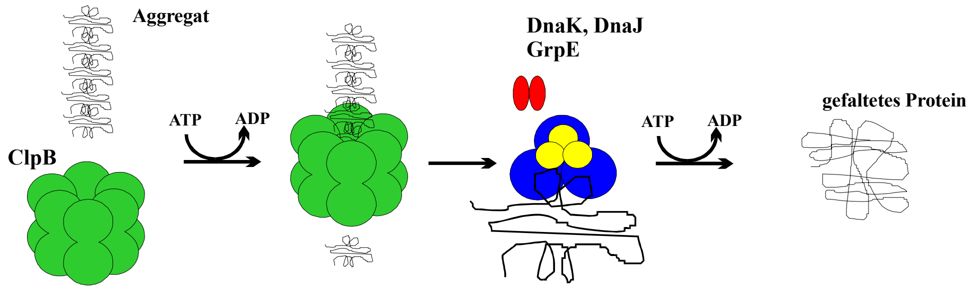
Das DnaK-System kann jedoch in großem molaren Überschuß kleinere aggregierte Proteinpartikel auflösen und reaktivieren (Diamant *et al.*, 2000). Die Effizienz der Disaggregation sowie die Größe der Aggregate, die für eine Reaktivierung zugänglich sind, wird durch katalytische Mengen ClpB enorm erhöht (Parsell *et al.*, 1994b; Zolkiewski, 1999; Diamant *et al.*, 2000). Es scheint, als ob ClpB die Fähigkeit von DnaK verbessert, produktive Interaktionen mit Aggregaten einzugehen, die hauptsächliche Reaktivierungsarbeit liegt jedoch auch in ClpB-abhängigen Reaktionen beim DnaK und seinen Kochaperonen DnaJ und GrpE.

Grundsätzlich sind für das Zusammenwirken der beiden Chaperonsysteme bei der Auflösung von Aggregaten zwei Mechanismen denkbar (siehe Abb. 4.4):

1) Ein sequentieller Mechanismus, bei dem zuerst ClpB, dann DnaK zeitlich getrennt auf das Substrat einwirken. Das Produkt der ersten Reaktion, wahrscheinlich ein kurzlebiges Intermediat, wäre dann das Substrat für die nachfolgende Reaktion.
2) Ein konzertierter Mechanismus, bei dem ClpB und DnaK gleichzeitig auf das Substrat einwirken. Dabei könnten beide Chaperone direkt mit dem Substrat interagieren oder ClpB die Eigenschaften des DnaK-Systems durch Bildung eines Chaperonkomplexes so modifizieren, dass aggregierte Proteine gute Substrate darstellen.

In unseren Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob ClpB direkte und produktive Wechselwirkungen mit Substratproteinen eingeht und Intermediate für das DnaK-System produziert. Eventuell vorhandene Chaperonkomplexe sollten identifiziert und eine wechselseitige Beeinflussung der Substrat- oder Nukleotidbindungseigenschaften im Komplex quantifiziert werden.

Schema: sequentieller Mechanismus



Schema: konzertierter Mechanismus

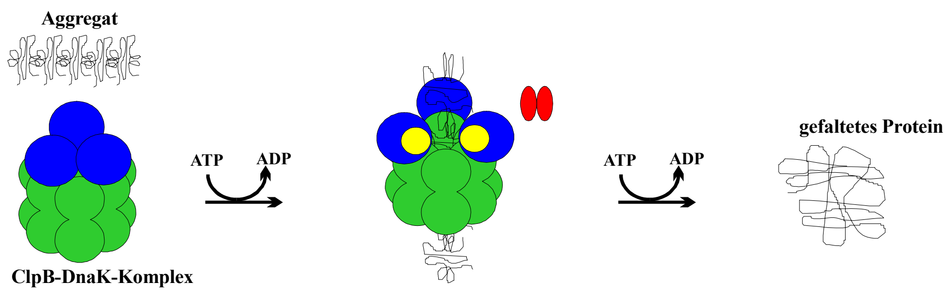


Abb. 4.4: Modelle für das Zusammenwirken von ClpB und DnaK bei der Auflösung von Proteinaggregaten: Sequentieller und konzertierter Mechanismus.
In einem sequentiellen Mechanismus wirken die Chaperonsysteme zeitlich (und räumlich) getrennt auf das Substrat ein. Ein konzertierter Mechanismus beinhaltet die Bildung eines Chaperonkomplexes und die gleichzeitige Aktion der Chaperone. Der ClpB-Hexamer ist grün, DnaK blau, DnaJ gelb und GrpE rot dargestellt.

4.3.2 Die Interaktion von ClpB mit Proteinaggregaten ist direkt, aber kurzlebig

Das Arbeiten mit Proteinaggregaten wird dadurch erschwert, dass diese kaum definierbar (Gemisch aus Partikeln unterschiedlicher Größe und Form) oder manipulierbar sind. So ist die Größe der Aggregate und die damit verbundene Effizienz der Reaktivierung durch das DnaK-System oder das ClpB-DnaK-System stark von der Wahl der Denaturierungsmethode (chemische Denaturierung durch GdnHCl oder Harnstoff, Denaturierung durch Hitze) abhängig (Groemping, 2000). Bei Hitzedenaturierung ist außerdem Inkubationszeit und -temperatur, sowie Konzentration der Substratproteine für die Ausbeute der Rückfaltung entscheidend. Die Substratspezifität des ClpB-DnaK-Systems ist breit und ist nicht auf Proteine bestimmter Größe oder Strukturmerkmale limitiert. So solubilisiert das ClpB-DnaK-System in substöchiometrischer Konzentration mindestens 75% der nach thermischer Denaturierung aggregierten *E.coli*-Proteine in Zellextrakten (Mogk *et al.*, 1999). Während DnaK an ausgedehnte hydrophobe Bereiche mit 4-5 aufeinanderfolgenden Aminosäureresten, angereichert mit großen hydrophoben und aromatischen Aminosäuren und flankiert von basischen Resten, bindet (Rüdiger *et al.*, 1997), ist über die Substratbindung von ClpB wenig bekannt. Versuche mit löslichen Modellpeptiden legen nahe, dass Lysin-reiche Regionen verbunden mit einer unstrukturierten Konformation ein Erkennungsmerkmal für ClpB sein könnte (Cashikar *et al.*, 2002).

Rückfaltungsassays mit den bekannten Substratproteinen des ClpB-DnaK-Systems Luziferase (Zolkiewski, 1999) (siehe 2.5.5.1) oder α-Glucosidase$_{Bst}$ (Motohashi *et al.*, 1999) (siehe 2.5.1.3) wurden unter folgenden Gesichtspunkten optimiert: In Abwesenheit von Chaperonen sollte nach der Denaturierung keine spontane Reaktivierung der Substratproteine auftreten und der Unterschied zwischen der Reaktivierungseffizienz mit dem DnaK-System alleine und dem ClpB-DnaK-System sollte möglichst groß sein.

Wie Experimente mit hitzedenaturierter LDH$_{Bst}$ zeigen (Abb. 3.53), verändert eine Einwirkung von ClpB auch in Anwesenheit von ATP die Partikelgröße der Aggregate nicht. Die Inkubation von hitzedenaturierter Luziferase mit ClpB und ATP bewirkt eine Reaktivierung (siehe Abb. 3.56). Allerdings ist der Effekt so gering (0.4% Reaktivierung nach 100 min), dass er auf eine durch Bindung von ClpB ausgelöste Gleichgewichtsverschiebung zwischen löslichen und aggregierten Proteinformen beruhen könnte. Bei Verwendung des hitzedenaturierten Substratprotein α-Glucosidase hat ClpB alleine keinerlei Reaktivierungsaktivität (siehe 3.5.4, Abb. 3.60).

Eine längere Vorinkubation von hitzedenaturierter Luziferase mit ClpB vermindert die Ausbeute bei einer nachfolgenden Reaktivierungsreaktion mit dem ClpB-DnaK-System. ClpB interagiert demnach direkt mit dem Substrat, ist jedoch nicht in der Lage Substratproteine dauerhaft zu stabilisieren und in einer für das DnaK-System zugänglichen Form zu halten. Interaktionen von ClpB mit Aggregaten scheinen eher transienter Natur zu sein. Dafür spricht auch, dass es nicht möglich ist, ClpB-Substratkomplexe in Anisotropie- oder Fluoreszenzmessungen zu identifizieren, weder mit ClpB-Mutanten noch mit nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanaloga.

Ist ClpB zusammen mit dem DnaK-System schon während der Hitzedenaturierung der Luziferase anwesend, so vermindert es die schützende Wirkung des DnaK-Systems (siehe 3.5.3.4, Abb. 3.59). Eine Erklärung dafür ist, dass ClpB und DnaK um die Bindung an Luziferase konkurrieren, die Bindung an ClpB während der Denaturierung aber unproduktiv ist, oder ClpB an DnaK bindet und dadurch die Substratbindungsstelle blockiert.

Eine Stimulation der ATPase-Aktivität durch Substratproteine, die auf eine Bindung von Substratproteinen und Stabilisierung des Oligomers hinweisen würde, wird nicht beobachtet (siehe 3.5.1, Abb. 3.52).

Zusammengefaßt belegen die Experimente, dass ClpB direkt mit aggregierten Substratproteinen interagieren kann, die Wechselwirkung jedoch transient und in Abwesenheit von DnaK nicht produktiv ist.

Weitere Beobachtungen stützen diese Aussage. Obwohl Hsp104 die Konformation der Prionproteine Sup35 aus Hefe und PrP aus Säugetieren *in vitro* beeinflußt (Schirmer und Lindquist, 1997; DebBurman *et al.*, 1997), konnten stabile Ko-komplexe nicht isoliert werden. *In vivo* reichert sich Hsp104 in der unmittelbaren Umgebung von hitzedenaturierten Aggregaten an (Fujita *et al.*, 1998). Aggregate, die aus mit Hitzeschock behandelten Zellen isoliert werden, enthalten jedoch kein Hsp104 (Cashikar *et al.*, 2002).

