

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Das Gruppe I und Gruppe II
Chaperoninsystem
des Archaeons *Methanosarcina mazei* Gö 1

Luís Gonçalo Cavaleiro de Ferreira Mousinho de Figueiredo

aus

Lissabon

(2005)

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. F. U. Hartl betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubter Hilfe erarbeitet.

München, 30.03.2005

Dissertation eingereicht am 07.04.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. F.U. Hartl

2. Gutachter: Dr. K. Winkelhofer

Mündliche Prüfung am 14.06.2005

1 Einleitung	8
1.1 Proteinfaltung und Fehlfaltung	8
1.2 Molekularen Chaperone	11
1.2.1 Einleitung	11
1.2.2 Chaperone in der Zelle	13
1.3 Chaperonine	17
1.3.1 Das Gruppe I Chaperonin <i>EcGroEL</i>	18
1.3.1.1 Struktur von <i>EcGroEL</i>	18
1.3.1.2 Faltungszyklus des <i>E. coli</i> GroE-Systems	20
1.3.2 Das Gruppe II Chaperonin	22
1.4 Der Prefoldin-Komplex: Struktur und Funktion	26
1.5 Archaea	28
1.6 Das Archaeon <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	29
1.7 Wissenschaftliches Interesse	30
1.8 Zielsetzung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Verbrauchsmaterialien	32
2.2 Geräte	34
2.3 Zellstämme, Plasmide und Proteine	35
2.4 Molekularbiologische Methoden	38
2.4.1 Herstellung und Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	38
2.4.2 DNA Analyse	38
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	39
2.4.4 Oligonukleotide und Sequenzierung	39
2.5 Biochemischen Methoden	40
2.5.1 Gelelektrophorese	40
2.5.2 Bestimmung der Protein-Konzentration	40
2.5.3 Polyklonale Antikörper	41
2.5.4 Westernblot	41
2.5.5 Gelfiltrationsanalysen	42
2.6 Klonierung und Expression von Chaperone aus <i>M. mazei</i>	43
2.6.1 Klonierung von <i>MmPfd</i> α und <i>MmPfd</i> β	43
2.6.2 Klonierung des <i>MmPfd</i> Komplexes	43

2.6.3 Klonierung der <i>MmThs</i> Untereinheiten α , β und γ	44
2.6.4 Expression von <i>M. mazei</i> Chaperonen	44
2.7 Reinigung von <i>M. mazei</i> Chaperonen	45
2.7.1 Reinigung von <i>MmGroEL</i> und <i>MmGroES</i>	45
2.7.2 Reinigung der <i>MmPfd</i> β Untereinheit	46
2.7.3 Reinigung des <i>MmPfd</i> -Komplexes	46
2.7.4 Reinigung der <i>MmThs</i> α , β und γ Untereinheiten	47
2.8 Assemblierung des <i>M. mazei</i> Thermosom Komplex	47
2.9 Funktionelle Analysen	48
2.9.1 ATPase-Aktivität	48
2.9.2 Chaperonaktivität der <i>M. mazei</i> Chaperone	48
2.9.3 Rückfaltung von Rhodanese	49
2.9.4 Rückfaltung von Malat-Dehydrogenase	49
2.9.5 Gelfiltrationsexperimente	50
2.9.6 Proteinase K Verdau	51
2.9.7 Analyse von <i>MmPfd</i> -Substrat Komplexe	51
2.9.8 Transfer entfalteter Rhodanese von <i>MmPfd</i> auf ein <i>M. mazei</i> Chaperonin	52
2.9.9 Chaperonin-vermittelte Rückfaltung von <i>MmPfd</i> -gebundener Rhodanese	52
2.10 Bioinformatische Methoden	53
2.10.1 Sequenzanalyse	53
2.10.2 Strukturvorhersage von „ <i>coiled coil</i> “ Strukturen	54
2.11 Biophysikalische Methoden	54
2.11.1 Massenspektroskopie	54
2.11.2 Elektronenmikroskopie	54
2.11.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz	55
3 Ergebnisse	56
3.1 Gruppe I Chaperoninsystem von <i>M. mazei</i>	56
3.1.1 <i>MmGroEL</i> ist ein oligomerer Komplex mit einer 7-fachen Symmetrie	57
3.2 Funktionelle Charakterisierung von <i>MmGroEL</i> und <i>MmGroES</i>	58

3.2.1 <i>MmGroEL</i> verhindert die Aggregation denaturierter Rhodanese	58
3.2.2 <i>MmGroEL</i> und <i>MmGroES</i> vermitteln die Faltung denaturierter Rhodanese	60
3.2.3 ATPase Aktivität von <i>MmGroEL</i>	62
3.2.4 Das archaeelle GroEL/GroES zyklisiert nur langsam	63
3.2.5 <i>MmGroEL/MmGroES</i> entlässt native Rhodanese mit Verzögerung	66
3.2.6 <i>MmGroE</i> vermittelt nicht die Faltung von MDH	69
3.2.7 Einfluss von Ammoniumsulfat auf das <i>MmGroE</i> -System	71
3.2.8 Ammoniumsulfat erlaubt die beschleunigte Freisetzung nativer Rhodanese durch <i>MmGroEL/MmGroES</i>	75
3.2.9 Reaktivierung von MDH durch <i>MmGroEL/MmGroES</i> in Anwesenheit von Ammoniumsulfat	76
3.2.10 Einschluss in die <i>MmGroEL</i> -Kavität ist notwendig für die Reaktivierung von MDH	81
3.3 <i>M. mazei</i> Gruppe II Chaperoninsystem: Thermosom und Prefoldin	86
3.3.1 Thermosom aus <i>M. mazei</i>	86
3.3.2 <i>MmThs</i> Untereinheiten	87
3.3.3 Endogene <i>MmThs</i> Zusammensetzung	88
3.3.4 <i>MmThs</i> Assemblierung	91
3.3.5 ATPase Aktivität von <i>MmThs</i>	94
3.3.6 <i>MmThs</i> verhindert die Aggregation denaturierter Rhodanese und Luziferase	95
3.3.7 <i>MmThs</i> bindet denaturierter Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand	96
3.3.8 Prefoldin aus <i>M. mazei</i>	98
3.3.9 <i>MmPfd</i> ist ein heterooligomerer Komplex	99
3.3.10 <i>MmPfd</i> verhindert die Aggregatbildung von denaturierter Rhodanese	101
3.3.11 <i>MmPfd</i> überträgt denaturierte Rhodanese auf <i>MmThs</i> und <i>MmGroEL</i>	102
3.3.12 <i>MmPfd</i> stabilisiert denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand	103

3.3.13 <i>MmPfd</i> bindet denaturierte Rhodanese und Aktin in unterschiedlicher Weise	104
3.3.14 <i>MmThs</i> bindet <i>MmPfd</i> -stabilisiertes Aktin	105
3.4 Zusammenfassung	107
4 Diskussion	109
4.1 Das <i>MmGroE</i> -System	110
4.1.1 <i>MmGroE</i> ist <i>in vitro</i> funktionell	110
4.2 Das Gruppe II Chaperonin-System von <i>M. mazei</i> : <i>MmThs</i> und <i>MmPfd</i>	114
4.2.1 <i>MmThs</i>	114
4.2.2 <i>MmPfd</i>	115
4.3 Proteinfaltung in den Archaea der Gattung <i>Methanosarcina</i>	117
4.4 Perspektiven in der Forschung an archaeele molekulare Chaperonen	119
5 Literatur	120
6 Anhang	138
6.1 Veröffentlichungen	138
6.2 Poster	138
6.3 Danksagung	139
6.4 Lebenslauf	140

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCT	Chaperonin Containing TCP-1
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GimC	Genes involved in microtubule biogenesis
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactose
kb	Kilobasenpaare
kDa	1000 Dalton
<i>Mm</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>
<i>Mb</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>
<i>Ma</i>	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
<i>Mt</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
NAC	Nacent Chain Associated Complex
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Pfd	Prefoldin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ Konzentration
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RU	Response Units
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
Std.	Standard
<i>Ta</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
Tab.	Tabelle
TCP-1	tailless complex polypeptid-1
Ths	Thermosom
TRiC	TCP-1 Ring complex
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt. Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code bezeichnet.

1 Einleitung

Proteinfaltung ist ein fundamentaler Schritt im Informationstransfer vom Gen zum funktionellen Protein. Die vielfältige Funktionalität von Proteinen beruht auf der definierten räumlichen Anordnung ihrer Aminosäurereste. Eine der großen Herausforderung der modernen Molekularbiologie ist es, den komplexen Zusammenhang zwischen der linearen Aminosäuresequenz eines Proteins und seiner dreidimensionalen Struktur zu verstehen.

1.1 Proteinfaltung und Fehlfaltung

Proteine sind die zentralen Funktionsträger in allen biologischen Prozessen. Die native, dreidimensionale Proteinkonformation ist die Grundlage ihrer Funktion. Zelluläre Proteine werden an Ribosomen als Polypeptidketten synthetisiert, die anschließend die genau definierte, dreidimensionale Proteinstruktur ausbilden. Die Information für die Proteinstruktur ist alleine durch die Aminosäuresequenz der Peptidkette festgelegt (Anfinsen 1973).

Proteinfaltung *in vitro*

Proteine besitzen *in vitro* generell auch ohne die Hilfe zusätzlicher Faktoren die Fähigkeit zur spontanen Faltung. Theoretisch wäre es möglich, dass während der Faltung eines Proteins alle denkbaren konformationellen Zustände von der sich faltenden Polypeptidkette durchlaufen werden. Der zeitlichen Dimension eines solchen ungerichteten Faltungsprozesses (bei einem Protein aus 100 Aminosäuren ergäbe sich eine theoretische Faltungsdauer von 10^{11} Jahren) steht allerdings die durchschnittliche Dauer biologischer Prozesse entgegen (Levinthal Paradox) (Zwanzig *et al.* 1992).

Die Faltung eines Proteins muss also über bevorzugte Faltungswege und Faltungsintermediate verlaufen.

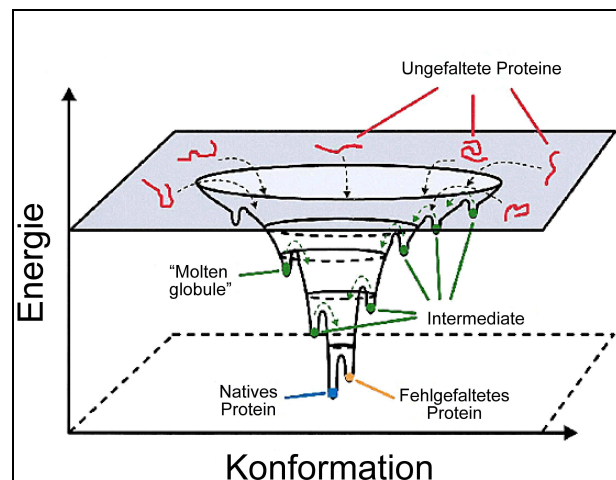


Abbildung 1. Schematische Darstellung einer Proteinfaltungslandschaft. Die Energie eines Proteins ist als Funktion der topologischen Anordnung seiner Atome dargestellt (verändert nach Schultz, 2000).

Den Faltungsprozess eines Proteins kann man sich dazu energetisch als Bewegung auf einer dreidimensionalen Energielandschaft vorstellen (Abb. 1) (Dobson 1998). Die native Struktur des Proteins liegt im thermodynamischen Energieminimum. Zum Erreichen dieses Zustandes können unterschiedliche Wege mit unterschiedlichen Intermediaten (auch unproduktive oder metastabile) durchlaufen werden, die jeweils lokale Energieminima darstellen. Mit einer Reduzierung auf diese thermodynamisch bevorzugten Zwischenstufen lässt sich die Zeitspanne der spontanen Proteinfaltung auf den Bereich von Millisekunden verringern und das Levinthal Paradox auflösen (Schultz 2000).

Proteinfaltung *in vivo*

Da das zelluläre Milieu eine Umgebung mit einer hohen Konzentrationen an Makromolekülen zwischen 200-300 mg/ml darstellt und sich damit deutlich von den *in vitro* verwendeten verdünnten Proteinlösungen unterscheidet (Elowitz *et al.* 1999), existieren für die spontane Proteinfaltung *in vivo* ungünstigere Bedingungen (Zimmerman *et al.* 1991). Die hohe

Makromolekülkonzentration bewirkt in der Zelle einen Volumenausschlußeffekt (*molecular crowding*), der zu erhöhten Assoziationskonstanten und einer Veränderung der Bindungsgleichgewichte führt (Minton 1983; Zimmerman *et al.* 1993). Auch andere Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert und Ionenkonzentrationen weichen von den optimierten *in vitro* Bedingungen ab. Gleichzeitig sind die meisten zellulären Proteine mit durchschnittlich 40-60 kDa erheblich größer als die *in vitro* eingesetzten Modellproteine (Dobson 1998).

In vivo kommt es daher vermehrt zur Bildung von Faltungsstadien, in denen Proteine zwar schon Sekundärstrukturen aber noch keine stabile Tertiärstruktur ausgebildet haben (*molten globules*). Dabei werden häufig hydrophobe Regionen exponiert, die erst während der weiteren Faltung in das Innere des Proteins gelangen und damit abgeschirmt werden. Hydrophobe Oberflächen können zu unspezifischen Assoziationen und zur irreversiblen Proteinaggregation führen (Ellis *et al.* 1999).

Die Bedingungen, die *in vivo* herrschen, verstärken den Effekt der Aggregatbildung. Bei manchen Proteinen kann es zu vorübergehenden Fehlfaltungen, den „kinetischen gefangenen“ Intermediaten (Pande *et al.* 1998; Dobson and Karplus 1999; Dinner *et al.* 2000) kommen. Diese entstehen unabhängig von „molecular crowding“, allerdings führt letzterer Effekt hier verstärkt zu einer Aggregatbildung (Abb. 1). Fehlfaltungen entstehen, wenn es zu Bindungen zwischen Regionen innerhalb des Proteins kommt, die im nativen Zustand weit auseinander liegen. Dadurch kann eine Konformation entstehen, bei der hydrophobe Seitenketten nach außen zeigen, die wiederum in der nativen Struktur im Inneren des Proteins verborgen wären (Dobson *et al.* 1998).

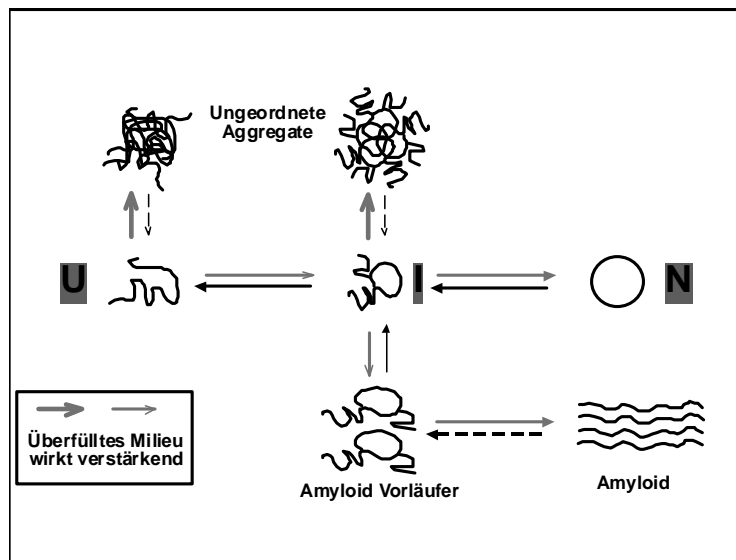


Abbildung 2. Protein-Aggregation. In der hochkonzentrierter Umgebung (*crowded environment*) der Zelle kommt es während der Proteinfaltung zu Aggregatbildung nicht-nativer Proteine. Die roten Pfeile stehen für die verstärkende Wirkung des *crowded environment* auf die entsprechenden Vorgänge. **U:** ungefaltete neusynthetisierte Polypeptidketten, **I:** teilweise gefaltete Intermediate, **N:** Natives gefaltetes Protein (Schema in Anlehnung an Dobson und Karplus, 1999).

Diese hydrophoben Seitenketten stellen nun einen „Angriffspunkt“ für weitere Fehlbindungen dar. So kann es schließlich zur Bildung von Aggregaten falsch gefalteter Proteine kommen, die durch hydrophobe Kräfte und Wasserstoffbrücken innerhalb der Polypeptidketten zusammen gehalten werden (Ellis *et al.* 1989; Dobson 1999).

Diese Vorgänge werden durch die in der Zelle vorliegende hochkonzentrierte Umgebung verstärkt (Abb. 2). Die dabei entstehenden, typisch strukturierten, fibrillären Aggregate werden als Amyloide bezeichnet. Diese werden insbesondere mit bestimmten Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington in Verbindung gebracht (Dobson 1999). Da eine Aggregation in der Regel irreversibel ist und zu einem Verlust an neu synthetisierten Proteinen führt, hat die Zelle einen Mechanismus entworfen, diesem vorzubeugen.

1.2 Molekulare Chaperone

1.2.1 Einleitung

Zellen haben einen komplexen und hoch entwickelten Schutzmechanismus entwickelt, um unerwünschte Wechselwirkungen zwischen nicht-nativen

Proteinen und somit deren Aggregation zu verhindern: Molekulare Chaperone (Hartl 1996; Netzer und Hartl 1998; Ellis und Hartl 1999; Agashe und Hartl 2000; Feldman und Frydman 2000).

Der Begriff Chaperon geht auf das französische Wort „chaperone“ zurück und kann mit Anstandsdame übersetzt werden. Er wurde erstmals von Ron Laskey verwendet, um die Rolle von Nukleoplasmin während der Nukleosom-Assemblierung zu beschreiben (Laskey *et al.* 1978). Laskey konnte nachweisen, daß das stark basische Nukleoplasmin unproduktive Verbindungen zwischen Histonen und DNA verhindert.

Molekulare Chaperone sind Proteinmaschinen und zeichnen, ähnlich wie ihre menschlichen Pendanten, dadurch aus, daß sie unerwünschte Kontakte zwischen ihren „Protegés“ verhindern. Molekulare Chaperone liefern keine sterische Information zur Faltung des Zielproteins, sondern unterdrücken vielmehr unproduktive Wechselwirkungen und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit, daß ein Protein seine native Struktur ausbilden kann.

Die Gene von molekularen Chaperonen sind stark konserviert. Viele sind Speziesübergreifend innerhalb der Eukarya, Bakterien und Archaea vertreten. Molekulare Chaperone können auf der Basis von Sequenzhomologien und Molekulargewichten in verschiedenen Klassen, wie Hsp70-Proteinen und Chaperoninen, zugeordnet werden. Eine Zelle kann dabei mehrere Mitglieder einer bestimmten Chaperonfamilie exprimieren. Proteine aus der gleichen Chaperonfamilie zeigen häufig ein hohes Maß an Sequenzhomologie und sind strukturell wie funktionell eng verwandt. Dagegen bestehen zwischen Chaperonen aus unterschiedlichen Familien kaum strukturelle Ähnlichkeiten.

Die wichtigste Eigenschaft der Chaperone ist ihre Fähigkeit, entfaltete oder teilentfaltete Proteine zu binden. Zu Beginn des Faltungsprozesses oder bei Missfaltung sind die hydrophoben Reste eines Proteins teilweise zum Lösungsmittel exponiert und können somit die Aggregation der Proteine auslösen. Chaperone binden die exponierten hydrophoben Oberflächen und verhindern die Aggregation. Die geringe Spezifität der hydrophoben Wechselwirkung führt dazu, daß Chaperone mit einer Vielzahl verschiedenen Proteinen interagieren können, vorausgesetzt sie sind in einer nicht-nativen Konformation. Lösliche, nativ gefaltete Proteine exponieren hingegen meist keine hydrophoben Bereiche und stellen somit keine Substrate für molekulare

Chaperone dar. Chaperone haben zudem die Fähigkeit, gebundene, nicht-native Proteinen in einer kontrollierten Reaktion wieder freizusetzen, die zur produktiven Faltung führt. Dies geschieht oft durch ATP-reguliertes Umschalten in eine Konformation mit geringer Affinität für hydrophobe Sequenzbereiche.

Bei unphysiologischen hohen Temperaturen (Hitzestress) oder in Gegenwart bestimmter denaturierender Agenzien (z.B. Schwermetalle, Alkohol) können Proteine strukturell destabilisiert werden und entfalten. Die Konsequenz ist letztlich ein Funktionsverlust des betroffenen Proteins und eine Anreicherung von Proteinaggregaten. Die Zelle reagiert auf diese Bedingungen mit der verstärkten Synthese molekularer Chaperone, ein Phänomen, das als Hitzeschock- oder Stressantwort bezeichnet wird (Lindquist 1986; Morimoto 1998, Ellis *et al.* 1987). Viele, aber nicht alle, Chaperontypen sind stressreguliert und werden daher als Stressproteine oder Hitzeschockproteine (Hsp's) bezeichnet.

1.2.2 Chaperone in der Zelle

Die vielfältigen Aufgaben molekularer Chaperone haben im Laufe der Evolution zu einer Differenzierung, Spezialisierung und Aufgabenteilung geführt. Dies beinhaltet auch die Notwendigkeit zu einer funktionellen Kooperation verschiedener Chaperontypen. Es kam zur Ausbildung definierter Proteinfaltungswege sowie von Multichaperonkomplexen. In Abbildung 3 sind die *de novo* Proteinfaltungswege im Zytosol von Bakterien (A), Archaea (B) und Eukaryonten (C) schematisch zusammengestellt.

Proteine werden an Ribosomen vektorieell aus Aminosäuren synthetisiert (Abb. 3). Die gesamte Faltungsinformation steht dem Protein somit erst nach der vollständigen Synthese zur Verfügung. Sekundärstrukturelemente können sich jedoch schon vor der vollständigen Synthese des Proteins spontan bilden. Naszierende Proteinketten exponieren in der Regel hydrophobe Bereiche, die im nativen Zustand im Inneren des Proteins geschützt vorliegen. Um unerwünschte hydrophobe Wechselwirkungen während der Synthese zu verhindern, werden Polypeptidketten in Bakterien bereits am Ribosom durch

das Chaperon Trigger Factor in Empfang genommen (Abb. 3 A) (Bukau *et al.* 1996; Hartl 1996; Rassow und Pfanner, 1996). In Eukarya und Archaea wurde der Trigger Factor bislang nicht gefunden, man nimmt allerdings an, daß hier andere Proteine, zum Beispiel der Ribosomen-assoziierte Proteinkomplex NAC (nascent-polypeptide-associated complex), eine ähnliche Funktion ausüben (Abb. 3 B und C) (Wiedmann *et al.* 1994, Wang *et al.* 1995).

Die meisten kleinen Proteine erreichen eine gefaltete Struktur schnell nach abgeschlossener Synthese. In Bakterien beträgt dieser Anteil ca. 65-80 % (Abb. 3 A). Größere Proteine, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind, benötigen jedoch weitere Chaperoninteraktionen, um effizient zu falten. Sie werden kotranslational von Hsp70 und/oder Prefoldin gebunden. Das Hsp70 Chaperon System stabilisiert die neu synthetisierenden Polypeptidketten, vermittelt die ko- und posttranslationale Faltung und leitet sie gegebenenfalls zur Faltung an ein Chaperonin weiter (Abb. 3 A-C) (Siegers *et al.* 1999; Deuterling *et al.* 1999, Teter *et al.* 1999). Prefoldin stabilisiert in Eukaryonten kotranslational neu synthetisierte Polypeptidketten und transferiert sie ebenfalls zur Faltung an ein Chaperonin (Abb. 3 C). In Archaea hat Prefoldin wahrscheinlich eine ähnliche Funktion (Abb. 3 B).

Besonders aggregationsgefährdete Polypeptide werden als Substrate von zylindrischen Chaperoninen (Hsp60 Chaperon), erkannt und durch ATP-abhängige Zyklen von Bindung und Loslösung auf dem Weg zur nativen Struktur begleitet (Agashe und Hartl 2000). Chaperonine vermitteln die Faltung von 10-15 % der neu synthetisierten Proteine in bakteriellen und eukaryontischen Zytosol (Abb. 3 A und C) (Thulasiraman *et al.* 1999, Ewalt *et al.* 1997, Houry *et al.* 1999). Welcher Anteil der neu synthetisierten Proteine in Archaea Chaperon-abhängig ist, ist noch nicht bekannt (Abb. 3 B). Eine detaillierte Beschreibung der Chaperonine und deren Wirkungsweise wird in Kapitel 1.3 geschildert.

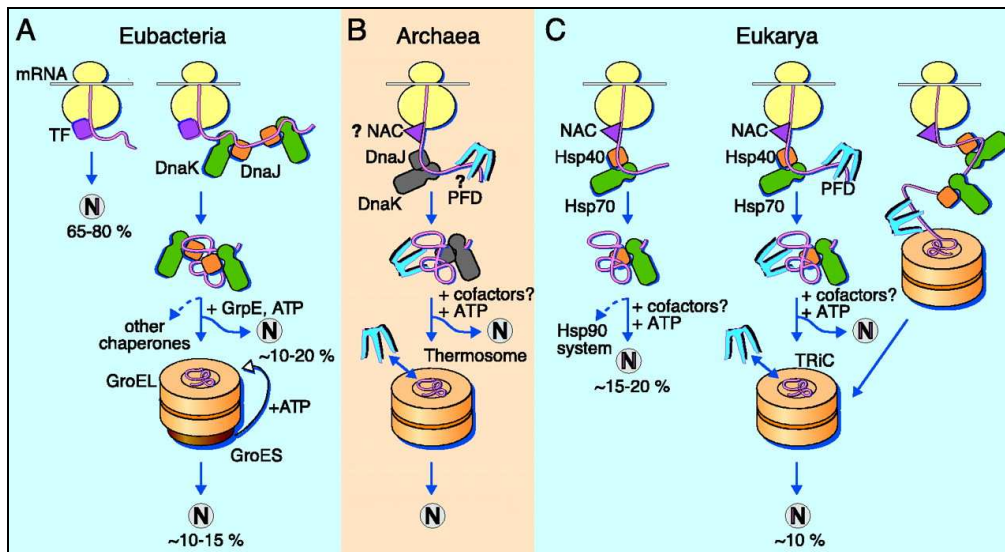


Abbildung 3. Modell des Polypeptid-Flux durch das Chaperon-System der drei Domänen des Lebens während der *de novo* Proteinsynthese (aus Hartl und Hayer-Hartl 2002). (A) Bakteria. TF, Trigger Factor; N, natives Protein. Neu synthetisierte Proteine werden vom TF gebunden. ~65-80 % aller neu synthetisierten Proteinen falten ohne weitere Chaperon Assistenz. Längere Polypeptide (10-20 %) gehen Wechselwirkungen mit DnaK und DnaJ ein und falten Chaperon-assistiert. Etwa 10-15 % der neu synthetisierten Proteine benötigen das GroE Chaperoninsystem zur Faltung. (B) Archaea. Pfd, Prefoldin, NAC, „nascent chain-associated complex“. Nicht alle Archaea besitzen DnaK und DnaJ. Die Existenz eines archaeeellen NAC-Homologen und eine kotranslationale Bindung von Pfd an neu synthetisierte Proteine konnten noch nicht nachgewiesen werden. Neu synthetisierte Proteine werden zunächst von DnaK/DnaJ und/oder von Pfd gebunden. Ein Teil dieser Proteine erreicht anschließend die native Konformation, andere müssen zur Faltung an Thermosom weitergeleitet werden. (C) Eukarya, Zytosol. NAC, TF und Pfd binden neu synthetisierte Proteine. Kleine Polypeptidketten erreichen ohne Assistenz von Chaperone die native Struktur. Etwa 15-20 % der Polypeptide tritt in Wechselwirkung mit Hsp70 und Hsp40, um die native Struktur zu erreichen, wobei ein Teil zur weiteren Faltung Assistenz von Hsp90 benötigt. ~10 % der Polypeptidketten werden ko- oder posttranslational von TRiC in deren Faltung assistiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die Wege der Chaperon-vermittelte Proteinfaltung in den drei Domänen grundsätzlich ähnlich sind. Chaperone wie Trigger Factor, Hsp70 und Prefoldin binden kotranslational an neu synthetisierte Polypeptide, um diese in einem faltungskompetenten Zustand zu halten. Das Hsp70 Chaperon System ist in der Lage einen gewissen Teil der neu synthetisierten Proteine in deren Faltung zu assistieren. Zudem besitzen praktisch alle drei Zellen große zylindrische Chaperonin Komplexe, die die ungefalteten Proteine in einer schützenden Kavität in deren Faltung unterstützen.

Gegenüber prokaryontischen Zellen besteht in Eukaryonten eine größere Tendenz zur kotranslationalen Faltung neu synthetisierter Polypeptidketten,

da eukaryontische Proteine im Durchschnitt größer sind als prokaryontische und sich aus einer größeren Anzahl unabhängiger Domänen (Faltungseinheiten) zusammensetzen (Netzer und Hartl 1997).

Chaperone erfüllen darüber hinaus wichtige Aufgaben beim Transport von Proteinen zu verschiedenen Orten innerhalb des Zytoplasmas und durch Membranen (Neupert 1997; Pfanner und Meijer 1997; Pilon und Schekman 1999). Zu sezernierende Proteine werden z.B. im Bakterium *E. coli* häufig durch das Chaperon SecB gebunden und zur Exportmaschinerie in der Zytoplasmamembran transportiert. Man nimmt an, daß das Proteinsubstrat durch Interaktion mit SecB in einer nur teilweise gefalteten, exportkompetenten Struktur gehalten wird. Beim Transportvorgang liegt das Protein weitgehend entfaltet vor.

Stressbedingungen, wie zum Beispiel eine Temperaturerhöhung, können zur Proteinentfaltung und damit zu einer Proteinaggregation in der Zelle führen. Verschiedene Chaperonsysteme, wie Hsp70, Hsp60 und kleine Hitzeschockproteine (sHsps), dienen als Schutz und verhindern durch die Bindung entfalteter Proteine deren Aggregation (Haslbeck *et al.* 1999; Jakob *et al.* 1999; Clark und Muchowski 2000).

Zellen verfügen somit über ein Arsenal an molekularen Chaperonen, die sowohl bei der Faltung neu synthetisierter Proteine assistieren als auch für die Aggregationprävention bei zellulärem Stress zuständig sind. Chaperone bilden funktionelle Netzwerke mit essentieller Bedeutung für die Zelle.

Während die Chaperonine unter allen Wachstumsbedingungen essentiell sind, zeigen die bereits an naszierenden Proteinketten bindenden Chaperonen eine erheblich funktionelle Redundanz, so daß der Verlust einzelner dieser Komponenten nur zu vermindertem Wachstum oder Letalität unter Stressbedingungen neigen (Voderwülbeck *et al.* 2004).

1.3 Chaperonine

Der Begriff „Chaperonin“ wurde von Hemmingsen eingeführt (Hemmingsen *et al.* 1988) und bezeichnet eine Familie von hochmolekularen Chaperonkomplexen, die aus ca. 60 kDa schweren Proteinuntereinheiten bestehen. Die Chaperonin-Untereinheiten assemblieren zu einem oligomeren Doppelring von ca. 800-1000 kDa und bilden dabei eine zentrale Kavität pro Ring (Horwich und Willison 1993; Ewalt *et al.* 1997; Hartl und Hayer-Hartl 2002). Ausnahmen bilden die Chaperonine der Mitochondrien, welche nur aus einem Einzelring bestehen.

In der zentralen Kavität der Chaperonine werden einzelne, nicht native Proteine in einem ATP-abhängigen Mechanismus eingeschlossen und falten in einen nativen Zustand unter Ausschluss der Aggregation (Mayhew *et al.* 1996; Weissman *et al.* 1996).

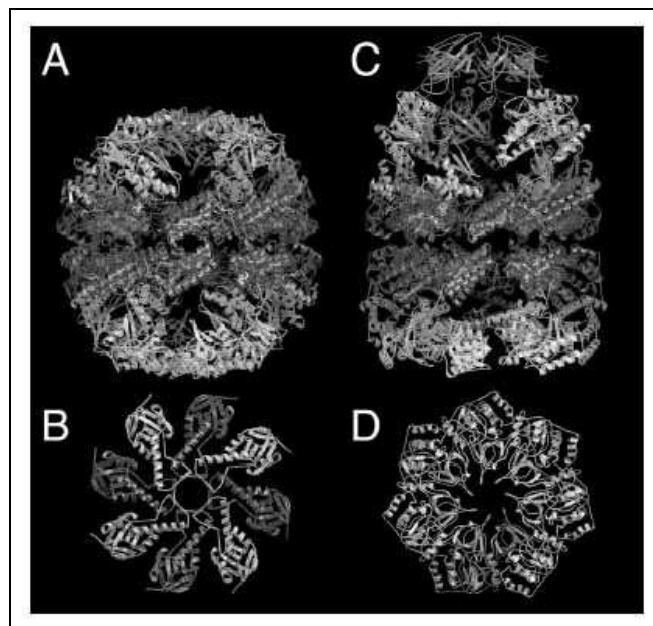


Abbildung 4. Allgemeine Struktur der Chaperonine. (A) Seitenansicht der hexadecameren geschlossenen Thermosom-Struktur (Ditzel *et al.* 1998). (B) Draufsicht auf das Thermosom. (C) Seitenansicht des GroEL-GroES-(ADP)₇ Komplexes (Xu *et al.* 1997). (D) Draufsicht auf das GroEL-GroES-(ADP)₇.

Chaperonine werden in zwei Gruppen unterteilt und können auf Grund ihrer evolutionären Verwandtschaft klassifiziert werden. Die Proteine der beiden

Gruppen sind nur sehr entfernt miteinander verwandt, besitzen aber ähnliche Strukturen.

Die Familie der Gruppe I Chaperonine schließt das bakterielle GroEL, das mitochondriale Hsp60 sowie das Rubisco bindende Protein (RBP) der Chloroplasten ein. Die eukaryontischen Gruppe I Chaperonine Hsp60 und RBP, die in Organellen lokalisiert sind, weisen eine hohe Identität der Aminosäuresequenz mit dem bakteriellen GroEL auf (45–60 %). Dies ist vermutlich auf deren endosymbiontischen Ursprung zurückzuführen (Viale und Arakaki 1994). Gruppe I Chaperonine sind homooligomer. Eine Ausnahme stellt das RBP dar, das aus zwei miteinander verwandten Untereinheiten aufgebaut ist (Hemmingsen *et al.* 1988).

Die Familie der Gruppe II Chaperonine besteht aus Komplexen, die im Zytosol von Eukarya sowie von Archaea lokalisiert sind (Trent *et al.* 1991; Gao *et al.* 1992; Lewis *et al.* 1992; Kubota *et al.* 1995). Das zytosolische Chaperonin von Eukarya wird TRiC (TCP-1 Ring complex) oder CCT (Chaperonin Containing TCP-1) genannt und ist aus 8 verwandten Untereinheiten einer Multigen-Familie zusammengesetzt (Kubota *et al.* 1994; Kubota *et al.* 1995; Stoldt *et al.* 1996), die zu einem Doppelring aus insgesamt 16 Untereinheiten assemblieren. Das archaeelle Gruppe II Chaperonin wird als Thermosom oder TF55 (engl.: *thermophilic factor*) (Waldmann *et al.* 1995; Kowalski *et al.* 1998) bezeichnet und ist je nach Organismus aus einer bis drei unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt, die ebenfalls zu einer Doppelringstruktur assemblieren. Je nach Anzahl der kodierten Untereinheiten werden Ringe aus 8 oder 9 Untereinheiten gebildet.

1.3.1 Das Gruppe I Chaperonin *EcGroEL*

1.3.1.1 Struktur von *EcGroEL*

Das GroEL mit seinem Kofaktor GroES aus *E. coli* (*EcGroEL* und *EcGroES*) ist das am besten untersuchte Chaperoninsystem. *EcGroEL* setzt sich aus zwei heptameren, übereinander liegenden Ringen zusammen, wobei jeder

Ring eine zentrale Kavität bildet. Die Ringe bestehen aus je sieben 57 kDa großen identischen Untereinheiten.

Jede *EcGroEL* Untereinheit ist in drei Domänen gegliedert (Abb. 5). Die apikale Domäne bildet die Öffnung des Rings und exponiert hydrophobe Aminosäuren zur Kavität hin (Fenton *et al.* 1994). Diese Aminosäuren sind für die Bindung an die exponierten hydrophoben Seitenketten von ungefalteten Proteinen von Bedeutung (Hartl 1996; Bukau und Horwich 1998; Sigler *et al.* 1998). Die Bindung eines Substratproteins wird durch die Bindung an mehrere apikale Domänen des *EcGroEL* Komplexes gewährleistet (Farr *et al.* 2000). Eine weitere Aufgabe der apikalen Domäne ist die Bindung an dem Kofaktor *EcGroES*. Die apikale Domäne ist durch eine „scharnierartige“ intermediäre Domäne mit der equatorialen Domäne verbunden. Diese intermediäre Domäne leitet allosterische Informationen zwischen der apikalen und der equatorialen Domäne weiter. Die equatoriale Domäne beinhaltet die Nukleotidbindetasche und vermittelt die Interaktion zwischen den Untereinheiten im Ring und zwischen den Ringen.

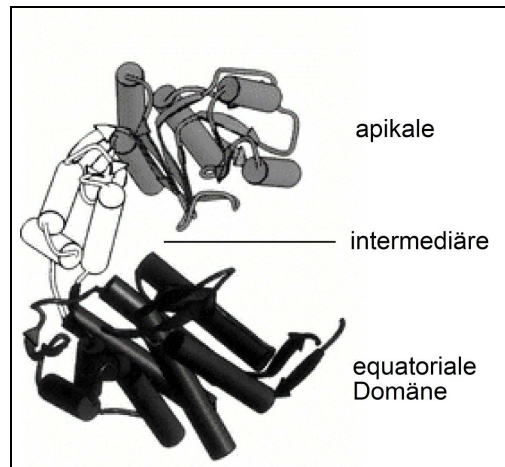


Abbildung 5. Struktur der GroEL-Untereinheit. Gezeigt ist die Struktur einer GroEL Untereinheit in einem nukleotidfreien Zustand. Die drei Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt: equatoriale (schwarz), intermediäre (weiß) und apikale Domäne (grau).

