

Technische Universität München
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Chaperon-vermittelte Proteinfaltung in Archaea

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von:

- *MtGimC*, einem hochkonservierten neuartigen Chaperon
- *MmGroEL/GroES*, einem Gruppe I Chaperonin in Archaea

Daniel Klunker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 26.05.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie
am 08.09.2003 angenommen.

1. EINLEITUNG	9
1.1. Definition der Proteinfaltung	9
1.2. Aggregatbildung missgefalteter Proteine	11
1.3. Die molekularen Chaperone	13
1.3.1. Definition	13
1.3.2. Klassifizierung der Chaperone	14
1.3.3. Aufgaben der Chaperone	16
1.3.4. Einfluss molekularer Chaperone während der <i>de novo</i> Proteinfaltung	17
1.3.5. Kotranslationale Proteinfaltung	18
1.4. Gruppe I und Gruppe II Chaperonine	19
1.4.1. Definition	19
1.4.2. Klassifizierung und Struktur der Chaperonine	20
1.4.3. Funktionsmechanismus der Gruppe I Chaperonine	22
1.4.4. Funktionsmechanismus der Gruppe II Chaperonine	25
1.5. Der Gim-Komplex: Aufgabe und Funktion	28
1.6. Entwicklung der drei Lebensdomänen, Archaea, Eukarya, Bakteria	29
1.6.1. Molekulare Chaperone in Archaea	31
1.7. Das Archaeon <i>Methanobacterium thermoautotrophikum</i>	31
1.7.1. Eigenschaften und Lebensraum	31
1.7.2. Wissenschaftlicher Nutzen	32
1.8. Das Archaeon <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	33
1.8.1. Eigenschaften und Lebensraum	33
1.8.2. Wissenschaftlicher Nutzen	33
1.9. Zielsetzung	35
2. MATERIAL UND METHODEN	36
2.1. Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Enzyme)	36

2.2.	Geräte	38
2.3.	Bakterienstämme, Plasmide, Proteine	39
2.4.	Molekularbiologische Methoden	41
2.4.1.	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Zellen	41
2.4.2.	DNA-analytische Methoden	42
2.4.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.4.4.	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	43
2.4.5.	Sequenzierung	43
2.5.	Biochemische Methoden	43
2.5.1.	Gelelektrophorese	43
1.1.2.	Bestimmung der Protein-Konzentration	44
2.5.3.	Herstellung polyklonaler Antikörper	44
2.5.4.	Westernblot Analysen	45
2.5.5.	Gelfiltrationsanalysen	46
2.5.6.	Assemblierung der aufgereinigten Gim-Untereinheiten	46
2.5.7.	Analyse der Chaperonine im Cytosol von <i>M.mazei</i>	47
2.5.8.	Autoradiogramme	47
2.5.9.	Phosphoimaging	48
2.6.	Klonierung und Expression von <i>MtGima</i> und <i>MtGimb</i>	48
2.7.	Aufreinigung von <i>MtGima</i> und <i>MtGimB</i>	49
2.8.	Klonierung und Expression der Chaperonine aus <i>M.mazei</i>	50
2.9.	Reinigung von <i>MmGroEL</i> und <i>MmGroES</i>	50
2.10.	Funktionelle Analysen	51
2.10.1.	Cross-linking Analyse	51
2.10.2.	Ermittlung der Chaperon-Eigenschaft von <i>MtGimC</i>	52
2.10.3.	Analyse der <i>MtGimC</i> -Rhodanese Komplexe sowie der Protease-Resistenz	52
2.10.4.	Rückfaltungsversuche von Aktin und Rhodanese	53
2.10.5.	Substrat-Transfer von <i>MtGimC</i> auf ein Chaperonin	54

2.10.6.	Chaperonin-vermittelte Rückfaltung von <i>MtGimC</i> gebundener Rhodanese	
	54	
2.10.7.	Messung der ATPase-Aktivität	55
2.10.8.	Rückfaltung von Rhodanese	55
2.10.9.	Rückfaltung von Malatdehydrogenase (MDH)	55
2.10.10.	Gelfiltrationsexperimente	56
2.10.11.	Protease Resistenz	57
2.11.	Bioinformatische Methoden	57
2.11.1.	Multialignment und BLAST-Suche	57
2.11.2.	Strukturvorhersagen	58
2.11.3.	Phylogenetische Analysen	58
2.12.	Biophysikalische Methoden	61
2.12.1.	Elektronenmikroskopie	61
2.12.2.	Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	61
3.	ERGEBNISSE	63
3.1.	<i>MtGimC</i>, ein neuartiges Chaperon in Archaea	63
3.1.1.	Gim-Untereinheiten sämtlicher Spezies weisen eine verwandte Struktur auf und lassen sich zwei Klassen zuordnen	63
3.1.2.	Die beiden Gim-Untereinheiten von <i>Methanobacterium thermoautotrophikum</i> bilden hochmolekulare Komplexe im Zytoplasma	67
3.1.3.	<i>MtGimα</i> und <i>MtGimβ</i> bilden einen hexameren Komplex	69
3.1.4.	Untersuchung der Chaperon Eigenschaft von <i>MtGimC</i>	71
3.1.5.	<i>MtGimC</i> gebundenes Protein ist nicht Protease-resistent	75
3.1.6.	<i>MtGimC</i> stabilisiert nicht-natives Aktin und vermittelt den Transfer an ein Gruppe II Chaperonin zur vollständigen Faltung	77
3.1.7.	Das Gruppe I Chaperonin GroEL aus <i>E.coli</i> vermittelt die Faltung von <i>MtGimC</i> gebundener nicht-nativer Rhodanese	80
3.1.8.	Zusammenfassung	84
3.2.	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung eines Gruppe I Chaperonins in Archaea	85