4.3.3 Die Reaktivierung durch ClpB und DnaK kann nicht in diskrete Reaktionsschritte unterteilt werden

In einer sequentiellen Reaktion sollten durch die Aktion von ClpB generierte Intermediate in einer nachfolgenden Reaktion mit dem DnaK-System interagieren. Um solche Intermediate zu identifizieren, wurde die Auswirkung einer Vorinkubation mit ClpB auf die Kinetik der Reaktivierung von hitzedenaturierter Luziferase (siehe 3.5.3.3, Abb. 3.58) oder α-Glucosidase (siehe 3.5.4, Abb. 3.60) durch das DnaK-System untersucht. Die Vorinkubation sollte zu einem "Burst" der Reaktivierungsaktivität nach Zugabe des DnaK-Systems führen, wenn ClpB Intermediate erzeugt, die für das DnaK-System schneller zugänglich oder leichter aufzulösen sind. Wir beobachten keine Beschleunigung der Reaktivierung oder eine Erhöhung der Effizienz, im Gegenteil, die Reaktivierung wird im Falle von α-Glucosidase durch die Vorbehandlung mit ClpB sogar gehemmt. Die Experimente zeigen, dass die Aktion von DnaK und ClpB nicht in diskrete Schritte unterteilt werden kann. Es gibt keinen Hinweis auf von ClpB generierte langlebige Intermediate in einem sequentiellen Mechanismus.

Dennoch könnte eine sequentielle Reaktion nach folgendem Schema ablaufen: Disaggregation (von ClpB vermittelt), Verhinderung der Re-aggregation (durch die Pufferkapazität von DnaK), Rückfaltung des Substrats und schließlich Rückgewinnung der enzymatischen Aktivität (durch das DnaK-System). Wenn der letzte Schritt dieser Reaktionsfolge der ratenlimitierende ist, ist es unmöglich etwas über Geschwindigkeit oder Abfolge der vorausgehenden Schritte auszusagen, solange die Rückgewinnung der enzymatischen Aktivität des Substrats die einzige Meßgröße ist. Eine allgemeine Vermutung ist, dass ClpB neue Angriffsstellen für das DnaK-System schafft (Goloubinoff *et al.*, 1999; Ben Zvi und Goloubinoff, 2001). Von ClpB vorbereitete Intermediate würden jedoch bei der hohen lokalen Proteinkonzentration in der Zelle re-aggregieren sobald sie freigesetzt werden. Da die Interaktion von ClpB mit Substraten sehr kurzlebig ist, müssten Intermediate von

ClpB direkt an das DnaK-System weitergeleitet werden. Dies kann nur erreicht werden, wenn ein bereits vorgeformter ClpB-DnaK-Komplex an das Aggregat bindet, oder gebundenes ClpB DnaK rekrutiert.

4.3.4 ClpB und DnaK bilden einen spezifischen Komplex

Erste experimentelle Hinweise, dass die Bildung eines spezifischen Komplexes zwischen ClpB und DnaK für die Reaktivierung von Proteinaggregaten notwendig ist, stammten von Komplementationsstudien mit heterologen Chaperonsystemen aus *E. coli* und *T. thermophilus* (siehe 3.6.1, Abb. 3.62). Thermophiles ClpB kann die Reaktivierung nur vermitteln, wenn auch thermophiles DnaK anwesend ist, nicht aber in Gegenwart von $DnaK_{Eco}$. Da $DnaK_{Eco}$ eine Sequenzidentität von 56% zu thermophilem DnaK aufweist, aber nicht mit $ClpB_{Tth}$ kooperieren kann, ist die Bildung eines spezifischen ClpB-DnaK-Komplexes naheliegend. Ein Einwand ist, dass strukturelle Unterschiede ($DnaK_{Eco}$ liegt als Monomer, $DnaK_{Tth}$ als Trimer vor) die Spezifität begründen könnten. Die Notwendigkeit eines homologen ClpB-DnaK-Paares wurde jedoch auch für andere Chaperonsysteme nachgewiesen, die diese strukturellen Unterschiede nicht aufweisen. So wird berichtet, dass $DnaK_{Eco}$ nicht mit mitochondrialem Hsp78 aus Hefe wechselwirkt (Krzewska *et al.*, 2001b), Hsp104 aus Hefe benötigt für eine effiziente Reaktivierungsreaktion eukaryotisches, nicht bakterielles Hsp70 (Glover und Lindquist, 1998).

Die Existenz eines spezifischen ClpB-DnaK-Komplexes wurde in dieser Arbeit durch Ko-Elutionsexperimente belegt. An ATP-Agarose gekoppeltes $DnaK_{Tth}$ eluiert zusammen mit $ClpB_{Tth}$ (siehe 3.6.2.1, Abb. 3.63); auch DnaK, welches über eine His-Sequenz an Ni-NTA gekoppelt wurde, kann zusammen mit ClpB eluiert werden (siehe 3.6.3.2).

Die Spezifität der Wechselwirkung von $DnaK_{Tth}$ mit $ClpB_{Tth}$ wird dadurch bewiesen, dass $ClpB_{Tth}$ zusammen mit $DnaK_{Tth}$ aber nicht mit $DnaK_{Eco}$ von der ATP-Agarose eluiert wird.

Die Kinetik der Substratbindung von DnaK ist von dem gebundenen Nukleotid abhängig. Es könnte sein, dass eine Komplexbildung nur in Gegenwart von ATP beobachtet wird, weil ATP die DnaK-Konformation mit niedriger Substrataffinität, aber hohen Austauschraten stabilisiert. Die Substratbindung und -freisetzung in der ADP-Konformation ist dagegen vergleichsweise langsam (Farr *et al.*, 1995; McCarty *et al.*, 1995; Klostermeier *et al.*, 1999). Um dies auszuschließen, wurden ClpB und DnaK für 90 min zusammen mit der Ni-NTA-Matrix inkubiert. Dieser Zeitraum ist lange genug für eine Substratbindung an DnaK im ADP-gebundenen Zustand. Trotzdem wird ClpB in Gegenwart von ADP nicht mit DnaK ko-eluiert (siehe Abb. 3.65), womit ausgeschlossen wird, dass DnaK ClpB als Pseudosubstrat bindet. Außerdem hat die Gegenwart von ClpB keinerlei Auswirkungen auf die Kinetik oder Affinität der Bindung des Modellpeptides p-p53-NBD. (p-p53-NBD ist ein Modellpeptid für

die Untersuchung des Substratbindungszyklus von $DnaK_{Tth}$ (Klostermeier *et al.*, 1999)). ClpB konkurriert also nicht mit anderen DnaK-Substraten um die Substratbindungstasche.
Wir können nicht vollständig ausschließen, dass ClpB DnaK als Pseudosubstrat bindet. Dies ist aber unwahrscheinlich, da $DnaK_{Eco}$ trotz der großen Homologie mit $DnaK_{Tth}$ die Substratbindungstasche von ClpB nicht besetzt. Wir gehen deshalb davon aus, dass die Interaktion von ClpB mit DnaK auch physiologisch relevant ist und eine spezifische Komplexbildung von ClpB mit DnaK für die Auflösung von Aggregaten notwendig ist.

4.3.5 ClpB-Oligomerisierung ist für die Komplexbildung notwendig

Um einzugrenzen, wo die Kontaktfläche des ClpB-Moleküls für die Bindung an DnaK liegt, wurden verschiedene ClpB-Deletionsmutanten auf ihre Ko-Elution mit DnaK untersucht (siehe 3.6.2, Abb. 3.63 und 3.65). Deletionen am C-Terminus (ClpB(ΔC), ClpB(Cshort), siehe Abb. 3.64) beeinträchtigen die Komplexbildung mit ClpB. Sollte sich die Kontaktfläche mit DnaK also am C-Terminus von ClpB befinden? Die Position wäre sinnvoll, da auch die Substratbindungstasche von ClpB innerhalb der C-terminalen Domäne lokalisiert sein soll (Cashikar *et al.*, 2002) und somit DnaK und Substrate direkt nebeneinander am ClpB-Molekül lokalisiert wären. Andere Mitglieder der Hsp100/ClpB-Familie (ClpA, ClpX, HslU) binden Substrate oder auch Kofaktoren über eine C-terminale Domäne, die SSD-Domäne (sensor und substrate discrimination) genannt wird (Smith *et al.*, 1999). Erstaunlich ist jedoch, dass schon die Deletion von 26 Aminosäuren am C-Terminus (ClpB(Cshort)) für die Hemmung der Wechselwirkung ausreichend ist.
Besonders der Einfluß von Nukleotiden auf die Komplexbildung – Komplex in Gegenwart von ATPγS und ATP, kein Komplex in Gegenwart von ADP – machte uns auf einen weiteren Zusammenhang aufmerksam: Es besteht eine Korrelation zwischen der nukleotidabhängigen Oligomerisierung von ClpB und der Fähigkeit zur Interaktion mit DnaK (siehe Tab. 4.1). Mutanten, die unabhängig vom gebundenen Nukleotid als Monomer oder Dimer vorliegen, oder ClpB(wt) in der ADP-gebundenen Dimer-Form sind nicht in der Lage, den Komplex mit DnaK auszubilden. Nur die hoch-oligomere Form von ClpB, die die als Chaperon aktive Form darstellt, interagiert mit DnaK.

Tab. 4.1: Zusammenhang zwischen Oligomerisierung verschiedener ClpB-Mutanten und der Komplexbildung mit DnaK.

Die Tabelle zeigt die Ko-Elution verschiedener ClpB-Konstrukte und nukleotidabhängiger Konformationen mit $DnaK_{CHis}$ und korreliert diese mit der oligomeren Form, wie sie in Gelfiltrationsexperimenten unter gleichen Bedingungen ermittelt wurden (Gelfiltrationsexperimente mit ClpB(ΔC) und ClpB(Cshort) wurden von P. Beinker durchgeführt).