Der GroEL Komplex ist nur in Kooperation mit seinem ca. 70 kDa großen Kofaktor GroES voll funktionsfähig (Ellis 1996; Hartl 1996; Fenton und Horwich 1997; Bukau und Horwich 1998). Dieser Kofaktor, der weder eine Chaperon-Eigenschaft noch ATP Hydrolyseaktivität besitzt, ist ein

Einzelringkomplex, der aus sieben 10 kDa großen Untereinheiten besteht. Die GroES-Untereinheiten besitzen so genannte bewegliche Schleifen (engl.: *mobile loops*), die mit den Substratbindestellen der apikalen Domänen von GroEL interagieren. Dies führt dazu, daß das gebundene Substrat in die Kavität des GroEL Komplexes freigesetzt und schließlich eingeschlossen wird (Xu *et al.* 1997; Bukau und Horwich 1998; Richardson *et al.* 1998; Sigler *et al.* 1998). Das nicht native Protein wird vorübergehend in der Kavität eingeschlossen, wodurch dessen Faltung ermöglicht wird (Martin *et al.* 1993; Mayhew *et al.* 1996).

1.3.1.2 Faltungszyklus des *E. coli* GroE-Systems

Der Reaktionszyklus des Gruppe I Chaperonin aus *E. coli* ist weitestgehend verstanden. Zusammen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Chen *et al.* 1994; Roseman *et al.* 1996, Mayhew *et al.* 1996) ermöglichten die Kristallstrukturen von GroEL (Braig *et al.* 1994), ATP-bindendem GroEL (Boisvert *et al.* 1996) und dem GroEL-GroES-Komplex (Xu *et al.* 1997) viele Einsichten in die verschiedenen konformationellen Strukturen von GroEL während eines funktionellen Faltungsprozesses in Kooperation mit GroES.

Abbildung 6 zeigt eine schematische Ansicht des GroEL-GroES Faltungszyklus.

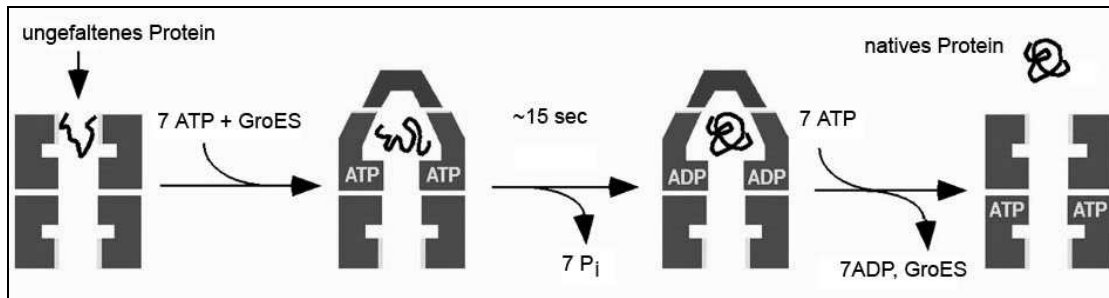


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Faltungszyklus von GroEL/GroES. Ungefaltetes Protein bindet an die hydrophoben Substratbindestellen (gelb) von GroEL (blau). GroES (rot) und ATP binden an den so genannten cis-Ring. Dabei kommt es zu einer konformationellen Änderung des GroEL und das Substratprotein wird in einer Kavität eingeschlossen. Während ATP hydrolysiert wird, erhält das ungefaltete Substrat in der Kavität die Möglichkeit den nativen Zustand zu erreichen. Am trans-Ring kommt es zu einer Bindung von ATP, während ADP und GroES vom cis-Ring dissoziieren. Das gefaltete Substrat wird in die Lösung entlassen. Im Anschluss kann es zu einer erneuten Substrat-Bindung an den ATP-gebundenen Ring kommen. Falls das Substratprotein die native Konformation noch nicht erreicht hat, kann ein neuer Faltungszyklus beginnen.

In einem ersten Schritt bindet GroEL ein ungefaltetes Substratprotein. Die apikalen Domänen der GroEL-Untereinheiten exponieren hydrophobe Aminosäurereste, die mit den exponierten hydrophoben Oberflächen der ungefalteten Substratproteine interagieren (Hayer-Hartl *et al.* 1994; Farr *et al.* 2000; Chen *et al.* 1999). Diese Substratbindestellen der apikalen GroEL Domäne sind zudem auch für die Bindung mit dem Kofaktor GroES zuständig. Die Interaktion zwischen GroEL und GroES ist dynamisch und wird durch die ATPase Aktivität von GroEL reguliert (Hartl 1996; Bukau und Horwich 1998; Sigler *et al.* 1998). Aufgrund negativer Allosterie zwischen den beiden Ringen im Chaperonin Komplex, bindet ATP nur an einen der beiden GroEL Ringe. Nach der Bindung des Substrates und von 7 ATP Molekülen im so genannten cis-Ring, erfolgt die Interaktion mit GroES. Diese Bindung ist durch eine deutliche konformationelle Änderung der apikalen Domänen innerhalb des cis-Ringes gekennzeichnet. Dabei wird das Volumen der cis-Kavität ungefähr verdoppelt (Roseman *et al.* 1996; Xu *et al.* 1997). Die entstehende Kavität ist in der Lage, Substrate bis zu einer Größe von ~60 kDa einzuschließen (Sigler *et al.* 1998; Ellis 2001). Die konformationelle Änderung der apikalen Domäne bewirkt zudem, daß eine zuvor exponierte hydrophobe Oberfläche einer hydrophilen Oberfläche weicht (Langer *et al.* 1992; Roseman *et al.* 1996; Xu *et al.* 1997). Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den apikalen Domänen und den exponierten hydrophoben Bereiche des nicht nativen

Proteins werden gelöst und das Substratprotein gelangt in die zentrale Kavität. In einem weiteren Schritt erfolgt die Hydrolyse von ATP. Der gesamte Vorgang von der ATP-Bindung bis zur ATP-Hydrolyse dauert ~15 Sekunden (Hayer-Hartl *et al.* 1995; Rye *et al.* 1997). Das Substrat hat die Möglichkeit während dieser Zeit innerhalb des hydrophilen Milieus des „GroEL-Käfigs“ zu falten. Durch die Bindung von sieben ATP an den trans-Ring wird die Dissoziation der sieben ADP und GroES vom cis-Ring ausgelöst. Die Dissoziation des GroES öffnet die cis-Kavität und ermöglicht dem Substrat das Verlassen der Kavität. Sollte das Substrat nach einem Faltungszyklus nicht vollständig gefaltet sein und weiterhin hydrophobe Seitenketten exponieren, kommt es zu einer wiederholten Bindung an GroEL bis die native Konformation erreicht ist.

1.3.2 Das Gruppe II Chaperonin

Die Gruppe II Chaperonine sind weit weniger gut verstanden als die Chaperone der Gruppe I. Sie bilden ebenfalls Komplexe mit einer Doppelringstruktur mit je einer Kavität pro Ring, sind aber oft heterooligomer, wobei die Anzahl der Untereinheiten pro Ring zwischen 8 und 9 variieren kann (Gutsche *et al.* 1999, Leroux *et al.* 2001).

Die Kristallstruktur vom Gruppe II Chaperonin Thermosom aus *Thermoplasma acidophilum* konnte gelöst werden (Klumpp *et al.* 1997). Der Komplex besteht aus zwei achtegliedrigen Ringen, die jeweils aus alternierenden α und β Untereinheiten aufgebaut sind. Jeder Ring bildet eine eigene zentrale Kavität. Beide Ringe sind so angeordnet, daß jeweils sowohl die α Untereinheiten der beiden Ringe als auch die β Untereinheiten homodimere Paare bilden (Abb. 7).

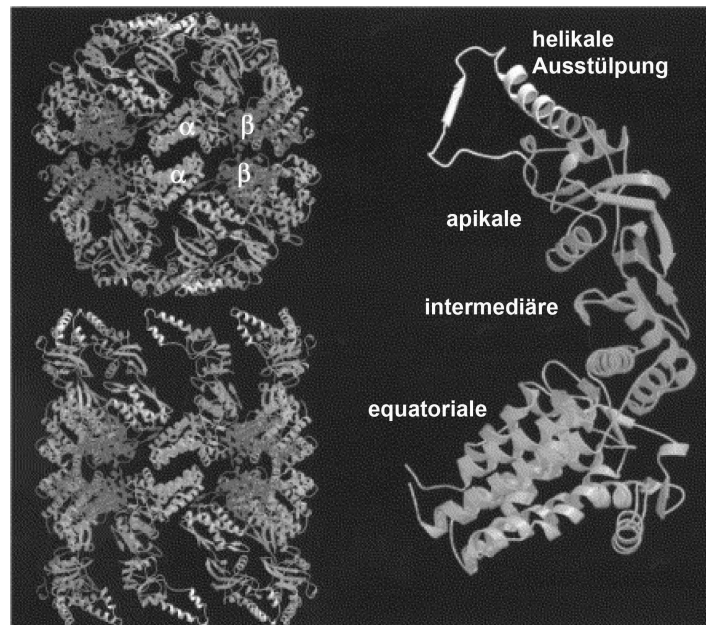


Abbildung 7. Struktur des Gruppe II Chaperonins Thermosoms des Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. (oben links) Kristallstruktur der geschlossenen Konformation des α/β heterooligomeren Thermosoms. (unten links) Elektronentomographische Studien an dem α homooligomeren Thermosom lieferten ein Modell für die geöffnete Form. (Rechts) Struktur der α Thermosomuntereinheit in der geschlossenen Konformation. Die Untereinheit ist aus drei Domänen aufgebaut: einer equatorialen, einer intermediären und einer apikalen Domäne mit einer helikalen Extension (Gutsche *et al.* 1999).

Die Aminosäuresequenzen der α und β Untereinheiten sind zu 60 % identisch (Waldmann *et al.* 1995). Analog zu den Gruppe I Chaperoninen wird die Struktur der Thermosomuntereinheit in drei Domänen aufgeteilt (Abb. 7 rechts). Die equatoriale Domäne beinhaltet die ATP Bindetasche und ist maßgeblich an der Interaktion zwischen den beiden Ringen beteiligt. Die apikale Domäne ist für die Substraterkennung und Bindung zuständig. Die intermediäre Domäne verbindet die apikale und die equatoriale Domäne miteinander. Im Gegensatz zu Gruppe I Chaperoninen benötigen Gruppe II Chaperonine jedoch keinen GroES-ähnlichen Kofaktor. Stattdessen weist ihre Struktur einen eingebauten „Deckel“ in Form einer helikalen Extension (Abb. 7 rechts) der apikalen Domäne auf (Klumpp *et al.* 1997).

Der Faltungsmechanismus der Gruppe II Chaperonine ist erst in Ansätzen verstanden. Anhand der Kristallstruktur des Thermosoms und mit Hilfe von Neutronenstreuungs-Experimenten (Gutsche *et al.* 2000; Gutsche *et al.* 2000), die Konformationsänderungen des Thermosoms in einem nukleotidfreien und -gebunden Zustand zeigen, war es möglich ein einfaches

Modell für einen Faltungszyklus vorzuschlagen (Abb. 8) (Kusmierczyk und Martin 2001).

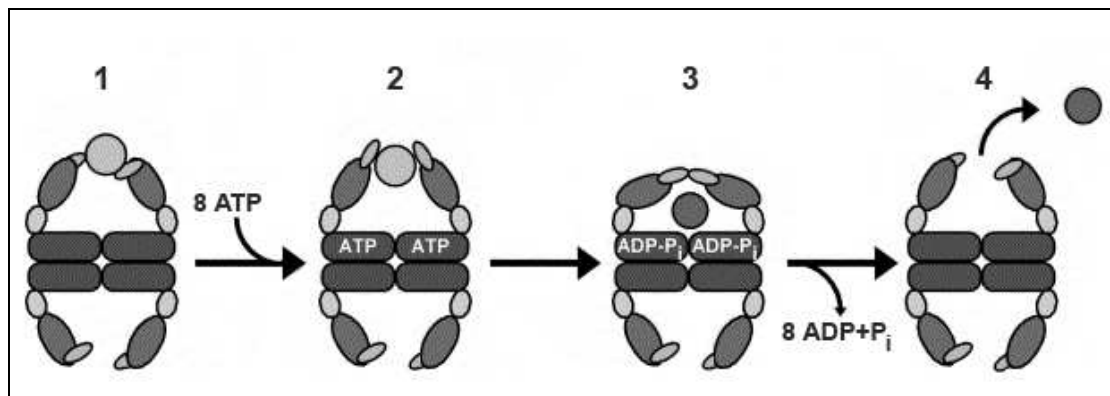


Abbildung 8. Modell des Thermosom-Faltungszyklus. (1) Das Substratprotein wird an den apikalen Domänen des Thermosoms, möglicherweise an den helikalen Extensionen, gebunden. (2) Die Bindung von ATP veranlasst eine Rotation der apikalen Domänen. (3) ATP wird hydrolysiert und die Kavität wird mittels der helikalen Extensionen geschlossen. Das Substrat wird eingeschlossen und erhält die Möglichkeit die native Struktur zu erreichen. (4) Die apikalen Domänen öffnen sich und ermöglichen die Freisetzung des nativen Substrates. (rot) equatoriale Domäne, (gelb) intermediären Domäne, (grün) apikale Domäne, (hellblau) ungefaltetes Substratprotein, (dunkelblau) gefaltetes Protein. (Modell nach Kusmierczyk und Martin, 2001).

In einem ersten Schritt wird angenommen, daß die helikalen Extensionen ihre konservierten hydrophoben Domänen nach Außen exponieren und das Thermosom eine offene Konformation einnimmt, um ungefaltete Substrate binden zu können (Klumpp *et al.* 1997). Nach ATP Bindung und Hydrolyse könnte sich die Konformation der apikalen Domäne ändern. Es würde zu einer Rotation der apikalen Domäne kommen, wobei diese das ungefaltete Substrat in der Kavität des Thermosoms einschließen würden und die hydrophobe Oberfläche würde einer hydrophilen weichen. Das Substrat hätte nun die Möglichkeit, in der geschützten Umgebung eines „Anfinsen Käfigs“ die native Struktur zu erreichen (Ditzel *et al.* 1998). In einem weiteren Schritt würde ADP dissoziieren, die helikalen Extensionen würden die Kavität öffnen und das native Protein könnte in Lösung entlassen werden.

Obwohl die Rolle der helikalen Extensionen als eine Art „eingebauter GroES artiger Verschluss“ der Gruppe II Chaperonine akzeptiert ist, ist ihre Rolle in der Substratbindung noch nicht nachgewiesen. Ergebnisse von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von CCT-Tubulin- und CCT-

Aktin-Komplexen deuten darauf hin, daß eine Bindung auch an den apikalen Domänen erfolgen kann und nicht auf die helikalen Extensionen beschränkt sein muss (Llorca *et al.* 2000; Llorca *et al.* 1999).

Das Volumen der Kavität des Gruppe II Chaperonins wurde auf 130 000 Å³ geschätzt, welches für die vollständige Einkapslung eines 50 kDa großen Proteins ausreichen würde (Ditzel *et al.* 1998). Nun wurde aber gezeigt, daß CCT in der Lage ist, größere Proteine zu falten, wie zum Beispiel die 62 kDa große Luziferase (Frydman *et al.* 1992). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Aktin und Tubulin effizient durch CCT gefaltet werden können, obwohl die Kavität partiell von einem monoklonalen Antikörper besetzt war, der spezifisch eine CCT Untereinheit erkennt (Grantham *et al.* 2000). Die Autoren dieser Studie zogen den Schluß, daß ein Einschluss des Substrates nicht zwingend notwendig ist. Die Tatsache, daß CCT *in vivo* mit translatierenden Ribosomen assoziiert (Fydman *et al.* 1994) und die Faltung von eukaryontischen Proteinen oft kotranslational erfolgen kann (Netzer *et al.* 1997), deutet auf eine Interaktion von CCT mit naszierenden Polypeptidketten hin (Frydman *et al.* 1994; McCallum *et al.* 2000). Die Möglichkeit der Gruppe II Chaperonine, auch in geschlossenen Zustand eine Öffnung für die Polypeptidkette zu erhalten, würde die Interaktion mit einer naszierenden Kette erlauben, die noch mit dem C-Terminus an das Ribosom gebunden ist und nur partiell in die Kavität von CCT/TRiC aufgenommen werden kann. CCT/TRiC wäre so in der Lage die kotranslationale und domänenweise Faltung eines Proteins zu vermitteln. Dies ist auch für Proteine denkbar, die größer als 50 kDa sind, wenn nur einzelne Domänen gebunden und gefaltet werden. Eine solche Funktion wäre aber für das GroE-System wegen des separaten GroES Deckel nicht möglich.

Über die *in vivo* Substrate des archaeeellen Gruppe II Chaperonin Thermosom ist bisher nichts bekannt. Die starke Induzierbarkeit weist jedoch auf ein breites Spektrum an Substraten hin.

1.4 Der Prefoldin-Komplex: Struktur und Funktion

Prefoldin ist ein hexamerer, ATP unabhängiges Chaperon, welches aus zwei verschiedenen aber miteinander verwandten Untereinheiten, α und β , in einer $\alpha_2\beta_4$ Stöchiometrie aufgebaut ist (Leroux *et al.* 1999). Die Kristallstruktur des Prefoldins aus dem Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* konnte gelöst werden und offenbarte eine unerwartete Struktur, die sich von anderen bekannten Chaperone unterscheidet (Siegert *et al.* 2000).

Der Prefoldin-Komplex aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* beinhaltet eine aus β Faltblättern bestehende Plattform an der sechs Tentakeln angegliedert sind, die jeweils aus langen antiparallelen α -helikalen „coiled coils“ bestehen (Abb. 9) (Siegert *et al.* 2000). Die N- und C-Termini der Untereinheiten befinden sich an den freien Enden dieser Segmente.

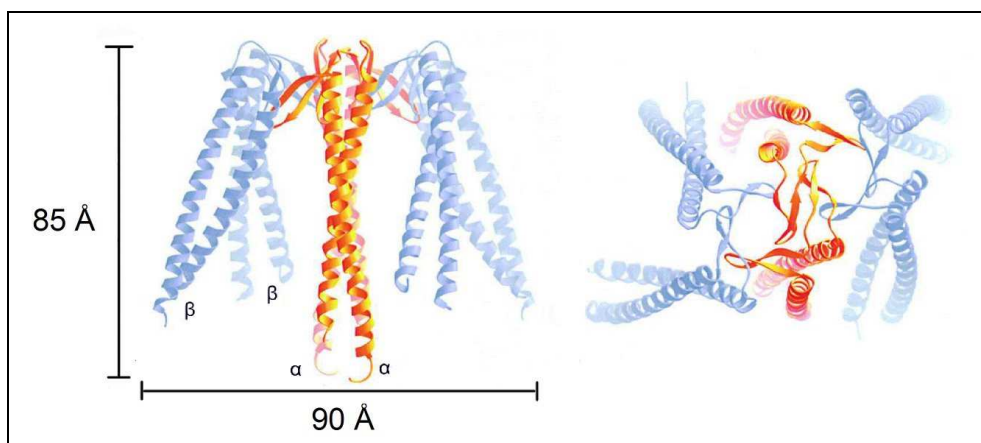


Abbildung 9. Struktur des Prefoldins aus dem Archaeum *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Zwei α -Prefoldin (α -Pfd) Untereinheiten (gelb) bilden ein Dimer, an das sich vier β -Pfd Untereinheiten (blau) anlagern. (links) Seitenansicht des Pfd-Komplexes. Am Ende der Tentakel sind die flexiblen N- und C-Termini der Pfd-Untereinheiten. (rechts) Untenansicht des Komplexes. Deutlich zu sehen ist die aus β Faltblättern gebildete Plattform (Abbildung aus Siegert *et al.* 2000).

Abbildung 10 zeigt schematisch die Strukturelemente der beiden Klassen der Prefoldin Untereinheiten. Drei Domänen können jeweils klar unterschieden werden. Die zentrale Region weist eine β -Faltblatt Struktur auf, die im Prefoldin Komplex die zentrale Plattform bilden. Zwei flankierende Regionen bilden die α -Helices der „coiled coils“. Im Unterschied zur β -Untereinheit

liegen bei den Untereinheiten der α Klasse zwei zusätzliche β -Faltblatt-Elemente in der zentralen Region des Proteins vor.

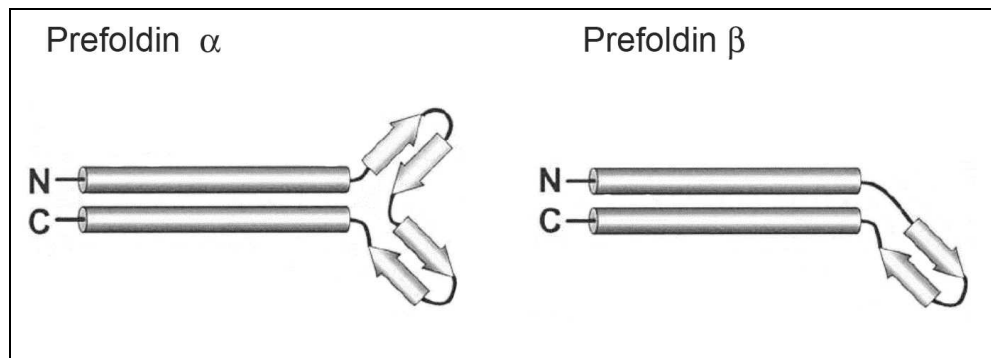


Abbildung 10. Sekundäre Strukturelemente der beiden Prefoldin-Untereinheiten α und β . Die Zylinder stellen α Helices dar, die „coiled coil“ Strukturen bilden. Die Pfeile symbolisieren β -Faltblattstrukturen. Die α Prefoldin Untereinheit besitzt ein zusätzliches β -Faltblatt.

Molekulare Chaperone exponieren hydrophobe Oberflächen, die an der Bindung mit ungefalteten Proteinen beteiligt sind (Fenton *et al.* 1994, Xu *et al.* 2000, Zhu *et al.* 1996). Archaeelles Prefoldin besitzt jeweils am Ende der helikalen Tentakel einen Bereich, welcher eine exponierte, hydrophobe Oberfläche aufweist. Die Entfernung dieser hydrophoben Bereiche führte zum Verlust der Fähigkeit, ungefaltete Proteine zu binden (Siegert *et al.* 2000). Diese Beobachtung zeigt, daß sich die Substratbindestellen vom Prefoldin an den distalen Enden der coiled coil-Segmente befinden. Es gibt Hinweise, daß zur Bindung des Substrates auch eine partielle Entwindung der „coiled coils“ erfolgen muss (Lundin *et al.* 2004). Es wird angenommen, daß die Tentakel in Lösung eine gewisse Flexibilität besitzen und so dem Prefoldin gestatten, Substrate unterschiedlicher Größen zu binden.

Eukarya besitzen ein Prefoldinhomolog, welches auf Grund seiner Beteiligung an der Synthese der Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin auch GimC (**G**enes **i**nvolved in **m**icrotubule biogenesis) genannt wird. Im Unterschied zum archaellen Chaperon besitzt das eukaryontische GimC sechs verschiedene Untereinheiten, die ebenfalls in zwei Klassen unterteilt werden können (Geissler *et al.* 1998; Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). GimC bindet kotranslational an Aktin und Tubulin, um beide posttranslational an das Chaperonin CCT zu übergeben (Vainberg *et al.* 1998, Hansen *et al.* 1999).

GimC kooperiert bei der Faltung dieser Proteine mit TRiC/CCT, bildet aber keinen stabilen Komplex mit dem Chaperon (Siegers *et al.* 1999).

Die Rolle des archaeellen Prefoldin ist dagegen noch relativ unklar. Archaea besitzen kein Zytoskelett und somit kommen strukturbildende Proteine als wesentliche Substrate für Prefoldin in Archaea nicht in Frage. Prefoldin aus *M. thermoautotrophicum* kann *in vitro* mit einer Vielzahl denaturierter Proteine interagieren (Leroux *et al.* 1999). Daher ist anzunehmen, daß Prefoldin *in vivo* eine dem eukaryontischen GimC vergleichbare Rolle hat. Es dürfte seine Substrate kotranslational binden und sie dann an das Thermosom heranführen.

1.5 Archaea

Seit 1977 werden alle Lebensformen einer der drei phylogenetischen Domänen des Lebens zugeordnet: Eukarya, Bakteria und Archaea.

Bakteria und Archaea sind sich morphologisch sehr ähnlich und besitzen im Unterschied zu den Eukarya weder einen Zellkern noch Organellen. Definiert wurden die Archaea als eigenständige Domäne durch Sequenzvergleiche der 16S rRNA (Woese *et al.* 1977, Olsen *et al.* 1985). Der Begriff „Archaea“ spiegelt eine frühe Vorstellung wieder, daß diese Organismen von einer Lebensform abstammen, die vor der Abspaltung in Prokarya und Eukarya existierte.

Wesentliche Unterschiede zwischen Bakteria und Archaea sind unter anderem der unterschiedliche Aufbau des Chromosoms und der Mechanismus der Translation. Ein weiterer großer Unterschied ist der Aufbau der Zellwand, welche in Archaea keine Peptidoglykane enthält (Kandler *et al.* 1993).

Archaea wachsen meist unter ungewöhnlichen Bedingungen. Manche Arten bevorzugen Temperaturen von über 80° C (Hyperthermophile) oder leben in gesättigten Salzlösungen (Halophile) oder bevorzugen wiederum extrem saure Lebensräume (Acidophile) (Rothschild und Mancinelli 2001; Thomas

und Dieckmann 2002). Früher glaubte man, daß Archaea nur extreme Lebensräume besiedeln. Neuere Analysen zeigten jedoch, daß auch in weniger extremen Lebensräumen wie Meeresgrund, Erdreich oder auch Rindermagen Archaea vorkommen.

1.6 Das Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1

Methanosarcina mazei Gö1 (*M. mazei*) ist ein strikt anaerobes und methanogenes Archaeon, das unterschiedliche Lebensräume, wie Reisfelder, Meeres- und Seesedimente besiedelt. Die irregulären Kokken von ca. 1-3 µm Durchmesser können je nach Umweltbedingungen entweder als Pakete, Lamina oder als Einzeller vorliegen (Macario 1995; Lange *et al.* 1997). *M. mazei* ist mesophil und lässt sich optimal bei einem pH-Wert von 6,8 bis 7,2, einer Natriumchloridkonzentration von 0,5 M und einer Temperatur von 35 °C kultivieren. *M. mazei* und weitere Vertreter der Familie der *Methanosarcinaceae* sind die einzigen Organismen, die die Fähigkeit besitzen die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen Kohlendioxid, Acetat, Methanol und Methylamine zur Energiegewinnung zu nutzen. Die Generationszeit unterscheidet sich je nach eingesetzter Quelle: 9 h bei Kohlendioxid, 17 h bei Acetat und 7-15 h bei der Verwendung von Methanol bzw. Methylamine (Baumer *et al.* 2000).

Das zirkuläre Chromosom des *M. mazei* wurde erst kürzlich sequenziert (Deppenmeier *et al.* 2002). Das Genom enthält etwa 4×10^6 Basenpaare und es konnten 3371 ORF's identifiziert werden. 2450 ORF's konnte eine Funktion zugeordnet werden. Das Bemerkenswerte an diesem Genom ist die Tatsache, daß 1043 ORF's, ca. ein Drittel aller Gene, ihre nächsten Homologen in der Domäne der Bakteria haben. Diese „bakteriellen“ Gene bilden keinen großen, zusammenhängenden Genomabschnitt, sondern sind über das gesamte Chromosom verteilt, was auf wiederholten lateralen Gentransfer schließen lässt. Diese Gene bakteriellen Ursprungs haben *M. mazei* möglicherweise geholfen, eine breite Palette von

Stoffwechselfähigkeiten zu entwickeln. Der laterale Gentransfer hat möglicherweise dazu beigetragen, daß *M. mazei* die Fähigkeit besitzt Substrate wie Acetat, Methanol und Methylamine zur Energiegewinnung zu metabolisieren. Die Fähigkeit, Wasserstoff und Kohlendioxid als Energiequelle zu nutzen sind archaeellen Ursprungs (Deppenmeier *et al.* 2002).

1.7 Wissenschaftliches Interesse

Das heutige Wissen über molekulare Chaperone stammt hauptsächlich aus Untersuchungen an Eukarya und Bakterien. Die Chaperone der Domäne der Archaea sind dagegen wesentlich weniger gut untersucht. Eine der Ursachen ist, daß die Archaeaforschung ein relativ junges Forschungsgebiet ist. Zudem wurden erst wenige archaeelle Genome, im Vergleich zu Bakterien, vollständig sequenziert. Am wichtigsten scheint aber, daß viele Archaea im Labor nur schwer kultivierbar sind und ihre Proteine zumeist nur in extremen Bedingungen funktionell aktiv sind.

Das Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 bietet hier wesentliche Vorzüge als Modellorganismus für die Domäne der Archaea. Die Kultivierungsbedingungen sind bekannt, so daß es relativ einfach im Labor gezüchtet werden kann. Des Weiteren liegt die optimale Wachstumstemperatur dieses Organismus bei 35°C. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig für die Handhabung und funktionelle *in vitro* Analyse archaeeller Proteine. Das Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 ist ein geeignetes System für das Studium archaeeller molekularer Chaperone. Wie bereits erwähnt, sind ein Drittel der Gene von *M. mazei* bakteriellen Ursprungs. Interessanterweise konnten Deppenmeier und Kollegen auf der genomischen Ebene nicht nur das typisch archaeelle Gruppe II Chaperonin Thermosom nachweisen, sondern auch das normalerweise typische bakterielle Chaperoninsystem GroE. In einer vorangegangenen Studie konnte festgestellt werden, daß sowohl das archaeelle Chaperonin Thermosom als auch das Chaperoninsystem GroE in *M. mazei* in äquimolarer Mengen

exprimiert werden und unter Hitzeschock moderat induzierbar sind (Klunker *et al.* 2003).

1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende funktionelle Analyse der Gruppe I und Gruppe II Chaperoninsysteme des mesophilen Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö 1. Die mechanistischen und biochemischen Eigenschaften der beiden Chaperonintypen sollten definiert werden.

Da die Präsenz von Gruppe I Chaperoninen in Archaea bis dato nicht bekannt war, sollte dieses Chaperonin in einer vergleichenden Analyse mit dem bakteriellen Gruppe I Chaperoninsystem aus *E. coli* untersucht werden. Ziel war es festzustellen, ob sich die hohe Homologie auf genetischer und struktureller Ebene auch funktionell widerspiegelt. Ein besonderer Schwerpunkt der vorliegenden Studien war die Untersuchung der Kinetik der Chaperonin-vermittelten Faltungsreaktion sowie der Substrat-Bindungseigenschaften.

Neben dem Gruppe I Chaperoninsystem sollte auch das konservierte archaeelle Gruppe II Chaperoninsystem bei *M. mazei*, bestehend aus *MmThs* und *MmPfd*, biochemisch analysiert werden. Ziel war es u.a. mit Hilfe rekombinant hergestellter Proteine, die Assemblierung der Komponenten zu den funktionellen Komplexen nachzuvollziehen. Weiterhin sollte die funktionelle Kooperation zwischen *MmThs* und *MmPfd* untersucht werden, um Aufschluss über den Polypeptidflux im archaeellen Zytosol zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Abgen (Hamburg, BRD):

PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml

Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK):

ECL (Blot-Entwicklungs-kit), Hyperfilm ECL, Proteinmarker für Gelfiltrationen

Applied Biosystems (Darmstadt, BRD)

Proteomics analyser 4700 (MALDI-TOF/TOF)

BioMol (Hamburg, BRD):

IPTG, HEPES

Bio-Rad Laboratories (Herkules, USA):

Ethidiumbromid, Affigel 15 Säulen, Protein Assay, Dye Reagent Concentrate

BMA (Rockland, USA):

LE Agarose

Difco (Detroit, USA):

Baktotrypton, Baktoyeast Extrakt, Bactoagar

Eppendorf (Hamburg, BRD):

Reaktionsgefäße

Fluka (Deisenhofen, BRD):

LB-Medium (vorgemischt), DMSO

Greiner (Finkenhausen, BRD):

Petrischalen

Invitrogen (Groningen, CH):

Vektoren

Merck (Darmstadt, BRD):

Benzonase, PEI-Zellulose F Dünnschichtchromatographiemembranen, EDTA, CDTA, NaCl, KCl, KH₂PO₃, K₂HPO₃, NaOH, KOH, Tris, SDS, β-Mercaptoethanol, APS, DTT, HCl, Methanol, NaCl, NaOH

New England Biolabs (Beverly, USA):

E. coli Zellen DH5 α F', Restriktionsenzyme und -Puffer, T4-DNA-Ligase und – Puffer, Deep Vent DNA Polymerase und Thmol Puffer, T7-DNA-Polymerase

Novagen (Bad Soden, BRD):

E. coli Stämme BL21 (DE3), pET-Vektoren

Promega (Mannheim, BRD):

Pfu-DNA-Polymerase

Quiagen (Hilden, BRD):

Plasmid Mini und Midi Kits, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAexII Gelextraktions Kit, PCR Purification Kit

Roche (Basel, CH):

ADP, ATP, Complete Protease Inhibitor Cocktail (ohne EDTA), DTT, DNA Standardmarker, Ampicillin, Proteinase K

Roth (Karlsruhe, BRD):

Polyacrylamid/0,8% Bisacrylamid (40%), SDS

Saliter (Obergünzburg, BRD)

Magermilchpulver

Schleicher & Schuell (Daßel, BRD):

Protran Nitrozellulose Transfer Membran

Serva (Heidelberg, BRD):

Aceton

Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA):

Kanamycin, Proteinstandardmarker, Lysozym, Ethanol, Glukose, Magnesiumacetat, PMSF, Titermax Classic Adjuvant

USB (Cleveland, USA):

Bovin Serum Albumin (BSA), Coomassie-Brilliant-Blau G-250, HEPES, Tris, Triton X-100, Tween-20

2.2 Geräte

Amersham/Pharmacia (Freiburg, BRD):

FPLC-System, SMART-System, MonoQ Säule (20 ml), 5ml Hi Trap Heparin-Säule, Phenylsepharose 20/10, Gelfiltrationssäulen: HiLoad 26/60 Superdex 200, HighPrep 26/60 S300, Superdex 200 PC 3.2/10, Superose 6, S-100 HR (High Resolution), Superose 75, Säulenmaterialien: 30 Q-Sepharose, DE52

Amicon (Beverly, USA):

Vakuumfiltrationseinheit (0,2 µm), Konzentrationskammern zur Zentrifugation (Centriprep, Centricon)

Beckman (München, BRD):

DU640 Spektrophotometer, GS-6R Zentrifuge mit GH-3.8 Ausschwingrotor, Avanti J-25 Zentrifuge, J6 MI Zentrifuge mit SS30 Rotor, Optima LE-80K Ultrazentrifuge mit 70 Ti und 45 Ti Rotoren

Bender & Hobein (Zürich, Schweiz):

Vortex

BIAcore (Freiburg, BRD):

BIAcore 2000 Biosensor

Bio-Rad (München, BRD):

Elektrophoresekammer MiniProtean II

Branson (Heusenstamm, BRD):

Ultraschallbad R103H

Eppendorf (Hamburg, BRD):

Zentrifugen 5415C und 5417R

Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)

Westernblot Apparatur Semi-Phor

Life Science (Freiburg, BRD):

Geltrockner SGD2000, Lyophilisator

Kodak (Stuttgart, BRD):

Filmentwickler X-Omat

Max-Planck-Institut, Zentralwerkstatt (München, BRD):

Agarosegel-Elektrophoresekammer

Mettler-Waagen (Gießen, BRD):

Elektronische Feinwaage AE160, Laborwaage Toledo PB602

Millipore (Eschborn, BRD):

Deionisierungsanlage MilliQPlus PF, Sterilfilter 0,45 µm Millex-HA

Misonix (Rockland, USA):

Ultraschallstab Ultrasonic Converter CL4, Ultrasonic Processor XL

Perkin Elmer (Weiterstadt, BRD):

GenAmp2400 und Cyclor480 Thermocycler

Savant (Holbrook, USA):

Geltrockner SGD300

2.3 Zellstämme, Plasmide und Proteine

Bakterienstämme:

DH5αF (Novagen)

***E. coli* XL1-Blue** (Stratagene)

BL21 DE3 (Novagen)

BL21 DE3 (pLys) (Novagen)

Archaea:

Methanosarcina mazei Gö1 wurde aus der DSMZ bezogen und wie in der Literatur beschrieben (Jussofi *et al.* 1986) kultiviert. Das Zellysat wurde freundlicherweise von Dipl. Biol. Angela Hirtreiter bereitgestellt.

Plasmide:

pET22b, pUC18 (beide Novagen)

pT29R mit der *MmPfd* Untereinheiten kodierenden DNA (A. Johann, U. Deppenmeier, Göttingen Genomic Laboratories)

pET22b mit *MmGroEL* oder *MmGroES* kodierender DNA (Dr. Daniel Klunker, MPI für Biochemie, Martinsried)

Primer:

MmPfd α

5'-GTAGCTGAGGAGTGAAGCATATGGCAGAAGTCAGTGAAGAGATCA
GGAATC-3'

5'-CTTTTCCTGAGGATCCGCTAGCTCATGCCTGGCCAGGTTGAATTT
TGCAG-3'

MmPfd β

5'-TGGACTCAGGTGAAAATCATATGACTTCAGAATTACCTCCTCAAAT
CC-3'

5'-TATGTGTAGAGGATCCGCTAGCTCATTGTGCTCTGGGCCCAAGAG
CCTGCT-3'

MmThs α

5'-CACACTAATAAGGAGGATTAACATATGGCAGGACAGCCAATATTCA
TT-3'

5'-CGGTTTTTCTCATGGATCCGCTAGCTCACATCATTCTGGTGGCA
TC-3'

MmThs β

5'-CATTATTTTCAGGAGGTTTCGTTTCATATGGATAAAGGTGGCCAGCCA
GTC-3'

5'-AGAATCCGGCTTAAGGATCCGCTAGCTCATCTGTGCATGTTTAGTG
CAGGT-3'

MmThs γ

5'-TCATTAAAAAGGAGATTGAACATATGGCAGCACAACCGATCTTTATAT
TAAG-3'

5'-TTAAGTTTTGATTTTAGGATCCGCTAGCTCACATCATGTCTTCCATGTC
GCC-3'

Proteine:

β -³⁵S-Aktin (*Mus musculus*) wurde freundlicherweise von Markus Stemp bereitgestellt.

GroES und GroEL aus *E. coli* stammten aus dem Proteinstock der Abteilung Zelluläre Biochemie des MPI für Biochemie, Martinsried (BRD).