3.2.1.	Das Genom des mesophilen Archaeon <i>Methanosarcina mazei</i> kodiert für Gruppe I und Gruppe II Chaperonin Systeme	85
3.2.2.	Die Gene, die für das archaeelle Gruppe I Chaperonin-System kodieren sind im archaeellen Genom eingebettet.	86
3.2.3.	Das archaeelle GroEL weist eine hohe Homologie zu anderen Gruppe I Chaperoninen auf	89
3.2.4.	<i>MmGroEL</i> und <i>MmTHS</i> sowie die Kofaktoren <i>MmGroES</i> und <i>MmGimC</i> sind im Zytoplasma exprimiert	91
3.2.5.	<i>MmGroEL</i> und <i>MmTHS</i> sind abundante, Stress induzierbare Proteine	93
3.2.6.	Klonierung und Expression von rekombinanten Gruppe I Chaperonin-System aus <i>Methanosarcina mazei</i>	95
3.2.7.	Das archaeelle Gruppe I Chaperonin <i>MmGroEL</i> hat eine Aggregationshemmende Eigenschaft	96
3.2.8.	Das archaeelle Chaperonin-System <i>MmGroEL</i> /GroES vermittelt die Faltung denaturierter Rhodanese in einer ATP-abhängigen Reaktion	97
3.2.9.	Das archaeelle Chaperonin-System weist eine langsame Dissoziationsrate auf	100
3.2.10.	<i>MmGroEL</i> hat eine schwache ATPase-Aktivität	101
3.2.11.	Das archaeelle Chaperonin-System entlässt das gefaltete Substrat mit deutlicher Verzögerung	103
3.2.12.	Ammoniumsulfat stimuliert die ATPase-Aktivität von GroEL	105
3.2.13.	Ammoniumsulfat beschleunigt die Substratfreisetzung aus der Kavität von <i>MmGroEL</i>	108
3.2.14.	Das archaeelle Chaperonin-System erlaubt die Faltung des dimeren Substrats Malat Dehydrogenase nur in Anwesenheit von Ammoniumsulfat	109
3.2.15.	MDH wird von archaeellem Chaperonin-System gefaltet, wenn Ammoniumsulfat im Puffer vorhanden ist	111
3.2.16.	Ammoniumsulfat vermittelt den Einschluss von ungefalteter MDH in die cis-Kavität von <i>MmGroEL</i>	114
3.2.17.	Zusammenfassung	118
4.	DISKUSSION	119
4.1.	Das molekulare Chaperon <i>MmGimC</i> in Archaea	121

4.1.1.	Strukturvorhersage des Gim-Komplexes	122
4.1.2.	<i>MtGimC</i> assistiert bei der Chaperonin-vermittelten Proteinfaltung	125
4.2.	Die Entwicklung der Chaperonine in den <i>Methanosarcinales</i>	127
4.2.1.	Das archaeelle Gruppe I Chaperonin zeigt eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu bakteriellem GroEL	128
4.2.2.	Das rekombinante archaeelle Gruppe I Chaperonin ist <i>in vitro</i> funktionell	129
4.3.	Perspektiven der Forschung an molekularen Chaperonen in Archaea	132
5.	LITERATUR	135
6.	ANHANG	153
6.1.	Veröffentlichungen	153
6.2.	Poster	153
7.	DANKSAGUNG	154
8.	LEBENS LAUF	156

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BIAcore	engl.: <i>Biomolecular Interaction Analysis</i>
BLAST	engl.: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCT	engl.: <i>Chaperonin Containing TRiC</i>
CD	engl.: <i>Circular Dichroisme</i>
C-terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
dATP	didesoxyadenosintriphosphat
dCTP	didesoxycytidintriphosphat
dGTP	didesoxyguanosintriphosphat
dNTP	didesoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	didesoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcGroEL</i>	<i>E.coli</i> GroEL
<i>EcGroES</i>	<i>E.coli</i> GroES
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FPLC	engl.: <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>

GimC	engl.: <i>Genes involved in microtubule biogenesis Complex</i>
Glc	Glukose
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	10 ³ Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
LB	Lauri Bertani
<i>Mm</i>	<i>Methanosarcina mazei (M.mazei)</i>
<i>Mb</i>	<i>Methanosarcina barkeri (M.barkeri)</i>
<i>Mac</i>	<i>Methanosarcina acetivorans (M.acetivorans)</i>
MS	Massenspektrometrie
NAC	Nacent Chain Associated Complex
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
N-terminal	aminoterminal
<i>Mt</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophikum</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RU	engl.: <i>Response Units</i>
RT/rt	Raumtemperatur
<i>Sc</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
<i>Ta</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	engl.: <i>trigger factor</i>
TRiC	engl.: <i>TCP-1 containing Ring Complex</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

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

1. Einleitung

Es ist eine der großen Herausforderungen der modernen Biologie, die Mechanismen zu entschlüsseln, durch die eine dem Ribosom entwachsende Polypeptidkette ihre dreidimensionale Struktur erreicht. Die biologische Aktivität eines Proteins ist in der Regel absolut abhängig von dem Erreichen der nativen Struktur. In der Tat macht der schnelle Fortschritt im Bereich der Genom-Sequenzierung die mit der Proteinfaltung verbundenen Fragestellungen um so drängender. Neben der Entschlüsselung der genetischen Information ist es von essentieller Bedeutung, die Struktur und die Funktion der codierten Proteine zu kennen. Um zum Beispiel den Grund für eine Krankheit und erfolgversprechende Behandlungsansätze zu erforschen, ist es unabdingbar, nicht nur den eventuell verursachenden Gendefekt zu erkennen, sondern auch das entsprechende Protein, das durch eine mögliche Fehlfaltung zu der Krankheit beiträgt.

Die Proteinfaltung ist somit ein entscheidender Prozess in der Entwicklung vom Gen zur nativen Proteinstruktur, der vor allem in der letzten Dekade eine wachsende Anzahl von Wissenschaftlern beschäftigt.