Chaperone	Ko-Elution mit $DnaK_{CHis}$	Oligomere Form von ClpB
$DnaK_{CHis}$, ClpB	ClpB	Tetramer
$DnaK_{CHis}$, ClpB, ADP	-	Dimer
$DnaK_{CHis}$, ClpB, ATP	ClpB	Tetramer
$DnaK_{CHis}$, ClpB, ATPγS	ClpB	Tetramer
$DnaK_{CHis}$, ClpB(K204Q)	ClpB(K204Q)	Tetramer
$DnaK_{CHis}$, ClpB(K601Q)	ClpB(K601Q)	Tetramer
$DnaK_{CHis}$, ClpB(ΔN)	ClpB(ΔN)	Tetramer
$DnaK_{CHis}$, ClpB(ΔC)	-	Monomer/Dimer
$DnaK_{CHis}$, ClpB(Cshort)	-	Monomer/Dimer

Die Ausbildung großer oligomerer Multiproteinkomplexe und die Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Effektoren ist charakteristisch für AAA-Proteine. Der ClpA-Hexamer beispielsweise bildet einen stabilen Komplex mit der Protease-Komponente ClpP (Heptamer-Ring) aus, der über mehrere Zyklen der Substratbindung, Substratdegradation und Produktfreisetzung bestehen bleibt (Singh *et al.*, 1999). Das AAA-Protein NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*), welches in Gegenwart von ATP auch Hexamere bildet (Fleming *et al.*, 1998), interagiert mit dem Adaptorprotein α-SNAP (*soluble NSF attachment protein*) und dem SNARE-Komplex (*SNAP receptor*) auf der Oberfläche von Membranen und bildet dabei die sogenannten 20S-Partikel (Matveeva *et al.*, 2001; May *et al.*, 2001). α-SNAP stimuliert die ATPase-Aktivität von NSF, welche die Auflösung des SNARE-Komplexes bewirkt.

4.3.6 Mechanismus der Reaktivierung von Proteinaggregaten durch das ClpB-DnaK-System

Ein Modell für den Mechanismus der Proteinreaktivierung durch das ClpB-DnaK-System sollte folgende Beobachtungen berücksichtigen:

- ClpB interagiert direkt mit Aggregaten, die Wechselwirkung ist transient und führt nur in Gegenwart von DnaK zu einer produktiven Reaktion.
- Die Oligomerisierung von ClpB ist sehr viel dynamischer als bei anderen AAA-Proteinen, jeder ATP-Hydrolysezyklus ist mit einer Dissozation des Oligomers verbunden.

- Es wird ein spezifischer ClpB-DnaK-Komplex ausgebildet, wenn ClpB in seiner aktiven oligomeren Form vorliegt.
- Da das DnaK-System kleinere Partikel auch ohne ClpB reaktivieren kann, ist das DnaK-System für die hauptsächliche Reaktivierungsarbeit verantwortlich.

Ein hypothetisches Modell der ClpB-DnaK-Kooperation unter Berücksichtigung dieser Bedingungen ist in Abb. 4.5 dargestellt. Ein ternärer Komplex bestehend aus ClpB, DnaK und Proteinaggregat wird gebildet, wobei hauptsächlich ClpB mit dem Substrat interagiert. Der ClpB-Oligomer bindet dabei in kooperativer Weise mit mehreren Bindungsstellen gleichzeitig an das Proteinsubstrat. Nukleotidbindung und ATP-Hydrolyse bewirken Strukturänderungen des ClpB-Rings, die zu einer Entzerrung der Aggregate und der Freisetzung neuer hydrophober Bereiche am Proteinsubstrat führen. In der ADP-Form dissoziiert der ClpB-Oligomer, und verliert dadurch die Affinität zum Substratprotein und DnaK. Da DnaK schon korrekt positioniert ist, bindet es an die freigesetzten hydrophoben Bereiche und verhindert die Reaggregation. Statistisch kommt eine DnaK-Bindungsstelle auf 36 Aminosäuren innerhalb einer Proteinsequenz (Rüdiger *et al.*, 1997). Die Rückfaltung erfolgt dann mit Hilfe des DnaK-Systems.

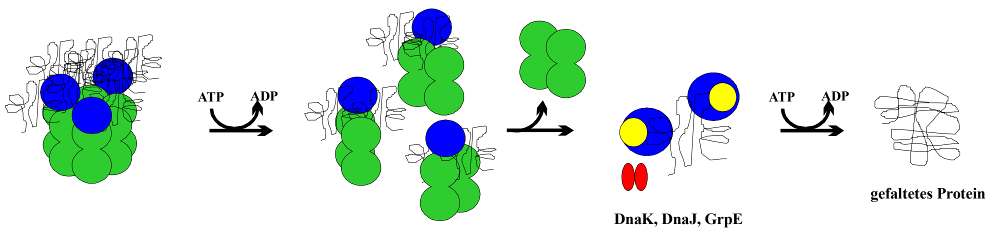


Abb. 4.5: Modell der Kooperation von ClpB und dem DnaK-System.
Ein ternärer Komplex aus ClpB, DnaK und Substrat wird ausgebildet. In einer ATP-abhängigen Reaktion bewirkt ClpB eine Entzerrung der Aggregate, die ADP-Form von ClpB dissoziiert von DnaK und Substrat, DnaK kann jedoch zeitgleich an freigesetzte Bindungsstellen binden und verhindert eine Reaggregation. Die Rückfaltung erfolgt in einer vom DnaK-System abhängigen Reaktion. Der ClpB-Hexamer ist grün, DnaK blau, DnaJ gelb und GrpE rot dargestellt.

Die Dissoziation des ClpB-Oligomers ist ein elementarer Schritt in diesem hypothetischen Mechanismus und trägt der beobachteten hohen Dynamik der Oligomerisierung Rechnung. Der Mechanismus unterscheidet sich daher grundlegend von der Aktivität der verwandten Hsp100-Proteine ClpA und ClpX, die lösliche Proteinsubstrate vor der Proteolyse entfalten (Weber-Ban *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 2000). Die Substrate werden vom ringförmigen ClpA oder ClpX über Translokation durch die axiale Pore direkt zur Protease ClpP transportiert (Ortega *et al.*, 2000). Die Translokation erfolgt in mehreren Schritten und benötigt multiple ATPase-Zyklen, wobei Intermediate in der axialen Pore durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurden (Ishikawa *et al.*, 2001). Für die Entfaltungsreaktion ist eine Serie von Interaktionen des Proteinsubstrates mit verschiedenen Bindungsstellen des Chaperons notwendig.

4.4 Ausblick

Der ATPase-Zyklus von ClpB wird von einem komplexen Zusammenspiel der beiden Nukleotidbindungsdomänen bestimmt, das sowohl kooperative Wechselwirkungen innerhalb des Rings, als auch Kommunikation zwischen beiden AAA-Modulen umfaßt. Im katalytisch aktiven ClpB-Ring können mehrere Untereinheiten gleichzeitig mit dem Proteinsubstrat interagieren. Die Charakterisierung dieser Interaktion in Verbindung mit der nukleotidabhängigen Dissoziation und Assoziation des Oligomers ist der Schlüssel zum Verständnis des Chaperonmechanismus von ClpB.

Teile des ATPase-Zyklus wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des fluoreszierenden Nukleotidanalogons Mant-ADP analysiert. Auch die Geschwindigkeit der Oligomerisierung konnte durch Anisotropiemessungen mit ClpB(A94C)-Alexa ermittelt werden. Für die vollständige kinetische Beschreibung des ATPase-Zyklus müssen Daten zur Bindung von ATP an ClpB ergänzt werden. Da Mant-ATP in Bezug auf $ClpB_{Tth}$ kein ATP-Analogon darstellt, muß entweder ein fluoreszierendes ATP-Analogon gefunden oder die ATP-Bindung anhand fluoreszierender Reportergruppen am ClpB verfolgt werden. Mit der ANBD-markierten ClpB-Mutante ClpB(T611C) steht dafür bereits eine fluoreszierende Sonde zur Verfügung. Da elementare Schritte des Nukleotidbindungsmechanismus von ClpB in dieser Arbeit definiert wurden, könnte auch die unterschiedliche Lichtstreuung von ClpB-Oligomeren in *Stopped-Flow*-Experimenten genutzt werden, um weitere kinetische Konstanten von ClpB(wt) zu definieren.

Von besonderem Interesse für den Chaperonmechanismus von ClpB wird sein, wie sich aggregierte Substratproteine und der Interaktionspartner DnaK auf die Kinetik von ClpB auswirken.

Da das Arbeiten mit aggregierten Proteinen einige Schwierigkeiten mit sich bringt, sollten die für eine Substraterkennung von ClpB notwendigen Faktoren definiert und lösliche Modellsubstrate gefunden werden. Ein vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von Poly-L-Lysin oder das Histonprotein H1 (Cashikar *et al.*, 2002).

Die Auflösung von Aggregaten erfolgt durch eine funktionelle Kooperation von ClpB und DnaK. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine direkte, spezifische Wechselwirkung von ClpB mit DnaK nachgewiesen. $ClpB_{Tth}$ und $DnaK_{Tth}$ nehmen selbst eine große Bandbreite oligomerer Formen ein. Dies ist ein Grund dafür, warum Versuche den Komplex durch Ultrazentrifugation, native Gelelektrophorese, Gelfiltration oder ITC näher zu charakterisieren, bisher nicht erfolgreich waren. Durch nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga, verschiedene Mutationen von ClpB und besonders durch die Bindung eines Modellsubstrates könnte ein ternärer Komplex stabilisiert und somit besser charakterisiert werden. Erste Versuche mit Poly-L-Lysin, ClpB und DnaK, welche die Tryptophanfluoreszenz von ClpB nutzen, sind vielversprechend.