Gekaufte Proteine:

Rhodanese, bovine liver mitochondrial (Sigma)

Lysozym aus Hühnereiweiß(Sigma)

Malate Dehydrogenase aus dem Schweineherzen (Sigma)

Luziferase, *Photinus pyralis* (Sigma)

Zitratsynthase, *Thermoplasma acidophilum* (Sigma)

Proteinase K, *Tritirachium album* (Roche)

Kulturmedien:

Luria-Bertani (LB) Medium pro Liter: 10 g Baktotrypton, 5 g Baktoyeast Extrakt und 5 g NaCl auf 1 l mit Wasser aufgefüllt und auf einen pH von 7,0 eingestellt.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium 15 g/l Baktoagar zugesetzt.

Puffer:

2 x Gelladepuffer (SDS-PAGE): 120 mM Tris pH 6,8, 200 mM DTT, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau

SDS Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 380 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v)

TAE: 40 mM Tris-HAc, 1 mM EDTA, pH 8,0

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,4 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ mit konz. HCl auf pH 7,4 einstellen

TB1: 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, pH-Einstellung auf pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure, Sterilfiltration, Lagerung bei -20°C

TB2: 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 10 mM MOPS, 15 % Glycerol, pH-Einstellung auf pH 6,5 mit 3 M KOH, Sterilfiltration, Lagerung bei -20°C

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Herstellung und Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Um chemisch kompetente *E. coli* Zellen herzustellen, wurden 50 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* Zellen angeimpft und die Kultur bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,3–0,5 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 2.500 g, 4°C), in eiskaltem TB1-Puffer aufgenommen, 5 min auf Eis gehalten und erneut pelletiert (10 min, 2.500 g, 4°C). Die Zellschlammung wurde anschließend in 2 ml eiskaltem TB2 Puffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden 50 µl Zellschlammung mit 0,05–0,2 µg gereinigtem Plasmid gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C für 40 sec erhitzt, 3 min auf Eis gestellt, in 1 ml LB Medium resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden antibiotikahaltige LB Agaroseplatten mit der Zellschlammung ausgestrichen und für 12-16 h bei 37°C inkubiert bis einzelne Zellkolonien sichtbar wurden.

2.4.2 DNA Analyse

Die DNA Konzentrationen wurden durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestimmt, wobei eine 50 µg/ml doppelsträngige DNA Lösung hat eine $OD_{260} = 1,0$ hat.

Zur Trennung von DNA wurden Gele hergestellt, die 1-2 % Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die Elektrophorese wurde in TAE Puffer bei einer Spannung von 70–100 V und einer Stromstärke von 15-30 mA durchgeführt (Ausubel *et al.* 1992). DNA Standardmarker diente zur Bestimmung der linearen DNA Fragmente.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Dazu wurden je 0,25 mM ATP, CTP, GTP, TTP, ca. 50 ng Matrizen-DNA, 2,5 U Pfu-DNA Polymerase oder Vent-DNA Polymerase, 15 pmol Primern und die vom Hersteller gelieferten Pufferlösungen verwendet. Zunächst wurde die Matrizen-DNA 1 min bei 96 °C denaturiert, um anschließend das gewünschte DNA-Segment in einem 20-30mal sich wiederholenden Zyklus zu amplifizieren.

PCR-Zyklus Protokoll:

Denaturierung:	30 sec bei 96°C
<i>Primer</i> -Anlagerung:	45-60 sec bei 45-65°C (je nach Schmelztemperatur des <i>Primers</i>)
Verlängerung:	2 min bei 72°C pro 1000 Basenpaare zu amplifizierender DNA

Die Reaktionslösung wurde nach den Amplifizierungszyklen 10 min bei 72°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gehalten.

2.4.4 Oligonukleotide und Sequenzierung

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, synthetisiert.

DNA-Sequenzierungen wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*1977) von der Firma Medigenomix, Martinsried, durchgeführt.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Gelelektrophorese

Die zu analysierenden Proteine wurden durch SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt (Laemmli 1970). Die Konzentration des Acrylamids im Sammelgel betrug 4 %. Je nach der Größe der zu analysierenden Proteine wurden Konzentrationen von 8 % bis 16 % Acrylamid im Trenngel verwendet. Der Quervernetzer Bisacrylamid wurde in einer Konzentration relativ zu Acrylamid von 0,8 % sowohl im Sammel- als auch im Trenngel verwendet.

Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 150-200 V und einer Stromstärke von 15-50 mA in einer Elektrophorese-Kammer (BioRad) durchgeführt.

Die Analyse von nativen Proteinen erfolgte mit nicht-denaturierende 4,5%igen PAGE-Gelen bei 4°C und wurde mit folgendem Puffer durchgeführt:

80 mM MOPS-KOH, pH 7,0, 1 mM MgCl₂.

2.5.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Konzentration von gereinigten Proteinen wurde mittels der berechneten molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt (ProtParam tool). Die Proteinkonzentration von Zellysaten oder Proteingemischen konnte mittels der Bradford-Methode (Bradford 1976) mit dem BioRad Protein Assay bestimmt werden. Dazu wurde ein Probenvolumen von 2-8 µl mit Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen verdünnt, mit 490 µl Bradfordreagenzlösung versetzt, kurz geschüttelt und 30 min bei 37° C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand einer BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Der Reinheitsgrad von Proteinen wurde durch SDS-PAGE kontrolliert. Dazu wurden die zu analysierenden Proben mit 5 x Lämmli-puffer versetzt, für ca. 4

min bei 95° C denaturiert und auf SDS-PAGE-Gelen aufgetragen. Die Anfärbung der Proteine erfolgte für 45 min in Coomassie-Färbelösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,25 % Coomassie Blau in Wasser). Das gefärbte Gel wurde daraufhin wiederholt mit Entfärbelösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in H₂O) gewaschen bis die gefärbten Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

2.5.3 Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper wurden gegen folgende Proteine in Kaninchen hergestellt: *MmGroEL*, *MmGroES*, *MmPfd β*, *MmThs β*, *MmThs γ*.

Eine Emulsion aus 0,5 mg Protein, gelöst in 300 µl Natriumphosphatpuffer (30 mM, pH 7,0), und 300 µl *Titermax Classic Adjuvant* (Sigma-Aldrich) wurde einem Kaninchen subkutan injiziert. In 4-wöchigen Abständen wurden Injektionen mit derselben Menge Antigen wiederholt. 10 Tagen nach der vierten Injektion wurden Testseren entnommen und auf die Anwesenheit des gewünschten Antikörpers mit *M. mazei* Zellysat und dem Antigen getestet. Die Injektionen wurden solange fortgesetzt bis die Seren den polyklonalen Antikörper in ausreichend hohem Titer enthielten.

2.5.4 Westernblot

Die Immunodetektion von Proteinen wurden nach der Westernblot-Methode (Towbin *et al.* 1979) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst auf einem Polyacrylamidgel getrennt. Der Transfer vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher&Schuell) der Porengröße 0,45 µm erfolgte im Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol) in einer Westernblot-Apparatur (Hoefer Scientific Instruments) bei einer Stromstärke von 150 mA für 45 min.

Die immunologische Detektion wurde mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Nitrozellulose-Membran wurde 45 min in TBS-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) mit 5 % Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem polyklonalen Antikörper in TBS Puffer (5.000-fachen Verdünnung) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie dreimal 10 min in TBS Puffer gewaschen und 40 min mit dem sekundären, HRP-gebundene (engl.: *horse-radishperoxidase*) Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma-Aldrich) in 1000-facher Verdünnung in TBS Puffer inkubiert. Die Membranen wurden dreimal gewaschen und mit den beiden ECL Lösungen kurz inkubiert. Durch die Exposition auf einem Film (Amesham Bioscience) konnten sie Signale visualisiert werden.

2.5.5 Gelfiltrationsanalysen

Zu analysierende Proteinlösungen wurden auf einer Superdex 200 oder auf einer Superose 6 Gelfiltrationssäule (beide Pharmacia) in Aliquots von 50-100 μ l aufgetragen. Die Gelfiltration fand bei Raumtemperatur statt, die Flussrate betrug 40 μ l/min und Fraktionsvolumina von 100 oder 200 μ l wurden gesammelt. Die Säulen wurde mit folgenden Proteinmarkern kalibriert: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (460 kDa), Katalase (206 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA (67 kDa), Karbon-Anhydrase (29 kDa) und α -Lactalbumin (14 kDa) (alle Pharmacia).

2.6 Klonierung und Expression von Chaperone aus *M. mazei*

2.6.1 Klonierung von *MmPfd* α und *MmPfd* β

Die *MmPfd* α und *MmPfd* β Gene wurden aus der *M. mazei* Genom-Bibliothek (U. Deppenmeier, A. Johann, Göttingen Genomic Laboratorys) erhalten.

Die Gene wurden mittels einer PCR mit den in Kapitel 2.3. beschriebenen Primern amplifiziert. Das originale archaeelle Stop-Codon TAA wurde durch das Codon TGA ersetzt. Zusätzlich wurde eine 5´ NdeI Schnittstelle sowie je eine NheI und eine BamHI Restriktionsschnittstelle am 3´ einkloniert.

Das PCR-Produkt wurde zunächst in dem Vektor pUC18 subkloniert. Der Vektor wurde in DH5 α -Zellen transformiert und die Zellen kultiviert. Das Plasmid wurde isoliert und mit NdeI- und BamHI-Restriktionsnukleasen verdaut. Das Gen wurde mittels Agarosegel gereinigt und mit einer T4 Ligasereaktion in das pET22b Plasmid ligiert. Dieses pET22b Plasmid wurde in BL21 (DE3) Zellen transformiert.

2.6.2 Klonierung des *MmPfd* Komplexes

Das *MmPfd* β Gen enthaltende pET 22b Plasmid wurde mit den XbaI- und BamH1- Restriktionsnukleasen verdaut und das *MmPfd* β Gen gereinigt.

Das pET22b Plasmid, das das *MmPfd* α Gen enthielt, wurde mit den NheI- und BamH1- Restriktionsnukleasen verdaut und mit dem *MmPfd* β Gen in einer T4 Ligasereaktion ligiert. Das pET 22b Plasmid, das beide *MmPfd*-Untereinheiten kodiert, wurde in DH5 α Zellen transformiert. Anschließend wurden die Zellen kultiviert, das Plasmid isoliert und in BL21 (DE3) Zellen transformiert.

2.6.3 Klonierung der *MmThs* Untereinheiten α , β und γ

Die Gene für die *MmThs* Untereinheiten α , β und γ wurden aus der *M. mazei* Genom-Bibliothek (U. Deppenmeier, A. Johann, Göttingen Genomic Laboratories) erhalten.

Mittels PCR wurden die Gene mit den in Kapitel 2.3 beschriebenen Primern amplifiziert. Das originale archaeelle Stop-Codon TAA wurde durch das Codon TGA für alle drei Untereinheiten ersetzt. Im Falle der *MmThs* γ Untereinheit war es notwendig, das Startcodon TTG durch ATG zu ersetzen. Das PCR-Produkt wurde zunächst in dem Vektor pUC18 subkloniert. Der Vektor wurde in DH5 α -Zellen transformiert und die Zellen kultiviert. Das Plasmid wurde isoliert und 5' an einer NdeI, bzw. 3' an einer NheI Schnittstellen mit den entsprechenden Restriktionsnukleasen verdaut. Das Gen wurde mittels Agarosegel gereinigt und mit einer T4 Ligasereaktion in das pET22b Plasmid ligiert. Dieses pET22b Plasmid wurde anschließend in BL21 (DE3) Zellen transformiert.

2.6.4 Expression von *M. mazei* Chaperonen

Die transformierten BL21 (DE3) Zellen wurden bei 37°C in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin kultiviert. Bei einer optischen Dichte (600 nm) von O.D. = ~0,7 wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von 1mM IPTG für 3-4 h induziert. Die Zellen wurden pelletiert und in folgendem Puffer lysiert:

50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 1x Complete Protease Inhibitor (Roche), 0,1 mg/ml Lysozym (46.400 U/mg, Aldrich-Sigma)

Die Zellen wurden durch Sonifikation (Misonix sonifier) auf Position 4 im Puls-Modus aufgeschlossen. Durch Zugabe von 0,1 μ l/ml Benzonase (250 U/ μ l, Merck) wurden die freigewordenen Nukleinsäuren bei 4°C während 20 min verdaut. Durch zwei Zentrifugationschritte bei 4°C von 20 min mit 50.000 g und 1 h bei 100.000 g wurden die löslichen Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt.

Die *M. mazei* Chaperonen wurden anschließend wie im folgenden Kapitel beschrieben gereinigt.

2.7 Reinigung von *M. mazei* Chaperonen

Die Reinigung aller *M. mazei* Chaperonen wurden bei 4°C mit einer FPCL-Anlage durchgeführt. Jede benutzte Säule wurde vor dem Auftragen des zu reinigenden Proteins im verwendeten Laufpuffer äquilibriert. Nach jedem Säulentrennung wurden die gesammelten Fraktionen durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Alle gereinigten Proteine wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7.1 Reinigung von *MmGroEL* und *MmGroES*

Das Zellysat wurde auf eine DE52-Säule (Whatman) aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden in dem Laufpuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM DTT) mit einem NaCl-Gradienten von 0-1 M eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden über Nacht gegen den Puffer (25 mM Histidin-HCl pH 5,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) dialysiert und auf eine Source30Q-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die Elution erfolgte in dem Laufpuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM DTT) mit einem NaCl-Gradienten von 10-500 mM. Die gesammelten Fraktionen wurden wiederum über Nacht gegen den Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM DTT) dialysiert und auf eine Heparin-HiTrap-Säule aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden in dem Laufpuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM DTT) mit einem Salzgradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Als letzter Reinigungsschritt wurden die gesammelten Fraktionen über eine Gelfiltrationssäule (S-300 HR 26/60, Pharmacia) nach ihrer Größe getrennt. Folgender Laufpuffer wurde dabei verwendet: 20 mM MOPS-NaOH pH 7,4, 100 mM NaCl, 10% Glycerin.

Das gereinigte Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Reinigung der *MmPfd* β Untereinheit

Der Überstand des Zellysates wurde auf eine DE52 Säule (Whatman) aufgetragen. Das gebundene Protein wurde in einem NaCl-Gradienten von 10-800 mM im Laufpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM DTT) eluiert und die *MmPfd* β enthaltene Fraktionen auf 5 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine Superose 75 Säule aufgetragen und im Puffer (40 mM MOPS, pH 7,4, 400 mM NaCl) gelfiltriert. Das gereinigte Protein wurde konzentriert, aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.7.3 Reinigung des *MmPfd* Komplexes

Der Überstand des Zellysates wurde auf eine Sepharose-30Q Säule aufgetragen und das Protein wurde in einem NaCl-Gradienten von 10-800 mM NaCl im Laufpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM DTT) eluiert. Die *MmPfd* enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht gegen den Puffer (25 mM Histidin-HCl, pH 5,8, 30 mM NaCl) dialysiert, auf eine Heparin-Sepharose HiTrap Säule aufgetragen und in einem Salzgradienten von 10-600 mM NaCl im Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM DTT) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden erneut über Nacht gegen den Puffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 1,5 M (NH₄)₂SO₄) dialysiert und auf eine Phenylsepharose Säule aufgetragen. Die Proteine wurden im Salzgradienten 1,5 M-0 M (NH₄)₂SO₄ im Puffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0) eluiert. Beim Aufkonzentrieren der *MmPfd* Fraktionen fiel das reine *MmPfd* Komplex aus und wurde daraufhin vom Überstand getrennt. Das Präzipitat löste sich über Nacht bei 4°C im Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) auf. Das gereinigte *MmPfd* Komplex wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.7.4 Reinigung der *MmThs* α , β und γ Untereinheiten

Der Überstand des Zellysates wurde auf eine Source30Q Ionenaustauscher-Säule aufgetragen und im Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol) mit dem Salzgradienten 50-500 mM NaCl eluiert. Monomere *MmThs* Untereinheiten eluierten bei einer Salzkonzentration von ~180 mM NaCl, Komplexe eluierten bei ~250 mM NaCl. Die Monomere enthaltenden Fraktionen wurden konzentriert und im Verhältnis 1:6 im Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM β -Mercaptoethanol) verdünnt und auf vier hintereinander geschalteten Heparin-Sepharose HiTrap Säulen aufgetragen. Die gebundene *MmThs* Untereinheit wurde im Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM β -Mercaptoethanol) mit dem Salzgradienten 0,05-1,0 M NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden konzentriert und auf eine Sephacryl S300 HR Säule aufgetragen und im Laufpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 10 % Glycerin) gelfiltrierte. Das gereinigte Protein wurde konzentriert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.8 Assemblierung des *M. mazei* Thermosom-Komplex

Zur Assemblierung des *M. mazei* Thermosom-Komplexes (*MmThs*) wurden die gereinigten *MmThs*-Untereinheiten α , β und γ in einem molaren Verhältnis 2:1:1 gemischt (Endkonzentration des *MmThs* Komplex: 10 μ M). Die Assemblierung der Untereinheiten wurde durch Zugabe von 2 mM ATP zum Assemblierungspuffer (200 mM NH_4 -Acetat, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl_2) initiiert. Diese Assemblierungslösung wurde 45 min bei 32°C inkubiert. Nicht assemblierte *MmThs*-Untereinheiten wurden vom *MmThs*-Komplex durch eine Gelfiltration bei Raumtemperatur getrennt. Verwendet wurde eine Superose 6 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) und als Laufpuffer diente der Assemblierungspuffer. Die Fraktionen, die den *MmThs*-Komplex enthielten, wurden vereint, der Komplex konzentriert und die Konzentration des Proteins mittels des berechneten molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Der

MmThs-Komplex wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt und zügig weiterverwendet.

2.9 Funktionelle Analysen

2.9.1 ATPase-Aktivität

Zur Messung der ATPase-Aktivität wurde das zu untersuchende Chaperonin in einer Endkonzentration von 1 μ M in Puffer (20 mM MOPS, pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) gebracht, der wahlweise unterschiedliche Mengen Ammoniumsulfat enthielt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurde das Aliquot (10 μ l) des Nullzeitpunktes genommen. Durch Zugabe von ATP (2 mM Endkonzentration) wurde die Reaktion gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μ l Aliquots entnommen und mit CDTA (2 mM Endkonzentration) gestoppt. Die Aliquots wurden anschließend mit 300 μ l Malachit-Grün Farbstofflösung versetzt. Nach einer Minute bei 37°C wurde durch Zugabe von 40 μ l einer 37%igen Zitronensäurelösung die Farbreaktion gestoppt (Lanzetta 1979). Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 640 nm bestimmt.

2.9.2 Chaperonaktivität der *M. mazei* Chaperone

Um die Chaperonaktivität der zu untersuchenden Proteinen nachzuweisen, wurden die Modellsubstrate Rhodanese und Luziferase (beide Sigma) verwendet.

Die Proteine wurden im Puffer (6 M Guanidium-HCl, 20 mM MOPS-KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT) in einer Endkonzentration von 50

μM bei Raumtemperatur 45 min lang denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden anschließend 100-fach in Ab- oder Anwesenheit unterschiedlicher Mengen von Chaperonen im Puffer (20 mM MOPS-KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2) verdünnt. Die Aggregatbildung wurde daraufhin bei 30°C während 10 min verfolgt. Dabei wurde die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 320 nm in einem Spektrophotometer (DU640 Beckmann) gemessen.

2.9.3 Rückfaltung von Rhodanese

Denaturierte Rhodanese (aus: bovine liver mitochondrial) wurde in Puffer (20 mM MOPS pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2) auf eine Konzentration von 0,5 μM in An- oder Abwesenheit von 0,5 μM GroEL verdünnt. Der Ansatz wurde 3 min bei 37°C inkubiert, um eine Bindung des Substrates an GroEL zu ermöglichen. Anschließend wurde kurz zentrifugiert, um mögliche Aggregate abzutrennen. GroES wurde in einer Endkonzentration von 1 μM hinzugegeben und die Reaktion bei 37°C mit 2 mM ATP gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 60 μl Aliquots entnommen und 3 min bei Raumtemperatur mit 140 μl der folgenden Lösung inkubiert: 70 mM KCN, 60 mM KH_2PO_4 , 70 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 15 mM CDTA (pH 8,0). Durch Zugabe von 100 μl einer 15 % Formaldehydlösung wurde die native Rhodanese inaktiviert. Daraufhin wurde die Lösung mit 300 μl einer Eisennitratlösung versetzt und kurz zentrifugiert. Die Absorption wurde bei 460 nm gemessen (Horowitz 1995).

2.9.4 Rückfaltung von Malat Dehydrogenase

Malat Dehydrogenase (aus Schweineherzen) wurde 30 min bei Raumtemperatur in einer Endkonzentration von 50 μM im Denaturierungspuffer (3,0 M Guanidium-HCl, 20 mM MOPS-KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM DTT) entfaltet.

Denaturierte Malat Dehydrogenase wurde 50fach in Puffer (20 mM MOPS-KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂) in An- oder Abwesenheit von Ammoniumsulfat, von GroEL (1 μM) und von GroES (2 μM) verdünnt. Diese Lösung wurde 3 min bei 37°C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Durch Zugabe von ATP (5 mM) wurde die Rückfaltung bei 37°C initiiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben von 10 μl entnommen und entweder sofort oder erst nach einer Stunde spektrometrisch vermessen. Im zweiten Fall wurde eine CDTA-Lösung (2 mM) zugegeben und die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die enzymatische Aktivität der nativen Malat Dehydrogenase wurde durch Zugabe von 400 μl eines Reaktionsmixes (220 μM β-NADH, 550 μM Oxalacetat, 1 mg/ml BSA, 1 mM CDTA) nachgewiesen (Hayer-Hartl 1999). Dazu wurde die Abnahme der Absorption von β-NADH 50 sec lang (25 °C) spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 320 nm verfolgt. Anhand der negativen Steigung konnte die Enzymaktivität berechnet werden.

2.9.5 Gelfiltrationsexperimente

Chaperonin-Substrat-Komplexe wurden mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Nach 5 und 45 min Rückfaltung wurden Aliquots von 50 μl aus den Faltungsansätzen entnommen. Durch Zugabe von Glukose in einer Endkonzentration von 25 mM und Hexokinase in einer Endkonzentration von 0,3 U/μl wurde eine weitere Faltung der Substrate unterbunden und gleichzeitig die Dissoziation der Chaperonin-Substrat-Komplexe verhindert. Die Proben wurden anschließend auf eine Superose 6 3.2/30 Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit dem Laufpuffer (20 mM MOPS, pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) eluiert. Die Elution der Proteine wurde mittels UV bei 280 nm detektiert. Die 100 μl Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Chaperonine und das Substrat in den einzelnen Elutionsfraktionen wurden durch Coomassie-Färbung oder Western Blot Analyse nachgewiesen.

Die Aktivität von Rhodanese wurde ermittelt, indem 50 µl pro Fraktion nach der im Kapitel 2.9.3 beschriebenen Methode einem Aktivitätsassays unterzogen wurden.

2.9.6 Proteinase K Verdau

Denaturierte Malat Dehydrogenase (MDH) wurde in einer Endkonzentration von 0,5 µM mit einer equimolaren Mengen GroEL in Puffer (20 mM MOPS pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 5 min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. GroES (1 µM) und AMPPNP (2 mM) wurde zum Überstand hinzugefügt und der Ansatz für weitere 5 min bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 µg/ml Proteinase K (*Tritirachium album*, Roche) wurde der Verdau bei 25°C gestartet. 20 µl Aliquots wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und durch Zugabe von 1 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) wurde der Verdau inhibiert. Die Aliquots wurden mittels SDS-PAGE analysiert und der MDH-Verdau durch Western Blot mit einem spezifischen MDH-Antikörper nachgewiesen.

2.9.7 Analyse von *MmPfd*-Substrat Komplexe

Denaturierte Rhodanese bzw. Aktin (1 µM Endkonzentration) wurden in Anwesenheit von 2 µM *MmPfd* in folgendem Puffer verdünnt:

20 mM MOPS, pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

Diese Reaktionslösung wurde 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Der Überstand wurde auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen und die gesammelten Fraktionen immunologisch auf die Anwesenheit von *MmPfd*, Aktin und Rhodanese analysiert. Als Kontrolle wurde 1 µM nativer und denaturierter Rhodanese in Puffer in Abwesenheit von *MmPfd* verdünnt.

2.9.8 Transfer entfalteter Rhodanese von *MmPfd* auf ein *M. mazei* Chaperonin

Denaturierte Rhodanese (0,5 μM) wurde mit *MmPfd* (1,0 μM) 10 min bei 37°C im Puffer (20 mM MOPS, pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) präinkubiert. Diese Lösung wurde anschließend zentrifugiert, um sie von möglichen Proteinaggregaten zu befreien, und mit *MmThs* bzw. *MmGroEL* (je 1,0 μM) 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf eine Superose 6 3.2/30 (Pharmacia) Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und auf die Anwesenheit von Rhodanese, *MmPfd* und *MmGroEL* oder *MmThs* immunologisch oder durch Anfärben des Gels getestet.

2.9.10 Chaperonin-vermittelte Rückfaltung von *MmPfd* gebundener Rhodanese

Denaturierte Rhodanese (50 μM) wurde 100-fach in Rückfaltungspuffer verdünnt (20 mM MOPS-KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2). Der Puffer enthielt entweder 1,0 μM *MmPfd* oder in einem Kontrollexperiment das *MmGroEL*/*GroES* Chaperoninsystem. Aggregate wurden pelletiert (14.000 rpm, 10 min, Raumtemperatur). Nach Zugabe von 5 mM ATP, erfolgte die Entnahme nach den angegebenen Zeitpunkten bei 37°C. Die Zugabe von *MmGroEL* (1,0 μM) und *MmGroES* (2,0 μM) zur *MmPfd* enthaltene Reaktionslösung erfolgte nach 15 min. Die Aliquots wurden anschließend auf Rhodaneseaktivität (Kapitel 2.9.3.) untersucht. Die Ergebnisse sind im Verhältnis zu einem Kontrollexperiment mit nativer Rhodanese angegeben.

2.10 Bioinformatische Methoden

2.10.1 Sequenzanalyse

Die vergleichende Sequenzanalyse erfolgte durch BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

BLAST steht für Basic Local Alignment Search Tool und ist eine Methode um innerhalb der Datenbanken nach bestimmten Nukleotid- oder Proteinsequenzen zu suchen. Es handelt sich um eine Zusammenstellung verschiedener Suchprogramme, die entwickelt wurden, um alle zugänglichen Datenbanken nach entsprechenden Sequenzen zu durchsuchen (Altschul *et al.* 1997). Die BLAST-Suchen in der vorliegenden Arbeit wurden mit der BLAST-Option auf dem NCBI-Server durchgeführt (National Centre of Biological Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) sowie des Sanger Centres (<https://www.sanger.ac.uk/>). Das BLAST-Programm ist für eine maximale Geschwindigkeit ausgelegt, wobei selbst weit entfernte Sequenzen noch berücksichtigt werden. Die von BLAST berechneten Treffer basieren auf einer definierten statistischen Interpretation, wodurch es vereinfacht wird wahre Treffer von Zufallstreffern zu unterscheiden. BLAST benutzt dabei einen Algorithmus, der lokale Sequenzähnlichkeiten berücksichtigt anstelle von globalen Vergleichen. Dadurch ist es möglich auch Verwandtschaften zu Spezies zu finden, die lediglich Ähnlichkeiten in einzelnen isolierten Regionen der gesuchten Sequenz aufweisen.

Das Alignment der Prefoldin Untereinheiten wurde mit der *multialin interface page* mit dem Programm „Blosom62-12-2“ (Henikof und Henikof 1992) durchgeführt. Multialin erstellt einen multiplen Sequenzvergleich von einer Gruppe verwandter Sequenzen, indem es progressiv paarweise Alignments durchführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) (Corper 1988).

2.10.2 Strukturvorhersage von „coiled coil“ Strukturen

Die Vorhersage zur Bildung von „coiled coil“ Strukturen innerhalb der *MmPfd*-Untereinheiten konnten mit dem COILS Server ermittelt werden (https://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html; (Lupas *et al.* 1991)). Dabei werden die zu untersuchenden Sequenzen mit einer Datenbank aus Sequenzen verglichen, die „coiled coil“ Strukturen bilden.

2.11 Biophysikalische Methoden

2.11.1 Massenspektroskopie

Die massenspektroskopische Analyse von *MmGroEL* und *MmGroES* wurde in Zusammenarbeit mit Monica Zobawa (Abteilung Proteinchemie, Max Planck Institut für Biochemie) durchgeführt.

Das zu analysierende Protein (1,5 µg/µl) wurde über Nacht bei 37°C mit Trypsin (0,015 µg/µl) in einem 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) Puffer verdaut. Der Verdau wurde anschließend in einem Proteomics analyser 4700 (MALDI-TOF/TOF, Applied Biosystems, Darmstadt, BRD) untersucht. Als Matrix diente eine alpha-Matrix (α-Cyano-4-Hydroxy-Zimmtsäure). Die MALDI-MS Messungen wurden mit einem 355 nm Nb-Laser durchgeführt.

2.11.2 Elektronenmikroskopie

Die beiden Chaperonine von *M. mazei* wurden in Zusammenarbeit mit Günther Pfeiffer, Max-Planck-Institut für Biochemie, elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Chaperonine wurden mit einer Uranyl-Acetat Lösung (50 µg/ml) negativ gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem CM 20 FEG Philips Elektronenmikroskop, das mit einer 2000 x 2000 CCD-Kamera mit einer nominalen 47.000-fachen Vergrößerung ausgestattet ist. Um Standard-Korrelations-Methoden anwenden zu können, wurden 785 *MmGroEL* und 345 *MmThs* Moleküle ausgewählt.

2.11.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Das Assoziations- und Dissoziationsverhalten von GroEL mit seinem Kofaktor GroES wurden in Zusammenarbeit mit Michael Kerner, Max-Planck-Institut für Biochemie, untersucht. Alle Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Experimente wurden an einem BIAcore 2000 Gerät mit NTA-Biosensor Chips durchgeführt (Nieba-Axmann *et al.* 1997). Die Flussrate betrug 20 µl/min bei 37°C. Folgende Puffer wurden verwendet:

Puffer A: 20 mM MOPS, pH 7,4, 100 mM KCl, 2 mM ATP

Puffer B: Puffer A + 500 mM (NH₄)₂SO₄

Wahlweise wurde *EcGroES* oder *MmGroES* mit C-terminalen His-Tag₆ an einen NTA-Biosensor Chip gebunden und dessen Interaktion mit *EcGroEL* oder *MmGroEL* untersucht. Nach jeder Messung wurden NTA-Biosensor Chips 3 min lang mit 350 mM EDTA (pH 8,3) gewaschen und anschließend 1 min lang mit 0,5 mM NiCl₂ regeneriert. GroES-His₆ wurden 1-2 min lang in einer Konzentration von 30 nM bis zu einer Einheit von 25 RU (*response units*) immobilisiert, wobei *MmGroES* und *EcGroES* auf verschiedene Flusszellen aufgetragen wurden. GroEL wurde in Puffer A oder Puffer B, wie im Ergebnisteil erläutert, über die Flusszellen geleitet, wobei die Assoziation 8 min und die Dissoziation 15 min betrug.

3 Ergebnisse

3.1 Gruppe I Chaperoninsystem von *M. mazei*

Um eine eingehende funktionelle Untersuchung von *MmGroEL* und *MmGroES* zu ermöglichen, wurden die beiden Proteine rekombinant in *E. coli* BL21 DE3 Zellen exprimiert und gereinigt. Das SDS-PAGE Gel (Abb. 11) zeigt jeweils 4 µg gereinigtes rekombinantes *MmGroEL* und *MmGroES*. Als Vergleichsproteine dienen dieselbe Menge an *EcGroEL* bzw. *EcGroES*.

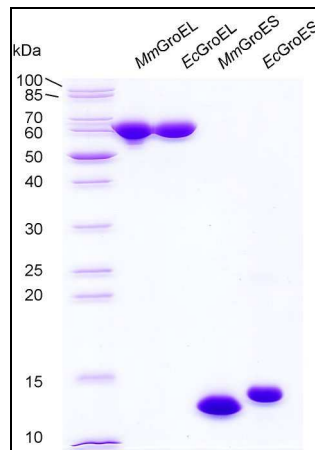


Abbildung 11. SDS-PAGE Gel von gereinigtem *MmGroEL* und *MmGroES*. Gezeigt ist ein Coomassie Blue gefärbtes PAGE Gel mit jeweils 4 µg gereinigtem *MmGroEL* und *MmGroES*. Als Vergleichsproteine dienen jeweils 4 µg *EcGroEL* bzw. *EcGroES*.

Die Reinheit beider Proteine wurde massenspektroskopisch untersucht, um sicher zu stellen, daß während der Reinigung von *MmGroEL* und *MmGroES* kein *EcGroEL* bzw. *EcGroES* mitgereinigt wurde. Die ermittelte Masse stimmte mit dem theoretisch errechneten Molekulargewicht von *MmGroEL* und *MmGroES* überein. Weder in der *MmGroEL*- noch in der *MmGroES*-Präparation konnten Kontaminationen des jeweiligen bakteriellen Proteins detektiert werden.

3.1.1 *MmGroEL* ist ein oligomerer Komplex mit 7-facher Symmetrie

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die 7-fache Symmetrie des oligomeren *MmGroEL* (Abb. 12 A). Diese Abbildung entstand durch Mittelung von 785 Molekülen. In Abbildung 12 B ist in den Seitenansichten einzelner *MmGroEL*-Komplexen die Doppelringstruktur des Homotetradekameren zu erkennen (Pfeile). Dies deutet wie zu erwarten auf eine konservierte Struktur des archaeellen Gruppe I Chaperonins hin. Bei elektronenmikroskopischer Auflösung sind *MmGroEL* und *EcGroEL* nicht zu unterscheiden (Saibil *et al.* 1991).

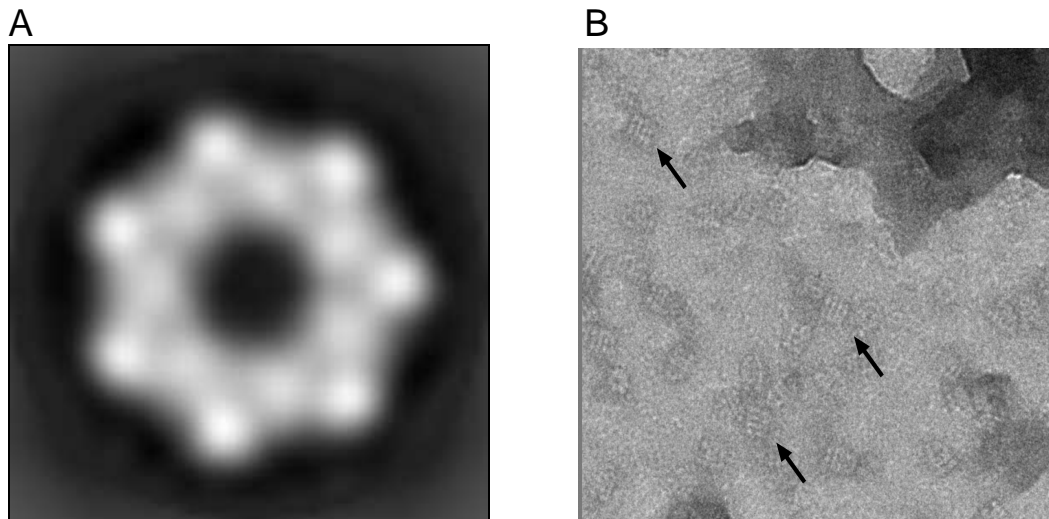


Abbildung 12. EM-Aufnahmen des archaeellen *MmGroEL*. (A) Mittelung der Aufsicht von 785 *MmGroEL* Molekülen. Deutlich ist eine 7-fache Symmetrie zu erkennen. (B) Seitenansicht von einzelnen *MmGroEL* Molekülen. Erkennbar ist die Doppelringstruktur. Die Untereinheiten des archaeellen GroEL assemblieren zu einem heptameren Doppelring, analog dem des *EcGroEL*. *MmGroEL* (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$) wurde mit 2 % (Gewicht/Volumen) Uranyl-Acetat markiert.

3.2 Funktionelle Charakterisierung von *MmGroEL* und *MmGroES*

3.2.1 *MmGroEL* verhindert die Aggregation denaturierter Rhodanese

Die Stabilisierung von nicht-gefalteten Proteinen und die Verhinderung der Aggregatbildung gelten als allgemeine Merkmale molekularer Chaperone. Aggregationsassays dienen daher dem Nachweis der Chaperonaktivität. Die Chaperon-Eigenschaft von *MmGroEL* wurde anhand des Modellsubstrates Rhodanese aus Rinderlebermitochondrien (33 kDa) in einem Lichtstreuungsexperiment getestet.

Proteinaggregate haben die Eigenschaft eingestrahktes Licht zu streuen, wohingegen lösliche Proteine nur zu einer geringen Lichtstreuung führen. Die Anwesenheit von Proteinaggregaten kann ermittelt werden, da Lichtstreuung zu einer Abnahme der Lichtintensität des eingestrahkten Lichtes führt. Diese Abnahme kann spektrometrisch gemessen werden. Die Streuung hängt bei einem Aggregationsassay von den Konzentrationen des aggregationsanfälligen Substrats und des Chaperons ab.

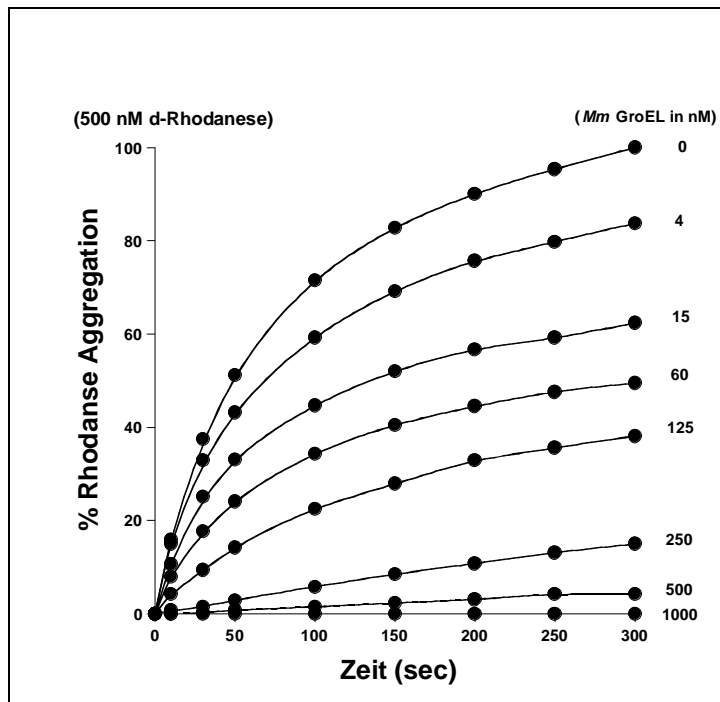


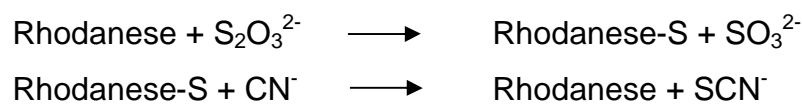
Abbildung 13. *MmGroEL* verhindert wirkungsvoll die Aggregation denaturierter Rhodanese. Denaturierte Rhodanese wurde in einer Endkonzentration von 0,5 μ M in Puffer verdünnt, der unterschiedliche Mengen an *MmGroEL* enthielt. *MmGroEL* verhindert die Bildung von Aggregaten denaturierter Rhodanese in einer konzentrationsabhängigen Weise. Bei equimolaren Mengen Chaperonin wurde die Aggregation vollständig verhindert. Lichtstreuung bei 320 nm diente zum Nachweis der Aggregatbildung.