1.1. Definition der Proteinfaltung

Grundsätzliche Überlegungen zur Proteinfaltung gehen auf Erkenntnisse aus den frühen 50er und 60er Jahren zurück. Damals ließen *in vitro* Experimente von Christian Anfinsen darauf schließen, dass Proteine unter bestimmten Bedingungen die Fähigkeit haben spontan zu falten (Sela *et al.* 1957; White Jr. and Anfinsen 1959; Anfinsen 1973). Dabei wurden Proteine denaturiert und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen das denaturierende Agens nach und nach entfernt. Die Grundlage dieser Experimente war, dass mit relativ niedriger Proteinkonzentration intermolekulare Polypeptid-Interaktionen verringert werden. Durch ein Absenken der Temperatur wiederum werden hydrophobe Interaktionen geschwächt. In der Tat konnte

Anfinsen auf diese Weise Bedingungen definieren, die eine spontane Rückfaltung ermöglichen (Anfinsen 1973). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde schon damals postuliert, dass die erreichte native, dreidimensionale Struktur alleine durch die Aminosäuresequenz des Proteins definiert ist.

Das effiziente Rückfalten von denaturierten Proteinen ist allerdings zumeist auf kleine Proteine beschränkt, die nur aus einer Domäne bestehen, und somit ihre hydrophoben Regionen schnell, zum Teil innerhalb von Millisekunden (Dobson 1999) verbergen. Der kurze zeitliche Ablauf der Proteinfaltung lässt auf eine biologische Determinierung der Faltungsabläufe schließen, die einem fest vorgegebenen Faltungsweg folgen (Baldwin 1995; Baldwin 1996). In der Tat wäre es unwahrscheinlich, dass zum Erreichen der nativen Proteinstruktur alle theoretisch denkbaren konformationellen Zustände der faltenden Polypeptidkette durchlaufen werden. Ein solcher Faltungsprozess würde gemäss dem **Levinthal Paradoxon** in astronomischen zeitlichen Dimensionen ablaufen.

Levinthal Paradoxon:

Für ein Protein mit 100 AS und jeweils 3 Möglichkeiten für jeden Winkel an einer Peptidbindung (dihedral) ergäben sich 3^{200} mögliche Konformationen. Bei einer Proteinfaltungsgeschwindigkeit von 10^{-15} sec würde es 10^{80} sec dauern, alle Möglichkeiten auszuprobieren, um die energetisch günstigste Konformation zu finden. Ein solcher Prozeß würde das Alter des Universums um 60 Größenordnungen übersteigen.

Man geht heute davon aus, dass multiple Faltungswege bestehen und das Levinthal Paradoxon durch die Trichterform der Energielandschaften der Faltung gelöst wird. So können die Prozesse der Proteinfaltung energetisch als Bewegung auf einer dreidimensionalen Energielandschaft beschrieben werden (Onuchic 1997). Die Faltung ist demnach auf das Erreichen der nativen Struktur im absoluten Energieminimum ausgerichtet.

1.2. Aggregatbildung missgefalteter Proteine

Die von Anfinsen beschriebenen *in vitro* Rückfaltungen sind nur mit Einschränkungen auf die *in vivo* Situation übertragbar. In der Zelle liegen völlig andere Bedingungen vor als im Reagenzglas. Hier kommen nicht nur die Vorgänge der posttranslationalen Proteinfaltung eines bereits vollständig synthetisierten Proteins zum tragen. Auch die Prozesse der kotranslationalen Proteinfaltung von wachsenden Proteinen am Ribosom spielen hier eine wichtige Rolle. Schließlich sind auch Faltungsereignisse zu berücksichtigen, die durch den Transport von entfaltenen Proteinen durch Membranen, wie zum Beispiel in Mitochondrien, notwendig sind. Ein weiterer wichtiger Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass das intrazelluläre Milieu eine makromolekular sehr dicht gedrängte Umgebung darstellt. Diese hohen Makromolekülkonzentrationen von 200-300 mg/ml (Elowitz *et al.* 1999) führen unweigerlich zu einem Volumenausschlusseffekt (engl.: *excluded volume effect* oder *molecular crowding*) und wirken sich auf molekulare Assoziationskinetiken und Bindungsgleichgewichte aus. Es wird vermutet, dass die Assoziationskonstanten von Makromolekülen unter diesen Bedingungen um mehrere Größenordnungen ansteigen (Minton 1983; Zimmerman and Minton 1993). Diese Bedingungen können nun den Effekt der Aggregatbildung verstärken. Bei manchen Proteinen kann es zu vorübergehenden Fehlfaltungen, den „kinetisch 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 Aggregation (Abbildung 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). 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).

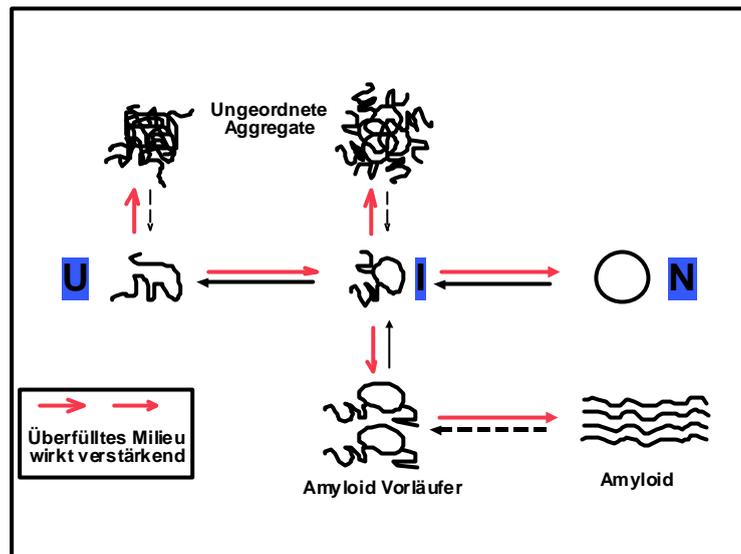


Abbildung 1. Protein Aggregation

In der hochkonzentrierten Umgebung (engl.: *crowded environment*) der Zelle kommt es während des Prozesses der Proteinfaltung zu Aggregation 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, Amyloide (Schema in Anlehnung (Dobson and Karplus 1999).