Die hohe Dynamik der ClpB-Oligomerisierung und die inherente Konformationsflexibilität der Domänen zueinander (Parsell *et al.*, 1994a) sind auch eine mögliche Erklärung dafür, warum ClpB-Kristalle bisher nicht für eine Röntgenstrukturaufklärung geeignet waren. Auch hier könnte die Bindung eines Modellsubstrates in Kombination mit geeigneten ClpB-Mutanten hilfreich sein.

Ein Verständnis der molekularen Grundlagen für die Wechselwirkung von ClpB mit Aggregaten und des Mechanismus der Aggregatsauflösung sollte nicht nur neue Hilfsmittel bei der Überexpression aggregationsanfälliger Proteine bieten, sondern auch neue Erkenntnisse zur Entstehung und Behandlung von Amyloidosen bringen.

5. Zusammenfassung

Das molekulare Chaperon ClpB aus *T. thermophilus* gehört zu der AAA^+-Familie der ATPasen, die konservierte Nukleotidbindungsdomänen enthalten und ringförmige Oligomere bilden. Die Aufgabe des Chaperons ClpB in der Zelle ist es, in funktioneller Kooperation mit dem DnaK-System Proteinaggregate aufzulösen und zu reaktivieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der beiden Nukleotidbindungsdomänen (NBDs) von ClpB für die Nukleotidbindung, ATPase-Aktivität und Oligomerisierung zu charakterisieren. Die beiden Nukleotidbindungsdomänen binden Nukleotide mit sehr unterschiedlicher Affinität (hochaffine NBD2 und niedrigaffine NBD1). Basale ATP-Hydrolyse findet an beiden Bindungsstellen statt, kooperative Effekte innerhalb des ClpB-Rings als auch Kommunikation zwischen NBD1 und NBD2 führen jedoch zu einer enormen Beschleunigung der ATPase-Aktivität. Dass eine effektive ATP-Hydrolse und somit zwei intakte NBDs für die Chaperonfunktion notwendig sind, belegt die eindeutige Korrelation der Chaperonaktivität mit der hocholigomeren Form des Proteins

Die Oligomerisierung von $ClpB_{Tth}$ wird von der Ionenstärke, der Temperatur und dem gebundenen Nukleotid beeinflußt. $ClpB_{Tth}$ liegt bei physiologischer Salzkonzentration in Abwesenheit von Nukleotid und in Gegenwart von ATP als Tetramer vor, die Gegenwart von ADP bewirkt die Dissoziation des Oligomers. Die ADP-Bindung an die NBD1 ist für die Dissoziation verantwortlich, da die Inaktivierung der NBD1 eine Auflösung des Oligomers verhindert.

Die kinetische Charakterisierung der Mant-ADP-Bindung in dieser Arbeit zeigte, dass die Affinität der NBD2 für Nukleotide stark vom oligomeren Zustand von ClpB abhängt. Als funktionelle Einheit mit hoher Nukleotidbindungsaffinität wurde der ClpB-Dimer identifiziert, der ClpB-Tetramer besitzt dagegen niedrige Affinität. Im Gegensatz zu anderen AAA-Proteinen ist die Dynamik der Oligomerassoziation bzw. Dissoziation sehr hoch. Die Kinetik deutet an, dass jeder ATPase-Zyklus mit der Dissoziation des ClpB-Oligomers verbunden ist. Dies ist wahrscheinlich auch für den Chaperonmechanismus von ClpB relevant. Der entworfene Nukleotidbindungsmechanismus von ClpB, der die Nukleotidbindung an den ClpB-Dimer, den ClpB-Tetramer sowie das Oligomerisierungs-gleichgewicht zwischen beiden Oligomeren beschreibt, bietet einen guten Ausgangspunkt für die Einbeziehung weiterer Einflußfaktoren in die Kinetik, wie beispielsweise die Substratbindung oder die Wechselwirkung mit DnaK.

Studien mit den Modellsubstraten Luziferase und α-Glucosidase belegen außerdem, dass ClpB direkt mit aggregierten Proteinen wechselwirkt. Die Interaktion ist jedoch kurzlebig und führt nur in Gegenwart von DnaK zu einer Reaktivierung. Die Isolation eines spezifischen ClpB-DnaK-Komplexes in Ko-Elutionsexperimenten weist darauf hin, dass ClpB und DnaK direkt miteinander wechselwirken und in einer konzertierten Aktion auf aggregierte Substratproteine einwirken. ClpB interagiert nur mit DnaK, wenn ClpB in seiner katalytisch wirksamen hocholigomeren Form vorliegt Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde ein Modell für den Mechanismus der Aggregatsauflösung durch das ClpB-DnaK-Chaperonsystem entworfen.

6. Summary

The molecular chaperone ClpB from *T. thermophilus* belongs to the AAA^+ superfamily of ATPases, which are characterized by homologous ATPase-modules and form ring-shaped oligomers. In the cell, ClpB mediates the reactivation of denatured protein aggregates in cooperation with the DnaK system.

In this work the contribution of the two nucleotide binding domains (NBDs) to fundamental capacities of the chaperone, namely nucleotide binding, ATPase-activity and oligomerization, were defined. Notably the affinities of the two NBDs for Mant-ADP differ significantly, with the NBD2 being the high-affinity and the NBD1 being the low-affinity binding site. Both domains contribute to the basal ATPase-activity of the protein, which is greatly enhanced because of cooperative effects within the ClpB-ring and also intramolecular communication between NBD1 and NBD2. Two intact NBDs, as well as effective ATP-hydrolysis within the ClpB-ring are necessary for the chaperone activity of ClpB.

The oligomerization equilibrium of ClpB is influenced by ionic strength, temperature as well as the nucleotide-state of the chaperone. At physiological salt concentration and at a temperature of 25°C, $ClpB_{Tth}$ exists predominantly as a tetramer in the absence of nucleotide and in the presence of ATP. Binding of ADP leads to dissociation of oligomers and dimer-formation. ADP-binding to the NBD1 is responsible for oligomer dissociation, as ADP-triggered dissociation of the ClpB-oligomer is impaired, when the NBD1 is inactivated.

Investigations of nucleotide binding kinetics using the *stopped-flow* technique revealed that binding affinities of the NBD2 for Mant-ADP depend on the oligomeric form of ClpB. The ClpB-dimer was identified as the high-affinity oligomer, the tetramer as a low-affinity form. In contrast to other AAA-proteins, the velocitiy of the association and dissociation of the ClpB-oligomer is very high. The determined kinetic parameters imply that every ATPase cycle is coupled to a dissociation of the ClpB oligomer, which might be important for the chaperone mechanism of ClpB. The determined mechanism of nucleotide binding includes the binding of Mant-ADP to the ClpB-dimer and ClpB-tetramer as well as the oligomerization equilibrium between these two oligomers. It represents a very good framework for defining the influence of further components on the ClpB-system, like DnaK or substrate proteins.

Using the model substrates luciferase and α-glucosidase, we found evidence that ClpB directly binds to aggregated proteins. Interaction is transient and therefore leads to a productive reactivation of aggregated protein substrates only in the presence of DnaK. The isolation of a specific ClpB-DnaK-complex indicates that ClpB and DnaK interact directly with each other, and act on the aggregated protein substrate in a concerted manner. For the interaction of ClpB with DnaK, ClpB has to be in its active oligomeric form. Based upon all these observations, a mechanism for disaggregation of protein aggregates by the ClpB-DnaK chaperone system was derived.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AAA	*ATPases Associated with a variety of cellular Activities*
Abb.	Abbildung
ANBD	N-(Acetoxyethyl)-N-(methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP, ATP	Adenosin-5´-diphosphat, Adenosin-5´-triphosphat
ATPγS	Adenosin-5´-(γ-thio)-triphosphat
BSA	*Bovine Serum Albumin*
CD	Zirkularer Dichroismus
Clp	*Caseino-Lytic Protease*
DEAE	Diethylammoniumethyl-
DTE	Dithioerythritol
E. coli, $_{Eco}$	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F	Fluoreszenz
Fern-UV	spektraler Bereich von 180-250 nm
FPLC	*Fast Performance Liquid Chromatography*
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
Gl.	Gleichung
hd	hitzedenaturiert
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
k	Ratenkonstante allgemein
k_{cat}	maximale Ratenkonstante bei mit Substrat gesättigtem Enzym
K_d	Dissoziationskonstante
λ	apparente Ratenkonstante aus der Angleichung von *Stopped-Flow*-Transienten an exponentielle Gleichungen
Km	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactatdehydrogenase
Mant-	N-Methylanthraniloyl-
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NSF	*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
p-p53	Peptid mit der Sequenz FYQLA KTCRV
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	*Polymerase chain reaction*
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFP	Standardfluoreszenzpuffer
SNAP	*Soluble NSF attachment protein*
SNARE	*SNAP receptor*
Tab.	Tabelle

T. thermophilus, Tth	*Thermus thermophilus*
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UZ	Ultrazentrifugation
wt	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

Adam, H. (1962). Adenosin-5´-diphosphat und Adenosin-5´-monophosphat. Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer, H.U. (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim, 1962, 573-577.

Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., und 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.

Barnett, M.E., Zolkiewska, A., und 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.

Beinker, P., Schlee, S., Groemping, Y., Seidel, R., und Reinstein, J. (2002) The N Terminus of ClpB from Thermus thermophilus Is Not Essential for the Chaperone Activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 47160-47166.

Ben Zvi, A.P. und Goloubinoff, P. (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* **135**, 84-93.

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

Bernasconi, C.F. (1976). Relaxation Kinetics, Academic Press, New York, 20-39.

Beuron, F., Maurizi, M.R., Belnap, D.M., Kocsis, E., Booy, F.P., Kessel, M., und Steven, A.C. (1998) At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J. Struct. Biol.* **123**, 248-259.

Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., und Huber, R. (2000) The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* **403**, 800-805.

Bradford, M.M. (1976) A rapid und 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., und Sigler, P.B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 A. *Nature* **371**, 578-586.

Buchberger, A., Schröder, H., Hesterkamp, T., Schönfeld, H.J., und Bukau, B. (1996) Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.* **261**, 328-333.