Bei den in Abbildung 13 gezeigten Messungen wurde denaturierte Rhodanese in eine Pufferlösung verdünnt, die unterschiedliche Konzentrationen an *MmGroEL* enthielt. Die Aggregation wurde 5 min lang bei Raumtemperatur verfolgt. Mit zunehmender Konzentration an *MmGroEL* wird die Aggregation der Rhodanese verhindert. Bei einer equimolaren Konzentration des Chaperonins zu Rhodanese wird die Aggregation komplett verhindert. In einer Kontrollreaktion wurde BSA anstelle von *MmGroEL* eingesetzt, welches nicht in der Lage war die Aggregation von Rhodanese zu verhindern (Daten nicht gezeigt).

Somit ist gezeigt, daß *MmGroEL* die typische Chaperoneigenschaft der Aggregationsverhinderung aufweist. *MmGroEL* ist in dieser Eigenschaft dem GroEL aus *E. coli* vergleichbar (Martin *et al.* 1991).

3.2.2 *MmGroEL* und *MmGroES* vermitteln die Faltung denaturierter Rhodanese

Thiosulfat:Zyanit-Sulfurtransferase (Rhodanese) aus Mitochondrien von *Bos bovis* ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. Es besteht aus zwei strukturell homologen Domänen, die das katalytische Zentrum einschließen. Im aktiven Zentrum hat die Aminosäure Cystein 247 eine zentrale Bedeutung (Ploegman 1978). Rhodanese katalysiert den Schwefel-Transfer von Thiosulfat auf Zyanit. Diese katalytische Reaktion kann in zwei Schritte unterteilt werden:



Die Aktivität der Rhodanese kann durch den kolorimetrischen (460 nm) Nachweis des bei der Reaktion entstandenen SCN^- als farbigen Eisenrhodanid-Komplex gemessen werden. Die zeitabhängige Produktion von SCN^- ist ein Maß für die Rückfaltungsrate von Rhodanese.

Rhodanese diente erfolgreich in vielen Studien als Modellsubstrat des Gruppe I Chaperonins GroEL aus *E. coli* (*EcGroEL*). Es konnte gezeigt werden, daß *EcGroEL in vitro* die Rückfaltung von Rhodanese in einer *EcGroES*- und ATP-abhängigen Weise assistiert (Martin *et al.* 1991). Die Fähigkeit die Faltung denaturierter Proteine zu vermitteln, ist eine typische Eigenschaft der Chaperonine und sollte nun auch für das archaeele *MmGroEL* ermittelt werden.

Denaturierte Rhodanese wurde in eine Pufferlösung verdünnt, die äquimolare Mengen *MmGroEL* und einen zweifachen molaren Überschuss an *MmGroES* enthielt. Die Rückfaltungsreaktion wurde durch Zugabe von ATP gestartet (Abb. 14).

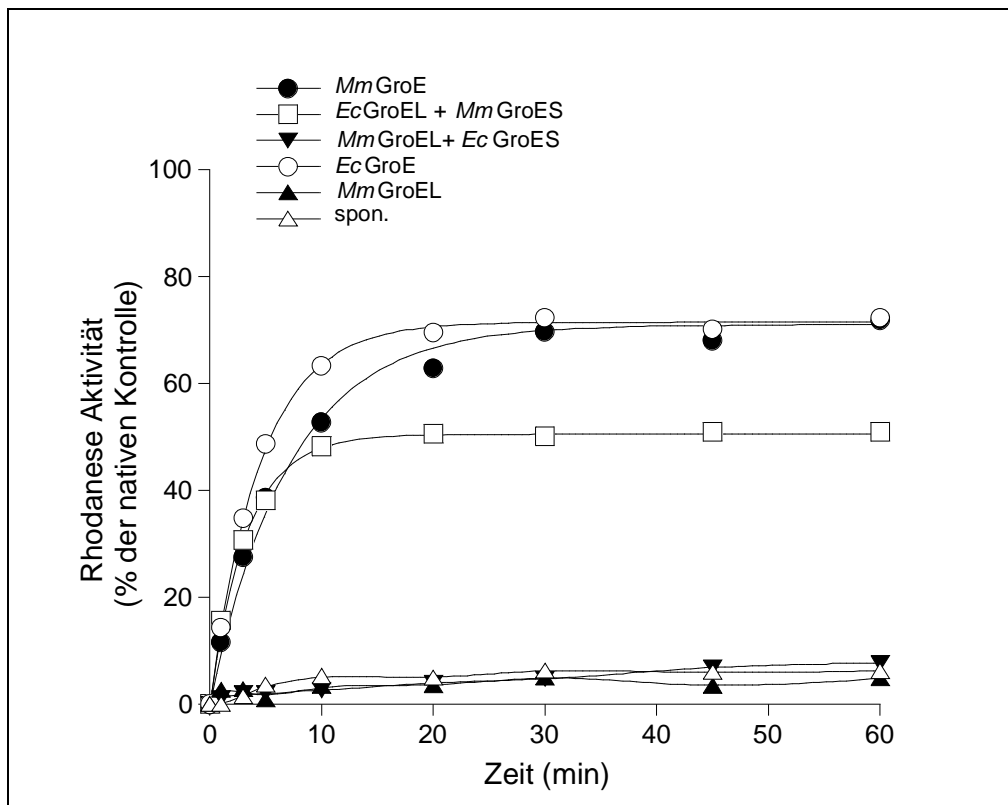


Abbildung 14. Das *MmGroE*-System assistiert die Faltung denaturierter Rhodanese. *MmGroEL* vermittelt die Faltung denaturierter Rhodanese in Kooperation mit *MmGroES* in einer ATP-abhängigen Reaktion. 0,5 μM denaturierte Rhodanese wurde mit 0,5 μM *MmGroEL* inkubiert. Die Faltungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 μM GroES und 5 mM ATP gestartet. Die Rhodaneseaktivität ist in % der Aktivität von 0,5 μM nativer Rhodanese wiedergegeben.

Die Abbildung 14 zeigt den Zeitverlauf der Rückfaltung von Rhodanese. Das archaeele Gruppe I Chaperoninsystem ist in der Lage, die Faltung von Rhodanese mit der gleichen Effizienz zu vermitteln wie das bakterielle Chaperoninsystem. Es wird eine Rückfaltungseffizienz von 70 % im Vergleich zur nativen Rhodanese erreicht. Auffällig ist jedoch die langsamere Rückfaltungskinetik im Vergleich zu *EcGroEL/ES*. $T_{1/2}$ beträgt für das *MmGroE* System $t_{1/2}$ 5,7 min im Vergleich zu $t_{1/2}$ 3,3 min für das *EcGroE*-System. Das archaeele Chaperoninsystem weist damit eine um ca. 70 % langsamere Faltungsrate für Rhodanese auf. In Abwesenheit von *MmGroES* oder ATP wird keine Rückfaltung beobachtet.

Somit ist gezeigt, daß *MmGroEL* ein Chaperonin ist, das mit seinem Kofaktor *MmGroES* in einer ATP-abhängigen Reaktion die Faltung von denaturierter Rhodanese vermittelt.

Ein Sequenzvergleich der bakteriellen und archaeellen GroEL sowie der beiden GroES-Proteine zeigt eine hohe Homologie. Es war naheliegend zu untersuchen, ob und inwieweit ein Austausch der GroES-Proteine die Funktionalität der Rückfaltungssystemen erlaubt. Abbildung 14 zeigt, daß die Kombination aus *EcGroEL* mit *MmGroES* aktiv ist. Allerdings beträgt die Menge an rückgefalteter Rhodanese nur ca. 50 % im Vergleich zur nativen Rhodanese. Die Rückfaltung ist somit um ca. 20 % weniger effizient als mit dem bakteriellen Chaperonin. Die Rückfaltungsrates beträgt $t_{1/2}$ 4,3 min und ist vergleichbar mit dem bakteriellen Chaperoninsystem, aber schneller als das reine archaeelle Chaperoninsystem. Interessanterweise ist die Kombination aus *MmGroEL* und *EcGroES* nicht in der Lage die Faltung von Rhodanese zu unterstützen. Rhodanese-Aktivität konnte in diesem Fall nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 ATPase-Aktivität von *MmGroEL*

Zur weiteren Charakterisierung von *MmGroEL* wurde die ATPase Aktivität des Chaperonins untersucht.

Die ATPase Aktivität wird in einem Versuch bestimmt, bei dem das gebildete Phosphat, das bei der Hydrolyse von ATP zu ADP entsteht, mittels eines farbigen Molybdänphosphat-Komplexes spektroskopisch nachgewiesen wird (Lanzetta *et al.* 1977).

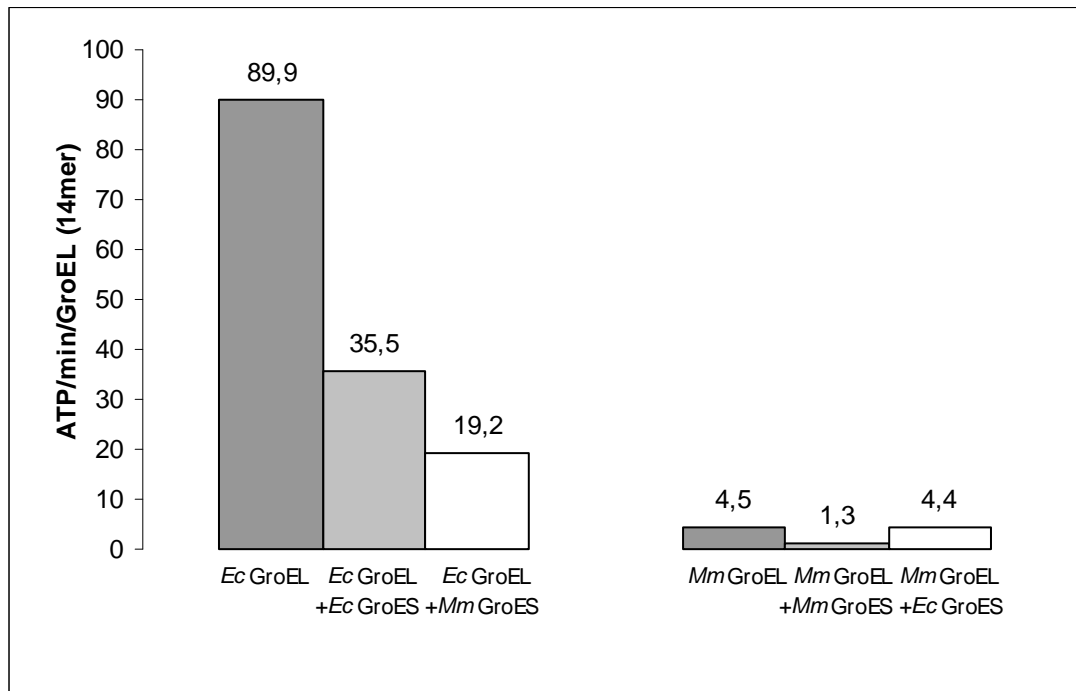


Abbildung 15. *Mm*GroEL hat eine geringere ATPase-Aktivität als *Ec*GroEL. 1 μ M GroEL wurde in An- und Abwesenheit von GroES präinkubiert. Durch Zugabe von 2 mM ATP wurde die ATP-Hydrolyse gestartet. Nach dem Stopp der Reaktion mit CDTA wurde die Hydrolyserate durch Zugabe von Malachit-Grün und anschließender Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 640 nm ermittelt. Die Versuche zur Messung der ATP-Hydrolyse erfolgten bei 37°C.

Abbildung 15 zeigt die ATPase Aktivität des bakteriellen und archaeellen GroEL in An- und Abwesenheit von GroES. Auffallend ist die wesentlich geringere ATPase Aktivität des *Mm*GroEL im Vergleich zu *Ec*GroEL. Jedes Molekül des Homotrimerdecamers *Mm*GroEL hydrolysiert 4,5 ATP/min im Vergleich zu einer Hydrolyserate von 90 ATP/min für das *Ec*GroEL Komplex. In Anwesenheit von *Ec*GroES ist die ATPase Aktivität von *Ec*GroEL auf 35,5 ATP/min reduziert. *Mm*GroES reduziert die Aktivität von *Ec*GroEL stärker auf 19,2 ATP/min. Die Aktivität von *Mm*GroEL wird durch die Anwesenheit seines Kofaktors auf 1,3 ATP/min reduziert. Hingegen hat die Anwesenheit von *Ec*GroES keinen Einfluss auf die Aktivität des *Mm*GroEL.

Ausgehend von der Kristallstruktur des *Ec*GroEL ist bekannt, welche Aminosäuren mit dem Nukleotid ADP interagieren und Kontakte dabei eine Rolle spielen (Xu *et al.* 1997). Durch einen Sequenzvergleich von *Mm*GroEL mit *Ec*GroEL ist es möglich, die Aminosäuren zu identifizieren über die *Mm*GroEL mit Nukleotiden interagiert.

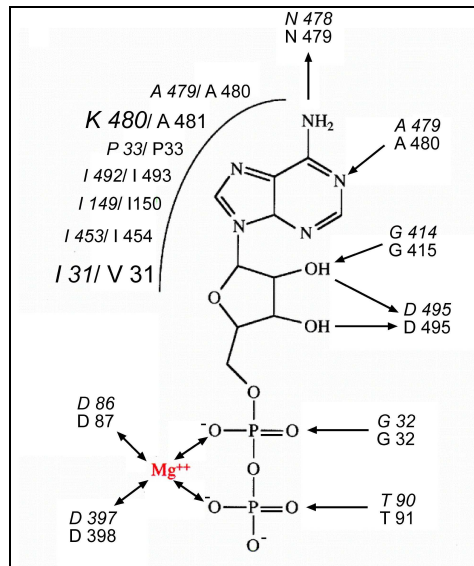


Abbildung 16. Nukleotid Bindetasche von *EcGroEL* und *MmGroEL*. Darstellung der Nukleotid Bindetasche von *EcGroEL*. Dargestellt sind die Aminosäuren und ihre jeweilige Position im Protein (Kursiv: *MmGroEL*, nicht-kursiv: *EcGroEL*). Wasserstoffbrücken sind als einfache Pfeile, Mg^{2+} Interaktionen als Doppelpfeil dargestellt. Die Interaktionen der Aminosäuren mit dem Nukleotid mittels van der Waals Kräfte sind durch eine gekrümmte Linie dargestellt (Xu *et al.* 1997). Die beiden Nukleotid-Bindetaschen sind identisch bis auf zwei Positionen. Bei *MmGroEL* ist in der Position 31 Valin durch Isoleucin und in Position 481 Aspartat durch Lysin ersetzt.

Abbildung 16 zeigt diejenigen Aminosäuren im *EcGroEL* Molekül, die mit dem Nukleotid ADP interagieren (Xu *et al.* 1997). In kursiver Schrift sind die Aminosäuren von *MmGroEL* mit der jeweiligen Position im Molekül wiedergegeben. Alle in *EcGroEL* an der Nukleotidbindung beteiligten Aminosäuren sind in *MmGroEL* konserviert, bis auf zwei Ausnahmen. In der Position 31 ist Valin durch Isoleucin ersetzt. Beide Aminosäuren haben einen hydrophoben Charakter und annähernd dieselbe Größe. Sie unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche Methylengruppe bei Isoleucin. In Position 481 von *EcGroEL* ist ein negativ geladenes Aspartat durch ein positiv geladenes Lysin im *MmGroEL* Molekül ersetzt. Dadurch ergibt sich eine große Differenz in der Ladungsverteilung der Nukleotid-Bindetasche. Vorstellbar ist, daß durch diesen Ladungsunterschied in der Bindetasche eine geänderte Affinität von *MmGroEL* zum Nukleotid entsteht und daß sich daraus eine niedrigere Hydrolyserate von ATP durch das *MmGroEL* ergibt.

Die ATP-Hydrolyse von *MmGroEL* beträgt ~5 % des bakteriellen Chaperonins. *MmGroES* hemmt die ATPase Aktivität von *EcGroEL* stärker als

EcGroES. Dies deutet auf eine stärkere Interaktion von *MmGroES* mit *EcGroEL* hin. Bemerkenswert ist auch, daß *EcGroES* keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität von *MmGroEL* hat. Dies weist auf eine fehlende Interaktion der beiden Proteine hin, was den Befund erklären würde, daß das gemischte Chaperoninsystem *EcGroEL/MmGroES* die Faltung denaturierter Rhodanese nicht unterstützt (siehe Abb. 14).

3.2.4 Das archaelle GroEL/GroES zyklert nur langsam

Sowohl die langsamere Faltungsrate für Rhodanese als auch die geringere ATPase Aktivität von *MmGroEL* in Anwesenheit von *MmGroES* deuten auf einen langsameren Faltungszyklus hin. Um diesen Sachverhalt weiter zu analysieren, wurde die Bindung und Dissoziation des *MmGroES* an *MmGroEL* mit Hilfe der Technik der Oberflächen-Plasmon-Resonanz untersucht.

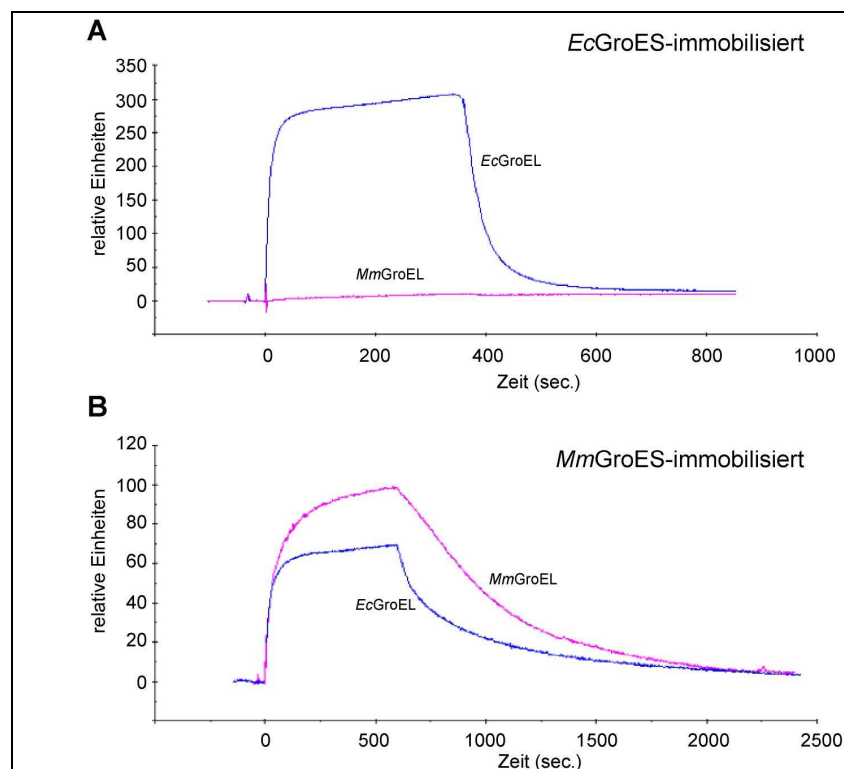


Abbildung 17. Nachweis der Wechselwirkungen von GroEL mit GroES mit der Technik der Oberflächen-Plasmon-Resonanz. (A) immobilisiertes *EcGroES*. Eine Interaktion mit *MmGroEL* ist nicht nachweisbar. (B) immobilisiertes *MmGroES*. Deutlich ist die langsamere Dissoziation zu beobachten im Vergleich zu (A).

Abbildung 17 zeigt das Assoziations- und Dissoziationsverhalten des GroE Chaperoninsystems. *MmGroES* bzw. *EcGroES* wurden auf Sensor-Chips immobilisiert und dann *MmGroEL* oder *EcGroEL* darüber geleitet. Die Dissoziation des *MmGroES* von *MmGroEL* ist deutlich langsamer als im bakteriellen Chaperoninsystem. Auffällig ist auch, daß *MmGroEL* nicht mit *EcGroES* interagiert.

Dissoziationskonstanten (1/sec)	<i>EcGroEL</i>	<i>MmGroEL</i>
<i>EcGroES</i>	$4,1 \times 10^{-2}$	0
<i>MmGroES</i>	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$

Tabelle 1. Dissoziationskonstanten des archaeellen und des bakteriellen GroE-Systems, sowie der gemischten Chaperoninsysteme.

Tabelle 1 gibt die Dissoziationskonstanten an, die aus den in Abbildung 17 gezeigten Messungen abgeleitet wurden. Die Dissoziationskonstante für *MmGroEL* und *MmGroES* ist ungefähr 15-mal langsamer als für die bakteriellen Proteine. Die Dissoziationsrate beider GroEL Proteine von *MmGroES* ist nahezu identisch.

Die geringere Dissoziationsrate des archaeellen Chaperoninsystems steht im Einklang mit der langsameren ATPase Aktivität. Eine Bindung von *MmGroEL* an *EcGroES* ist nicht nachweisbar. Dieser Befund erklärt, warum mit dem heterologen Chaperoninsystem aus *EcGroES* und *MmGroEL* keine Rückfaltung für Rhodanese nachzuweisen war (Kapitel 3.2.2) und warum *EcGroES* keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität von *MmGroEL* hat (Kapitel 3.2.3).

3.2.5 *MmGroEL/MmGroES* entlässt native Rhodanese mit Verzögerung

In den vorherigen Kapiteln wurden Unterschiede zwischen den bakteriellen und archaeellen Chaperoninsystemen deutlich. Die ATPase Aktivität in Anwesenheit von bakteriellem oder archaeellem GroES ist bei *MmGroEL* um

etwa 30-mal langsamer als bei *EcGroEL*. Die Dissoziation des archaeellen Chaperonins von seinem Kofaktor erfolgt etwa 15-mal langsamer als im bakteriellen System. Die Rückfaltungsrate des archaeellen Chaperoninsystems ist zwar langsamer als beim bakteriellen System, liegt aber in der gleichen Größenordnung. Somit sollte sich Rhodanese in ihrem nativen und funktionell aktiven Zustand in der *MmGroEL/ES* Kavität anhäufen, da die Dissoziation von *MmGroES* von *MmGroEL* deutlich langsamer ist als die Faltungsrate. Die Struktur von GroEL erlaubt ein Eindringen der beiden Substrate von Rhodanese, Thiosulfat und Cyanid, durch seitliche Lücken. Es kann somit über den enzymatischen Test native Rhodanese in der GroEL/GroES Kavität nachgewiesen werden. Rhodanese ist ein monomeres Enzym, das nicht oligomerisieren muss, um seine Aktivität zu erlangen.

Um festzustellen, ob tatsächlich aktive Rhodanese in der *MmGroEL/MmGroES* Kavität akkumuliert, wurden die Komplexe durch Größenausschlusschromatographie isoliert, wobei Chaperonin-gebundene und freie Rhodanese voneinander getrennt werden.

Um die GroE-Komplexe zu stabilisieren, war es nötig das vorhandene ATP schnellstmöglich zu ADP zu hydrolysieren. Durch Zugabe von Glukose und Hexokinase kann eine schnelle Hydrolyse des ATP erreicht werden. Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glukose an der 6'-Hydroxygruppe zu Glukose-6-Phosphat, dabei wird ATP zu ADP hydrolysiert. Abbildung 18 zeigt die Rückfaltung von Rhodanese mit dem archaeellen und bakteriellen Chaperoninsystem und die Verteilung der Rhodaneseaktivität in den verschiedenen Fraktionen nach einer Größenausschlusschromatographie.

Fünf Minuten nach Start der Faltungsreaktion mit ATP wurde Hexokinase und Glukose hinzugefügt (Abb.18). Im Falle des *MmGroE*-System hatte dies die Hemmung der Faltungsreaktion zur Folge (Abb. 18 A). Ein Aliquot dieser Reaktion wurde mittels einer Gelfiltrationssäule getrennt und die verschiedenen Fraktionen auf deren Rhodaneseaktivität getestet (Abb. 18 B). Das Elutionsprofil von *MmGroEL* ist durch eine gestrichelte Linie in Abbildung 18 B dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, daß ca. 50 % der nativen Rhodanese mit *MmGroEL* koeluiert. Nach 5 min sind ca. 50 % der nativen Rhodanese in der *MmGroEL* Kavität eingeschlossen.

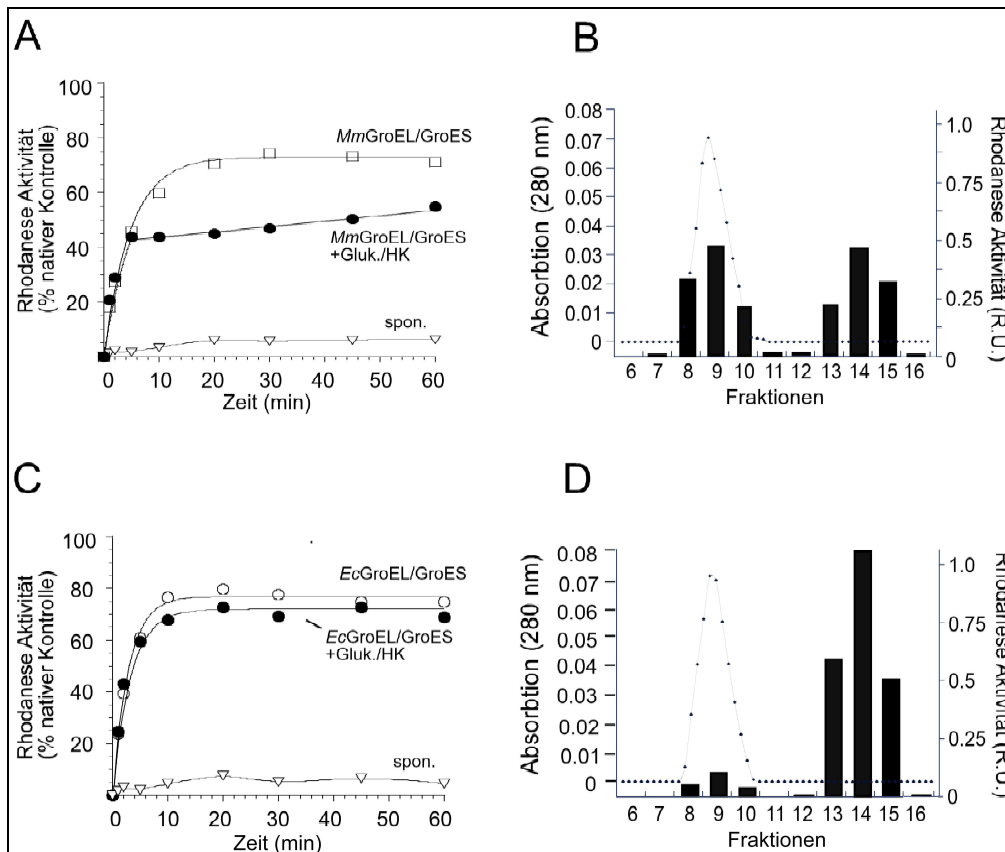


Abbildung 18. Isolierung von *MmGroEL*-Rhodanese-Komplexen durch Gelfiltration. Eine Chaperonin-vermittelte Rhodanese-Rückfaltungsreaktion wurde mit Glukose/Hexokinase (Gluk./HK) gestoppt und der Substrat-Chaperonin-Komplex mittels Gelfiltrationsanalyse untersucht (A) Assistierte Rückfaltung von Rhodanese durch das *MmGroE*-System. (B) Zum Zeitpunkt 5 min wurde ein Aliquot der Chaperonin-vermittelten Rückfaltung von Rhodanese auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen und die einzelnen Fraktionen auf Rhodaneseaktivität getestet. Ca. 50 % der Rhodaneseaktivität wurde in den Fraktionen detektiert, in denen *MmGroEL* eluierte (gestrichelte Linie). (C) Kontroll-Rückfaltungsreaktion mit dem bakteriellen Chaperonin-System. (D) Nur ca. 10 % der Rhodaneseaktivität konnte in den Fraktionen detektiert werden, in denen *EcGroEL* eluierte (gestrichelte Linie).

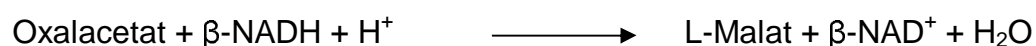
Nach Zugabe von Hexokinase und Glukose zum bakteriellen GroE-System wird die Rhodanese-Faltung im Gegensatz zum *MmGroE*-System nicht unterbunden. Nach der ATP-Hydrolyse kann jedoch ATP nicht an den trans-Ring binden und somit nicht GroES vom cis-Ring des *EcGroEL* verdrängen. Rhodanese, die in der Kavität eingeschlossen ist, kann zwar den nativen Zustand erreichen, bleibt aber in der Kavität eingeschlossen. Nach 5 min sind ca. 90 % der nativen Rhodanese frei in Lösung. Lediglich ca. 10 % koeluiieren mit *EcGroEL*. Das bakterielle GroE-System hat in den ersten 5 min der vermittelten Faltung fast die gesamte native Rhodanese in gefalteter Form in die Lösung entlassen.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß das archaeelle GroE-System das Modellsubstrat Rhodanese zwar ähnlich schnell faltet, es aber wesentlich langsamer aus der Kavität freigibt. Die langsamere Zyklisierungsgeschwindigkeit des *MmGroE*-Systems könnte eine Anpassung an die im Vergleich mit *E. coli* wesentlich langsamere Wachstumsrate von *M. mazei* darstellen.

3.2.6 *MmGroE* vermittelt nicht die Faltung von MDH

Rhodanese ist ein monomeres Protein, das bereits innerhalb der GroEL-Kavität seine native und damit aktive Struktur erreichen kann. Dies war entscheidend, um die langsame Freilassung von gefaltetem Substrat beobachten zu können. Anhand eines geeigneten dimeren Substrat-Proteins sollte es möglich sein, den langsameren Faltungszyklus des archaeellen Chaperonins detaillierter zu untersuchen, da hier erst nach Freisetzung gefalteter Untereinheiten aus der GroEL Kavität und anschließender Assemblierung Enzymaktivität messbar werden sollte. Das dimere Protein Malat Dehydrogenase (MDH) wurde für diese Untersuchungen gewählt. MDH ist erst als Dimer enzymatisch aktiv und in seiner Rückfaltung strikt von GroEL/GroES abhängig (Ranson *et al.* 1995; Rye *et al.* 1997; Veinger *et al.* 1998).

Die aus Schweineherzen isolierte MDH ist aus zwei gleichen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je ~45 kDa (Devenyi *et al.* 1966) zusammengesetzt. MDH katalysiert die folgende Reaktion:



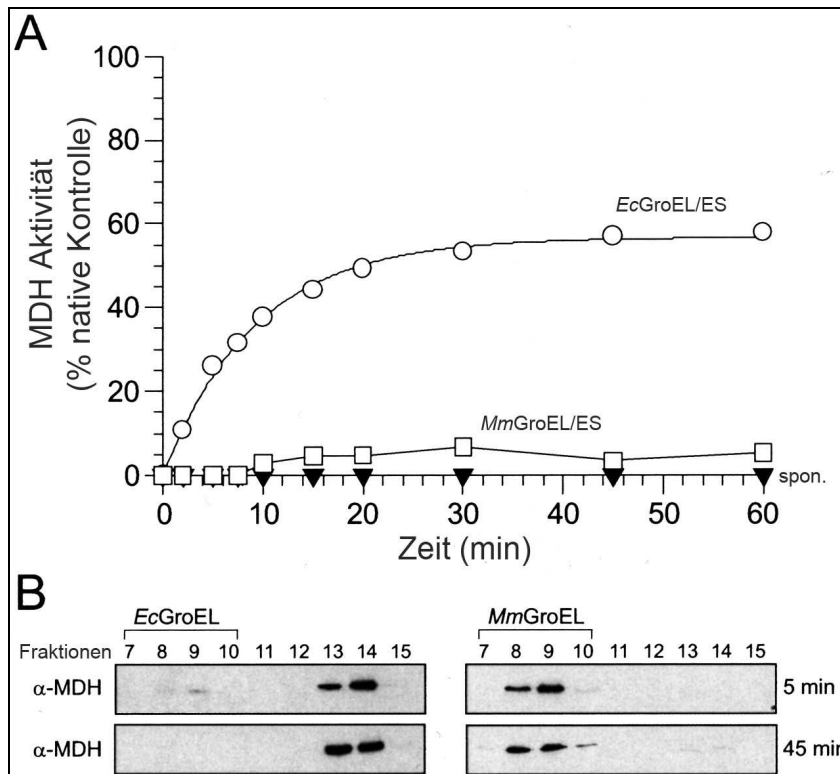


Abbildung 19. *MmGroEL* bindet denaturierte MDH, vermittelt aber nicht deren Faltung. (A) 1 μ M denaturierte MDH wurde in Puffer verdünnt, der 1 μ M GroEL enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ M GroES und 5 mM ATP gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die MDH-Aktivität spektrometrisch ermittelt. (B) Gelfiltration zum Zeitpunkt 5 und 45 min. Fraktionen 7–15 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Elution von GroEL wurde mit Coomassie Färbung ermittelt (eckige Klammern); freie und gebundene MDH konnte mit Western Blot nachgewiesen werden.

Abbildung 19 A zeigt ein Rückfaltungsexperiment für MDH. Das bakterielle Chaperoninsystem erreicht eine Rückfaltungseffizienz von ca. 60 % der enzymatischen Aktivität der nativen Kontrolle. Auffallend ist die Tatsache, daß das *MmGroE*-System unter den für das bakterielle GroE-System optimierten Pufferbedingungen die Faltung von denaturierter MDH nicht vermittelt. Um festzustellen, ob denaturierte MDH von *MmGroEL*, wie im Falle von Rhodanese, zurückgehalten wird, wurden Aliquots aus den Rückfaltungsansatz nach 5 und 45 min durch Gelfiltration analysiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert und auf die Anwesenheit von MDH mit spezifischen Antikörpern getestet (Abb. 19 B). Im archaellen Chaperoninsystem koeluiert das gesamte MDH-Protein nach 5 min in denselben Fraktionen wie das *MmGroEL*. Dies ist selbst noch nach 45 min der Fall. *MmGroEL* bindet also denaturierte MDH stabil, ist aber nicht in

der Lage das Substrat in seinem nativen Zustand zu überführen. Im Kontrollexperiment mit dem *EcGroE*-System ist dagegen nach 5 min MDH bereits fast vollständig frei in Lösung. Nach 45 min ist keine MDH mehr in den *EcGroEL* enthaltenen Fraktionen nachweisbar.

Das archaeele und das bakterielle Chaperoninsystem unterscheiden sich gravierend in der Interaktionsweise mit MDH.

3.2.7 Einfluss von Ammoniumsulfat auf das *MmGroE*-System

Der langsame Faltungszyklus des *MmGroE*-System ist wahrscheinlich durch die niedrige ATPase Aktivität bedingt. Um den langsameren Faltungsmechanismus des archaeeellen GroE-System weiter untersuchen zu können, wurde nach Bedingungen gesucht, die die ATPase Aktivität von *MmGroEL* verstärken würden und somit den Faltungszyklus beschleunigen. In der Literatur ist beschrieben, daß Ammoniumsulfat einen stimulierenden Effekt auf die ATPase Aktivität von Chaperoninen hat (Kusmierczyk und Martin 2000, Andrä *et al.* 1998). Deshalb wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Ammoniumsulfat die ATPase Aktivität von *MmGroEL* untersucht.

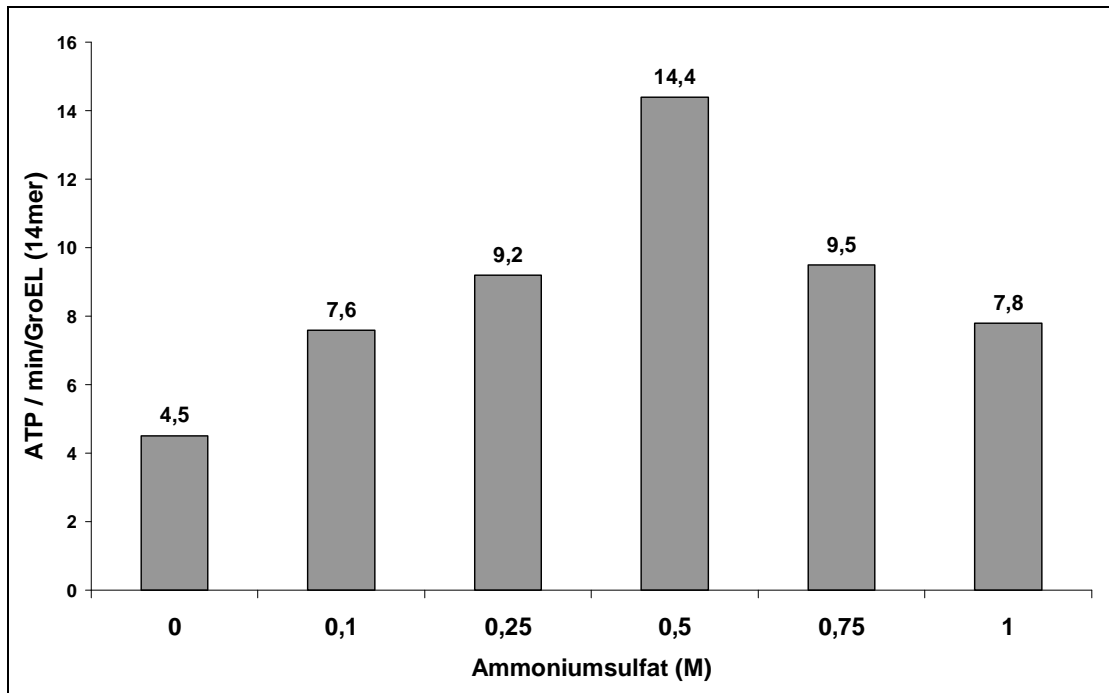


Abbildung 20. Die ATP Hydrolyserate von *MmGroEL* in Abhängigkeit der Ammoniumsulfatkonzentration. Die höchste Stimulation der ATP Hydrolyserate von *MmGroEL* ist bei einer Konzentration von 0,5 M Ammoniumsulfat erreicht.