Diese Vorgänge werden durch die in der Zelle vorliegende hochkonzentrierte Umgebung verstärkt (siehe Abbildung 1). 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.

1.3. Die molekularen Chaperone

1.3.1. Definition

Es sind die sogenannten „molekularen Chaperone“, die Proteinaggregation in der Zelle verhindern und damit eine korrekte Faltung gewährleisten. Sie sind essentiell für das Überleben aller Zellen (Hartl 1996; Netzer and Hartl 1998; Ellis and Hartl 1999; Agashe and Hartl 2000; Feldman and Frydman 2000; Walter and Buchner 2002). Der Begriff molekulare Chaperone geht auf das französische Wort „chaperone“ (Anstandsdame) zurück. Diese Bezeichnung wurde erstmals von Ron Laskey und Kollegen 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. Der Begriff molekulare Chaperone wurde im folgenden von John Ellis übernommen, um damit eine große Gruppe funktionell verwandter Proteine zusammen zu fassen.

Eine gängige Definition eines molekularen Chaperons ist in Anlehnung an Hendrick (Hendrick and Hartl 1993):

„Jedes Protein, das transient mit einem instabilen Konformer eines anderen Proteins interagiert, diesen stabilisiert und dessen Faltung (in Folge von de novo Proteinsynthese, Transit durch Membranen oder Stress-induzierter Denaturierung) sowie die Oligomerisierung, die Interaktion mit anderen zellulären Komponenten, den intrazellulären Transport oder den proteolytischen Verdau entweder alleinig oder unter Zuhilfenahme von Kofaktoren vermittelt.“

Da Chaperone in aller Regel nicht Teil des nativen Proteins sind, dessen Faltung sie unterstützen, haben viele Chaperone entsprechende Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen, sich von dem Produkt wieder zu lösen. Im Falle von Chaperonen der Hsp60, Hsp70 und Hsp90-Familie handelt es sich um so genannte ATPasen. Die Bindung und Hydrolyse von

Nukleotiden spielt hier eine entscheidende Rolle bei der Ausübung ihrer Funktion, da auf diese Weise konformationelle Veränderungen ausgelöst werden, die ein Freilassen des Substrates bewirken.

1.3.2. Klassifizierung der Chaperone

Molekulare Chaperone sind insbesondere in Zusammenhang mit ihrer Funktion als Stressproteine entdeckt worden, da sie zu einer Klasse von Proteinen gehören, deren Expression unter Stressbedingungen ansteigt (Lindquist 1986; Morimoto 1998). Dies führte zu dem Begriff Hitzeschockproteine (HSPs, engl.: *heat shock proteins*). In der letzten Dekade haben neue Erkenntnisse den Fokus hin zu einer Untersuchung der Rolle der HSPs als molekulare Chaperone gerichtet, da sie offensichtlich einen gewichtigen Anteil am Schutz der zellulären Proteine vor Stresseinwirkungen haben.

Die Gene, die für HSPs codieren, sind stark konserviert. Viele sind in sämtlichen Spezies innerhalb der Eukarya, Bakteria und Archaea vertreten. Die molekularen Chaperone können auf der Basis von Sequenzhomologie und typischen Molekulargewicht einer der folgenden Klassen zugeordnet werden (Tabelle 1)

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass im Laufe der Evolution komplexere Lebewesen auch eine größere Anzahl von Chaperonen aufweisen. So enthält beispielsweise die Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* 14 verschiedene Hsp70 Proteine, während das Bakterium *E.coli* lediglich zwei verschiedene Vertreter aufweist (Pahl *et al.* 1997). *Mycobakterium genitalum*, der einfachste bekannte Organismus, besitzt dagegen nur ein einziges Hsp70. Bestimmte Chaperonklassen sind in manchen Organismen sehr wichtig, während sie in anderen überhaupt nicht vorkommen.

Chaperon Familie	Eukarya	Bakteria	Archaea
Kleine Hsps	Hsp12-Hsp42, α -Crystallin	IbpA, IbpB	Hsp16.5
Hsp10 (Gruppel Chaperonin Kofaktor)	Hsp10	GroES	GroES (nur Methanosarcinales)
GimC	<i>höhere Eukaryonten:</i> Prefoldin <i>Hefe:</i> Gim1-6	-	GimC (in den meisten Archaea)
Trigger Faktor	Trigger Faktor	-	-
GrpE	<i>höhere Eukaryonten:</i> GrpE <i>Hefe:</i> Mge1	GrpE	GrpE
Hsp40	<i>höhere Eukaryonten:</i> Hsp40 <i>Hefe:</i> Ydj1, Mdj1, Sec63	DnaJ	DnaJ
Hsp60 (Chaperonine)	<i>Gruppe I:</i> Hsp60 (Mitochondrien, Chloroplasten) <i>Gruppe II:</i> TriC/CCT (Zytosol)	<i>Gruppel:</i> GroEL	<i>Gruppe I:</i> GroEL (nur Methanosarcinales) <i>Gruppe II:</i> Thermosom
Hsp70	<i>höhere Eukaryonten:</i> Hsp72, Hsp73, mtHsp70, BiP <i>Hefe:</i> Ssa1-4, Ssb1-2, mtSsc1	DnaK, Hsc66, Hsc62	DnaK
Hsp90	<i>höhere Eukaryonten:</i> Hsp90- α (Zytosol, induzierbar) Hsp- β (Zytosol, konstitutiv) Hsp75 (mitochondrial) Gp96 (ER) <i>Hefe:</i> Hsp82 (Zytosol)	HtpG	Nicht bekannt
Hsp100	<i>Hefe:</i> Hsp104	Cps	Nicht bekannt