Buchberger, A., Theyssen, H., Schröder, H., McCarty, J.S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J., und Bukau, B. (1995) Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J. Biol. Chem.* **270**, 16903-16910.

Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136-141.

Burston, S.G., Ranson, N.A., und Clarke, A.R. (1995) The origins and consequences of asymmetry in the chaperonin reaction cycle. *J. Mol. Biol.* **249**, 138-152.

Burston, S.G., Weissman, J.S., Farr, G.W., Fenton, W.A., und Horwich, A.L. (1996) Release of both native and non-native proteins from a cis-only GroEL ternary complex. *Nature* **383**, 96-99.

Cashikar, A.G., Schirmer, E.C., Hattendorf, D.A., Glover, J.R., Ramakrishnan, M.S., Ware, D.M., und 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.

Chandrasekhar, G.N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R., und Georgopoulos, C. (1986) Purification and properties of the groES morphogenetic protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **261**, 12414-12419.

Chen, L. und Sigler, P.B. (1999) The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* **99**, 757-768.

Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R., und 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.

Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G., und Liebman, S.W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion- like factor [psi+]. *Science* **268**, 880-884.

Choudhury, P., Liu, Y., und Sifers, R.N. (1997) Quality control of protein folding: Participation in human disease. *News in Physiological Sciences* **12**, 162-166.

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

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

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

Cremo, C.R., Neuron, J.M., und Yount, R.G. (1990) Interaction of myosin subfragment 1 with fluorescent ribose-modified nucleotides. A comparison of vanadate trapping and SH1-SH2 cross-linking. *Biochemistry* **29**, 3309-3319.

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

DebBurman, S.K., Raymond, G.J., Caughey, B., und Lindquist, S. (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease- resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13938-13943.

DeLuca, M. (1976) Firefly luciferase. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* **44**, 37-68.

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

Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., und Goloubinoff, P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.* **276**, 39586-39591.

Diamant, S., Peres Ben-Zvi, A., Bukau, B., und Goloubinoff, P.A. (2000) Size-Dependent Disaggregation of Stable Protein Aggregates by the DnaK Chaperone Machinery. *J. Biol. Chem.*

Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329-332.

Dougan, D.A., Reid, B.G., Horwich, A.L., und Bukau, B. (2002) ClpS, a Substrate Modulator of the ClpAP Machine. *Mol. Cell* **9**, 673-683.

Eccleston, J.F., Moore, K.J., Brownbridge, G.G., Webb, M.R., und Lowe, P.N. (1991) Fluorescence approaches to the study of the p21ras GTPase mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 432-437.

Ehresmann, B., Imbault, P., und 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. (1994) Roles of molecular chaperones in protein folding. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **4**, 117-122.

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

Ellis, R.J. und van der Vies, S.M. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347.

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

Farr, C.D., Galiano, F.J., und Witt, S.N. (1995) Large Activation Energy Barriers to Chaperone-Peptide Complex Formation and Dissociation. *Biochemistry* **34**, 15574-15582.

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

Fierke, C.A. und Hammes, G.G. (1995) Transient kinetic approaches to enzyme mechanisms. *Methods Enzymol.* **249**, 3-37.

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

Fleming, K.G., Hohl, T.M., Yu, R.C., Müller, S.A., Wolpensinger, B., Engel, A., Engelhardt, H., Brunger, A.T., Sollner, T.H., und Hanson, P.I. (1998) A revised model for the oligomeric state of the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF. *J. Biol. Chem.* **273**, 15675-15681.

Fourie, A.M., Sambrook, J.F., und Gething, M.J. (1994) Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **269**, 30470-30478.

Freedman, R.B., Hawkins, H.C., und McLaughlin, S.H. (1995) Protein disulfide-isomerase. *Methods Enzymol.* **251**, 397-406.

Freeman, B.C. und Morimoto, R.I. (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.* **15**, 2969-2979.

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

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J.S., Tempst, P., und 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.

Fujita, K., Kawai, R., Iwahashi, H., und Komatsu, Y. (1998) Hsp104 responds to heat and oxidative stress with different intracellular localization in Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 542-547.

Galletto, R. und Bujalowski, W. (2002) The *E. Coli* Replication Factor DnaC Protein Exists in Two Conformations with Different Nucleotide Binding Capabilities. I. Determination of the Binding Mechanism Using ATP and ADP Fluorescent Analogues. *Biochemistry* **41**, 8907-8920.

Gallie, D.R., Fortner, D., Peng, J., und 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.

Gamer, J., Bujard, H., und Bukau, B. (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. *Cell* **69**, 833-842.

Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H., und Cowan, N.J. (1992) A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell* **69**, 1043-1050.

Georgopoulos, C. und Welch, W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-634.

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

Goldberg, M.E., Rudolph, R., und Jaenicke, R. (1991) A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry* **30**, 2790-2797.

Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., und Lorimer, G.H. (1989a) Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfoleded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **342**, 884-889.

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

Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., und Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 13732-13737.

Gottesman, S., Clark, W.P., Crecy-Lagard, V., und 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., und 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., und Wickner, S. (1997) Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* **91**, 435-438.

Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., und 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.

Greene, L.E., Zinner, R., Naficy, S., und Eisenberg, E. (1995) Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 2967-2973.

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

Grimshaw, J.P., Jelesarov, I., Schonfeld, H.J., und Christen, P. (2001) Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system. *J. Biol. Chem.* **276**, 6098-6104.

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

Groemping, Y., Klostermeier, D., Herrmann, C., Veit, T., Seidel, R., und 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.

Guo, F., Maurizi, M.R., Esser, L., und Xia, D. (2002) Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.* **277**, 46743-46752.

Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., und 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. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579.

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

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

Hattendorf, D.A. und Lindquist, S.L. (2002a) 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.

Hattendorf, D.A. und Lindquist, S.L. (2002b) Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J.* **21**, 12-21.

Hayer-Hartl, M.K., Martin, J., und Hartl, F.U. (1995) Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding. *Science* **269**, 836-841.

Hiratsuka, T. (1983) New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim.et Biophys.Acta* **742**, 496-508.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., und Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.

Hong, S.W. und Vierling, E. (2000) Mutants of Arabidopsis thaliana defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 4392-4397.

Horovitz, A., Fridmann, Y., Kafri, G., und Yifrach, O. (2001) Review: allostery in chaperonins. *J. Struct. Biol.* **135**, 104-114.

Horwich, A.L., Weber-Ban, E.U., und Finley, D. (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11033-11040.

Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R., und 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., und Hartl, F.U. (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**, 147-154.

Hwang, B.J., Woo, K.M., Goldberg, A.L., und Chung, C.H. (1988) Protease Ti, a new ATP-dependent protease in Escherichia coli, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits. *J. Biol. Chem.* **263**, 8727-8734.

Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M.R., und Steven, A.C. (2001) Translocation pathway of protein substrates in ClpAP protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 4328-4333.

Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.

Jaenicke, R. (1996) Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *FASEB J.* **10**, 84-92.

Kelly, J.W. (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 101-106.

Kim, K.I., Cheong, G.W., Park, S.C., Ha, J.S., Woo, K.M., Choi, S.J., und Chung, C.H. (2000) Heptameric Ring Structure of the Heat-shock Protein ClpB, a Protein- activated ATPase in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **303**, 655-666.

Kim, K.I., Woo, K.M., Seong, I.S., Lee, Z.W., Baek, S.H., und Chung, C.H. (1998) Mutational analysis of the two ATP-binding sites in ClpB, a heat shock protein with protein-activated ATPase activity in Escherichia coli. *Biochem. J.* **333 (Pt 3)**, 671-676.

Kitagawa, M., Wada, C., Yoshioka, S., und 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.

Klemm, R.D., Austin, R.J., und Bell, S.P. (1997) Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell* **88**, 493-502.

Klostermeier, D., Seidel, R., und Reinstein, J. (1998) Functional properties of the molecular chaperone DnaK from Thermus thermophilus. *J. Mol. Biol.* **279**, 841-853.

Klostermeier, D., Seidel, R., und Reinstein, J. (1999) The functional cycle and regulation of the Thermus thermophilus DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **287**, 511-525.

Krzewska, J., Konopa, G., und Liberek, K. (2001a) Importance of Two ATP-binding Sites for Oligomerization, ATPase Activity and Chaperone Function of Mitochondrial Hsp78 Protein. *J. Mol. Biol.* **314**, 901-910.

Krzewska, J., Langer, T., und Liberek, K. (2001b) Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in Saccharomyces cerevisiae, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Lett.* **489**, 92-96.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lakowicz, J.R. (1986). Fluorescence Polarisation. In Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, 112-151.

Landry, S.J., Jordan, R., McMacken, R., und Gierasch, L.M. (1992) Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature* **355**, 455-457.

Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., und Hartl, F.U. (1992a) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-689.

Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., und Hartl, F.U. (1992b) Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J.* **11**, 4757-4765.

Larsen, C.N. und Finley, D. (1997) Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* **91**, 431-434.

Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., und Bukau, B. (1999) Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *PNAS* **96**, 5452-5457.

Lee, C., Schwartz, M.P., Prakash, S., Iwakura, M., und Matouschek, A. (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol. Cell* **7**, 627-637.

Li, J. und 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. und 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., und Zylicz, M. (1991) Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 2874-2878.

Lin, Z., Schwartz, F.P., und Eisenstein, E. (1995) The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 1011-1014.

Lindquist, S. (1997) Mad cows meet psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell* **89**, 495-498.

Lorimer, G.H. (1996) A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB J.* **10**, 5-9.

Lorimer, G.H. (2001) A personal account of chaperonin history. *Plant Physiol* **125**, 38-41.

Lu, Z. und Cyr, D.M. (1998) Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. *J. Biol. Chem.* **273**, 27824-27830.

Makhatadze, G.I. und Privalov, P.L. (1995) Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **47**, 307-425.

Matveeva, E.A., He, P., und Whiteheart, S.W. (1997) N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein contains high and low affinity ATP-binding sites that are functionally distinct. *J. Biol. Chem.* **272**, 26413-26418.