Abbildung 20 zeigt die ATPase Aktivität von *MmGroEL* in Abhängigkeit von Ammoniumsulfat. Es wird deutlich, daß die Anwesenheit von Ammoniumsulfat die ATPase Aktivität stimuliert. Bei einer Konzentration von 0,5 M Ammoniumsulfat wird die ATPase Aktivität von *MmGroEL* mehr als verdreifacht und erreicht ihr Optimum. Für alle weiteren Versuche wurde daher eine Konzentration von 0,5 M Ammoniumsulfat gewählt.

Um festzustellen, ob die Anwesenheit von Ammoniumsulfat im Puffer einen Einfluss auf das Zusammenspiel von GroEL und GroES hat und somit auf den Faltungszyklus, wurde die ATPase Aktivität von GroEL auch in Anwesenheit von GroES bestimmt.

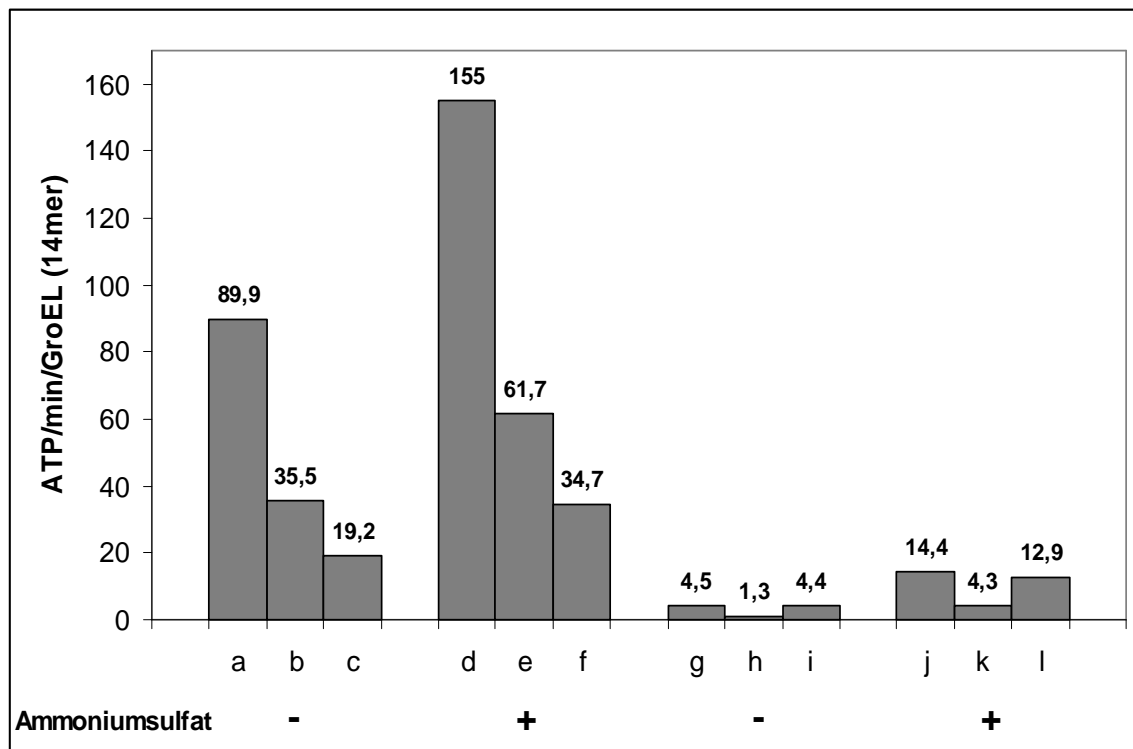


Abbildung 21. ATPase-Aktivitäten in An- und Abwesenheit von 0,5 M Ammoniumsulfat (AS), *EcGroES* bzw. *MmGroES* (a)-*EcGroEL*; (b)-*EcGroEL* + *EcGroES*; (c)-*EcGroEL* + *MmGroES*, (d)-*EcGroEL* + AS; (e)-*EcGroEL* + *EcGroES* + AS; (f)-*EcGroEL* + *MmGroES* + AS; (g)-*MmGroEL*; (h)-*MmGroEL* + *MmGroES*; (i)-*MmGroEL* + *EcGroES*, (j)-*MmGroEL* + AS; (k)-*MmGroEL* + *MmGroES* + AS; (l)-*MmGroEL* + *EcGroES* + AS; Die Reaktionen wurden unter Standardbedingungen oder in Anwesenheit von 0,5 M AS und/oder 2 μ M GroES durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt die ATPase Aktivität von *EcGroEL* und *MmGroEL* in An- und Abwesenheit von 0,5 M Ammoniumsulfat und GroES. Zu erkennen ist die Stimulierung der ATP-Hydrolyserate sowohl von *EcGroEL* als auch von *MmGroEL* in Anwesenheit von Ammoniumsulfat. *MmGroES* inhibiert die stimulierte Hydrolyserate sowohl von *MmGroEL* als auch von *EcGroEL* deutlicher als *EcGroES*. Dies bestätigt die im Vergleich zu *EcGroES* bereits beobachtete stärkere Bindung von *MmGroES* zu *MmGroEL* und *EcGroEL*. Trotz Anwesenheit von Ammoniumsulfat ist aber kein nennenswerter Einfluss von *EcGroES* auf *MmGroEL* zu beobachten.

Um das Assoziations- und Dissoziationsverhalten von GroEL und GroES in Anwesenheit von Ammoniumsulfat zu untersuchen, wurde die Interaktion der Proteine mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) unter veränderten Pufferbedingungen wiederholt.

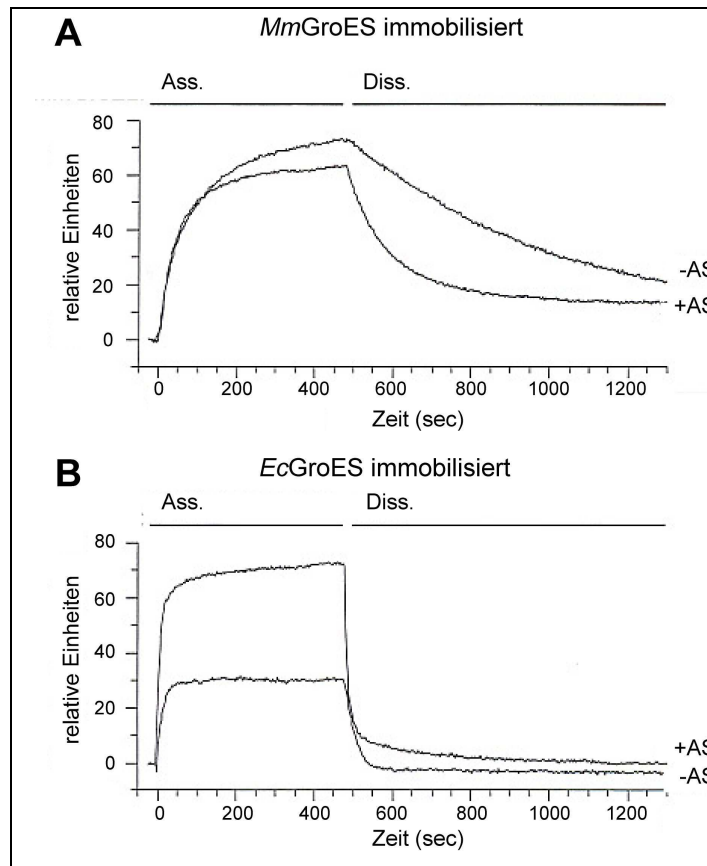


Abbildung 22. Oberflächen-Plasmon-Resonanz für das archaellen (A) und bakterielle (B) GroE-System in An- und Abwesenheit von 0,5 M AS. Dargestellt ist die Assoziation und Dissoziation an immobilisierten GroES. Die Anwesenheit von Ammoniumsulfat beschleunigt sowohl im bakteriellen als auch im archaellen Chaperoninsystem die Dissoziation des GroEL von seinem zugehörigen GroES.

Die SPR Experimente mit Ammoniumsulfat zeigen (Abb. 22 A), daß *MmGroES* mit einer Dissoziationsrate von $\sim 1,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ etwa 4-mal schneller als in Abwesenheit von Ammoniumsulfat von *MmGroEL* dissoziiert. Diese Dissoziationsrate ist aber immer noch 4-mal langsamer als die für *EcGroEL/GroES* beobachtete Rate in Abwesenheit von Ammoniumsulfat ($\sim 4,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Ammoniumsulfat beschleunigt die Dissoziation des bakteriellen GroE-Systems 2,5-fach (Abb. 22 B). Das Assoziationsniveau wird durch Ammoniumsulfat um das Zweifache erhöht.

Ammoniumsulfat hat in einer Konzentration von 0,5 M eine stimulierende Wirkung sowohl auf die ATPase Aktivität als auch auf das Zyklieren des GroE-Systems. Das *MmGroE*-System weist in Anwesenheit von Ammoniumsulfat eine ca. 4-fach schnellere ATPase Aktivität und eine ca. 4-

fach schnellere Dissoziationsrate auf. Das bakterielle GroE-System wird in seinem Reaktionszyklus etwa 2-fach beschleunigt.

3.2.8 Ammoniumsulfat erlaubt die beschleunigte Freisetzung nativer Rhodanese durch *MmGroEL/MmGroES*

Da Ammoniumsulfat eine beschleunigende Wirkung auf die ATPase Aktivität und die Dissoziationsrate des *MmGroE*-Systems hat, lag es nahe die Rückfaltung denaturierter Rhodanese und die Freisetzung des Substrates aus der GroEL/GroES Kavität unter diesen Bedingungen zu testen. Das in Kapitel 3.2.5 beschriebene Experiment wurde in Anwesenheit von 0,5 M Ammoniumsulfat wiederholt.

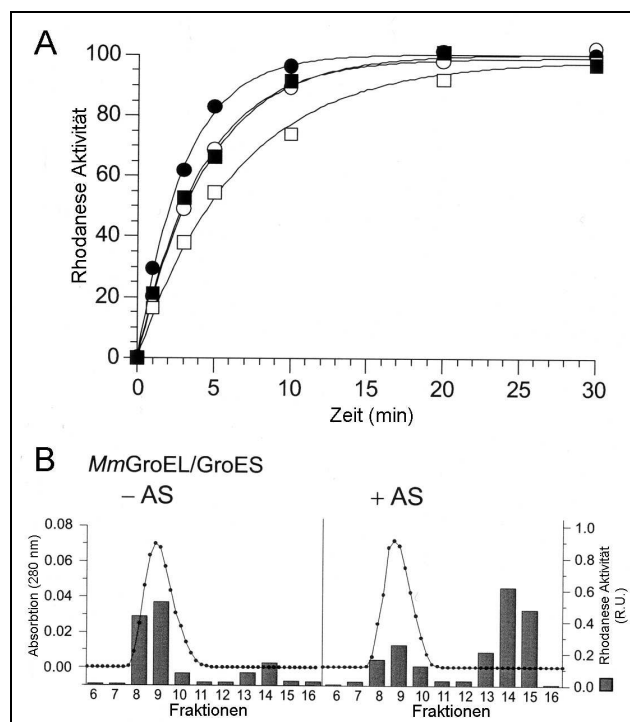


Abbildung 23. Ammoniumsulfat (AS) stimuliert den Substrat-Faltungszyklus des *MmGroE*-Systems. (A) Denaturierte Rhodanese (0,5 µM) wurde unter Standardbedingungen und in Anwesenheit von AS rückgefaltet. (□ *MmGroE*, ○ *EcGroE*, ■ *MmGroE*+0,5 M AS, ● *EcGroE*+0,5 M AS). (B) Nach 5 min wurden durch Zugabe von Hexokinase und Glukose die Faltung unterbrochen und Aliquots der Reaktion auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Während in Abwesenheit von AS ca. 80 % der nativen Rhodanese mit *MmGroEL* koeluiert, bewirkt die Anwesenheit des Salzes, daß ca. 70 % der nativen Rhodanese in Lösung freigesetzt wird. (Balken: Rhodaneseaktivität der einzelne Fraktionen; gestrichelte Linie: *MmGroEL* Elutionsprofil).

Abbildung 23 zeigt den Einfluss von 0,5 M Ammoniumsulfat auf die Rückfaltung von Rhodanese. Ammoniumsulfat beschleunigt die Rückfaltungsrate von Rhodanese sowohl im bakteriellen als auch im archaeellen GroE-System (Abb. 23 A). Die Gesamtausbeute an nativer Rhodanese wird aber durch das Salz nicht beeinflusst.

Die Abbildung 23 (B links) zeigt die Mengen an aktiver Rhodanese, die nach 5 min mit *MmGroEL* auf einer Gelfiltrationssäule koeluieren und frei in Lösung sind. Die Reaktion wurde bei diesem Experiment nach 5 min durch Zugabe von Hexokinase und Glukose gestoppt, um eine weitere Substratfreisetzung aus der GroEL-Kavität zu unterbinden. In Anwesenheit von Ammoniumsulfat war nach 5 min bereits ca. 70 % der gefaltete Rhodanese aus der Kavität entlassen (Abb. 23 B rechts), während unter den Standardbedingungen ohne Ammoniumsulfat zu diesem Zeitpunkt noch ca. 70 % des gefalteten Substrates an *MmGroEL* gebunden waren (Abb. 23 B links). Wird die Aktivität von GroEL-assoziierte und freier Rhodanese addiert, stellen man fest, daß in beiden Fällen nahezu die gleiche Gesamtmenge gefalteter Rhodanese vorliegt. Dies steht im Einklang und stimmt mit der Rückfaltung der in Abbildung 23 A gezeigten Rückfaltungskinetik.

Ammoniumsulfat stimuliert somit die Freisetzung der gefalteten Substratproteine aus der Chaperonin-Kavität, der Ertrag an rückgefalteter Rhodanese wird jedoch nicht erhöht.

3.2.9 Rückfaltung von MDH durch *MmGroEL/MmGroES* in Anwesenheit von Ammoniumsulfat

Unter den Pufferbedingungen, die für das *EcGroE*-System optimiert wurden, wird die Faltung denaturierte MDH durch das *MmGroE*-System nicht vermittelt. Es wurde daher die möglich stimulierende Wirkung von Ammoniumsulfat auf die MDH-Rückfaltung durch das *MmGroE*-System untersucht.

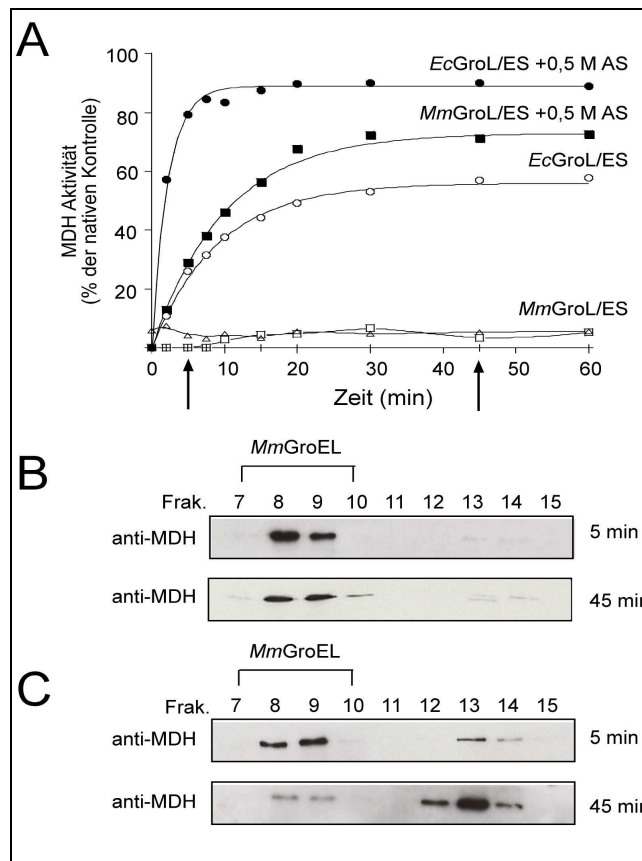


Abbildung 24. Ammoniumsulfat ermöglicht die korrekte Faltung von Malat-Dehydrogenase (MDH) durch das archaeelle GroE-System. (A) MDH-Rückfaltungsexperiment mit und ohne AS. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt für den Start der Gelfiltration. (B) Gelfiltration des Experimentes aus (A) unter Standardbedingungen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus der Rückfaltungsreaktion entnommen und die Fraktionen der Gelfiltration auf die Anwesenheit von MDH immunologisch analysiert. Die Klammer markiert die Fraktionen in denen GroEL eluiert. (C) Wiederholung des Experimentes von (B) in Anwesenheit von AS. Erst die Anwesenheit von AS ermöglicht die Freisetzung von MDH.

Abbildung 24 A zeigt die Rückfaltung von MDH in An- und Abwesenheit von 0,5 M Ammoniumsulfat. Es wird klar, daß das *MmGroE*-System die Faltung von MDH in Anwesenheit von Ammoniumsulfat mit hoher Ausbeute vermittelt. Das *MmGroE*-System erreicht eine Rückfaltungseffizienz von ca. 70 % der nativen Kontrolle. Die geänderten Pufferbedingungen haben auch einen stimulatorischen Effekt auf das *EcGroE*-System. Die Faltungseffizienz wird von ca. 60 % auf ca. 90 % erhöht und die Faltungsrate von MDH wird merklich beschleunigt.

Die Anwesenheit von Ammoniumsulfat hat auch einen deutlichen Einfluss auf die Substratfreisetzung (Abb. 24 C). Hier wurden Aliquots nach 5 bzw. 45 min aus einer Rückfaltungsreaktion entnommen und auf einer Gelfiltrationssäule

aufgetragen. Die Fraktionen wurden auf die Anwesenheit von MDH immunologisch getestet. Nach 5 min ist in Anwesenheit von Ammoniumsulfat eine gewisse Menge an freier, aus der *MmGroEL* Kavität entlassener MDH zu detektieren. Nach 45 min ist der weitaus größte Teil der MDH in die Lösung freigesetzt (Abb. 24 C). In Abwesenheit von Ammoniumsulfat ist MDH auch nach 45 min noch an *MmGroEL* gebunden (Abb. 24 B).

Anders als beim Modellsubstrat Rhodanese wird bei dem in Abbildung 24 A gezeigten Experiment nicht die Menge an korrekt gefalteter nativer MDH, sondern nur die Aktivität an aktiver dimerer MDH gemessen. Die Zugabe von CDTA zu einer GroEL-vermittelten Faltungsreaktion führt zu der Dissoziation von GroES und somit zur Freisetzung des in der GroEL Kavität befindlichen Substrates. CDTA komplexiert Magnesium, welches essenziell für die Hydrolyse von ATP ist. Eine weitere Faltung in Anwesenheit von CDTA ist nicht mehr möglich. Während der Inkubation mit CDTA kommt es zur Dissoziation von GroES, native MDH wird aus der GroEL Kavität entlassen und kann zum aktiven Enzym dimerisieren.

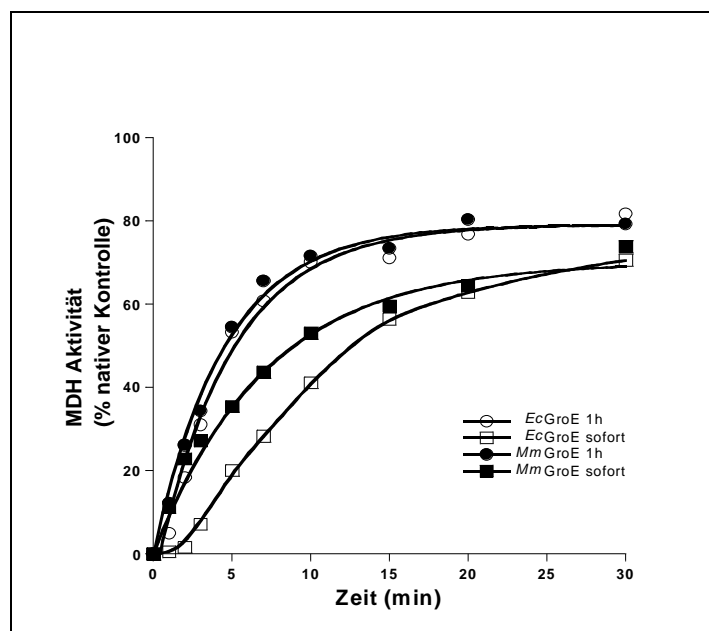


Abbildung 25. Verzögerte Freisetzung von MDH aus der *MmGroEL/MmGroES* Kavität. Die MDH-Aktivität wurde sofort und nach 1 h Inkubation mit CDTA gemessen. Ein Vergleich der assistierten Rückfaltungen von MDH durch das *MmGroE*-System lässt auf eine verzögerte Freisetzung nativer MDH aus der GroEL-Kavität schließen. CDTA hat keinen merklichen Einfluss auf das bakterielle GroE-System. Die Reaktionen wurden unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 0,5 M Ammoniumsulfat durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt die Rückfaltung von MDH bei sofortiger Messung der MDH-Aktivität und nach einstündiger Inkubation mit CDTA. Ein Vergleich der beiden Rückfaltungskurven des *EcGroE*-System mit und ohne CDTA zeigt deutlich, daß die Inkubation mit CDTA wenig Einfluss auf die Substratfreisetzung hat. Im *EcGroE*-System erfolgt das Zyklieren des GroES so rasch, daß die Freisetzung von nativer MDH aus der GroEL Kavität nicht limitierend ist für die Assemblierung. Es wird auch deutlich, daß der Dimerisierungsschritt der native MDH sehr rasch geschehen muss, da die beiden *EcGroE* vermittelten Rückfaltungskurven fast identisch sind.

Deutliche Unterschiede in An- und Abwesenheit von CDTA sind in der *MmGroE*-vermittelte Reaktivierung von MDH zu beobachten. Die Inkubation mit CDTA hat bei der *MmGroE* vermittelten Faltung einen deutlichen Anstieg der MDH Aktivität in den ersten 10 min der Reaktion zu Folge. Bei sofortiger Messung der durch *MmGroE* produzierte MDH ist eine „lag-Phase“ in den ersten 2 min zu beobachten. Native MDH-Untereinheiten werden vermutlich erst nach den ersten 2 min in höheren Konzentrationen in die Lösung entlassen, um anschließend rasch zu dimerisieren. CDTA hat keinen Einfluss auf die Gesamtausbeute an native, dimerisierte MDH.

MmGroEL bindet denaturierte MDH. Eine assistierte Faltung ist aber erst in Anwesenheit von Ammoniumsulfat möglich. Um festzustellen, ob sich die *MmGroEL*-gebundene MDH in Abwesenheit von Ammoniumsulfat in einem faltungskompetenten Zustand befindet, wurde im folgenden Experiment Ammoniumsulfat bzw. das bakterielle GroE-System zu einem späteren Zeitpunkt zur Rückfaltungsreaktion zugegeben (Abb. 26).

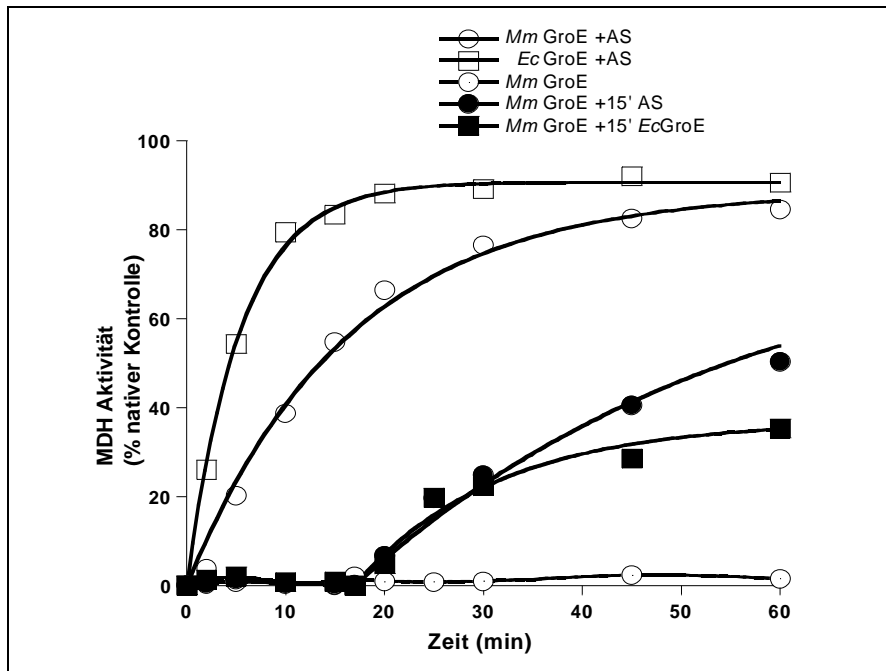


Abbildung 26. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) oder *EcGroE* kann *MmGroEL*-gebundene ungefaltete MDH die enzymatisch aktive Struktur erreichen. Nach 15 min wurde zu einer *MmGroE*-vermittelten Rückfaltungsreaktion in Standardpuffer entweder 0,5 M AS oder *EcGroEL* (1 μ M) und *EcGroES* (2 μ M) zugegeben.

Abbildung 26 zeigt die Auswirkung der Zugabe von Ammoniumsulfat bzw. bakteriellem GroEL/GroES nach 15 min auf die Reaktivierung von MDH. Die nachträgliche Zugabe von Ammoniumsulfat ermöglicht es dem *MmGroE*-System, die Reaktivierung von MDH zu vermitteln. Die nachträgliche Zugabe des bakteriellen GroE-Systems führt zu einem Transfer des Substrates an das produktive *EcGroEL*. Eine Faltung mittels *MmGroEL* und *EcGroES* ist nicht möglich, da es innerhalb dieses gemischten Chaperoninsystem keine Bindungsaffinität gibt.

Das *MmGroE*-System bindet also in Abwesenheit von Ammoniumsulfat denaturierte MDH in einem faltungskompetenten Zustand, erlaubt aber nicht deren Reaktivierung. Nur in Anwesenheit von Ammoniumsulfat erreicht MDH eine enzymatisch aktive Struktur, wobei es mit einer gewissen Verzögerung aus der GroEL-Kavität entlassen wird.

3.2.10 Einschluss in die *MmGroEL* Kavität ist notwendig für die Reaktivierung von MDH

Um zu untersuchen, ob MDH zwar faltet, aber die *MmGroEL* Kavität nicht verlässt, und somit nicht in Lösung dimerisieren kann, wurde der ternäre *MmGroEL*/GroES/MDH Komplex näher untersucht.

Der GroEL Doppelringzylinder hat eine kompakte Struktur und weist eine erhebliche Resistenz gegenüber Proteinase K auf. Nur die letzten 16 C-terminalen Aminosäuren jeder einzelnen Untereinheit werden verdaut (Langer *et al.* 1992). Dieses Peptid ist flexibel und ragt in das Innere des GroEL Zylinders heraus. Proteinase K ist klein genug (29 kDa), um in die GroEL Kavität zu gelangen und die im Innern liegenden C-Termini zu verdauen. Das partiell verdaute GroEL (GroEL Δ C) bildet ein intaktes Homotetradecamer, das Nukleotide, GroES und ungefaltetes Protein binden kann. Der partielle Verdau der 16 Aminosäuren des C-Terminus lässt sich durch SDS-PAGE nachweisen. Falls in der GroEL Kavität ein ungefaltetes Substratprotein gebunden ist, wird es ebenso von Proteinase K verdaut. Der Verdau des C-Terminus und eines gegebenenfalls gebunden Substrates kann durch das Binden von GroES an GroEL verhindert werden. GroES verschließt durch Binden an GroEL die Kavität und verhindert ein Eindringen der Proteinase K. Abbildung 27 zeigt den partiellen Verdau von *EcGroEL* und *MmGroEL* durch Proteinase K in Abwesenheit des jeweiligen GroES. In Anwesenheit von *EcGroES* bzw. *MmGroES* und dem nicht-hydrolysierten ATP-Analogen AMP-PNP bindet GroES an GroEL und verhindert das Eindringen der Proteinase K in die cis-Kavität des GroEL. Die trans-Kavität wird nicht durch GroES geschützt, da hier keine Bindung erfolgt. Proteinase K kann in die Kavität eindringen und die C-Termini partiell verdauen. Von jedem GroEL Homotetradecamer wird also nur die Hälfte der Untereinheiten vor dem Verdau geschützt (Abb. 27).

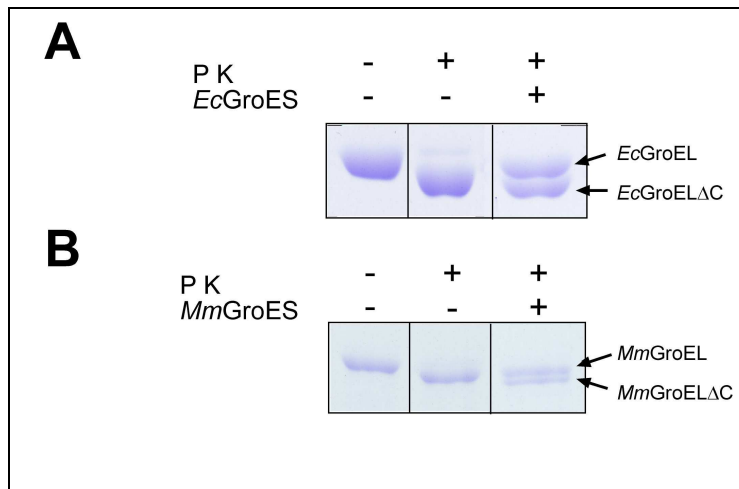


Abbildung 27. Proteinase K Verdau des C-Terminus von GroEL wird durch GroES verhindert. (A) Der C-Terminus von *EcGroEL* (0,5 µM) wurde durch Inkubation mit 0,5 µg/ml Proteinase K (PK) verdaut (*EcGroEL*ΔC). Zugabe von *EcGroES* (1 µM) schützt den C-Terminus des cis-Rings vor einem PK Verdau. (B) Auch der C-Terminus des cis-Rings von *MmGroEL* (0,5 µM) wird durch Zugabe von *MmGroES* (1 µM) vor einem Verdau geschützt.

Mit dem partiellen Verdau von *MmGroEL* durch Proteinase K lässt sich ermitteln, ob sich das Substrat MDH in der cis- oder trans-Kavität von *MmGroEL* befindet und ob *MmGroES* zugleich gebunden ist (Abb. 28).

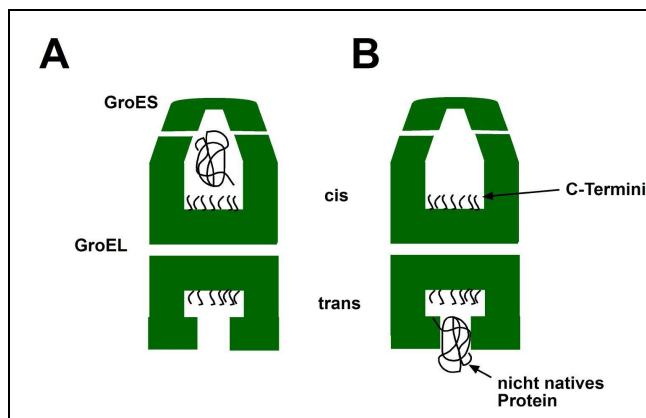


Abbildung 28. Modell eines eingeschlossenen Substrates in der cis-Kavität von GroEL (A) und in der offenen trans-Kavität (B).

Im folgenden Versuch wurde denaturierte MDH an *MmGroEL* bzw. *EcGroEL* in An- und Abwesenheit des jeweiligen GroES gebunden. Die Proben wurden mit AMP-PNP präinkubiert und der Verdau wurde durch Zugabe von Proteinase K gestartet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und immunologisch auf die Anwesenheit von MDH analysiert.

Mittels SDS-PAGE wurde eine Bindung von GroES an GroEL durch die Detektion von partiell verdauten GroEL nachgewiesen.

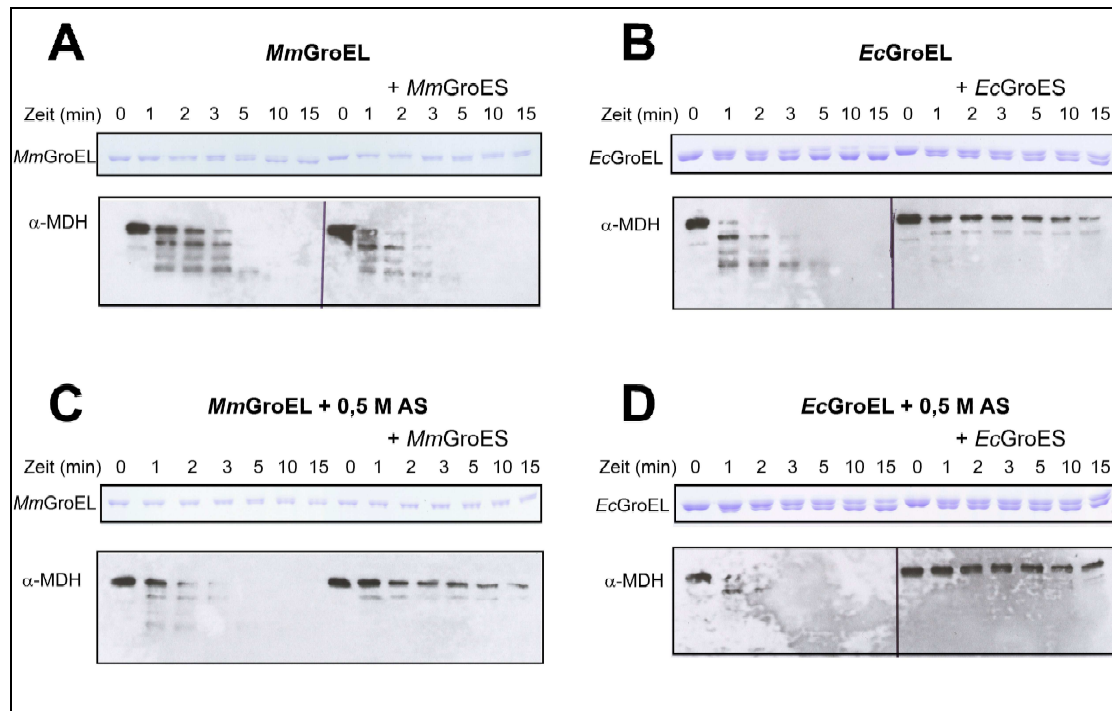


Abbildung 29. Ammoniumsulfat bewirkt die Einkapselung von ungefalteter MDH in die cis-Kavität des *MmGroEL*. GroEL (0,5 μ M) wurde mit denaturierter MDH (0,5 μ M) inkubiert. Nach Zugabe von AMP-PNP (2 mM) wurde die Hälfte des Ansatzes mit 10 μ g/ml Proteinase K (PK) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western Blot (MDH-Antikörper) analysiert. Die zweite Hälfte des Ansatzes wurde vor PK-Zugabe mit GroES (1 μ M) und AMP-PNP (2 mM) präinkubiert. (A) Experiment mit *MmGroE*. (B) Experiment mit *EcGroE*. (C) *MmGroE* in Anwesenheit von 0,5 M AS. (D) *EcGroE* in Anwesenheit von 0,5 M AS.

Abbildung 29 A zeigt einen raschen Verdau der *MmGroEL*-gebundenen MDH, unabhängig davon ob *MmGroES* anwesend ist oder nicht. In Abwesenheit von *MmGroES* wird *MmGroEL* partiell verdaut. In Anwesenheit von *MmGroES* wird die Hälfte des GroEL vor dem partiellen Verdau geschützt. Der Vergleich mit dem *EcGroEL* ergibt einen deutlichen Unterschied (Abb. 29 B). *EcGroEL* wird im gleichen Umfang wie *MmGroEL* in Anwesenheit von GroES vor dem partiellen Verdau geschützt, aber gleichzeitig wird die gebundene MDH ebenfalls geschützt.

Dieses Experiment wurde in Anwesenheit von Ammoniumsulfat wiederholt. Interessanterweise wird unter diesen Bedingungen denaturierte MDH durch das *MmGroE*-System geschützt (Abb. 29 C). *MmGroES* schützt wie erwartet

die Hälfte von *MmGroEL* vor dem partiellen Verdau. Das Kontrollexperiment mit dem *EcGroE*-System in Anwesenheit von Ammoniumsulfat zeigt keinen Unterschied im Vergleich zu *MmGroE* (Abb. 29 D).

Das Experiment (Abb. 29) zeigt zudem, daß trotz eines zweifachen Überschusses von GroES über GroEL es nicht zu einem vollständigem Schutz des GroEL vor partiellem Verdau kommt. Unter den verwendeten Bedingungen bindet GroES strikt asymmetrisch, so dass nur die Hälfte des GroEL vor dem partiellen Verdau geschützt wird.

Im Kapitel 3.2.2 wurde gezeigt, daß *MmGroEL* in der Lage ist, die Faltung des Modellsubstrates Rhodanese zu vermitteln. In einem weiteren Versuch mit Proteinase K sollte nun untersucht werden, ob Rhodanese bereits in Abwesenheit von Ammoniumsulfat in die cis-Kavität eingeschlossen wird und dies somit eine mechanistische Voraussetzung für die Faltung durch das *MmGroE*-System darstellt.

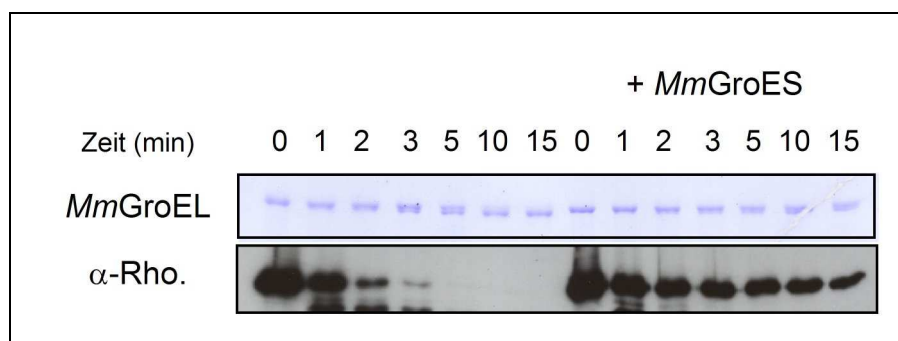


Abbildung 30. Das *MmGroE*-System bindet denaturierte Rhodanese in der cis-Kavität und verhindert den Verdau des Substrates durch Proteinase K. Experiment wie in Abb. 29 beschrieben. Die Anwesenheit von *MmGroES* und AMP-PNP verhindert den Verdau von denaturierter Rhodanese. In Abwesenheit von *MmGroES* erfolgt ein vollständiger Verdau des Substrates. Rhodanese wird in die cis-Kavität des *MmGroEL* eingeschlossen und vor einem Verdau geschützt.