Tabelle 1. Klassifizierung und Lokalisierung von Chaperonen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Chaperone sind rot gekennzeichnet. Zusammenstellung basiert auf Artikeln von V. Agashe und M.R.Leroux (Agashe and Hartl 2000; Leroux 2001)

Ein Grund für dieses Phänomen ist sicherlich die Vervielfältigung von einzelnen Genen innerhalb eines Genoms im Laufe der Evolution. Darauf lässt zumindest die oft sehr hohe Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Proteinen (oder Proteinuntereinheiten) schließen. Dies resultiert zum Teil in überlappenden Funktionen (mehrere Hsp70). Die Existenz mehrerer

homologer Proteine kann jedoch auch auf intrazelluläre Organelle zurückzuführen sein, in denen jeweils eines der homologen Proteine lokalisiert ist. Im Laufe der Evolution kann eine Gen-Vervielfältigung jedoch bestimmten mutationellen Veränderungen ausgesetzt sein. Gerade in höheren Organismen kann dies zur Bildung hetero-oligomeren Proteinstrukturen führen, die dann in einer höheren Spezifität der oligomeren Chaperonkomplexe resultiert. Dieses Phänomen ist ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit und wird im Anschluss speziell am Beispiel der Hsp60 Proteine (Kapitel 1.4), der sogenannten Chaperonine vertieft.

1.3.3. Aufgaben der Chaperone

Die Aufgaben der Chaperone und ihrer Kofaktoren sind ähnlich vielfältig wie deren primäre Strukturen. Chaperone assistieren während der *de novo* Proteinsynthese, wie in Abbildung 2 dargestellt. Hier spielen sie eine wichtige Rolle, indem sie entweder „passiv“ die Aggregation von noch ungefalteten Proteinen verhindern (kleinere Chaperone) oder auch in einer aktiven Weise die Faltung vermitteln (Hsp60, Hsp70, Hsp90) (Agashe and Hartl 2000). Diese Funktionen werden nicht nur bei der *de novo* Proteinsynthese ausgeübt, sondern auch wenn es in Folge von Stressbedingungen zu Denaturierung und Aggregatbildung von Proteinen kommt. Unter diesen Bedingungen sind gerade die kleinen Chaperone essentiell, die ATP-unabhängig wirken und durch ihre generelle Chaperonaktivität für die Unterdrückung von Proteinaggregation von Bedeutung sind (Haslbeck *et al.* 1999; Jakob *et al.* 1999; Clark and Muchowski 2000). Des weiteren erfüllen Chaperone wichtige Aufgaben beim Transport von Proteinen zu verschiedenen Orten innerhalb des Zytoplasmas, aber auch durch Membranen (Neupert 1997; Pfanner and Meijer 1997; Pilon and Schekman 1999). Für Chaperone der Hsp100 Familie konnte gezeigt werden, dass sie in Kooperation mit Hsp70 zur Auflösung von Proteinaggregaten beitragen (Glover and Lindquist 1998; Mogk *et al.* 1999; Weber-Ban *et al.* 1999). Aufgrund dieser Eigenschaft, nämlich Aggregationsprozesse zu modulieren, wird einigen Chaperonklassen ein Einfluss in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie

Chorea Huntington und Prionenerkrankungen zugesprochen (Horwich and Weissman 1997; Prusiner *et al.* 1998; Dobson 1999; Sakahira 2002). Eine Ursache dieser Krankheiten ist eine Missfaltung von essentiellen Proteinen (Horwich and Weissman 1997; Dobson 1999).

Es ist wichtig in diesem Zusammenhang auch anzumerken, dass es in der Zelle quasi eine Arbeitsteilung zwischen molekularen Chaperonen und zellulären Proteasen gibt. Da ungefaltete Proteine in beiden Fällen als Substrate erkannt werden, ist die Einstellung eines Gleichgewichts von Chaperon- und Proteaseaktivitäten essentiell für die Zelle. In diesem Zusammenhang werden Mechanismen der Qualitätskontrolle von Proteinkonformationen sowie der kinetischen Sortierung fehlgefalteter Proteine in Rückfaltungs- oder Abbauewege postuliert (Wickner *et al.* 1999) 101).

1.3.4. Einfluss molekularer Chaperone während der *de novo* Proteinfaltung

Die vielfältigen Aufgaben molekularer Chaperone haben im Laufe der Evolution zu einer Differenzierung, Spezialisierung und Aufgabenteilung geführt. Dies beinhaltet auch die Notwendigkeit zu funktionellen Kooperationen. Als Resultat kam es zur Ausbildung bevorzugter Proteinfaltungswege sowie von Multichaperonkomplexen, die in Abbildung 2 für Bakteria und Eukarya zusammengestellt sind.

Eine gewisse Gemeinsamkeit der Proteinfaltungswege in Eukarya und Bakteria ist deutlich zu erkennen. Die Chaperon-assistierten Proteinfaltungswege verlaufen in eukaryontischen Zellen über ähnliche Zwischenstadien wie in Bakterien (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Gegenüber prokaryontischen Zellen besteht in Eukaryonten jedoch eine größere Tendenz zur kotranslationalen Faltung neusynthetisierter Polypeptidketten, da eukaryontische Proteine im Durchschnitt größer sind als prokaryontische Proteine und sich aus einer größeren Anzahl unabhängiger Faltungseinheiten zusammensetzen. Außerdem ist die Translationsgeschwindigkeit in eukaryontischen Zellen typischerweise 5 – 10 x langsamer als in Bakterien (Netzer and Hartl 1997).