Matveeva, E.A., May, A.P., He, P., und Whiteheart, S.W. (2002) Uncoupling the ATPase Activity of the N-Ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF) from 20S Complex Disassembly. *Biochemistry* **41**, 530-536.

Maurizi, M.R. (2002) Love it or cleave it: tough choices in protein quality control. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 410-412.

Maurizi, M.R., Clark, W.P., Katayama, Y., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Bowers, B., und Gottesman, S. (1990) Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **265**, 12536-12545.

Maurizi, M.R. und 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.

May, A.P., Whiteheart, S.W., und Weis, W.I. (2001) Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N- ethylmaleimide-sensitive factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 21991-21994.

Mayer, M.P., Brehmer, D., Gassler, C.S., und Bukau, B. (2001) Hsp70 chaperone machines. *Adv. Protein Chem.* **59**, 1-44.

Mayer, M.P., Laufen, T., Paal, K., McCarty, J.S., und Bukau, B. (1999) Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **289**, 1131-1144.

Mayer, M.P., Rüdiger, S., und Bukau, B. (2000) Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol. Chem.* **381**, 877-885.

Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., und Hartl, F.U. (1996) Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* **379**, 420-426.

McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., und Bukau, B. (1995) The Role of ATP in the Functional Cycle of the DnaK Chaperone System. *J. Mol. Biol.* **249**, 126-137.

Minton, A.P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 34-39.

Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J., und 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*. (in press)

Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., und Bukau, B. (1999) Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**, 6934-6949.

Moore, K.J. und Lohman, T.M. (1994) Kinetic mechanism of adenine nucleotide binding to and hydrolysis by the Escherichia coli Rep monomer. 2. Application of a kinetic competition approach. *Biochemistry* **33**, 14565-14578.

Motohashi, K., Taguchi, H., Ishii, N., und Yoshida, M. (1994) Isolation of the stable hexameric DnaK.DnaJ complex from Thermus thermophilus. *J. Biol. Chem.* **269**, 27074-27079.

Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., und 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., und 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.

Nagiec, E.E., Bernstein, A., und Whiteheart, S.W. (1995) Each domain of the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein contributes to its transport activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 29182-29188.

Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., und 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.

Ogura, T. und Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**, 575-597.

Ortega, J., Singh, S.K., Ishikawa, T., Maurizi, M.R., und Steven, A.C. (2000) Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. *Mol. Cell* **6**, 1515-1521.

Otto, M.R., Lillo, M.P., und Beechem, J.M. (1994) Resolution of multiphasic reactions by the combination of fluorescence total-intensity and anisotropy stopped-flow kinetic experiments. *Biophys. J.* **67**, 2511-2521.

Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R.S., und Reinstein, J. (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**, 3417-3422.

Pahl, A., Brune, K., und Bang, H. (1997) Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms. *Cell Stress. Chaperones.* **2**, 78-86.

Pak, M., Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R., und Wickner, S. (1999) Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 19316-19322.

Palleros, D.R., Shi, L., Reid, K.L., und Fink, A.L. (1993) Three-state denaturation of DnaK induced by guanidine hydrochloride. Evidence for an expandable intermediate. *Biochemistry* **32**, 4314-4321.

Palleros, D.R., Welch, W.J., und Fink, A.L. (1991) Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 5719-5723.

Parsell, D.A., Kowal, A.S., und 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., und Lindquist, S. (1994b) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**, 475-478.

Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D., und Lindquist, S. (1991) Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* **353**, 270-273.

Patel, S. und Latterich, M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8**, 65-71.

Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R., und Lindquist, S. (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* **273**, 622-626.

Pearl, L.H. und Prodromou, C. (2001) Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv. Protein Chem.* **59**, 157-186.

Pelham, H.R. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**, 959-961.

Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., und Wuthrich, K. (1996) NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J. Mol. Biol.* **260**, 236-250.

Radford, S.E. (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 611-618.

Reinstein, J., Vetter, I.R., Schlichting, I., Rösch, P., Wittinghofer, A., und Goody,R.S. (1990) Fluorescence and NMR investigations on the Ligand binding properties of adenylate kinases. *Biochemistry* **29**, 7440-7450.

Rensland, H., Lautwein, A., Wittinghofer, A., und Goody, R.S. (1991) Is there a rate-limiting step before GTP cleavage by H-ras p21? *Biochemistry* **30**, 11181-11185.

Richardson, A., Schwager, F., Landry, S.J., und Georgopoulos, C. (2001) The importance of a mobile loop in regulating chaperonin/ co-chaperonin interaction: humans versus Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **276**, 4981-4987.

Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S.A., Huang, H.C., Engel, A., Baumeister, W., und Goldberg, A.L. (1997) The ATP-dependent HslVU 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., und Saibil, H.R. (1996) The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**, 241-251.

Rüdiger, S., Buchberger, A., und Bukau, B. (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 342-349.

Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., und Bukau, B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**, 1501-1507.

Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J., und Bukau, B. (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* **20**, 1042-1050.

Russell, R., Jordan, R., und McMacken, R. (1998) Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone. *Biochemistry* **37**, 596-607.

Russell, R., Wali, K.A., Mehl, A.F., und McMacken, R. (1999) DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates. *Biochemistry* **38**, 4165-4176.

Ryan, M.T. und 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., und Horwich, A.L. (1997) Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature* **388**, 792-798.

Sadhu, A. und Taylor, E.W. (1992) A kinetic study of the kinesin ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 11352-11359.

Saibil, H.R., Horwich, A.L., und Fenton, W.A. (2001) Allostery and protein substrate conformational change during GroEL/GroES-mediated protein folding. *Adv. Protein Chem.* **59**, 45-72.

Sakikawa, C., Taguchi, H., Makino, Y., und Yoshida, M. (1999) On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES. *J. Biol. Chem.* **274**, 21251-21256.

Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A., und Lindquist, S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**, 2357-2364.

Saraste, M., Sibbald, P.R., und Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.

Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., und Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289-296.

Schirmer, E.C. und Lindquist, S. (1997) Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13932-13937.

Schirmer, E.C., Queitsch, C., Kowal, A.S., Parsell, D.A., und Lindquist, S. (1998) The ATPase activity of Hsp104, effects of environmental conditions and mutations. *J. Biol. Chem.* **273**, 15546-15552.

Schirmer, E.C., Ware, D.M., Queitsch, C., Kowal, A.S., und 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., und 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.

Schlee, S. und Reinstein, J. (2002) The DnaK/ClpB chaperone system from Thermus thermophilus. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1598-1606.

Schmid, F.X. (2001) Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* **59**, 243-282.

Selkoe, D.J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791.

Seol, J.H., Baek, S.H., Kang, M.S., Ha, D.B., und 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.

Serio, T.R. und Lindquist, S.L. (2001) The yeast prion [PSI+]: molecular insights and functional consequences. *Adv. Protein Chem.* **59**, 391-412.

Sigler, P.B., Xu, Z., Rye, H.S., Burston, S.G., Fenton, W.A., und Horwich, A.L. (1998) Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 581-608.

Singh, S.K., Guo, F., und Maurizi, M.R. (1999) ClpA and ClpP remain associated during multiple rounds of ATP-dependent protein degradation by ClpAP protease. *Biochemistry* **38**, 14906-14915.

Sipe, J.D. (1992) Amyloidosis. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 947-975.

Smith, C.K., Baker, T.A., und 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.

Souren, J.E., Wiegant, F.A., und van Wijk, R. (1999) The role of hsp70 in protection and repair of luciferase activity in vivo; experimental data and mathematical modelling. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 799-811.

Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S., und 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., und Squires, C. (1991) ClpB is the Escherichia coli heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**, 4254-4262.

Sriram, M., Osipiuk, J., Freeman, B., Morimoto, R., und Joachimiak, A. (1997) Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure.* **5**, 403-414.

Studier, F.W. und 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.

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

Thomas, P.J., Qu, B.H., und Pedersen, P.L. (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456-459.

Thrall, S.H., Reinstein, J., Wohrl, B.M., und 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., Viitanen, P.V., und Lorimer, G.H. (1994) Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* **265**, 659-666.

Tuite, M.F. (1994) Genetics. Psi no more for yeast prions. *Nature* **370**, 327-328.

Vale, R.D. (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J. Cell Biol.* **150**, F13-F19.

Viitanen, P.V., Gatenby, A.A., und Lorimer, G.H. (1992) Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of Escherichia coli proteins. *Protein Sci.* **1**, 363-369.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., und 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.

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

Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marszalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C., und Zylicz, M. (1995) The ClpX heat-shock protein of Escherichia coli, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J.* **14**, 1867-1877.

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

Weissman, J.S., Hohl, C.M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H.R., Fenton, W.A., und Horwich, A.L. (1995) Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* **83**, 577-587.

Whiteheart, S.W., Rossnagel, K., Buhrow, S.A., Brunner, M., Jaenicke, R. und 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. und Maurizi, M.R. (1999) Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 8318-8320.

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

Woo, K.M., Kim, K.I., Goldberg, A.L., Ha, D.B., und Chung, C.H. (1992) The heat-shock protein ClpB in Escherichia coli is a protein-activated ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 20429-20434.

Woodward, S.K., Eccleston, J.F., und Geeves, M.A. (1991) Kinetics of the interaction of 2'(3')-O-(N-methylanthraniloyl)-ATP with myosin subfragment 1 and actomyosin subfragment 1: characterization of two acto-S1-ADP complexes. *Biochemistry* **30**, 422-430.

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

Yifrach, O. und 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.

Yifrach, O. und Horovitz, A. (1995) Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry* **34**, 5303-5308.

Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J.R., Maurizi, M.R., und 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., und Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-1614.

Ziemienowicz, A., Skowyra, D., Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C., und Zylicz, M. (1993) Both the Escherichia coli chaperone systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase. Different mechanisms for the same activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 25425-25431.

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., und Maurizi,M.R. (1999) Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from Escherichia coli. *Protein Sci.* **8**, 1899-1903.