Abbildung 30 zeigt, daß Rhodanese in Anwesenheit von *MmGroES* und dem Nukleotidanalogen AMP-PNP vor einen Proteinase K Verdau geschützt ist. Dieser Effekt ist unabhängig von der Anwesenheit von Ammoniumsulfat. Rhodanese muss sich somit in der cis-Kavität des *MmGroEL/ES* Komplexes befinden.

Rhodanese und MDH werden von *MmGroEL* unterschiedlich behandelt. Nur in Anwesenheit von Ammoniumsulfat wird MDH durch GroES in der Kavität

von GroEL eingeschlossen, wodurch die Faltung ermöglicht wird. In Abwesenheit von Ammoniumsulfat wird MDH dagegen am *MmGroEL* trans-Ring gebunden. Rhodanese wird dagegen auch ohne Ammoniumsulfat erfolgreich eingeschlossen, aber langsam aus der Kavität in gefalteter Form freigesetzt. Dieser Befund belegt die mechanistische Bedingung der Substrateinkapselung. Im Gegensatz zu *MmGroE* ist *EcGroE* auch in Abwesenheit von Ammoniumsulfat in der Lage, beide Modellsubstrate erfolgreich einzuschließen.

3.3 *M. mazei* Gruppe II Chaperoninsystem: Thermosom und Prefoldin

3.3.1 Thermosom aus *M. mazei*

Die Analyse des Genoms von *M. mazei* Gö1 offenbarte die Existenz von drei konservierten Thermosom-Genen. Die drei Thermosom-Untereinheiten (*MmThs* α , β und γ) haben ein Molekulargewicht von 58,9, 58,5 und 58,2 kDa. Ein Sequenzvergleich der *MmThs*-Untereinheiten mit eukaryontischen und archaeellen Gruppe II Chaperoninen ergab eine Sequenzhomologie von 50-80 %. Die apikalen Domänen von *MmThs* α und γ haben eine ~70 % identische und ~85 % ähnliche Aminosäuresequenz (Abb. 31), während hingegen die apikale Domäne der *MmThs* β -Untereinheit verglichen mit der der beiden anderen *MmThs* Untereinheiten eine nur zu ~35 % identische und ~60 % ähnliche Aminosäuresequenz aufweist. Die apikale Domäne von *MmThs* α ist ~50–95 % identisch und ~80–97 % ähnlich zu anderen archaeellen *Ths* α Untereinheiten (*Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Thermoplasma acidophilum*). Eine Sequenzanalyse der helikalen Extension der apikalen *MmThs* β Domäne zeigt, daß diese Untereinheit nur eine geringere Homologie zu den anderen beiden *MmThs* Untereinheiten aufweist (30-45 % identische und 60-70 % ähnliche Aminosäuresequenz). Die helikalen Extensionen der α - und die γ *MmThs* Untereinheiten weisen im Gegenzug eine hohe Homologie zueinander auf (~70 % identische, ~80 % ähnliche Aminosäuresequenz).

Sequenzvergleich der apikalen Domänen des Thermosoms

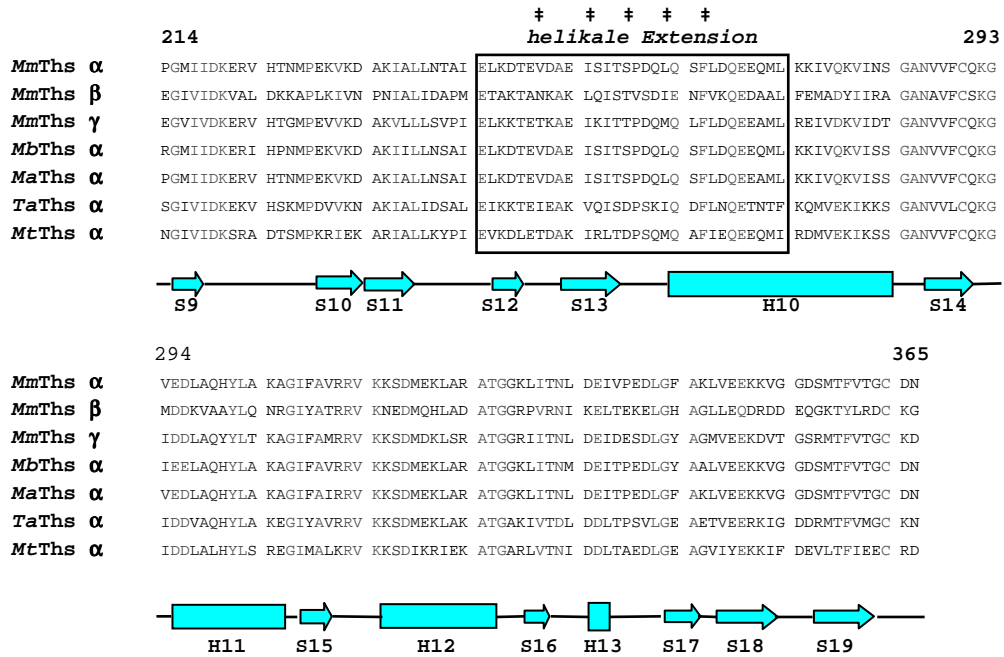


Abbildung 31. Sequenzvergleich der apikalen Domänen des Thermosoms (Ths). Die apikalen Domänen der *MmThs*-Untereinheiten weisen eine hohe Homologie zu den anderen archaeellen Ths-Untereinheiten auf (*Mm-Methanosarcina mazei*; *Mb-Methanosarcina barkeri*; *Ma-Methanosarcina acetivorans*; *Ta-Thermoplasma acidophilum*; *Mt-Methanobacterium thermoautotrophicum*). Konservierte Aminosäuren sind rot, ähnliche Aminosäuren sind blau gefärbt. Die Zahlen an den Sequenzen beziehen sich auf die Aminosäurenposition im *TaThs α* wieder. Die Aminosäuren, die die helikalen Extension der apikalen Domäne des *TaThs α* bilden, sind umrahmt. Rechtecke kennzeichnen die Position von α -Helices und Pfeile die Position von β -Faltblättern (Klump et al. 1997).

3.3.2 *MmThs* Untereinheiten

Um eine funktionelle Untersuchung von *MmThs in vitro* zu ermöglichen, wurde jede *MmThs* Untereinheit einzeln rekombinant in *E. coli* BL21 DE3 Zellen exprimiert und gereinigt (Abb. 32).

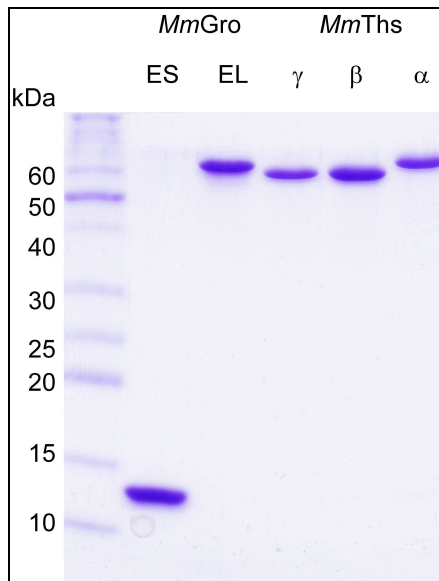


Abbildung 32. Rekombinante α , β und γ *MmThs*-Untereinheiten. Coomassie Blau gefärbtes SDS-PAGE Gel mit den drei *MmThs*-Untereinheiten (je 3 μ g). Zum Vergleich wurden *MmGroES* und *MmGroEL* (je 3 μ g) aufgetragen.

Abbildung 32 zeigt ein SDS-PAGE Gel mit jeweils 3 μ g *MmThs*-Untereinheiten, um die Reinheit der rekombinanten Proteine zu dokumentieren. Zum Vergleich wurde dieselbe Menge *MmGroEL* und *MmGroES* aufgetragen.

3.3.3 Endogene *MmThs* Zusammensetzung

M. mazei besitzt drei Gene, für die Ths-Untereinheiten kodieren. Dies wirft folgende Fragestellungen auf:

- Werden alle drei *MmThs*-Untereinheiten *in vivo* exprimiert?
- Gibt es *in vivo* *MmThs*-Populationen mit unterschiedlicher Untereinheiten-Zusammensetzung?
- Welche Zusammensetzung hat, im Falle einer einzigen Ths-Population, das endogene *MmThs*?

Mit Hilfe von Immunpräzipitationen des endogenen *MmThs* konnten diese Fragestellungen analysiert werden.

Gegen die *MmThs* α und β Untereinheiten wurden zunächst Antikörper in Kaninchen gezüchtet. Da die Sequenzhomologie zwischen der *MmThs* α und der β Untereinheit am geringsten ist, konnte davon ausgegangen werden, daß eine möglich auftretende immunologische Kreuzreaktion der jeweiligen Antikörper mit den verschiedenen *MmThs* Untereinheiten so am geringsten sein würde. Um aussagekräftige Immunpräzipitationen durchzuführen, wurden beiden Antikörper auf ihre Spezifität bezüglich der drei *MmThs* Untereinheiten analysiert.

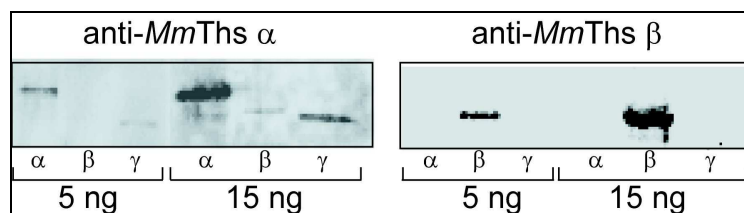


Abbildung 33. Spezifität von anti-*MmThs* α und anti-*MmThs* β . Die drei *MmThs* Untereinheiten (5 ng und 15 ng) wurden mit anti-*MmThs* α (links) oder anti-*MmThs* β Antikörper (rechts) immunogeblottet. Beide Antikörper erkennen mit hoher Spezifität das jeweilige Antigen. Anti-*MmThs* α kreuzreagiert nur schwach mit *MmThs* γ .

Abbildung 33 zeigt eine Western-Blot Analyse, welche die Kreuzreaktionen von anti-*MmThs* α und anti-*MmThs* β mit den drei *MmThs* Untereinheiten untersucht. Anti-*MmThs* α reagiert stark mit *MmThs* α , eine Kreuzreaktion mit *MmThs* γ ist ca. 10-fach schwächer (Abb. 33 links). Eine Interaktion des anti-*MmThs* α mit *MmThs* β war nicht nachzuweisen. Anti-*MmThs* β erkennt spezifisch nur *MmThs* β (Abb. 33 rechts). Eine Kreuzreaktion mit *MmThs* α oder *MmThs* γ wird nicht beobachtet.

Um festzustellen, ob alle drei *MmThs* Untereinheiten *in vivo* exprimiert werden, wurde das lösliche *M. mazei* Zelllysate auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen und die Fraktionen immunologisch mit anti-*MmThs* α und anti-*MmThs* β auf die Anwesenheit der *MmThs* Untereinheiten analysiert (Abb. 34).

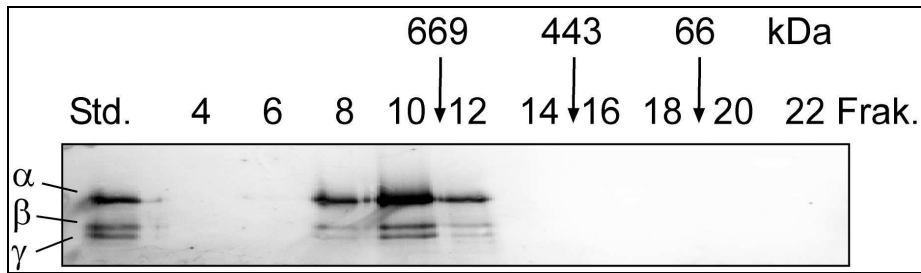


Abbildung 34. Gelfiltration des *M. mazei* Zelllysates mit anschließender immunologischer Analyse der Fraktionen mit anti-*MmThs* α und anti-*MmThs* β . Immunologische Detektion der drei *MmThs* Untereinheiten als hochmolekularen Komplex im *M. mazei* Zelllysate. (links) Die drei *MmThs* Untereinheiten als Standard (Std.).

In Abbildung 34 ist die immunologische Detektion der drei endogenen *MmThs*-Untereinheiten nach einer Gelfiltration gezeigt. Endogenes *MmThs* liegt als hochmolekularer Komplex vor. Die Elution monomerer *Ths*-Untereinheiten konnte nicht detektiert werden.

Da alle drei *MmThs* Untereinheiten *in vivo* exprimiert werden, ist es durchaus denkbar, daß entweder unterschiedliche Populationen an *MmThs* Komplexen existieren oder aber auch nur eine *Ths*-Population definierter Zusammensetzung. Durch Immunpräzipitation des endogenen *MmThs* konnte diese Fragestellung geklärt werden (Abb. 35).

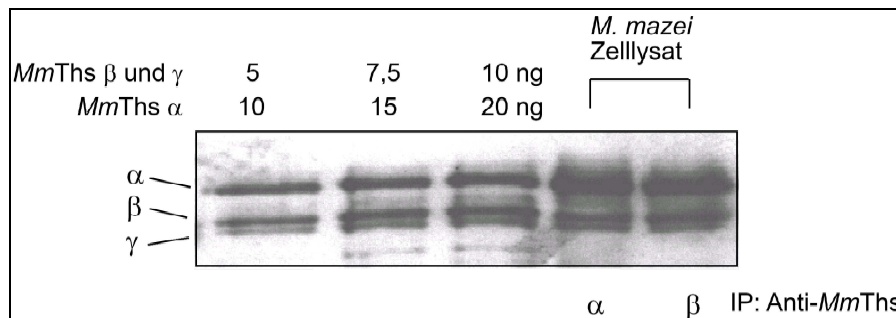


Abbildung 35. Koimmunpräzipitation endogener *MmThs* Komplexe. (rechts) *MmThs* aus dem Zelllysate wurde mit anti-*MmThs* α und - β präzipitiert. Die beiden Präzipitate wurden immunologisch mit anti-*MmThs* α und - β analysiert. Sowohl das anti-*MmThs* α - als auch das β -Präzipitat haben einen *Ths*-Untereinheitenverhältnis von 2:1:1 (α : β : γ). (rechts) α , β und γ *MmThs* Standards (2:1:1).

Endogenes *MmThs* wurde mit anti-*MmThs* α und anti-*MmThs* β immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend immunologisch mit anti-*MmThs* α und β analysiert (Abb. 35). Beide Präzipitationen zeigen ein identisches *Ths*-Untereinheitenmuster. Sowohl in

der anti-*MmThs* α - als auch in der anti-*MmThs* β -Immunpräzipitation werden die anderen *MmThs*-Untereinheiten im selben Verhältnis kopräzipitiert. Endogenes *MmThs* liegt also als ein Komplex vor, der alle drei *MmThs* Untereinheiten enthält. Durch Vergleich der Immunpräzipitationen mit den mitaufgetragenen Standards konnte eine Zusammensetzung des endogenen *MmThs* bezüglich der α , β und γ Ths-Untereinheiten von 2:1:1 nachgewiesen werden. Dieses Verhältnis lässt eine achtfache Symmetrie mit vier α und je zwei β und γ Ths-Untereinheiten pro Ring erwarten.

3.3.4 *MmThs* Assemblierung

Um eine Chaperonaktivität des *MmThs*-Komplexes zu untersuchen, war es notwendig die monomere *MmThs*-Untereinheiten *in vitro* zu assemblieren. Im folgenden Versuch wurden *MmThs*-Untereinheiten einzeln oder als equimolare Mischungen in An- und Abwesenheit von ATP und Mg^{2+} bei 32° C inkubiert und mittels nativer PAGE analysiert (Abb. 36).

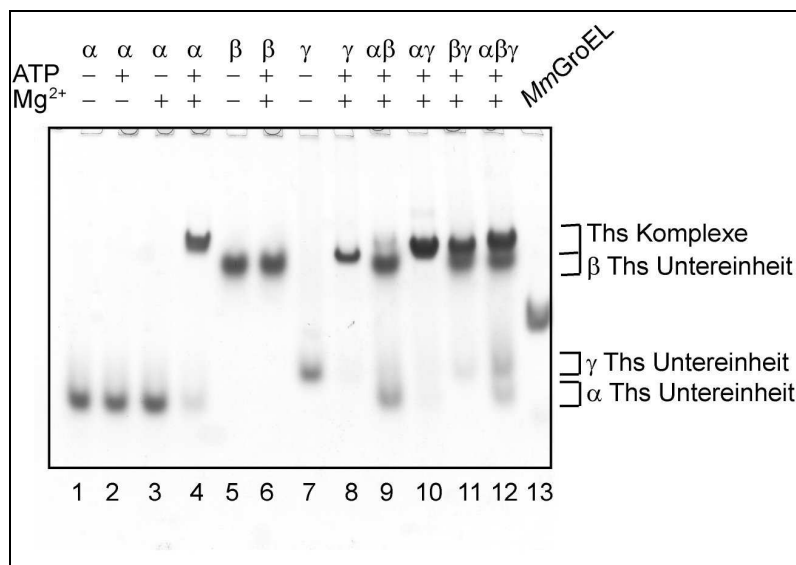


Abbildung 36. *In vitro* Assemblierung monomerer *MmThs*-Untereinheiten. Monomere *MmThs*-Untereinheiten wurden in An- und Abwesenheit von ATP und Mg^{2+} bei 32° C inkubiert und mittels nativer PAGE (bei 4° C) analysiert. In Anwesenheit von ATP/ Mg^{2+} assemblieren die Ths-Untereinheiten zu hochmolekularen Komplexen. Nur *MmThs* β bildet keine homooligomere Komplexe.

Die Inkubation in Anwesenheit von nur ATP oder Mg^{2+} ist nicht ausreichend für eine Komplexbildung (Abb. 36, Geltaschen 1-3). Wenn *MmThs* α mit ATP und Mg^{2+} inkubiert wird, lässt sich bei anschließender Analyse eine langsam migrierende Proteinbande detektieren (Geltasche 4). Eine Analyse dieser Proteinbande mittels Gelfiltration ergab, daß es sich um einen hochmolekularen Komplex mit einem Molekulargewicht von ~950 kDa handelt. Eine vollständige Komplexbildung in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} ist auch für *MmThs* γ zu beobachten (Geltasche 8). *MmThs* β bildet in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} keine Komplexe (Geltaschen 5 und 6). Die monomere *MmThs* β besitzen aufgrund ihres relativ hohen $pI = 5,5$ ein langsameren Migrationsverhalten als die beiden anderen *MmThs*-Untereinheiten (*MmThs* α : $pI = 4,6$; *MmThs* γ : $pI = 4,8$).

Die Inkubation von *MmThs* α und β (Geltasche 9) führt zu keinem detektierbaren oligomeren Komplex. Die Inkubation von *MmThs* α und γ (Geltasche 10) bzw. β und γ (Geltasche 11) im equimolaren Verhältnis in Anwesenheit von ATP/ Mg^{2+} zeigt die Bildung eines Komplexes. Auch die Inkubation der drei *MmThs* Untereinheiten in einem equimolaren Verhältnis führt zu einem hochmolekularen Komplex (Geltasche 12). Bei dieser Komplexbildung werden allerdings verhältnismäßig weniger *MmThs* β Untereinheiten eingebaut als *MmThs* α oder γ .

Eine Nukleotidhydrolyse ist offenbar für eine Oligomerisierung der *Ths*-Monomeren nicht erforderlich, da eine Komplexbildung auch in Anwesenheit von ADP/ Mg^{2+} zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Eine Nukleotidbindung ist für die Oligomerisierung aber zwingend notwendig.

Um die Zusammensetzung der assemblierten Komplexe zu analysieren, wurden diese nach einer Gelfiltration von nicht assemblierten *MmThs*-Monomeren isoliert. Die Analyse der Untereinheiten-Zusammensetzung erfolgte mittels Immunfluoreszenz (Tab. 2).

<i>MmThs</i>- Untereinheiten	eingesetztes Verhältnis	detektiertes Verhältnis
α	-	nur <i>MmThs</i> α
β	-	keine Komplexbildung
γ	-	nur <i>MmThs</i> γ
α:β	1:0,5	1:0,58
α:β	1:1	1:0,62
α:γ	1:0,5	1:0,57
α:γ	1:1	1:0,95
γ:β	1:0,5	1:0,44
γ:β	1:1	1:0,9
α:β:γ	2:0,5:1	2:1:1,3
α:β:γ	2:1:1	2:1,2:1,3

Tabelle 2. Zusammensetzung *in vitro* assemblierter *MmThs*-Komplexe. Monomere *MmThs*-Untereinheiten wurden einzeln oder im Gemisch in Anwesenheit von ATP/Mg²⁺ bei 32° C inkubiert. Komplexe wurden mittels einer Gelfiltration von nicht assemblierten Monomeren getrennt. Die Zusammensetzung der Komplexe wurde quantitativ mittels Immunoblotting analysiert (Mittelung von je drei Assemblierungsanalysen).

In Tabelle 2 ist die Untereinheiten-Zusammensetzung von assemblierten *Ths*-Komplexen gezeigt. Sowohl *MmThs* α als auch die *MmThs* γ bilden homooligomere Komplexe. Die *MmThs* β Untereinheit ist jedoch nicht in der Lage, homooligomere Komplexe zu bilden. Allerdings bildet *MmThs* β gemeinsam mit *MmThs* α heterooligomere Komplexe in einem Verhältnis von ~1:0,5, unabhängig von dem anfangs eingesetzten Monomerverhältnis. Dieser Komplex kann allerdings nicht auf dem nativen PAGE-Gel detektiert werden, welches bei 4 °C durchgeführt wurde (Abb. 36). Dies deutet auf eine gewisse Instabilität des Komplexes bei niedrigen Temperaturen hin. *MmThs* β bildet mit *MmThs* γ heterogene Komplexe. Da dieser Komplex ein dem homooligomeren *MmThs* γ unterschiedlichen Migrationsverhalten aufweist und *MmThs* β allein keine homooligomere Komplexe bildet, muss es sich um einen gemischten *MmThs* β γ-Komplex handeln.

Die Analyse endogenes *MmThs* ergab eine *MmThs*-Untereinheiten-Zusammensetzung (α:β:γ) in einem Verhältnis von 2:1:1. Für weitere Studien war es nun wichtig, Komplexe *in vitro* in diesem Verhältnis zu assemblieren.

Um sicher zu stellen, daß es sich nicht um verschiedene Ths-Populationen von homooligomeren *MmThs*-Komplexen handelt, die in denselben Fraktionen eluieren, wurde das eingesetzte Verhältnis der *MmThs* Untereinheiten variiert und die Zusammensetzung der Komplexe analysiert und miteinander verglichen. Falls unterschiedliche Ths-Populationen vorliegen würden, könnte dies durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Im Falle einer definierten Zusammensetzung des *MmThs*-Komplexes, sollte sich das detektierte Verhältnis der drei *MmThs* Untereinheiten, unabhängig von der eingesetzten Menge an *MmThs*-Monomeren, nicht ändern. In Tabelle 2 ist gezeigt, daß unabhängig von dem eingesetzten *MmThs*-Monomerverhältnis, eine Zusammensetzung von 2:1:1 ($\alpha:\beta:\gamma$) detektiert wurde. Dieser Komplex wurde, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, mittels anti-*MmThs* α und anti-*MmThs* β immunpräzipitiert (Daten nicht gezeigt). Bei beiden Immunpräzipitationen wurde das Verhältnis 2:1:1 ($\alpha:\beta:\gamma$) detektiert.

3.3.5 ATPase Aktivität von *MmThs*

Um zu untersuchen, ob die *in vitro* assemblierten *MmThs*-Komplexe die Voraussetzung für ein Proteinfaltungszyklus erfüllen, wurde die ATP-Hydrolyserate nach der Malachit-Green-Methode gemessen (Lanzetta *et al.* 1977).

Der homooligomere *MmThs* α und der *MmThs* $\alpha\gamma$ (1:1) Komplex weisen eine ähnlich ATP-Hydrolyserate auf (Abb. 37). Die nicht assemblierten *MmThs* β Monomere und die *MmThs* γ Komplexe haben keine oder nur eine sehr niedrige Hydrolyserate. Der *MmThs* $\alpha\beta\gamma$ (2:1:1) Komplex besitzt hingegen mit 4,7 ATP/min die höchste Hydrolyserate unter Standardbedingungen. Möglicherweise führt eine optimale Anordnung der Untereinheiten im Ring zu einer höheren ATPase Aktivität.

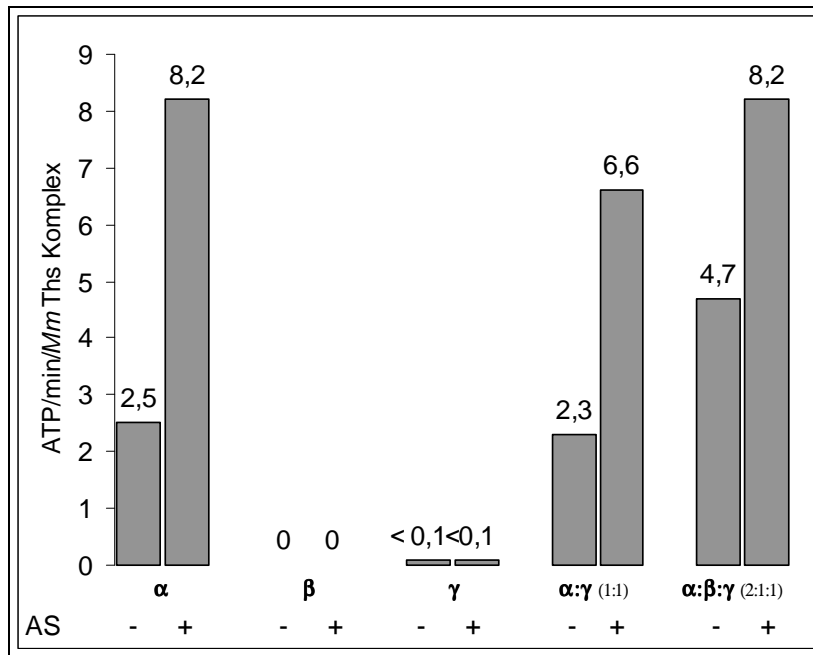


Abbildung 37. ATP-Hydrolyseraten von *in vitro* assemblierten *MmThs*-Komplexe. Die Hydrolyserate wurde in An- und Abwesenheit von 0,2 M Ammoniumsulfat (AS) bei 37° C gemessen.

Der stimulatorische Effekt von Ammoniumsulfat auf die Hydrolyserate von *MmGroEL* wurde in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Anwesenheit von Ammoniumsulfat konnte ebenfalls eine 2- bis 4-fache Stimulation der ATPase Aktivität der *MmThs* Komplexe bewirken (Abb. 37). *MmThs* β und das homooligomere *MmThs* γ zeigten jedoch auch in Anwesenheit von Ammoniumsulfat keine ATPase-Aktivität.

MmThs $\alpha\beta\gamma$ (2:1:1) besitzt mit 4,7 ATP/min/Komplex eine ähnliche ATP-Hydrolyserate wie *MmGroEL* in Abwesenheit von *MmGroES* (4,5 ATP/min/Komplex).

3.3.6 *MmThs* verhindert die Aggregation denaturierter Rhodanese und Luziferase

Chaperonaktivität zeichnet sich durch die Verhinderung von Aggregatbildung und der Stabilisierung nicht-gefaltete Proteine aus. Wie im Kapitel 3.2.1 für *MmGroEL* gezeigt, wurde mittels Lichtstreuung nun die Fähigkeit von *MmThs*

untersucht, denaturierte Rhodanese und Luziferase an der Aggregatbildung zu hindern. Für diese und allen weitere Studien wurde der *in vitro* assemblierte heterooligomere *MmThs* Komplex mit der Untereinheiten-Zusammensetzung von 2:1:1 (α : β : γ) verwendet.

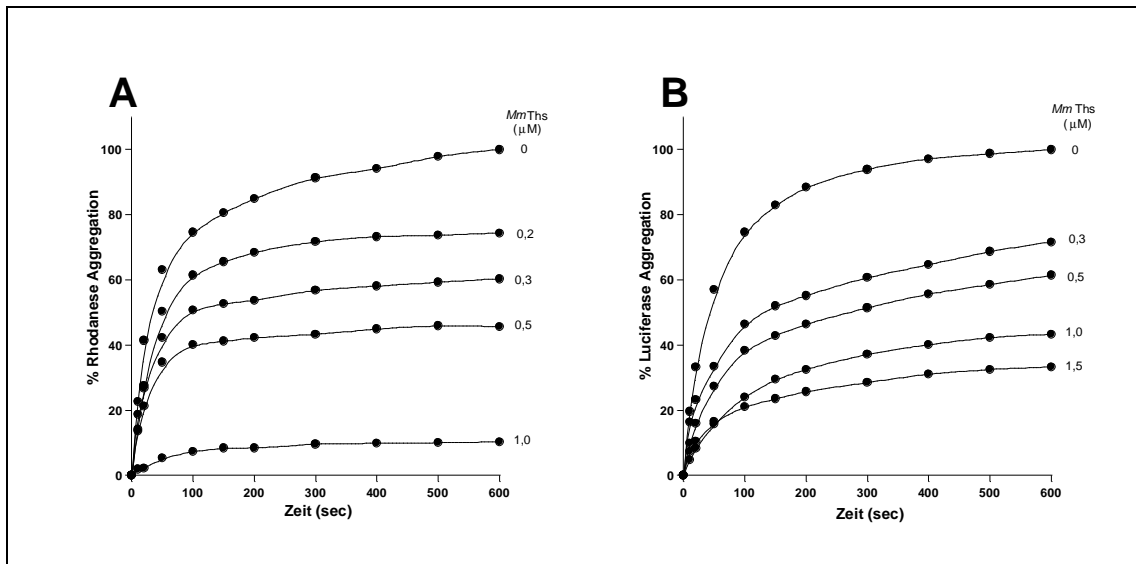


Abbildung 38. *MmThs* verhindert die Aggregation denaturierter Rhodanese (A) und Luziferase (B). Denaturierte Rhodanese (A) und Luziferase (B) (Endkonz. je 0,5 μ M) wurden in Ab- und Anwesenheit von unterschiedlichen *MmThs*-Konzentrationen verdünnt. Bei hohen *MmThs*-Konzentrationen wird die Aggregatbildung wirkungsvoll verhindert.

Bei den in Abbildung 38 gezeigten Messungen geht hervor, daß *MmThs* in einer konzentrationsabhängigen Weise die Aggregatbildung denaturierter Rhodanese (Abb. 38 A) und Luziferase (Abb. 38 B) verhindert. *MmThs* weist somit die typische Chaperoneigenschaft auf.

3.3.7 *MmThs* bindet denaturierte Rhodanese in einem faltungs-kompetenten Zustand

Im folgenden Versuch sollte nachgewiesen werden, daß *MmThs* denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand bindet und es an das *MmGroE*-System transferiert.

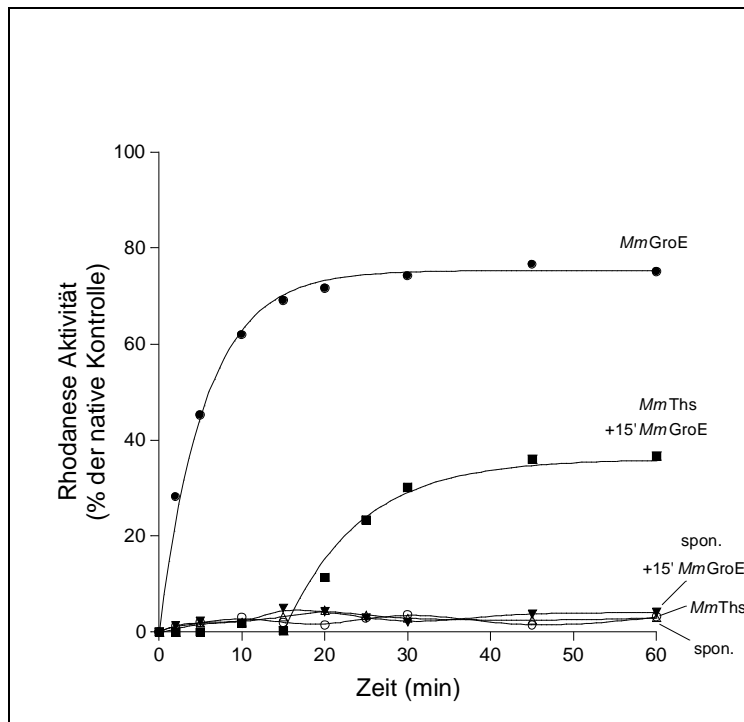


Abbildung 39. *MmThs* bindet denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand. Denaturierte Rhodanese (0,5 μ M) wurde in Puffer verdünnt, der *MmThs* (0,5 μ M) enthielt. Nach Zugabe von *MmGroE* (1 μ M) konnte enzymatisch aktive Rhodanese nachgewiesen werden. Ohne vorherige Bindung von Rhodanese an *MmThs* konnte nach Zugabe von *MmGroE* keine aktive Rhodanese nachgewiesen werden.

Denaturierte Rhodanese wurde in Anwesenheit von *MmThs* in eine ATP enthaltene Pufferlösung verdünnt (Abb. 39). Erst nach Zugabe von *MmGroE* wurde die Rückfaltung denaturierter Rhodanese vermittelt. Hingegen konnte eine spätere Zugabe von *MmGroE* in Abwesenheit von *MmThs* die Rückfaltung von Rhodanese nicht vermitteln. *MmThs* bindet zwar denaturierte Rhodanese, ist aber nicht in der Lage die Rückfaltung zu vermitteln. Ein Kontrollexperiment in Anwesenheit von *MmPfd* führte ebenfalls nicht zu einer Rückfaltung von Rhodanese (Daten nicht gezeigt).

MmThs bindet denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand und transferiert sie zu *MmGroE*, welches anschließend eine Rückfaltung vermittelt. In der Abwesenheit von *MmThs* aggregiert denaturierte Rhodanese, so dass eine spätere Rückfaltung durch *MmGroE* nicht vermittelt werden kann.

3.3.8 Prefoldin aus *M. mazei*

M. mazei besitzt zwei Gene, die je eine Untereinheit des Chaperons Prefoldin (*MmPfd* α , *MmPfd* β) kodieren. *MmPfd* α hat einen Molekulargewicht von 15,3 kDa, *MmPfd* β ist 13,5 kDa groß. In Abbildung 40 ist ein Sequenzvergleich der α und β Pfd-Untereinheiten von *M. mazei* mit denen von *Methanobacterium thermoautotrophicum* (*MtPfd* α und *MtPfd* β) gezeigt.

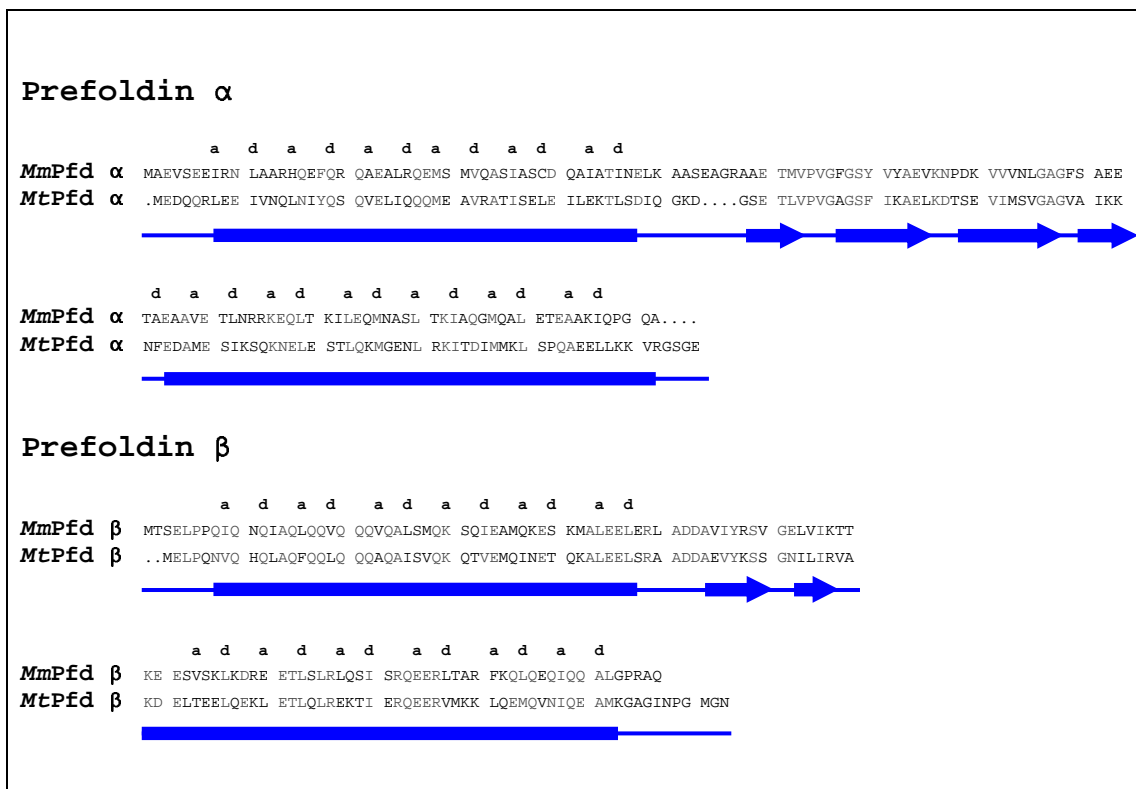


Abbildung 40. Sequenzvergleich der Prefoldin-Untereinheiten von *M. mazei* mit denen des *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Die „coiled coil“ Regionen sind durch Rechtecke, β -Faltblatt Regionen durch Pfeile schematisch dargestellt. a/d kennzeichnen die hydrophoben Aminosäuren, die für „coiled coil“ Regionen typisch sind (abcdefg).

Beide Pfd α sind zu 29 % identisch und zu 58 % homolog zueinander. Die Pfd β Untereinheiten sind zu 46 % identisch und zu 71 % homolog. Für α -Helices, die „coiled coil“ Strukturen bilden, ist ein Motiv aus sieben Aminosäuren (abcdefg) charakteristisch, wobei die Aminosäuren **a** und **d** jeweils einen hydrophoben Charakter haben (Lupas 1996). Sowohl *MmPfd* α als auch *MmPfd* β besitzen in den Regionen der Tentakel diese charakteristische hydrophobe Aminosäuren.