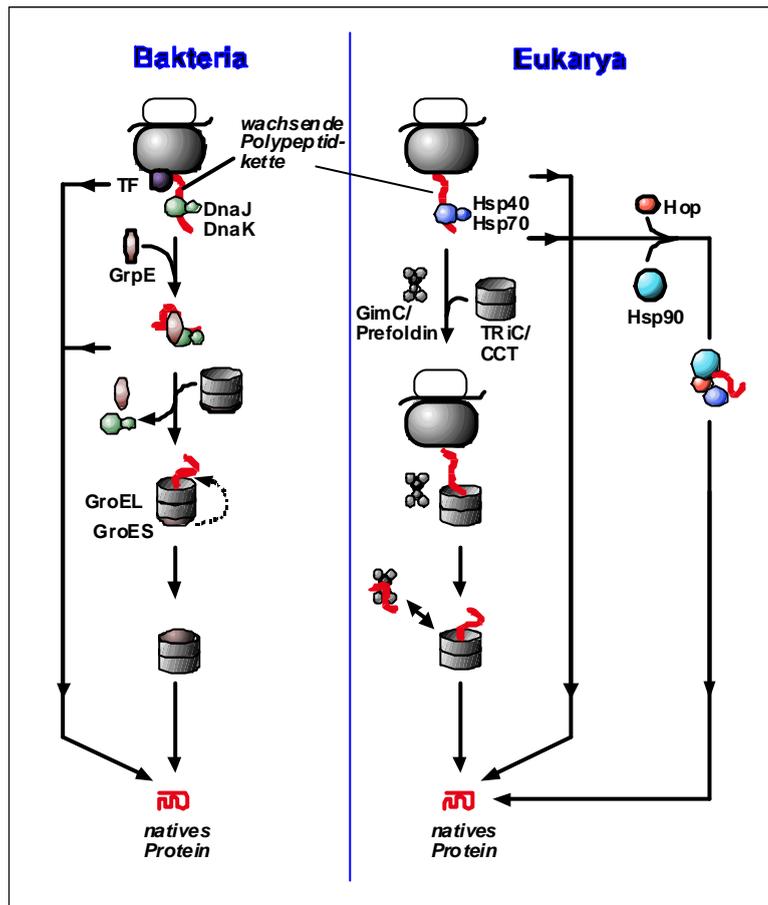


Abbildung 2. Möglichkeiten des Polypeptid-Flux durch das Chaperon-System während der *de novo* Proteinsynthese

1.3.5. Kotranslationale Proteinfaltung

Während der Proteinsynthese sind die ersten 30-40 C-terminalen Aminosäuren durch den ribosomalen Kanal geschützt (Nissen *et al.* 2000). Sobald die Polypeptidkette aus dem Ribosom austritt, kann sie mit Chaperonen interagieren. Diese Interaktion findet teilweise bereits kotranslational statt. Es ist anzunehmen, dass dadurch intra- und intermolekuläre Fehlbindungen verhindert werden, bevor die neusynthetisierte Kette in der Lage ist, korrekt zu falten. Die kotranslationale Assistenz durch Chaperone scheint vor allem bei längeren Proteinen und solchen, die aus mehreren Domänen bestehen, wichtig (Netzer and Hartl 1997). Eine Domäne besteht aus etwa 100 - 300 Aminosäuren und kann üblicherweise erst dann

die tertiäre Struktur einnehmen, wenn die komplette Domäne synthetisiert und auch aus dem Ribosom ausgetreten ist (Nissen *et al.* 2000). Die Synthese einer solchen Domäne dauert etwa 10-20 Sekunden in Bakterien und 30-100 Sekunden bei Eukaryonten (Frydman 2001). Dieser vergleichsweise lange Zeitraum verdeutlicht den notwendigen Schutz der „offenen“ hydrophoben Seitenketten durch entsprechende Chaperone. Versuche solche langen Proteinketten *in vitro* zu falten, führten oft zu Missfaltung und Aggregation (Frydman 2001). Durch eine kotranslationale Faltung, bei der eine Domäne bereits gefaltet wurde, bevor die nächste Domäne synthetisiert ist, wird dieses Problem *in vivo* umgangen. Das konnte mit künstlichen Proteinen, die aus zwei Domänen bestehen (H-ras und Dihydrofolat-Reduktase) experimentell bestätigt werden (Netzer and Hartl 1997).

Eukaryonten enthalten wesentlich mehr Proteine mit Multidomän-Struktur als Bakterien (Netzer and Hartl 1997). Bei *E.coli* sind 13% der 4300 Proteine größer als 55 kDa, während bei *S.cerevisiae* 38% der 5800 Proteine in dieser Größenordnung vorliegen (Hartl and Hayer-Hartl 2002). In Laufe der Evolution ist es daher bei Eukarya zu einer stärkeren Spezialisierung der kotranslationalen Faltung gekommen. Dieses Phänomen lässt sich besonders gut anhand der Hsp60 Proteine beobachten, die sogenannten Chaperonine, die im folgenden Kapitel beschrieben werden. Während das eukaryontische Chaperonin TRiC kotranslationale Faltung vermitteln kann (Frydman *et al.* 1994; McCallum *et al.* 2000; Hartl and Hayer-Hartl 2002), ist die Proteinfaltung mit Hilfe des bakteriellen Chaperonins strikt posttranslational (Ewalt *et al.* 1997).

1.4. Gruppe I und Gruppe II Chaperonine

1.4.1. Definition

Der Ausdruck „Chaperonine“ geht auf Hemmingsen und Ellis zurück (Hemmingsen *et al.* 1988) und bezeichnet eine Sequenz-konservierte Familie von ca. 60 kDa Proteinen, die zu einem oligomeren Doppelring von 800-1000 kDa assemblieren (Willison and Horwich 1996). Chaperonine vermitteln in

einem ATP-abhängigem Reaktionsmechanismus die Faltung einer bedeutenden Anzahl von Proteinen (Bukau and Horwich 1998; Ranson *et al.* 1998; Houry *et al.* 1999). Die Faltung findet in einer Kavität statt, die durch eine ringförmige Anordnung der Untereinheiten entsteht. Chaperonine sind lebenswichtige Proteine, die im Zytosol von Bakterien, Eukaryonten und Archaea, sowie in Mitochondrien und Chloroplasten vorkommen (Horwich and Willison 1993; Ewalt *et al.* 1997; Hartl and Hayer-Hartl 2002).