9. Anhang

9.1 Auswertung von Gleichgewichtstitrationen

9.1.1 Berechnung von Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenztitrationen

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

$$E + L \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EL$$

Die Dissoziationskonstante K_d ist der Quotient der Dissoziationrate 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:

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

$$[L]_0 = [L] + [EL] \qquad \text{(Gl. 9.1)}$$

[E]: Konzentration an freiem Enzym
$[E]_0$: Gesamtkonzentration an Enzym
[L]: Konzentration an freiem Liganden
$[L]_0$: Gesamtkonzentration an Ligand
[EL]: Konzentration des Enzym-Ligandenkomplexes

Die Gleichgewichtskonstante K_d ergibt sich zu:

$$K_d = \frac{[E] \cdot [L]}{[EL]} \qquad \text{(Gl. 9.2)}$$

Kombination von Massenwirkungsgesetz (Gl. 9.2) und Massenerhaltung (Gl. 9.1) liefert:

$$K_d = \frac{([E]_0 - [EL]) \cdot ([L]_0 - [EL])}{[EL]} \qquad \text{(Gl. 9.3)}$$

Durch Auflösen nach [EL] erhält man die beiden Lösungen

$$[EL] = \frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \cdot [L]_0} \qquad \text{(Gl. 9.4)}$$

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

Meßgröße ist die Zunahme der Fluoreszenzemission des fluoreszierenden Liganden, die proportional zum Bindungsgrad $[EL]/[L]_0$ ist. Proportionalitätskonstante ist die Fluoreszenz-zunahme ΔFmax, die man bei Sättigung (Bindungsgrad = 1) erhält:

$$\Delta F = \Delta F_{max} \cdot \frac{[EL]}{[L]_0} \qquad \text{(Gl. 9.5)}$$

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 9.5 ergibt sich:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{[EL]}{[L]_0} \qquad \text{(Gl. 9.6)}$$

Einsetzen des Ausdrucks für [EL] aus Gleichung 9.4 liefert für die Gesamtfluoreszenz F:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0} \qquad \text{(Gl. 9.7)}$$

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 9.7 die jeweilige K_d bestimmen.

9.1.2 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:

$$K_{d1} = \frac{[E] \cdot [L_1]}{[EL_1]} \quad \text{und} \quad K_{d2} = \frac{[E] \cdot [L_2]}{[EL_2]} \qquad \text{(Gl. 9.8)}$$

Sei L_1 der fluoreszierende und damit signalgebende Ligand. Zur Auswertung der experimentellen Daten wird analog zu Gl. 9.4 ein expliziter Ausdruck für $[EL_1]$ benötigt. Dies ist unter Berücksichtigung der Massenerhaltung möglich:

$$[E]_0 = [E] + [EL_1] + [EL_2] \qquad \text{(Gl. 9.9)}$$

$$[L_1]_0 = [L_1] + [EL_1] \qquad \text{(Gl. 9.10)}$$

$$[L_2]_0 = [L_2] + [EL_2] \qquad \text{(Gl. 9.11)}$$

Kombination der Gleichungen 9.8 – 9.11 führt auf ein Polynom 3. Grades der Form

$$[EL_1]^3 + a \cdot [EL_1]^2 + b \cdot [EL_1] + c = 0 \qquad \text{(Gl. 9.12)}$$

mit den Koeffizienten a, b und c:

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

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

$$c = \frac{[E]_0 \cdot [L_1]_0^2 \cdot K_{d2}}{K_{d1} - K_{d2}} \qquad \text{(Gl. 9.13 – 9.15)}$$

Dieses Polynom dritten Grades besitzt drei Lösungen. Mit

$$Q \equiv \frac{a^2 + 3b}{9} \quad \text{und} \quad R \equiv \frac{2a^3 - 9ab + 27c}{54} \qquad \text{(Gl. 9.16)}$$

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

$$\Theta = \arccos\left(\frac{R}{\sqrt{Q^3}}\right) \qquad \text{(Gl. 9.17)}$$

zu

$$[EL_1]_1 = -2\sqrt{Q} \cdot \cos\left(\frac{\Theta}{3}\right) - \frac{a}{3} \qquad \text{(Gl. 9.18)}$$

$$[EL_1]_2 = -2\sqrt{Q} \cdot \cos\left(\frac{\Theta + 2\pi}{3}\right) - \frac{a}{3} \qquad \text{(Gl. 9.19)}$$

$$[EL_1]_3 = -2\sqrt{Q} \cdot \cos\left(\frac{\Theta + 4\pi}{3}\right) - \frac{a}{3} \qquad \text{(Gl. 9.20)}$$

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

$$[EL_1] = -\mathrm{sgn}(R)\left(\left(\sqrt{R^2 - Q^3} + |R|\right)^{1/3} + \frac{Q}{\sqrt{R^2 - Q^3 + |R|}^{1/3}}\right) - \frac{a}{3} \qquad \text{(Gl. 9.21)}$$

Gleichungen 9.13 – 9.21 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 minimert wird.

9.2 Auswertung kinetischer Experimente mit DynaFit und Scientist

9.2.1 Globale Analyse der Nukleotidbindungskinetik mit DynaFit

Die Bindung von Mant-ADP an ClpB(trunc) oder ClpB(wt) folgt keinem einfachen Bindungsmechanismus. ClpB unterliegt einem Oligomerisierungsgleichgewicht und mindestens zwei Oligomere binden Mant-ADP mit unterschiedlichen kinetischen Parametern. Um sämtliche Bindungsschritte und die Gleichgewichtseinstellung beschreiben zu können, wurden Bindungskurven bei Variation der Mant-ADP und der ClpB(trunc)- bzw. ClpB(wt)-Konzentration gemessen.

Die Gleichungsdatei enthält das Bindungsmodell (mechanism), welches in Differentialgleichungen für die zeitliche Änderung der unterschiedlichen Spezies umgewandelt wird. Die Datei enthält Schätzwerte für zu berechnende Ratenkonstanten (constants) und Emissionskoeffizienten der verschiedenen Spezies (responses). Parameter, die mit einem \`?´ versehen sind, werden während der Abweichungsminimierung optimiert. Emissionskoeffizienten wurden als differentielle Koeffizienten definiert, d.h. als Differenz zwischen der Fluoreszenz des Reaktanten (Mant-ADP) und des Produkts (ClpB·Mant-ADP). Die Programmierzeile “offset auto local?” bewirkt, dass der erste Datenpunkt jeder Transiente automatisch als Nulllinie gilt, und nachfolgend die Nulllinie separat für jede Transiente in einer least-square Regression optimiert wird. Die Datenfiles wt1-wt10 enthalten die gemessenen Stopped-Flow-Transienten (auf 100 Datenpunkte reduziert) bei unterschiedlichen Mant-ADP und ClpB-Konzentrationen (D: Dimer-Konzentration, T: Tetramer-Konzentration, mADP: Mant-ADP-Konzentration). DynaFit erlaubt es, das Vorgleichgewicht der Oligomere in der Spritze zu berechnen (equilibrate), bevor diese in der Meßzelle mit Mant-ADP gemischt werden (dilute 50:100). Das Ergebnis der Minimierungsprozedur ist eine Parameterdatei, welche die optimierten Parameter und ihre Fehler enthält (siehe Abb. 9.1), sowie die Ausgabe der simulierten Transienten (siehe Abb. 3.50)

Gleichungsdatei:

```
[task]
   data = progress
   task = fit
   model= wt_2a
[mechanism]
   D + D      <===>   T       :   k1   k-1
   T + mADP   <===>   TmADP   :   k2   k-2
   D + mADP   <===>   DmADP   :   k3   k-3
   D + DmADP  <===>   TmADP   :   k4   k-4
   DmADP + mADP <===> DmADP2  :   k5   k-5
[constants] ; micromolar scale
   k1 = 0.05   ,  k-1 = 0.8
   k2 = 14.8?  ,  k-2 = 0.75?
   k3 = 3?     ,  k-3 = 0.04?
   k4 = 15?    ,  k-4 = 0.2?
   k5 = 0.2?   ,  k-5 = 0.8?
[concentrations] ; micromolar concentrations
[responses]
TmADP = 1.4?
DmADP = 2.0 ; response mADP = 0.0 assumed
DmADP2 = 4.0?
[progress]
directory      ./examples/wt_2a/data
extension      txt
mesh linear         from 0 to 10 step 0.02
   error        constant 0.000
offset auto local?
file        wt1
equilibrate D = 0.0, T = 0.25, dilute 50:100
concentration mADP = 0.5
file        wt2
equilibrate D = 0.0, T = 0.5, dilute 50:100
concentration mADP = 0.5
file        wt3
equilibrate D = 0.0, T = 1.25, dilute 50:100
concentration mADP = 0.5
file        wt4
equilibrate D = 0.0, T = 2.5, dilute 50:100
concentration mADP = 0.5
file        wt5
equilibrate D = 0.0, T = 5.0, dilute 50:100
concentration mADP = 0.5
file        wt6
equilibrate D = 0.0, T = 0.25, dilute 50:100
concentration mADP = 1.0
file        wt7
equilibrate D = 0.0, T = 0.25, dilute 50:100
concentration mADP = 1.5
file        wt8
equilibrate D = 0.0, T = 0.25, dilute 50:100
concentration mADP = 2.5
file        wt9
equilibrate D = 0.0, T = 0.25, dilute 50:100
concentration mADP = 5.0
file        wt10
equilibrate D = 0.0, T = 0.25, dilute 50:100
concentration mADP = 7.5
[output]
 directory ./Examples/wt_2a/output
```

```
[Settings]
<marquart> | Interrupt = 500
<Confidence intervals>
    Level          =  95.0
Minsteps                          = 20
        MaxSteps                  = 40
    OnlyConstants    =  No
    DetailedReport   =  Yes
[end]
```