Eine Strukturvorhersage, die auf einem Programm basiert (Lupas *et al.* 1991), das Sequenzen mit einer Datenbank aus bekannten „coiled coil“ Proteinstrukturen vergleicht, ergab, daß sowohl für *MmPfd* α als auch für *MmPfd* β „coiled coil“ Strukturen an den distalen Regionen der jeweiligen Untereinheit gebildet werden (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). Diese Ergebnisse lassen eine ähnliche Struktur für *MmPfd* erwarten wie die des Prefoldins aus dem Archeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Abb. 9).

3.3.9 *MmPfd* ist ein heterooligomerer Komplex

Beide *MmPfd*-Untereinheiten wurden gemeinsam mit Hilfe eines Plasmids, das beide Untereinheiten enthielt, in *E. coli* BL21 DE3 Zellen exprimiert und anschließend als Komplex gereinigt. Abbildung 41 zeigt ein SDS-PAGE-Gel mit dem gereinigten *MmPfd*-Komplex. Zum Vergleich wurde zusätzlich *EcGroES* und *MmGroES* aufgetragen.

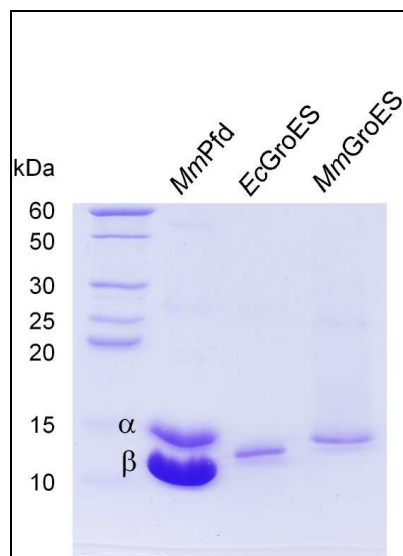


Abbildung 41. SDS-PAGE Gel von *MmPfd*. *MmPfd* (6 μ g) enthält *MmPfd* α (15,3 kDa) und *MmPfd* β (13,5 kDa) in einem Verhältnis von \sim 1:2. Zum Vergleich: *EcGroES* und *MmGroES* (je 2 μ g).

Pfd ist ein heteromerer Komplex bestehend aus zwei α - und vier β -Pfd-Untereinheiten. Um festzustellen, ob das rekombinante *MmPfd* auch als heterooligomeres Komplex vorliegt, wurde es mittels Gelfiltration analysiert.

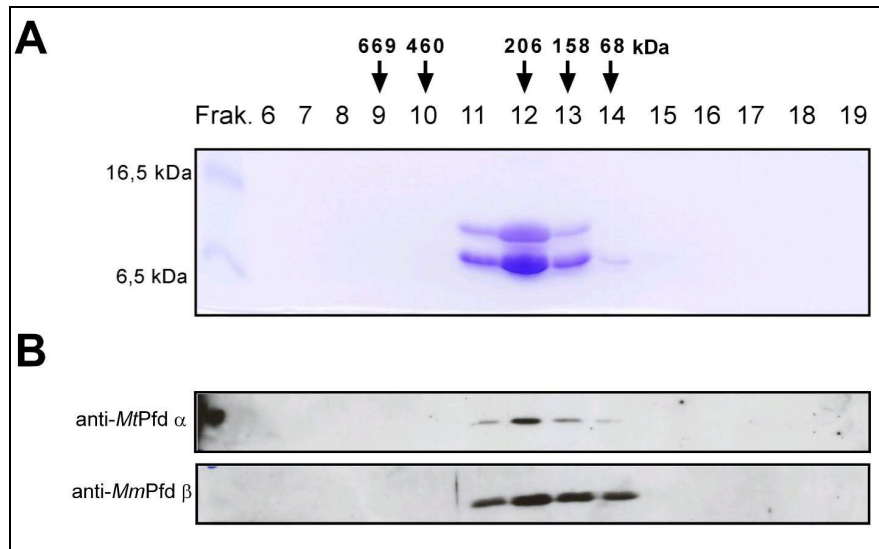


Abbildung 42. Gelfiltration von rekombinanten (A) und endogenem (B) *MmPfd*. (A) SDS-PAGE Analyse der Fraktionen nach einer Gelfiltration von rekombinanten *MmPfd*. Das rekombinante *MmPfd* eluiert in den Fraktionen mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 200 kDa. (B) Western Blot Analyse des endogenen *MmPfd* (anti-*MmPfd* α und anti-*MmPfd* β). Rekombinantes und endogenes *MmPfd* eluiert in denselben Fraktionen. (Pfeile: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule, in kDa: 669-Thyroglobulin, 460-Ferritin, 206-Katalase, 158-Aldolase, 68-Albumin).

Rekombinantes *MmPfd* eluiert als hochmolekularen Komplex (Abb. 42 A). Beide *MmPfd* Untereinheiten koeluiieren in denselben Fraktionen in einem Verhältnis von 1:2 (α : β). Ein Vergleich mit Standardproteinen erlaubt eine Abschätzung des Molekulargewichts. Das kalkulierte Molekulargewicht des $\alpha_2\beta_4$ Komplexes von 84,6 kDa weicht jedoch deutlich von dem beobachteten ca. 200 kDa ab. Diese scheinbare Diskrepanz ist in der ungewöhnlichen Struktur von Pfd begründet, die deutlich von einer globulären Form abweicht und auch beim GimC-Komplex aus Hefe, sowie dem aus Rinderhoden isoliertem Pfd beobachtet wurde (Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). Eine Western Blot Analyse zeigte, daß endogenes *MmPfd* auch als hochmolekularen Komplex vorliegt und in denselben Fraktionen eluiert wie rekombinantes *MmPfd* (Abb. 42 B).

3.3.10 *MmPfd* verhindert die Aggregatbildung denaturierter Rhodanese

Molekulare Chaperone stabilisieren nicht-native Proteine und verhindern so eine Aggregatbildung. Mittels eines Lichtstreuungsexperiments wurde die Chaperoneigenschaft von *MmPfd* untersucht. Dazu wurde denaturierte Rhodanese in Pufferlösungen verdünnt, welche unterschiedlich hohe Konzentrationen an *MmPfd* enthielten (Abb. 43).

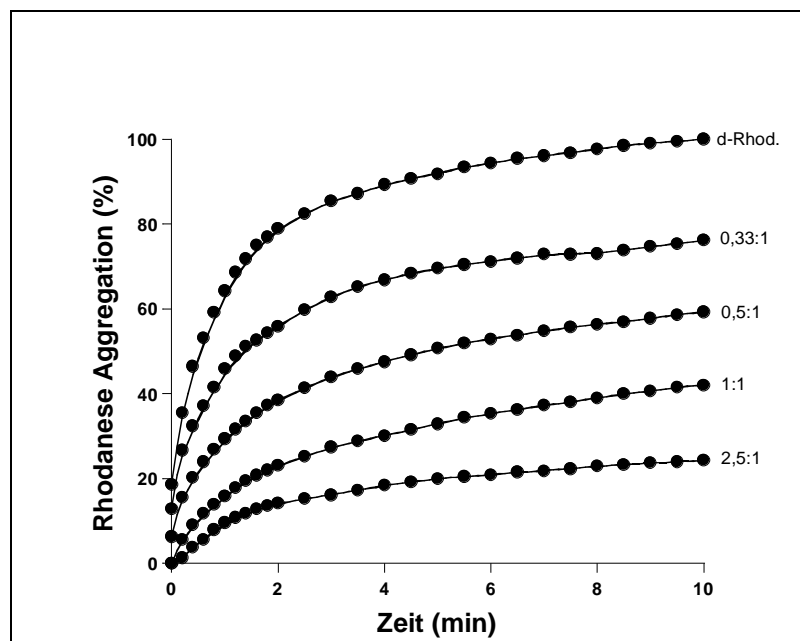


Abbildung 43. *MmPfd* verhindert die Aggregation denaturierter Rhodanese. Mit zunehmender *MmPfd*-Konzentration wird die Aggregatbildung denaturierter Rhodanese verhindert.

Die in Abbildung 43 dargestellten Messungen zeigen, dass bei zunehmender *MmPfd*-Konzentration die Aggregatbildung denaturierter Rhodanese unterbunden wird. *MmPfd* weist die für Chaperone typische Eigenschaft auf.

3.3.11 *MmPfd* überträgt denaturierte Rhodanese auf *MmThs* und *MmGroEL*

In *M. mazei* koexistieren *MmGroEL* und *MmThs* im selben zytoplasmatischen Kompartiment. Die vermittelte Faltung endogener *MmPfd*-Substrate kann von beiden Chaperoninen *in vivo* vorgenommen werden.

Im folgenden Versuch wurde analysiert, ob *MmPfd* denaturierte Rhodanese an *MmThs* und *MmGroEL* transferieren kann (Abb. 44). Denaturierte Rhodanese wurde 10 min lang mit *MmPfd* inkubiert und anschließend erfolgte eine Zugabe von *MmGroEL* oder *MmThs*. Die Lösung wurde mittels Gelfiltration analysiert und die Fraktionen auf die Anwesenheit von Chaperonin, Rhodanese und *MmPfd* untersucht.

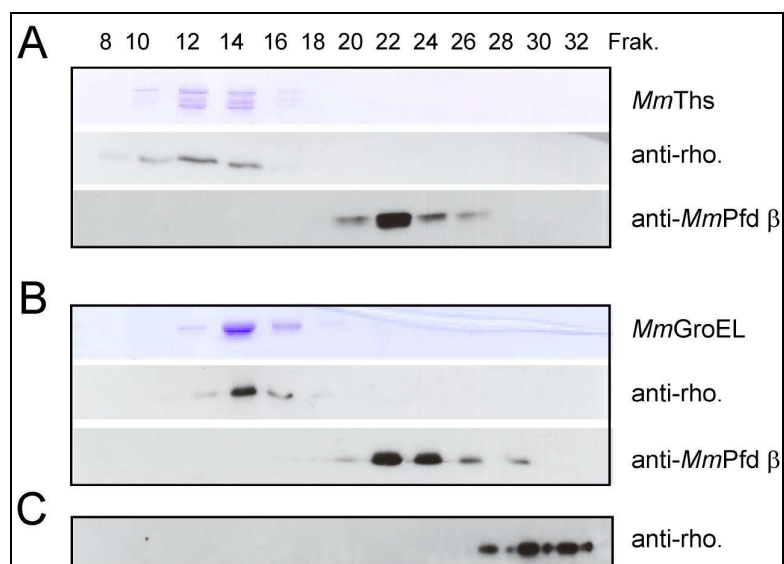


Abbildung 44. *MmPfd*-stabilisierte Rhodanese wird von *MmThs* (A) und *MmGroEL*(B) gebunden. Denaturierte Rhodanese wurde mit *MmPfd* inkubiert. Anschließend wurde *MmThs* (A) oder *MmGroEL* (B) hinzugefügt. Diese Lösung wurde auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen und die Fraktionen immunologisch auf die Anwesenheit von Rhodanese und *MmPfd* analysiert. Die Anwesenheit der *M. mazei* Chaperonine wurde mittels SDS-PAGE analysiert. (C) Elutionverhalten nativer Rhodanese.

Denaturierte Rhodanese koeluiert in denselben hochmolekularen Fraktionen wie *MmThs* (Abb. 44 A) bzw. *MmGroEL* (Abb. 44 B). *MmPfd* ist in der Lage, denaturierte Rhodanese in Lösung zu stabilisieren, so daß sie anschließend von einem Chaperonin gebunden werden kann. In den Fraktionen, in denen *MmPfd* eluiert, lässt sich keine Rhodanese detektieren, was auf eine höhere

Bindungsaffinität seitens der Chaperonine hindeutet. Nach 10 min Inkubationszeit in Abwesenheit von *MmPfd* erfolgte keine Bindung denaturierte Rhodanese an *MmThs* bzw. *MmGroEL* (Daten nicht gezeigt). Denaturierte Rhodanese aggregiert in Abwesenheit von *MmPfd* und kann nicht an einem Chaperonin gebunden werden. Rhodanese konnte in diesem Experiment in keiner der Elutionsfraktionen detektiert werden.

3.3.12 *MmPfd* stabilisiert denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die durch *MmPfd* stabilisierte denaturierte Rhodanese sich in einem faltungskompetenten Zustand befindet. Denaturierte Rhodanese wurde zunächst mit *MmPfd* inkubiert und anschließend erfolgte die Zugabe von *MmGroE* (Abb. 45).

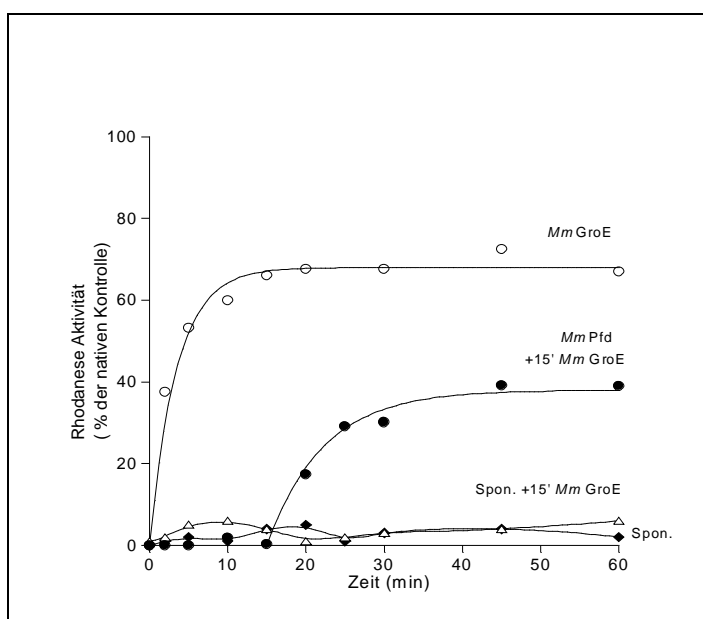


Abbildung 45. *MmPfd* stabilisiert denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand. Denaturierte Rhodanese wurde mit *MmPfd* inkubiert. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von *MmGroE*, welche die Rückfaltung der Rhodanese vermittelte. In Abwesenheit von *MmPfd* konnte keine *MmGroE*-vermittelte Rückfaltung von Rhodanese nachgewiesen werden.

MmGroE vermittelt die Faltung von denaturierter Rhodanese, welche zuvor durch *MmPfd* stabilisiert wurde (Abb. 45). Wird Rhodanese ohne *MmPfd* inkubiert, ist *MmGroE* nach 15 min nicht in der Lage eine Rückfaltung zu vermitteln.

MmPfd stabilisiert denaturierte Rhodanese in einem faltungskompetenten Zustand, vermittelt aber nicht die Rückfaltung. Erst nach der Zugabe von *MmGroE* wird die Rückfaltung von Rhodanese vermittelt.

3.3.13 *MmPfd* bindet denaturierte Rhodanese und Aktin in unterschiedlicher Weise

Das Pfd Homolog GimC aus *S. cerevisiae* bindet *in vivo* die Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin und überführt sie anschließend an TRiC. Endogene archaeele Pfd-Substrate sind noch nicht bekannt. Vorstellbar ist, dass Pfd einen bevorzugten Substratpool hat und dies sich in unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Substraten äußert.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde im folgenden Versuch Unterschiede im Bindeverhalten von *MmPfd* zu den beiden Modellsubstraten Aktin und Rhodanese untersucht. Dabei wurde die Fähigkeit von *MmPfd* analysiert, stabile binäre Komplexe mit den Substraten zu bilden. *MmPfd* wurde zunächst mit denaturiertem Substrat 15 min inkubiert. Nach einer Gelfiltration wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von *MmPfd* und Rhodanese bzw. Aktin immunologisch analysiert.

MmPfd und denaturierte Rhodanese koeluierten nicht in denselben Fraktionen (Abb. 46 A). Dies deutet auf eine schwache Interaktion von *MmPfd* mit Rhodanese, da keine stabilen binären Komplexe gebildet werden, die nach einer Größenausschlusschromatographie isoliert werden können. *MmPfd* war jedoch in der Lage ist die Aggregatbildung denaturierter Rhodanese zu verhindern (Kapitel 3.3.10). Es erfolgt möglicherweise ein rasches Assoziieren und Dissoziieren denaturierter Rhodanese an *MmPfd*. Die Konzentration an freier denaturierter Rhodanese in Lösung muss jedoch gering sein, so daß es zu keiner Aggregatbildung kommt. Erfolgt jedoch eine Gelfiltration, ist eine

erneute Assoziation von denaturierter Rhodanese an *MmPfd* nicht mehr möglich und es kommt zu einer Aggregatbildung.

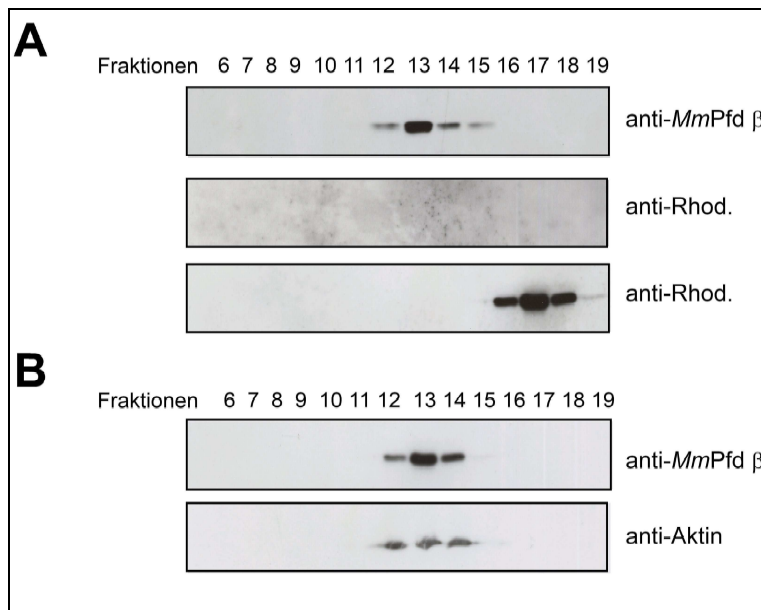


Abbildung 46. *MmPfd* interagiert in unterschiedlicher Weise mit denaturierter Rhodanese (A) bzw. Aktin (B). *MmPfd* wurde wahlweise mit denaturierter Rhodanese (A) oder Aktin (B) inkubiert. Nach einer Gelfiltration wurden die Fraktionen immunologisch auf die Anwesenheit von *MmPfd*, Rhodanese und Aktin analysiert. (A) Rhodanese koeluiert nicht mit *MmPfd*. (B) *MmPfd* und Aktin koeluiieren in denselben Fraktionen. Sie bilden einen stabilen binären Komplex.

Im Unterschied zu Rhodanese eluieren *MmPfd* und denaturiertes Aktin in denselben Fraktionen und bilden einen isolierbaren Komplex (Abb. 46 B). *MmPfd* geht eine feste Bindung zu Aktin ein.

3.3.14 *MmThs* bindet *MmPfd*-stabilisiertes Aktin

MmPfd bildet einen binären Komplex mit denaturierten Aktin (d-Aktin). Da *MmPfd* keine ATP-Hydrolyse Aktivität hat und nicht aktiv zwischen verschiedene Konformationen wechseln kann, darf *in vivo* eine zu starke Bindung von Pfd mit einem Substrat nicht zu einem Komplex führen, das eine Rückfaltung nicht erlaubt. *M. mazei* könnte Chaperone mit einer hohen Substrataffinität haben, welche *MmPfd*-gebundene Substrate binden und *MmPfd* in einem substratfreien Zustand zurückversetzt.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob *MmThs* *MmPfd*-gebundenes Aktin bindet und es so zu einer Übertragung von Aktin kommt (Abb. 47).

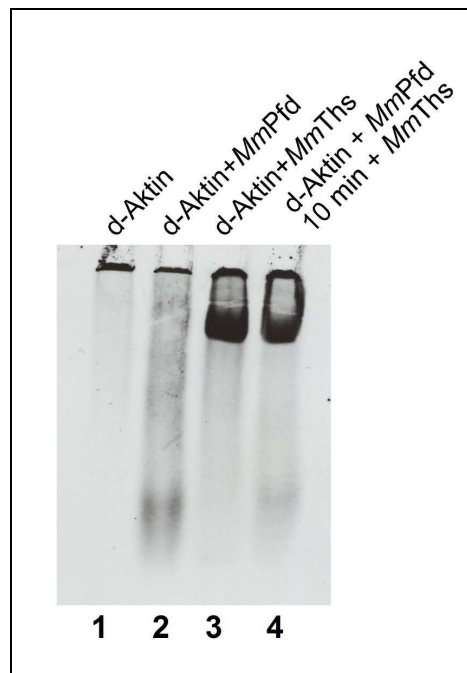


Abbildung 47. *MmThs* bindet *MmPfd*-gebundenes Aktin. Autoradiogramm eines nativen PAGE Gels. (1) Denaturiertes Aktin (d-Aktin) in Abwesenheit von Chaperone, (2) d-Aktin als Komplex mit *MmPfd*, (3) *MmThs* bindet d-Aktin. (4) Nach 10 min Inkubation von d-Aktin und *MmPfd* wurde *MmThs* zugesetzt. *MmThs* bindet *MmPfd*-gebundenes d-Aktin.

³⁵S-markiertes d-Aktin wurde in An- und Abwesenheit von Chaperonen mittels nativer PAGE analysiert (Abb. 47). In Abwesenheit der Chaperone blieb d-Aktin in der Geltasche und drang nicht in das Gel ein (1). Nach Inkubation von d-Aktin mit *MmPfd* (2) oder *MmThs* (3) wurde jeweils ein Signal detektiert, das mit dem jeweiligen Chaperone komigriert. d-Aktin komigrierte mit *MmThs* nach Zugabe von *MmThs*, nachdem zuvor d-Aktin mit *MmPfd* für 10 min inkubiert wurde (4). *MmThs* bindet d-Aktin, dass zuvor mit *MmPfd* einen binären Komplex bildete.

MmPfd-gebundenes d-Aktin lässt sich auf *MmThs* übertragen. *MmThs* muss demzufolge eine höhere Affinität zu d-Aktin haben als *MmPfd*.

3.4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Vertreter der Chaperoninklassen I und II (*MmGroEL/MmGroES* und *MmThs/MmPfd*) eines Archaeon untersucht.

Das Chaperonin *MmGroEL* und sein Kofaktor *MmGroES* aus *Methanosarcina mazei* sind oligomere Komplexe, die jeweils aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind. *MmGroEL* ist ein Homotetradecamer mit einer heptameren Doppelringstruktur. *MmGroEL* zeigt die für Chaperone typische Eigenschaft indem es ungefaltetes Substratprotein bindet und eine Aggregatbildung verhindert. *MmGroEL* (4,5 ATP/min) weist eine im Vergleich zum *EcGroEL* (89,9 ATP/min) niedrigere ATPase-Aktivität. Eine effiziente ATP-abhängige Rückfaltung denaturierter Proteine im Zusammenspiel mit *MmGroES* durch *MmGroEL* wird nur unter bestimmten Bedingungen vermittelt. Die Ergebnisse belegen, dass Ammoniumsulfat im Falle für das Modellsubstrat Malat-Dehydrogenase unerlässlich für den funktionellen Ablauf der Reaktivierung ist. Zwar kommt es auch in Abwesenheit von diesem Salz zu einer Faltung, wie dies im Falle des monomeren Substrates Rhodanese nachgewiesen werden konnte. Jedoch bewirkt im Fall der Malat-Dehydrogenase nur eine Zugabe von Ammoniumsulfat die mechanistisch notwendige Einschließung des Substrates in die cis-Kavität des GroEL. Auch die Dissoziation von *MmGroES* und somit die Freisetzung des Substrates wird durch Ammoniumsulfat stimuliert. Dabei ist der Effekt von Ammoniumsulfat auf eine Erhöhung der ATPase Aktivität des archaeellen Chaperonins zurückzuführen. Zum anderen beruht der Effekt aber auch auf einer möglicherweise durch AS induzierten konformationellen Änderung von *MmGroEL*, die beispielsweise erst die korrekte Bindung von Malat-Dehydrogenase veranlasst und somit die Faltung dieses Substrates ermöglicht.

Das Gruppe II Chaperonin *MmThs* ist ein aus drei Untereinheiten bestehender hochmolekularer Komplex. Durch Immunpräzipitationen konnte nachgewiesen werden, dass im endogenen *MmThs* die Ths-Untereinheiten in einem Verhältnis von 2:1:1 (α : β : γ) vorliegen. Die drei *MmThs* Untereinheiten assemblieren *in vitro* in einer Nukleotid-abhängigen Weise bevorzugt in einem

molaren Verhältnis von 2:1:1 (α : β : γ). Im Unterschied zu *MmThs* α und γ , ist jedoch *MmThs* β nicht in der Lage homooligomere Komplex zu bilden. *MmThs* weist eine dem *MmGroEL* ähnliche ATPase Aktivität auf und verhindert die Aggregatbildung denaturierter Proteine effizient.

Der *MmThs* Kofaktor *MmPfd* ist ein hochmolekularer Chaperon-Komplex mit einer heteromeren Untereinheiten-Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_4$, ohne jedoch eine ATP Hydrolyseaktivität aufzuweisen. *MmPfd* hat die für Chaperone typische Eigenschaft der Aggregationsprävention denaturierter Proteine und stabilisiert sie in einen faltungskompetenten Zustand. *MmPfd* ist zudem in der Lage denaturierte Proteine an *MmThs* und *MmGroEL* weiterzugeben. *MmPfd* wechselwirkt in unterschiedlicher Weise mit denaturierter Rhodanese und Aktin, was auf eine gewisse Substratspezifität hindeutet.

4 Diskussion

Wichtige Komponenten der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung sind in den letzten Jahren in Bakterien und Eukaryonten untersucht worden. Dabei sind deutliche Unterschiede zwischen den drei Domänen des Lebens erkennbar geworden. Aufgrund der Endosymbionten-Theorie gibt es klare Parallelen zwischen den Proteinfaltungswegen in Bakterien und eukaryontischen Organellen.

In Bakterien kooperiert das Chaperon *trigger-faktor* mit dem Hsp70-System bei der Stabilisierung und Faltung von neu synthetisierten Proteinen (Deuerling *et al.* 1999; Teter *et al.* 1999). Für viele Proteine ist diese Assistenz bereits ausreichend, um die native Struktur zu erreichen. Etwa 10 % der neu synthetisierten Proteine benötigen zur Faltung anschließend eine weitere Wechselwirkung mit dem Gruppe I Chaperonin GroEL in einem GroES und ATP-abhängigen Mechanismus (Ewalt *et al.* 1997).

In Eukaryonten sind die Prozesse der Faltung ähnlich. Hier sind es in erster Linie das molekulare Chaperon Hsp70 sowie der *nascent chain associated complex* (NAC), die bereits kotranslational mit den neu synthetisierten Proteinen interagieren (Beckmann *et al.* 1990; Pfund *et al.* 1998; Thulasiraman *et al.* 1999). Auch in Eukaryonten benötigt ein Teil der neu synthetisierten Proteine die weitere Unterstützung durch Chaperonine. Im Zytosol ist es das Gruppe II Chaperonin TRiC, das vor allem für die Faltung von Aktin und Tubulin nötig ist (Sternlicht *et al.* 1993; Hynes *et al.* 1996; Siegers *et al.* 1999; Thulasiraman *et al.* 1999).

Wenig bekannt ist hingegen über die Mechanismen der *de novo* Proteinfaltung in Archaea (de Macario and Macario 1994; Lange *et al.* 1997; Macario *et al.* 1999). Zu dem Zeitpunkt, als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, war das Gruppe II Chaperoninsystem, Thermosom und Prefoldin, der einzige untersuchte Vertreter der molekularen Chaperone in Archaea. Ein archaeeles NAC-Homolog oder auch *trigger factor* konnten in keiner der entsprechenden Datenbanken gefunden werden. Proteine der Hsp70 Familie konnten nur in etwa einem Drittel der untersuchten Archaea identifiziert

werden. Möglicherweise wurden diese durch lateralen Gentransfer von Bakterien erworben (Macario 1995; Gribaldo *et al.* 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse ermöglichen nun eine detailliertere Sichtweise der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung in Archaea. Es wurden die beiden Chaperoninsysteme, *MmGroEL/MmGroES* und *MmThs/MmPfd*, des Archaeons *Methanosarcina mazei* analysiert. Da Archaea keine Organellen aufweisen, muss davon ausgegangen werden, dass beide Chaperoninsysteme im selben zellulären Kompartiment vorliegen. Daraus resultiert die bisher einzigartige Situation, dass die Faltung eines Substratproteins theoretisch von beiden Systemen vermittelt werden kann.

4.1 Das *MmGroE*-System

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung und der funktionellen Analyse des Gruppe I Chaperonin *MmGroEL* und seines Kofaktors *MmGroES* aus dem Archeon *M. mazei*. Das archaeele GroE-System, *MmGroE*, das in einem ungewöhnlichen biologischen Kontext existiert, wurde mit GroE aus *E. coli* verglichen.

4.1.1 *MmGroE* ist *in vitro* funktionell

MmGroEL und *MmGroES* weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie (>90 %) zu den Gruppe I Chaperoninsystemen der beiden anderen bisher sequenzierten Archaea der Gattung *Methanosarcina* auf, was auf deren gemeinsamen evolutionären Ursprung des GroE-System schließen lässt.

MmGroEL bildet einen hochmolekularen Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 800.000 kDa. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß *MmGroEL* analog zum *EcGroEL* eine Doppelringstruktur mit 7-facher Symmetrie pro Ring aufweist.

MmGroEL ist ein funktionelles Chaperon, da es denaturierte Proteine stabilisiert und eine Aggregatbildung verhindert. Für das monomere Protein Rhodanese konnte nachgewiesen werden, dass *MmGroE* in einem ATP-abhängigen Mechanismus dessen korrekte Faltung vermittelt. Die Faltung führte zu einem ähnlichen Ertrag (~70 %) an aktiver Rhodanese wie mit dem bakteriellen *EcGroE*-System, wenn auch mit einer etwas langsameren Kinetik. Ein heterogenes Chaperonin-System bestehend aus bakteriellem *EcGroEL* und archaeelem *MmGroES* weist deutliche Einbußen im Ertrag (~50 %) an gefaltetem Substrat auf.

Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Costa Georgopoulos (Universität Genf) konnte nachgewiesen werden, dass das archaeele *groE*-Operon *EcGroE in vivo* nicht ersetzen konnte. Möglicherweise war dies in einer langsameren Dissoziation des gefalteten Substrates von *MmGroE* begründet. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Analysen mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass *MmGroE* eine wesentlich langsamere Assoziations- und Dissoziationsrate aufweist als *EcGroE*. Dies führt *in vitro* und *in vivo* dazu, dass gefaltetes Substrat wesentlich langsamer aus der GroEL-Kavität entlassen wird. Dies könnte die Ursache sein, weshalb die von Prof. Costa Georgopoulos durchgeführte *in vivo* Komplementationsstudie mit dem archaeelem *groE*-Operon in *E.coli* für die Zellen letal war. *In vivo* hat die verzögerte Freisetzung von Substraten eine erhebliche Wirkung, da dies die Vorgänge in der Zelle beträchtlich beeinflussen kann. Hier müssen Proteine, die über einen GroE-vermittelten Vorgang falten auch unmittelbar nach Erreichen der nativen Struktur frei in Lösung sein, um an wichtigen metabolische Vorgänge teilzunehmen. Essenzielle Proteine wurden möglicherweise zu lange in der *MmGroEL*-Kavität eingeschlossen und standen somit für metabolische Vorgänge der Zelle nicht zur Verfügung. Für einen Organismus, der hohe Reproduktionsraten hat wie *E. coli*, könnte dies letal sein. Dieses Verhalten von *MmGroE* konnte auch anhand von Gelfiltrationsanalysen nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Probe aus einer laufenden Chaperonin-vermittelten Rhodanese-Rückfaltungsreaktion entnommen und durch Gelfiltration aufgetrennt. Diese Methode ermöglichte es, Chaperonin-gebundenes von freiem Substrat zu trennen. Im Vergleich zu

EcGroE wird das Substrat im *MmGroE*-System wesentlich langsamer aus der Kavität entlassen. Demnach scheint tatsächlich das Entlassen des Substrates im Falle des *MmGroE*-Systems der kritische Faktor zu sein.

Der Funktionszyklus von GroEL hängt von seiner ATPase-Aktivität ab. Eine Analyse der *MmGroEL* ATPase-Aktivität ergab eine wesentlich niedrigere Hydrolyseaktivität als die, welche für das *EcGroEL* gemessen wurde. Die Gattung der *Methanosarcina* gilt im Allgemeinen als Energiesparer. Sie haben einen sehr niedrigen ATP-Verbrauch. Dies steht sicherlich in Zusammenhang mit der langen Generationszeit, die je nach eingesetzter Kohlenstoffquelle 8-15 h beträgt und somit ein Vielfaches von *E. coli* beträgt. Der Grund für das langsamere Zyklieren innerhalb des archaeellen GroE-System könnte somit auf der niedrigeren ATPase-Aktivität von *MmGroEL* beruhen. Die Kristallstruktur von GroEL ist bekannt und somit diejenigen Aminosäuren, die mit ADP interagieren und damit auch welche Arten von Interaktionen dabei eine Rolle spielen (Xu *et al.* 1997). Durch einen Sequenzvergleich von *MmGroEL* mit *EcGroEL* war es möglich, diejenigen Aminosäuren des *MmGroEL* zu identifizieren, welche die Nukleotidbindestelle bilden. Alle Aminosäuren in *EcGroEL* und in *MmGroEL* Molekül sind bis auf zwei Ausnahmen konserviert. In Position 31 ist Valin durch Isoleucin im *MmGroEL* ersetzt. Beide Aminosäuren sind hydrophob und haben annähernd dieselbe Größe. In Position 481 ist ein negativ geladenes Aspartat durch ein positiv geladenes Lysin im *MmGroEL* ersetzt. Dies stellt eine große Differenz in der Ladungsverteilung der Nukleotid-Bindetasche dar. Somit ist vorstellbar, daß dieser Ladungsunterschied in der Bindetasche einen starken Effekt auf die ATP-Hydrolyseaktivität des *MmGroEL* zur Folge hat und sich daraus die niedrigere Hydrolyserate von ATP ergibt. Durch den Austausch der negativ geladenen Seitenkette des Aspartats durch eine positiv geladene Seitenkette des Lysins in der Nukleotid-Bindetasche des *MmGroEL*-Moleküls könnte sich möglicherweise die ATPase Aktivität des Gruppe I Chaperonin evolutionär an seinen „Wirtsorganismus“ *M. mazei* angepasst haben.

Die Zugabe von Ammoniumsulfat führt zu einer Stimulierung der ATPase Aktivität von *EcGroEL* (Martin and Hartl 1997). In Anwesenheit von Ammoniumsulfat konnte die ATPase-Aktivität von *MmGroEL* verdoppelt werden. Mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz konnte zudem

nachgewiesen werden, dass die Zugabe des Salzes das Assoziieren und Dissoziieren des *MmGroES* von *MmGroEL* beschleunigt. Bei einer Rhodanese-Faltungsreaktion war der Einfluss von Ammoniumsulfat auf die vermittelte Rückfaltung zunächst nicht offensichtlich. Jedoch konnte mit einer Gelfiltrationsanalyse der Reaktionslösung festgestellt werden, dass die schnellere Dissoziation von *MmGroES* auch zu einer schnelleren Entlassung des gefalteten Substrats aus der GroEL-Kavität führte. Dieses Verhalten zeigte sich bei der enzymatischen Auswertung des Rückfaltungsexperimentes nicht, da das monomere Substrat Rhodanese im nativen Zustand innerhalb der GroEL-Kavität enzymatisch aktiv war. Es wurde daher für weitere Untersuchungen das dimere Substrat Malat-Dehydrogenase (MDH) gewählt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass *MmGroEL* ungefaltetes MDH bindet und damit dessen Aggregatbildung verhindert. Interessanterweise konnte aber unter den Standardversuchsbedingungen keine Reaktivierung von MDH nachgewiesen werden. Eine Reaktivierung war nur zu beobachten, wenn Ammoniumsulfat dem Reaktionspuffer hinzugefügt wurde. Zudem konnte festgestellt werden, dass MDH ohne Ammoniumsulfat in einem faltungskompetenten Zustand an GroEL bindet, jedoch erst die Zugabe von Ammoniumsulfat zu einer Reaktivierung führt. Die Versuche zur Protease-Resistenz von ungefalteter, *MmGroEL*-gebundener MDH zeigten, dass das Substrat unter Standardbedingungen verdaut wurde, selbst wenn *MmGroES* anwesend war. Dies war ein deutlicher Hinweis, dass MDH nicht in der geschützten cis-Kavität eingeschlossen war. Im Kontrollexperiment mit dem bakteriellen GroE-System war MDH unter diesen Bedingungen geschützt. Wurden diese Experimente nun in Anwesenheit von Ammoniumsulfat durchgeführt, war MDH Protease-resistent. Offensichtlich kam es unter diesen Bedingungen zu einem Einschluss von MDH in die cis-Kavität. Diese Ergebnisse könnten nun darauf hinweisen, dass das archaeele GroEL eine andere Substratspezifität als das bakterielle GroEL aufweist, insofern, als die MDH-Faltung nur unter bestimmten Bedingungen vermittelt werden kann. Möglicherweise erhöht die Anwesenheit von Ammoniumsulfat hydrophoben Wechselwirkungen und führt somit zu einer vorteilhafteren Interaktion von GroEL und MDH. Wahrscheinlich kommt es auch in Anwesenheit von

Ammoniumsulfat zu einer konformationellen Veränderung von MDH oder von GroEL, wodurch ein Einschluß des Substrates ermöglicht wird.

Stringente GroEL Substrate wie z.B. Rubisco oder MDH erreichen ihre native Struktur rasch und in hoher Ausbeute nur durch einen Einkapsulierungsmechanismus (Brinker *et al.* 2001). Ungeachtet dessen wurde kürzlich gezeigt, daß das Substrat Aconitase (82 kDa), welches zu groß ist für einen Einschluß in die cis-Kavität von GroEL, in der trans-Kavität gebunden wird und durch wiederholtes Zyklieren die native Struktur erreicht, obgleich mit langsamerer Kinetik und mit geringeren Gesamtausbeuten (Farr *et al.* 2003). Dieser „trans-Mechanismus“ wird für Substrate angenommen, die zu groß sind für eine Einkapselung durch GroES in der cis-Kavität (Chaudhuri *et al.* 2001). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stützen einen solchen Mechanismus für *MmGroE* nicht. Möglicherweise hat *MmGroE* während der Evolution die Fähigkeit verloren, Substrate in einem trans-Mechanismus zu falten.