1.4.2. Klassifizierung und Struktur der Chaperonine

Zwei Chaperonin-Familien sind bekannt und können auf Grund ihrer evolutionären Verwandtschaft klassifiziert werden.

Eine Familie (**Gruppe I**) schließt das bakterielle GroEL, das mitochondriale Hsp60 sowie das Rubisco-Untereinheit bindende Protein (RBP) ein. Die eukaryontischen Gruppe I Chaperonine Hsp60 und RBP weisen eine hohe Identität der Aminosäuresequenz mit dem bakteriellen GroEL auf (45-60 %). Dies ist vermutlich auf deren Lokalisierung in Organellen endosymbiontischen Ursprungs zurückzuführen (Viale and Arakaki 1994). Gruppe I Chaperonine sind im Allgemeinen aus einer bestimmten Art Untereinheit aufgebaut (abgesehen von RBP, zwei verwandte Untereinheiten (Hemmingsen *et al.* 1988). Jede Untereinheit besteht aus 3 Domänen: apikale Domäne, intermediäre Domäne und equatoriale Domäne (Abbildung 3 F). Gruppe I Chaperonine sind aus 14 Untereinheiten zusammengesetzt, die zwei Ringe bilden (Abbildung 3 C). Die rotations-symmetrischen Ringe bestehen aus je 7 Untereinheiten (Abbildung 3 D). Sie sind nur in Kooperation mit einem ca. 70 kDa großen Kofaktor voll funktional. Dieser besteht aus 7 Untereinheiten von 10 kDa Molekulargewicht (GroES oder Hsp10) (Ellis 1996; Hartl 1996; Fenton and Horwich 1997; Bukau and Horwich 1998).

Die zweite Familie (**Gruppe II**) besteht aus Chaperoninen im Zytosol von Eukaryonten sowie von Archaea (Trent *et al.* 1991; Gao *et al.* 1992; Lewis *et al.* 1992; Kubota *et al.* 1995). Das Chaperonin im Zytosol von Eukaryonten wird TRiC (TCP-1 Ring complex) oder CCT (Chaperonin Containing TCP-1) genannt und ist aus 8 Untereinheiten einer Muiltgen-Familie

zusammengesetzt (Kubota *et al.* 1994; Kubota *et al.* 1995; Stoldt *et al.* 1996) die zu einem Doppelring aus insgesamt 16 Untereinheiten assemblieren. Analog zu den Gruppe I Chaperoninen, weisen auch die Untereinheiten der Gruppe II Chaperonine drei Domänen auf (Abbildung 3 E).

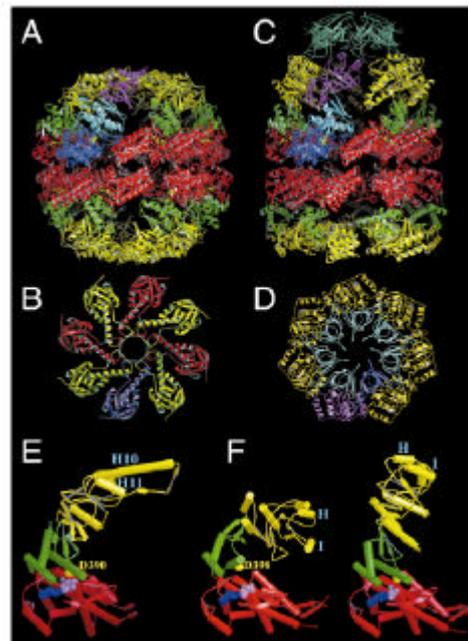


Abbildung 3. Allgemeine Struktur der Chaperonine

A Seitenansicht der hexadecameren Thermosom-Struktur. Rot: equatoriale Domäne, Grün: intermediale Domäne, gelb: apikale Domäne. B: Thermosom von oben mit α -(rot/violett) und β -(gelb) Untereinheiten C: Seitenansicht des asymmetrischen GroEL-GroES-(ADP)₇ Komplexes (Xu *et al.* 1997). D: GroEL-GroES-(ADP)₇ Komplex von oben. E: Thermosom Untereinheit mit drei verschiedenen Domänen. F: GroEL Untereinheit ohne (links) und mit (rechts) GroES-Bindung. Abbildung aus (Ditzel *et al.* 1998)

Das archaeele Chaperonin wird als Thermosom oder TF55/56 (engl.: *thermophilic factor*) (Waldmann *et al.* 1995; Kowalski *et al.* 1998) bezeichnet und ist je nach Organismus aus 1 bis 3 unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt, die zu einer Doppelringstruktur assemblieren (Abbildung 3 A). Je nach Anzahl der kodierten Untereinheiten werden Ringe bestehend aus 8 oder 9 Untereinheiten gebildet (Abbildung 3 B). Im Gegensatz zu Gruppe I Chaperoninen benötigen die zur Gruppe II gehörigen Chaperonine keinen GroES-ähnlichen Kofaktor. Stattdessen weist deren Struktur einen eingebauten "Deckel" in Form einer helikalen Ausstülpung (Abbildung 3 E, Helices:H10, H11) der apikalen Domäne auf (Klumpp *et al.* 1997). Dieser

schließt durch einen ATP-abhängigen Mechanismus den Ring wie im folgenden ausführlich erläutert wird.