Set	Parameter	Initial	Fit	Error	%
	k_{2}	14.8	12	0.4	3.4
	k_{-2}	0.75	0.528	0.029	5.5
	k_{3}	3	4.56	0.064	1.4
	k_{-3}	0.04	0.02	0.0023	12.0
	k_{4}	15	22.6	0.78	3.4
	k_{-4}	0.2	0.479	0.024	5.1
	k_{5}	0.2	1.07	0.044	4.1
	k_{-5}	0.8	5.53	0.26	4.7
	r_{TmADP}	1.4	1.752	0.0082	0.5
	r_{DmADP2}	4	4.74	0.076	1.6
1	offset	0.5955	0.5732	0.0016	0.3
2	offset	0.596924	0.6118	0.0018	0.3
3	offset	0.573975	0.5615	0.0021	0.4
4	offset	0.587891	0.5791	0.0025	0.4
5	offset	0.619629	0.6169	0.0034	0.5
6	offset	0.878418	0.8605	0.0017	0.2
7	offset	1.24316	1.233	0.0018	0.1
8	offset	2.10498	2.1056	0.0021	0.1
9	offset	4.32943	4.3299	0.0023	0.1
10	offset	5.61621	5.6127	0.0028	0.1

Abb. 9.1: Parameterdatei der Minimerungsprozedur von DynaFit

9.2.2 Simulation des Amplitudenverhaltens mit Scientist

Unter Verwendung des Programms Scientist wurde die Konzentrationsverteilung der ClpB·Mant-ADP-Komplexe MA und DA in Abhängigkeit von der eingesetzten Mant-ADP oder ClpB-Konzentration berechnet (siehe Abb. 3.33). Für die Simulation wurde die Mant-ADP bzw. ClpB-Konzentration von 0.01 µM – 10 µM variiert (50 log Intervalle), die Konzentration des Reaktionspartners wurde auf 0.5 µM festgesetzt. Die K_d-Werte hatten die Werte: (siehe Abb. 3.32) K_d1 = 1.0 µM, K_d2 = 0.5 µM, K_d3 = 0.5 µM, K_d4 = 1.0 µM. Die Gleichungsdatei für die Variation der ClpB-Konzentration (links) und der Mant-ADP-Konzentration (links) ist nachfolgend gezeigt (Abb. 9.2).

A

```
// Analysis of monomer-dimer equilibrium
// M (Monomer), D (Dimer), B (ClpBtotal)
// Reaction D<>M+M: Kd1
// DA <> D + A: Kd2
// MA <> M + A: Kd3
// MA <> M + MA: Kd4

IndVars: B
DepVars: D, M, DA, MA, A
Params: Kd1, Kd2, Kd3, Kd4, Atot

// Equations
// Equilibrium
D = (M*M)/Kd1
DA = (D*A)/Kd2
MA = (M*A)/Kd3
DA = (M*MA)/Kd4

//Mass conservation
B = 2*D + M + 2*DA + MA
Atot = A + DA + MA

//constraints
0 < D < B/2
0 < M < B
0 < A < Atot
0 < DA < B/2
0 < MA < B


//Parameter Values
Kd1 = 1.0
Kd2 = 0.5
Kd3 = 0.5
Kd4 = 1.0
Atot = 0.5

// Initial Conditions
B = 0
***
```

B

```
// Analysis of monomer-dimer equilibrium
// M (Monomer), D (Dimer), B (ClpBtotal)
// Reaction D<>M+M: Kd1
// DA <> D + A: Kd2
// MA <> M + A: Kd3
// DA <> M + MA: Kd4

IndVars: Atot
DepVars: D, M, DA, MA, A
Params: Kd1, Kd2, Kd3, Kd4, B

// Equations
// Equilibrium
D = (M*M)/Kd1
DA = (D*A)/Kd2
MA = (M*A)/Kd3
DA = (M*MA)/Kd4

//Mass conservation
B = 2*D + M + 2*DA + MA
Atot = A + DA + MA

//constraints
0 < D < B/2
0 < M < B
0 < A < Atot
0 < DA < B/2
0 < MA < B


//Parameter Values
Kd1 = 1.0
Kd2 = 0.5
Kd3 = 0.5
Kd4 = 1.0
B = 0.5

// Initial Conditions
Atot = 0
***
```

Abb. 9.2: Gleichungsdateien für die Simulation des Amplitudenverhaltens mit Scientist.
(A) Die Konzentration der Produkte DA (Dimer-Mant-ADP-Komplex) und MA (Monomer-Mant-ADP-Komplex) wurde in Abhängigkeit von der ClpB-Konzentration bei kontanter Mant-ADP-Konzentration (A_{tot}) berechnet.
(B) Die Konzentration der Produkte wurde in Abhängigkeit von der Mant-ADP-Konzentration bei konstanter ClpB-Konzentration (B) berechnet.

9.2.3 Analyse von Gleichgewichtstitrationen von ClpB(wt) mit Scientist

Der Bindung von Mant-ADP an ClpB geht die Einstellung eines Oligomerisierungsgleichgewichtes voraus. Die Daten der Gleichgewichtstitration (0.25 µM, 1.0 µM, 5.0 µM ClpB(wt) mit Mant-ADP, siehe Abb. 3.21) wurden in ein Datenblatt integriert mit folgenden Modell beschrieben.

$$D + D \rightleftharpoons T \qquad K_dA$$

$$D + A \rightleftharpoons DA \qquad K_dB$$

Abb. 9.3 Bindung von Mant-ADP an ClpB(wt)

Mant-ADP bindet nur an den ClpB-Dimer, der im Gleichgewicht mit dem ClpB-Tetramer vorliegt. (**D**: ClpB-Dimer, **T**: ClpB-Tetramer, **A**: Mant-ADP).

Die Gleichungsdatei enthält die beiden Gleichung der Bindungsreaktion. Außerdem wird die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von den signalgebenden Spezies in der Gleichung beschrieben. Die Datei enthält außerdem die Anfangsbedingungen, wie z.B. Konzentrationen, Anfangsfluoreszenzen und Emissionskoeffizienten, sowie Schätzwerte für zu berechnende K_d-Werte. Die Parameter KdA, KdB, sowie die Fluoreszenz der ClpB-Mant-ADP-Komplexe wurden während der Abweichungsminimierung variiert, Ausgangskonzentrationen und die Fluoreszenz von Mant-ADP in den einzelnen Messungen wurde als konstant vorgegeben.

```
// Analysis of equilibrium titration
// A (fluorescent substrate)
// Btot (totale ClpB-Dimer-Konzentration), D (ClpB-Dimer), H (ClpB-Hexamer)
// Reaction D+D <> T: KdA
//              D+A <> DA:    KdB
// Signal on A and DA

IndVars: Atot
DepVars: F1, F2, F3, A1, D1, T1, DA1, A2, D2, T2, DA2, A3, D3, T3, DA3
Params: KdA, KdB, yield1xx1, yield1xx2, yield1xx3, yield2xx1,  yield2xx2, yield2xx3,  Btot1, Btot2, Btot3

// Equations
// Equilibrium
T1 = (D1*D1)/KdA
DA1 = (D1*A1)/KdB
//Mass conservation
Atot = A1 + DA1
Btot1 = D1 + 2*T1 + DA1
//Signal
F1 = A1*yield1xx1 + DA1*yield2xx1
//constraints
0<D1<Btot1
0<T1<Btot1/2
0<A1<Atot

// Equations
// Equilibrium
T2 = (D2*D2)/KdA
DA2 = (D2*A2)/KdB
//Mass conservation
Atot = A2 + DA2
Btot2= D2 + 2*T2 + DA2
//Signal
F2 = A2*yield1xx2 + DA2*yield2xx2
//constraints
0<D2<Btot2
0<T2<Btot2/2
0<A2<Atot

// Equations
// Equilibrium
T3 = (D3*D3)/KdA
```

```
DA3 = (D3*A3)/KdB
//Mass conservation
Atot = A3 + DA3
Btot3 = D3 + 2*T3 + DA3
//Signal
F3 = A3*yield1xx3 + DA3*yield2xx3
//constraints
0<D3<Btot3
0<T3<Btot3/2
0<A3<Atot

//Parameter Values
KdA=0.01
KdB=0.07
yield1xx1 =  2.78
yield2xx1 = 15.10
yield1xx2 = 1.01
yield2xx2 = 4.51
yield1xx3 =0.21
yield2xx3 = 1.14
Btot1 = 0.25
Btot2 = 1.0
Btot3 = 4.85


// Initial Conditions
Atot=0
***
```

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 2000 bis April 2003 in der Abteilung Physikalische Biochemie des Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Arbeitsgruppe von Dr. Jochen Reinstein angefertigt.

Prof. Dr. Roger S. Goody danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung, die Übernahme des Erstgutachtens und hilfreiche Ratschläge bei der Interpretation der kinetischen Daten.

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

Bei Dr. Jochen Reinstein möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung und die unzähligen Erklärungen und Diskussionen in Sachen Kinetik bedanken. Seine uneingeschränkte Unterstützung und das positive Feedback halfen über so manche Frustphase hinweg.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Ralf Seidel und Marion Hülseweh, für die Bereitstellung von Plasmiden und den kleinen Einblick in die Welt der Molekularbiologie.

Ich danke ganz herzlich meinen Gruppenkollegen Alena, Elisabeth, Gina, Petra, Philipp, Simone, Thomas und Yvonne für die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen Gespräche und Aktivitäten außerhalb des Laboralltags. Ganz besonderer Dank auch an Peti für ihr offenes Ohr bei jeder Art von Laborproblemen und die geduldige Einführung an viele Geräte.

Simone, Philipp, Janina und Silke möchte ich außerdem für ihre Mühen beim Korrekturlesen der Arbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an unsere Praktikantinnen Charlotte Guddat, Anne Krampe, Christina Rabe für die statistische Auswertung der ATPase-Studien und Martina Brückert für die Hilfe bei diversen Proteinexpressionen.

Ein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während des ganzen Studiums in jeder Hinsicht unterstützt haben, und meinen Schwestern Lucia und Helena, die immer für mich da waren.