4.2 Das Gruppe II Chaperoninsystem von *M. mazei*: *MmThs* und *MmPfd*

4.2.1 *MmThs*

Das *M. mazei* Genom enthält drei stark konservierte Gene, die homologe Thermosom (Ths)-Untereinheiten (α , β , γ) kodieren. Diese Gene zeigen eine sehr hohe Homologie zu andern Thermosomsequenzen aus archaellen Organismen. Analysen von endogenem *MmThs* durch Co-Immunpräzipitation ergab eine Untereinheiten-Zusammensetzung von 2:1:1 (α : β : γ). Komplexe mit einer derartigen Zusammensetzung konnten auch *in vitro* durch Assemblierung aus den isolierten Untereinheiten hergestellt werden. Die Koexistenz von Ths-Komplexen mit unterschiedlicher Untereinheiten-Zusammensetzung kann nicht ausgeschlossen werden, aber die plausibelste Erklärung ist, daß *MmThs* eine definierte Untereinheiten-Zusammensetzung hat. Von solch einem Komplex würde eine 8-fache Symmetrie mit 4 α , 2 β und

2 γ *MmThs* Untereinheiten pro Ring erwartet werden. Denkbar ist eine Anordnung der Untereinheiten mit der Folge $\alpha\beta\ \alpha\gamma\ \alpha\beta\ \alpha\gamma$ oder auch $\alpha\alpha\ \beta\gamma\ \alpha\alpha\ \beta\gamma$ innerhalb eines Ringes.

Für eine erfolgreiche Assemblierung ist die Anwesenheit von ATP/Mg²⁺ oder ADP/Mg²⁺ zwingend notwendig. Der *in vitro* assemblierte *MmThs*-Komplex erwies eine dem *MmGroEL* ähnliche ATP-Hydrolyseaktivität. *MmThs* verhindert effizient die Aggregatbildung denaturierter Proteine und bindet sie in einem faltungskompetenten Zustand. Eine erfolgreiche Rückfaltung diverser Modellsubstrate konnte auch unter verschiedenen Pufferbedingungen nicht nachgewiesen werden. *MmThs* wird vermutlich *in vivo* einen selektiven Substratpool besitzen.

4.2.2 *MmPfd*

Das Genom von *M. mazei* enthält zwei Gene, die Untereinheiten des Ths-Kofaktors Prefoldin (Pfd) kodieren. Beide *MmPfd*-Untereinheiten (*MmPfd* α und *MmPfd* β) weisen eine hohe Sequenzhomologie zu den Pfd-Untereinheiten des Archaeons *Methanobacterium thermoautotrophicum* auf.

Eine Besonderheit der Pfd-Struktur ist die Bildung von „coiled coil“, die aus α -Helices aufgebaut sind (Abb. 9). Diesen α -Helices ist ein Motiv aus sieben Aminosäuren (abcdefg) charakteristisch, wobei die Aminosäuren **a** und **d** hydrophob sind (Lupas 1996). Für *MmPfd* α und *MmPfd* β konnte ebenfalls dieses Charakteristikum nachgewiesen werden. Eine Strukturvorhersage ergab, dass eine Bildung von „coiled coil“ Strukturen an den distalen Regionen der jeweiligen *MmPfd*-Untereinheit sehr wahrscheinlich ist.

Weitere Analysen zeigten, daß beide Pfd-Untereinheiten einen hochmolekularen Komplex mit einem Untereinheitenverhältniss von 1:2 (*MmPfd* α : *MmPfd* β) bilden. Das mittels Gelfiltration beobachtete Molekulargewicht von ca. 200 kDa weicht von den berechneten 84,6 kDa eines $\alpha_2\beta_4$ Komplexes deutlich ab. Dieser Unterschied ist in der Struktur von Pfd begründet, die deutlich von einer globulären Form abweicht und auch für andere Prefoldinohomologe beobachtet wurden (Vainberg *et al.* 1998; Siegers

et al. 1999). Diese Ergebnisse lassen für *MmPfd* eine Untereinheiten-Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_4$ und eine ähnliche Struktur erwarten wie die des Prefoldins aus dem Archeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Abb. 9).

MmPfd verhindert die Aggregatbildung ungefalteter Proteine und stabilisiert diese in einem faltungskompetenten Zustand, ein für Chaperone typisches Merkmal. *MmPfd* ist zudem in der Lage, ungefaltete Substrate sowohl an *MmThs* als auch an *MmGroEL* zu übergeben. Allerdings vermittelt *MmPfd* nicht die Faltung seiner Substrat-Proteine. Um eine korrekte Faltung zu ermöglichen, muss das Substrat an ein Chaperonin überführt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass *MmPfd*-gebundene ungefaltete Rhodanese an *MmGroEL* übertragen wurde und anschließend in einer *MmGroES* und ATP-abhängigen Reaktion die native Struktur erlangte. *MmPfd* hat keine ATPase Aktivität, dadurch besitzt es keinen regulativen Mechanismus, Substrate zu binden oder zu entlassen. Der Substrat-Transfer von *MmPfd* auf ein Chaperonin kann auf zwei Weisen erfolgen. *MmPfd*-gebundenes Aktin wird, bedingt durch die höhere Substrataffinität des *MmThs*, an das Chaperonin übertragen. Für das Modellsubstrat Rhodanese konnte nachgewiesen werden, dass hier keine isolierbaren binären Substrat-Pfd Komplexe vorliegen und es wahrscheinlich zu einer schnellen Assoziation und Dissoziation mit denaturierter Rhodanese kommt. *MmGroEL* bindet dann möglicherweise mit höherer Affinität die freie sich in Lösung befindende denaturierte Rhodanese.

Die hier gezeigte Kooperation von *MmPfd* mit den beiden *M. mazei* Chaperoninen scheint von einer starken Interaktion zwischen *MmPfd* und Chaperonin unabhängig zu sein, denn ein ternärer Komplex aus Substrat, *MmPfd* und Chaperonin konnte nicht nachgewiesen werden.

MmPfd hat sicherlich *in vivo* eine sehr wichtige Funktion als ein Chaperon, welches Substrate an beide *M. mazei* Chaperonine zur anschließenden Faltung übergeben kann. Eine interessante Frage ist nach welchen Kriterien endogene *MmPfd*-Substrate an *MmThs* oder *MmGroEL* übertragen werden.

4.3 Proteinfaltung in den Archaea der Gattung *Methanosarcina*

Die Genome von drei Vertretern der *Methanosarcina*; *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri*, und *Methanosarcina acetivorans*, sind zwischenzeitlich komplett sequenziert worden. Alle drei Organismen besitzen ein vergleichsweise für Archaea großes Genom, das einen bedeutenden Anteil an Genen aufweist, die bakteriellen Ursprungs sind.

Eine Untersuchung des Chaperon-Gehalts auf genetischer Ebene bei allen drei Organismen brachte die Erkenntnis, dass alle drei Archaea der Gattung *Methanosarcina* die Chaperone Thermosom, GroEL, Prefoldin und das Hsp 70 System (DnaK, DnaJ und GrpE) besitzen. Eine konservierte Untereinheit (*MmNAC* α) des NAC-Homologen (bestehend aus NAC α und NAC β), für welches in Eukarya eine Rolle als kotranslational bindendes Chaperon vermutet wird (Wiedmann *et al.* 1994), wurde ebenfalls in allen drei Genomen gefunden. Ein Homolog zur NAC β Untereinheit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein Homolog zum bakteriellen Trigger Faktor, der ebenfalls naszierende Polypeptidketten bindet, ist bisher in keinem Archaeon nachgewiesen worden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ermöglichen das Erstellen eines Modells für die Proteinfaltung im Archaeon *Methanosarcina mazei* (Abb. 48). Naszente Polypeptidketten könnten in den Archaea der Gattung *Methanosarcina* von NAC α gebunden werden (Abb. 48). Das Hsp70 System bindet wahrscheinlich ebenfalls kotranslational Proteine und stabilisiert sie. Das Fehlen eines Hsp70 Systems in vielen Archaea deutet darauf hin, daß eine mögliche Interaktion dieses Chaperonsystems mit naszierenden Polypeptidketten nicht essenziell ist und von anderen Chaperonen übernommen werden kann.

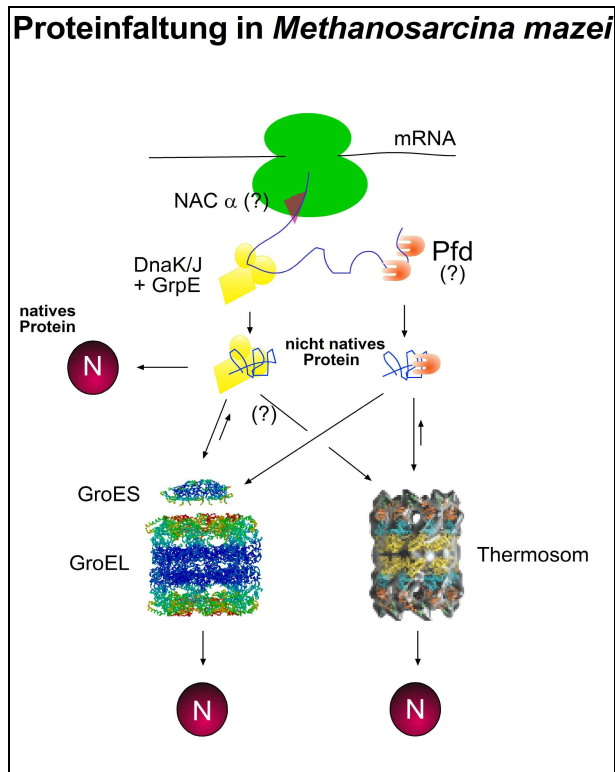


Abbildung 48. Modell der *de novo* Proteinfaltung im Archeon *Methanosarcina mazei*. Zwei Chaperonin-Systeme können im Archaeon *M. mazei* die Proteinfaltung vermitteln.

Posttranslational wird die Faltung nicht-nativer Proteine durch das Hsp70 System vermittelt. Eine anschließende Weitergabe von Substraten an eines der beiden Chaperonine ist wahrscheinlich.

Prefoldin stabilisiert nicht-native Proteine und verhindert somit eine Aggregatbildung. Da Prefoldin jedoch nicht die Faltung von Substratproteinen vermitteln kann, werden die Substrate an eines der beiden Chaperonine zur Faltung weitergeleitet. Die Arten der Gattung *Methanosarcina* besitzen mit GroEL und Ths im selben zellulären Kompartiment die einzigartige Möglichkeit, die Proteinfaltung durch zwei Chaperonine zu unterstützen, von denen GroEL zusammen mit seinem Kofaktor GroES bakteriellen Ursprungs und Ths archaeaspezifisch ist.

4.4 Perspektiven der Forschung an archaeellen molekularen Chaperonen

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse belegen die Bedeutung der Archaea für die Untersuchung der Konzepte und Mechanismen molekularer Chaperone.

Die Besonderheit der Archaea der Gattung *Methanosarcina*, nämlich die Koexistenz beider Chaperonine im selben zellulären Milieu, bietet nun die Möglichkeit, die differenzielle Substratspezifität beider Chaperonine zu untersuchen, was sicherlich zu einem besseren Verständnis dieser Systemen beitragen wird. Da ca. ein Drittel der Gene von *M. mazei* bakteriellen Ursprungs sind, ist es wahrscheinlich, daß zusammen mit GroEL und GroES auch Gene, die stringente GroEL-Substrate kodieren, in das Genom aufgenommen wurden.

Die Fragestellung, ob Pfd Polypeptide ko- und/oder posttranslational bindet kann eventuell innerhalb der Archaea einfacher untersucht werden, als dies bei Eukaryonten möglich ist. Auch gibt es über endogene Pfd-Substrate kaum Erkenntnisse. Die hier beschriebenen Eigenschaften von *MmPfd*, ungefaltete Proteine zu stabilisieren, sowie diese Proteine an ein Chaperonin weiterzureichen, weisen eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Chaperon Hsp70 auf. Vor dem Hintergrund, dass manche Archaea kein Hsp70 besitzen, jedoch alle bisher untersuchten Archaea-Genome Gene enthalten, die Pfd kodieren, könnte man vermuten, dass Pfd die Aufgaben des Hsp70 zumindest teilweise übernehmen kann.

5 Literatur

Agashe, V. R. and F. U. Hartl (2000). "Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding." Seminars in Cell & Developmental Biology **11**(1): 15-25.

Altschul, S. F., T. L. Madden, *et al.* (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**(17): 3389-402.

Andra, S., Frey, G., *et al.* (1996). "Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*." FEBS Lett. **379**: 127-131.

Andra, S., Frey, G., *et al.* (1998). "The thermosome from *Methanopyrus kandleri* possesses an NH_4^+ -dependent ATPase activity." Eur J Biochem. **255**(1):93-99.

Anfinsen, C. B., E. Haber, M. Sela, F. H. White (1961), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**: 1309-1314.

Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**: 223-230.

Archibald, J.M., Logsdon, J.M., *et al.*, (1999) "Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins." Curr. Biol. **9**: 1053-1056.

Ausubel, F. M., R. Brent, *et al.*, Eds. (1992). Current Protocols in Molecular Biology. New York, Wiley-Interscience.

Baumer, S., T. Ide, *et al.* (2000). "The F420H2 dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases." Journal of Biological Chemistry **275**(24): 17968-17973.

Beckmann, R. P., L. E. Mizzen, *et al.* (1990). "Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly." Science **248**(4957): 850-4.

Boisvert, D. C., J. M. Wang, *et al.* (1996). "The 2.4 angstrom crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP gamma S." Nature Struct Biology **3**(2): 170-177.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.

Braig, K., Z. Otwinowski, *et al.* (1994). "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 A ." Nature **371**(6498): 578-86.

Brinker, A., G. Pfeifer, *et al.* (2001). "Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding." Cell **107**(2): 223-233.

Bukau, B., Hesterkamp, T, and Luirink, J. (1996). Trends Cell Biol. **6**,480-486.

Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines." Cell. **92**(3): 351-366.

Chaudhuri, T. K., G. W. Farr, *et al.* (2001). "GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated." Cell. **107** (2): 235-246.

Chen, L. L. and P. B. Sigler (1999). "The crystal structure of a GroEL/peptide complex: Plasticity as a basis for substrate diversity." Cell **99**(7): 757-768.

Chen, S., A. M. Roseman, *et al.* (1994). "Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy." Nature **371**(6494): 261-4.

Clark, J. I. and P. J. Muchowski (2000). „Small heat-shock proteins and their potential role in human disease.” Current Opinion in Structural Biology **10**(1): 52-59.

de Macario, E. C., M. Clarens, *et al.* (1995). “Archaeal grpE: Transcription in two different morphologic stages of *Methanosarcina mazei* and comparison with dnaK and dnaJ.” J Bacteriol **177**(3): 544-550.

de Macario, E. C. and A. J. L. Macario (1994). “Heat-shock response in archaea.” Trends in Biotechnology **12**(12): 512-518.

Deppenmeier, U., M. Blaut, *et al.* (1989). “Dependence on membrane components of methanogenesis from methyl-CoM with formaldehyde or molecular hydrogen as electron donors.” European Journal of Biochemistry **186**(1-2): 317-23.

Deppenmeier, U., A. Johann, *et al.* (2002). “The genome of *Methanosarcina mazei*, a methanogenic archaeon containing a high percentage of bacterial genes.” J Mol Microbiol Biotechnol. **4** (4):453-461.

Deuerling, E., A. Schulze-Specking, *et al.* (1999). “Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins.” Nature. **400**(6745): 693-696.

Devenyi, T., S. J. Rogers, *et al.* (1966). “Structural studies of pig heart malate dehydrogenase.” Nature **210**(35): 489-91.

Dinner, A. R., A. Sali, *et al.* (2000). “Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment.” Trends Biochem Sci **25**: 331-229.

Ditzel, L., J. Lowe, *et al.* (1998). “Crystal Structure of the Thermosome, the Archaeal Chaperonin and Homolog of CCT.” Cell **93**(1): 125-138.

Dobson, C. and M. Karplus (1999). "The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment." Current Opinion Structural Biology **9**: 92-101.

Dobson, C. M. (1999). "Protein misfolding, evolution and disease." Trends in Biochemical Sciences. **24**(9): 329-332.

Dobson, C. M., A. Sali, *et al.* (1998). "Protein Folding - a Perspective from Theory and Experiment." Angewandte Chemie (International Edition in English) **37**(7): 868-893.

Doolittle, F. W. (1992). "What are the archaebacteria and why are they important?" Biochemical Society Symposia **58**: 1-6.

Ellis, R.J. and F. U. Hartl (1999). "Principles of protein folding in the cellular environment." Current Opinion in Structural Biology **9**(102-110).

Ellis, R. J. (1996). "Discovery of molecular chaperones." Cell Stress & Chaperones **1**(3): 155-60.

Ellis, R. J. (2001). "Molecular chaperones: Inside and outside the Anfinsen cage." Current Biology **11**(24): R1038-R1040.

Ellis, R. J., S. M. van der Vies, *et al.* (1989). "The molecular chaperone concept." Biochemical Society Symposia **55**: 145-53.

Elowitz, M. B., M. G. Surette, *et al.* (1999). "Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology. **181**(1): 197-203.

Ewalt, K. L., J. P. Hendrick, *et al.* (1997). "In Vivo Observation of Polypeptide Flux through the Bacterial Chaperonin System." Cell **90**(3): 491-500.

Farr, G. W., K. Furtak, *et al.* (2000). "Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL." Cell **100** (5): 561-573.

Farr, G. W., Fenton, W. A. *et al.* (2003) "Folding with and without encapsulation by cis- and trans-only GroEL-GroES complexes." EMBO J. **22** (13): 3220-3230.

Feldman, D. E. and J. Frydman (2000). "Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones." Current Opinion in Structural Biology **10**(1): 26-33.

Fenton, W. A. and A. L. Horwich (1997). "GroEL-mediated protein folding." Prot. Sci. **6**: 743-760.

Fenton, W. A., Y. Kashi, *et al.* (1994). "Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release [see comments]." Nature **371**(6498): 614-9.

Frydman, J. (2001). "Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones." Annual Review of Biochemistry **70**: 603-647.

Frydman, J. and F. U. Hartl (1996). "Principles of Chaperone-Assisted Protein Folding - Differences Between in Vitro and in Vivo Mechanisms." Science **272** (5267): 1497-1502.

Frydman, J., E. Nimmesgern, *et al.* (1992). "Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits." EMBO J **11** (13): 4767-4778.

Frydman, J., E. Nimmesgern, *et al.* (1994). "Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones." Nature **370** (6485): 111-117.

Galagan, J. E., C. Nussbaum, *et al.* (2002). "The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity." Genome Research **12** (4): 532-542.

Gao, Y., J. O. Thomas, *et al.* (1992). "A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding." Cell **69** (6): 1043-1050.

Geissler, S., K. Siegers, *et al.* (1998). "A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin." EMBO J. **17** (4): 952-966.

Grantham, J., Lorca, O., *et al.* (2000). "Partial occlusion of both cavities of the eukaryotic chaperonin with antibody has no effect upon the rates of beta-actin or alpha-tubulin folding." EMBO J. **275**, 4587-4591.

Gribaldo, S., V. Lumia, *et al.* (1999). "Discontinuous occurrence of the hsp70 (dnaK) gene among Archaea and sequence features of HSP70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein." Journal of Bacteriology **181** (2): 434-443.

Gutsche, I., J. Holzinger, *et al.* (2001). "ATP-induced structural change of the thermosome is temperature-dependent." Journal of Structural Biology **135** (2): 139-146.

Gutsche, I., J. Holzinger, *et al.* (2000). "Conformational rearrangements of an archaeal chaperonin upon ATPase cycling." Current Biology **10** (7): 405-408.

Gutsche, I., O. Mihalache, *et al.* (2000). "ATPase cycle of an archaeal chaperonin." Journal of Molecular Biology **300** (1): 187-96.

Gutsche, I., Essen LO, Baumeister, W, (1999), "Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine." Journal of Molecular Biology, **293**: 295-312.

Hansen, W. J., N. J. Cowan, *et al.* (1999). "Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins." Journal of Cell Biology. **145** (2): 265-277.

Hartl, F. U. (1996). "Molecular Chaperones in Cellular Protein Folding." Nature **381** (6583): 571-580.

Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295** (5561): 1852-1858.

Hartman, D. J., B. P. Surin, *et al.* (1993). "Substoichiometric amounts of the molecular chaperones GroEL and GroES prevent thermal denaturation and aggregation of mammalian mitochondrial malate dehydrogenase in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **90** (6): 2276-80.

Haslbeck, M., S. Walke, *et al.* (1999). "Hsp26: a temperature-regulated chaperone." EMBO Journal **18** (23): 6744-6751.

Hayer-Hartl, M. (1999). Assay of Malate Dehydrogenase.

Hayer-Hartl, M. K., J. J. Ewbank, *et al.* (1994). "Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin." EMBO J **13** (13): 3192-202.

Hayer-Hartl, M. K., J. Martin, *et al.* (1995). "Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding." Science **269** (5225): 836-841.

Hemmingsen, S. M., C. Woolford, *et al.* (1988). "Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly." Nature **333** (6171): 330-4.

Hendrick, J. P. and F. U. Hartl (1993). "Molecular chaperone functions of heat-shock proteins." Annu Rev Biochem **62** (349): 349-84.

Horowitz, P. M. (1995). Chaperonin-Assisted Protein Folding of the Enzyme Rhodanese by GroEL/GroES. Protein Stability and Folding. B. A. Shirley. 999 Riverview Dr, Ste 208, Totowa, NJ 07512, Humana Press Inc. **40**: 361-368.

Horwich, A. L. and J. S. Weissman (1997). "Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease." Cell **89** (4): 499-510.

Horwich, A. L. and K. R. Willison (1993). "Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperone, Hsp 60 and TF55-TCP1." Philos Trans R Soc Lond Biol **339** (1289): 313-325.

Houry, W. A., D. Frishman, *et al.* (1999). "Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL." Nature. **402** (6758): 147-154.

Hunt, J. F., A. J. Weaver, *et al.* (1996). "The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 angstrom resolution." Nature **379** (6560): 37-45.

Hynes, G., C. W. Sutton, *et al.* (1996). "Peptide mass fingerprinting of chaperonin-containing TCP-1 (CCT) and copurifying proteins." FASEB J **10** (1): 137-147.

Jussofi, A., Mayer, F., Gottschalk, G., (1986). "Methan formation from methanol and molecular hydrogen by protoplasts of new methanogenic isolates and inhibition by dicyclohexylcarbodiimide." Arch. Microbiol. **146**: 245-249.

Jakob, U., W. Muse, *et al.* (1999). "Chaperone activity with a redox switch." Cell **96**(3): 341-352.

Kandler, O., and H. König. (1993). "Cell envelopes of archaea: structure and chemistry, p. 223-259. *In* M. Kates, D. J. Kushner, and A.T. Matheson (ed.) The biochemistry of archaea. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Klumpp, M., W. Baumeister, *et al.* (1997). "Structure of the Substrate Binding Domain of the Thermosome, an Archaeal Group II Chaperonin." Cell. 91 (2): 263-270.

Klunker, D., B. Haas, *et al.* (2003). "Coexistence of Group I and Group II Chaperonins in the Archaeon *Methanosarcina mazei*." JBC, 278 (35), 33256-33267.

Kowalski, J. M., R. M. Kelly, *et al.* (1998). "Purification and Functional Characterization of a Chaperone from *Methanococcus Jannaschii*." Systematic & Applied Microbiology 21 (2): 173-178.

Kubota, H., G. Hynes, *et al.* (1994). "Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin." Curr Biol 4 (2): 89-99.

Kubota, H., G. Hynes, *et al.* (1995). "The Chaperonin Containing T-Complex Polypeptide 1 (TcP-1) - Multisubunit Machinery Assisting in Protein Folding and Assembly in the Eukaryotic Cytosol." European Journal of Biochemistry. 230 (1): 3-16.

Kubota, H., G. Hynes, *et al.* (1995). "The Eighth Cct Gene, Cctq, Encoding the Theta Subunit of the Cytosolic Chaperonin Containing Tcp-1." Gene. 154 (2): 231-236.

Kusmierczyk, A. R. and J. Martin (2000). "High salt-induced conversion of *Escherichia coli* GroEL into a fully functional thermophilic chaperonin." Journal of Biological Chemistry 275 (43): 33504-33511.

Kusmierczyk, A. R. and J. Martin (2001). "Chaperonins-keeping a lid on folding proteins." FEBS Letters 505, 343-347.

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

Lange, M., A. J. L. Macario, *et al.* (1997). "Heat-shock response in methanosarcina mazei S-6." Current Microbiology **35** (2): 116-121.

Lange, M., A. J. L. Macario, *et al.* (1997). "Increased transcripts of the dnaK locus genes in methanosarcina mazei s-6 exposed to supraoptimal concentrations of ammonia." FEMS Microbiology Letters **152** (2): 379-384.

Langer, T., C. Lu, *et al.* (1992). "Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding." Nature **356** (6371): 683-689.

Langer, T., G. Pfeifer, *et al.* (1992). "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** (13): 4757-4765.

Lanzetta, P. A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A. (1979). "An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate." Anal. Biochem. **100**: 95-97.

Laskey, R. A., B. M. Honda, *et al.* (1978). "Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA." Nature **275**: 416-420.

Leroux, M. R., Ed. (2001). "Protein Folding and Molecular Chaperones in Archaea." Advances in Applied Microbiology, Academic Press.

Leroux, M. R., M. Fandrich, *et al.* (1999). "MmPfd, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin." EMBO J. **18** (23): 6730-6743.

Lewis, S. A., G. L. Tian, *et al.* (1996). "Chaperonin-Mediated Folding of Actin and Tubulin." Journal of Cell Biology. **132** (1-2): 1-4.

Lewis, V. A., G. M. Hynes, *et al.* (1992). "T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol." Nature **358** (6383): 249-52.

Lindquist, S. (1986). "The heat-shock response." Ann. Rev. Biochem. **55**: 1151-1191.

Llorca, O., J. Benito-Martin, *et al.* (2000). "Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformation." EMBO Journal **19** (22): 5971-5979.

Llorca, O., McCormack, E., *et al.* (1999). "Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits." Nature **402**, 693-696.

Lundin, V. F., Stirling, P.C., *et al.* (2004). "Molecular clamp mechanism of substrates binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperon prefoldin." PNAS **101** (13), 4367-4372.

Lupas, A., D. M. Van, *et al.* (1991). "Predicting coiled coils from protein sequences." Science **252** (5010): 1162-64.

Lupas, A. (1996). "Coiled coils: new structures and new functions." Trends Biochem. Sci. **21**: 375-382.

Macario, A. J. L. (1995). "Heat-shock proteins and molecular chaperones: Implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics." Int J Clin Lab Res **25** (2): 59-70.

Macario, A. J. L., M. Lange, *et al.* (1999). "Stress genes and proteins in the archaea." Microbiology & Molecular Biology Reviews **63** (4): 923-933.

Martin, J., S. Geromanos, *et al.* (1993). "Identification of nucleotide-binding regions in the chaperonin proteins GroEL and GroES." Nature **366** (6452): 279-82.

Martin, J. and F. U. Hartl (1997). "Chaperone-assisted protein folding." Curr Opin Struct Biol **7** (1): 41-52.

Martin, J. and F. U. Hartl (1997). "The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94** (4): 1107-1112.

Martin, J., T. Langer, *et al.* (1991). "Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate." Nature **352** (6330): 36-42.

Mayhew, M., A. C. R. Da Silva, *et al.* (1996). "Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex." Nature **379** (6564): 420-426.

McCallum, C. D., H. Do, *et al.* (2000). "The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking." Journal of Cell Biology **149** (3): 591-601.

Minton, A. P. (1983). "The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences." Molecular & Cellular Biochemistry **55** (2): 119-140.

Mogk, A., T. Tomoyasu, *et al.* (1999). "Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB." EMBO Journal **18** (24): 6934-6949.

Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators." Genes & Development, **12**: 3788-3796.

Netzer, W. J. and F. U. Hartl (1997). "Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes." Nature **388** (6640): 343-349.

Netzer, W. J. and F. U. Hartl (1998). "Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanism." Trends Biochem Sci **23** (2): 68-73.

Neupert, W., C. C. Richardson, *et al.* (1997). "Protein import into mitochondria". Annual Review of Biochemistry, Paolo Alto, Annual Reviews Inc. **66**: 863-917.

Nieba-Axmann, S. E., M. Ottiger, *et al.* (1997). "Multiple cycle of global unfolding of GroEL-bound cyclophilin a evidenced by NMR." JMB **271**: 803-818.

Olsen, G.J., N.R. Pace *et al.* (1985). "Sequence of the 16S rRNA gene from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* and its evolutionary implications." J. Mol. Evol. **22**, 301-307.

Pfanner, N. and M. Meijer (1997). "Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine." Current Biology **7**: R100-R103.

Pfund, C., N. Lopezhoyo, *et al.* (1998). "The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex." EMBO J. **17** (14): 3981-3989.

Phipps, B. M., Typke, *et al.* (1993) "Structure of a molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium." Nature **361**, 475-477.

Phipps, B.M., Hoffmann, A., *et al.* (1991) „A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria.” EMBO J. **10**, 1711-1722.

Pilon, M. and R. Schekman (1999). “Protein translocation: How Hsp70 pulls it off.” Cell. **97** (6): 679-682.

Ploegman, J. H., Drent, *et al.* (1978). “The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese.” Nature **273**: 124-129.

Ranson, N. A., S. G. Burston, *et al.* (1997). “Binding, encapsulation and ejection: substrate dynamics during a chaperonin-assisted folding reaction.” Journal of Molecular Biology **266** (4): 656-664.

Ranson, N. A., N. J. Dunster, *et al.* (1995). “Chaperonins can catalyse the reversal of early aggregation steps when a protein misfolds.” J Mol Biol **250** (5): 581-586.

Ranson, N. A., H. E. White, *et al.* (1998). “Chaperonins.” Biochemical Journal **333** (Part 2): 233-242.

Rassow, J., and Pfanner, N. (1996). "Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides." Curr. Biol. **6**: 115-118.

Richardson, A., S. J. Landry, *et al.* (1998). “The ins and outs of a molecular chaperone machine.” Trends in Biochemical Sciences **23** (4): 138-143.

Robinson, C. V., M. Gross, *et al.* (1994). “Conformation of GroEL-bound alpha-lactalbumin probed by mass spectrometry.” Nature **372** (6507): 646-651.

Roseman, A. M., S. X. Chen, *et al.* (1996). "The chaperonin ATPase cycle - mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL." Cell **87** (2): 241-251.

Rothschild, L. J. and R. L. Mancinelli (2001). "Life in extreme environments." Nature **409**: 1092-1101.

Rye, H. S., S. G. Burston, *et al.* (1997). "Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL." Nature **388** (6644): 792-798.

Saibil, H.R., Dong, Z., *et al.* (1991). "Binding of chaperonins." Nature **353**: 25-26.

Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci USA **74** (12): 5463-5467.

Schultz, C. P. (2000). "Illuminating folding intermediates." Nat Struct Biol **7**(1): 7-10.

Siegers, K. and E. Schiebel (2000). "Purification of GimC from *Saccharomyces cerevisiae*." Chaperonin Protocols **140**: 185-193.

Siegers, K., T. Waldmann, *et al.* (1999). "Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system." EMBO J. **18** (1): 75-84.

Siegert, R., M. R. Leroux, *et al.* (2000). "Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins." Cell **103** (4): 621-632.

Sigler, P. B., Z. H. Xu, *et al.* (1998). "Structure and Function in GroEL-Mediated Protein Folding." Annual Review of Biochemistry **67**: 581-608.

Sternlicht, H., G. W. Farr, *et al.* (1993). "The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **90** (20): 9422-9426.

Stoldt, V., F. Rademacher, *et al.* (1996). "Review: The Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts." Yeast **12** (6): 523-529.

Teter, S. A., W. A. Houry, *et al.* (1999). "Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains." Cell **97** (6): 755-765.

Thomas, D. N. and G. S. Dieckmann (2002). "Antarctic Sea Ice - a habitat for extremophiles." Science **295**: 641-644.

Thulasiraman, V., C. F. Yang, *et al.* (1999). "In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment." EMBO J. **18** (1): 85-95.

Tian, G. L., I. E. Vainberg, *et al.* (1995). "Specificity in Chaperonin-Mediated Protein Folding." Nature. **375** (6528): 250-253.

Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76** (9): 4350-4354.

Trent, J. D., E. Nimmesgern, *et al.* (1991). "A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1 [see comments]." Nature **354** (6353): 490-493.

Vainberg, I. E., S. A. Lewis, *et al.* (1998). "Prefoldin, a Chaperone That Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin." Cell. **93** (5): 863-873.

Veinger, L., S. Diamant, *et al.* (1998). "The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network." Journal of Biological Chemistry **273** (18): 11032-11037.

Viale, A. M. and A. K. Arakaki (1994). "The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles." Febs Lett **341** (2-3): 146-151.

Voderwülbeck, A., Kramer, A., *et al.* (2004). "Low temperature or GroEL/ES overproduction permits growth of *Escherichia coli* cells lacking trigger factor and DnaK." Febs Lett. **559**: 181-187.

Waldmann, T., A. Lupas, *et al.* (1995). "Primary structure of the thermosome from *Thermoplasma acidophilum*." Biol Chem Hoppe Seyler **376** (2): 119-126.

Waldmann, T., Nimmesgern, E., *et al.* (1995), "The thermosome of *Thermoplasma acidophilum* and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC." Eur. J. Biochem. **227**: 848-56.

Wang, S., Sakai, H., *et al.*, (1995), "NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center." J Cell Biol. **130** (3): 519-28.

Weissman, J.S., Rey, H.S., *et al.*, (1996), "Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction." Cell **84** (3): 481-90.

Wiedmann, B., Sakai, H., *et al* (1994). "A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation." Nature **370**(6489):434-40.

Willison, K. R. and A. L. Horwich (1996). "Structure and function of chaperonins in archaeobacteria and eukaryotic cytosol." The Chaperonins. R. J. Ellis. London, Academic Press: 107-136.

Woese, C.R. und G.E. Fox (1977). "Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary kingdoms"; Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, 5088-5090.

Woese, C. R., O. Kandler, *et al.* (1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87** (12): 4576-4579.

Xu, Q., G. Schett, *et al.* (1994). "Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells." Circ Res **75** (6): 1078-85.

Xu, Z. H., A. L. Horwich, *et al.* (1997). "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex." Nature **388** (6644): 741-49.

Xu, Z., Knafels, J.D., *et al* (2000). "Crystal structure of the bacterial protein export chaperone secB." Nature Struct. Biol. **7**: 1172-1177.

Zhu, X., Zhao, X., *et al.* (1996). "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK." Science **272**, 1606-1614.

Zimmerman, S. B. and A. P. Minton (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences." Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure **22**: 27-65.

6 Anhang

6.1 Veröffentlichungen

Klunker*, D., Haas*, B., Hirtreiter*, A., **Figueiredo***, L., Naylor, D. J., Pfeifer, G., Müller, V., Deppenmeier, U., Gottschalk, G., Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. (2003) "Coexistence of Group I and Group II Chaperonins in the Archaeon *Methanosarcina mazei*." Journal of Biological Chemistry **278**: 33256-33267.

(*diese Autoren trugen gleichberechtigt zu dieser Arbeit bei)

Figueiredo*, L., Klunker*, D., Ang, D., Naylor, D. J., Kerner, M. J., Georgopoulos, C., Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. (2004) "Functional characterization of an archaeal GroEL/GroES chaperonin system: significance of substrate encapsulation." Journal of Biological Chemistry **279**: 1090-1099.

(*diese Autoren trugen gleichberechtigt zu dieser Arbeit bei)

6.2 Poster

Figueiredo, L., Klunker, D., Haas, B., Naylor, D. J., Kerner, M. J., Hirtreiter, A., Pfeifer, G., Deppenmeier, U., Hayer-Hartl, M. and Hartl, F. U. (2002) "Identification and Functional Analysis of the Group I and Group II Chaperonins in the Mesophilic Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1." Poster Presentation at the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Meeting, Saxtons River, Vermont, USA.

6.3 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. F. Ulrich Hartl für die umfangreiche Betreuung dieser Arbeit, die fortwährende Unterstützung und die zahlreiche Diskussionen. Des Weiteren geht mein Dank an Dr. Manajit Hayer-Hartl für hilfreiche Diskussionen und wertvolle Ratschläge.

Die Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen war essentiell für das gute Gelingen dieser Arbeit. So danke ich Prof. Costa Georgopoulos (Universität Genf) für die Durchführung von Komplementationsstudien, Günther Pfeifer (MPI für Biochemie, Martinsried) für die Kooperation in den elektromikroskopischen Aufnahmen, John Longo (MPI Biochemie, Martinsried) für die Zusammenarbeit bei der Antikörpergewinnung und Monica Zobawa (MPI Biochemie, Martinsried) für die massenspektroskopische Analysen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Daniel Klunker für seine fachliche Unterstützung, die hervorragende Zusammenarbeit und seine freundliche und hilfsbereite Art.

Bei allen Kollegen des Arbeitskreises möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Insbesondere geht mein Dank an Dr. Johanna Heske, Angela Hirtreiter, Michael Kerner, Dr. Bernd Haas, Dr. D. Jose Barral, Tobias Maier, Dr. Gregor Schaffer, Dr. Dean Naylor und Dr. Anna Stines.

Dirk Wischnewski danke ich sehr für seine hilfsbereite Art und für die Reinigung von *E. coli* Proteine.

6.4 Lebenslauf

Name: Luís Gonçalo Cavaleiro de Ferreira Mousinho de Figueiredo

Geburtsdatum: 23.10.1971

Geburtsort: Lissabon

1978-1991 Grundschule und Gymnasium an der Deutschen-Schule-Lissabon, Erlangung der Allgemeine Hochschulreife

1991-1994 Grundstudium der Chemie an der Universität Ulm, Abschluss der Diplom-Vorprüfung

1994-1998 Hauptstudium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, Abschluss des Chemie-Diploms

1998-1999 Diplomarbeit mit dem Thema: „*Nukleotidgallensalzimport in Rattenhepatozyten*“

1999-2000 Laborleiter bei der Biotechnologiefirma Metabion GmbH, Martinsried

2000-2004 Anfertigung der Dissertation unter der Betreuung von Prof. F. U. Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit dem Thema: „*Proteinfaltung im Archaeum Methanosarcina mazei G1*“

seit 2005 Projektleiter bei Dade Behring, Marburg