1.4.3. Funktionsmechanismus der Gruppe I Chaperonine

Der Faltungsmechanismus von Gruppe I Chaperoninen konnte mittels Struktur- und Funktionsanalysen, die mit dem bakteriellen GroEL aus *E.coli* durchgeführt wurden, weitestgehend geklärt werden. Zusammen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Langer *et al.* 1992; Chen *et al.* 1994; Roseman *et al.* 1996) ermöglichten die Kristallstrukturen von GroEL (Braig *et al.* 1994), ATP-gebundenem GroEL (Boisvert *et al.* 1996) und GroEL-GroES-Komplex (Xu *et al.* 1997) viele Einsichten in die konformationelle Dynamik von GroEL während eines funktionellen Faltungsprozesses in Kooperation mit GroES.

Die GroEL Untereinheiten sind in drei Domänen gegliedert (Abbildung 3 F). Die apikale Domäne formt die Öffnung des Zylinders und exponiert eine Reihe von hydrophoben Aminosäureresten in Richtung der Kavität (Fenton *et al.* 1994). Diese sind für die Bindung an hydrophobe Seitenketten von ungefalteten Substratproteinen von Bedeutung (Hartl 1996; Bukau and Horwich 1998; Sigler *et al.* 1998). Eine detaillierte Analyse ergab, dass die hydrophoben Sequenzen des Substrates an eine flexible Furche binden, die innerhalb der apikalen Domäne zwischen zwei amphiphilen α -Helixes entsteht (Chatellier *et al.* 1999; Chen and Sigler 1999). GroEL erkennt allerdings nicht extendierte hydrophobe Peptidsequenzen wie Hsp70, sondern bindet solche hydrophoben Oberflächen, die von kompakten, globulären Faltungsintermediaten, den sogenannten „molten globules“, exponiert werden (Martin *et al.* 1991; Hayer-Hartl *et al.* 1994; Robinson *et al.* 1994). Die stabile Bindung eines Substrates mit nanomolaren Affinitäten wird durch die Bindung an mehrere apikale Domänen gewährleistet (Farr *et al.* 2000). Die apikale Domäne ist durch eine Scharnier-artige intermediäre Domäne mit der equatorialen Domäne verbunden. Diese beinhaltet die Nukleotidbindungsstelle. Die Funktion von GroEL ist abhängig von GroES. Dieser Chaperonin Kofaktor, der selbst keine Chaperon-Eigenschaft besitzt,

ist ein heptamerer Einzelring, der koaxial an die apikalen Domänen von GroEL bindet und somit vorübergehend das nicht-native Polypeptid in einen Faltungskäfig einschließt (Martin *et al.* 1993; Mayhew *et al.* 1996). Die GroES-Untereinheiten besitzen sogenannte mobile Schleifen (engl.: *mobile loops*), die mit den Substratbindestellen der apikalen Domänen von GroEL interagieren und dazu beitragen, das Substrat in die Kavität zu translozieren (Xu *et al.* 1997; Bukau and Horwich 1998; Richardson *et al.* 1998; Sigler *et al.* 1998). Eine Seitenansicht des GroEL-GroES Komplexes ist in Abbildung 3C wiedergegeben. Ein GroEL-GroES Protein Faltungszyklus ist in Abbildung 4 dargestellt.

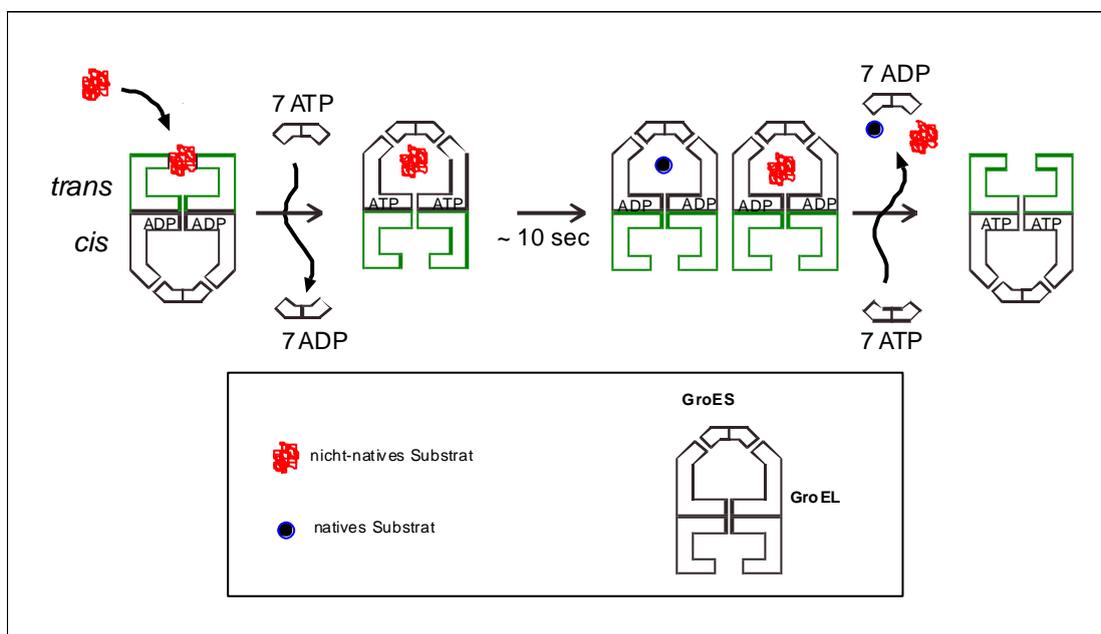


Abbildung 4. Reaktionszyklus von GroEL-GroES

Ungefaltete Substrate binden an den *trans* GroEL Ring. Bindung von ATP und GroES an den selben Ring führt zu einer konformationellen Änderung der Substrat-bindenden Kavität (= *cis*-Kavität). Das ungefaltete Substrat geht in der Kavität in einen nativen Zustand über, während simultan eine Hydrolyse des gebundenen ATP zu ADP stattfindet. Nun kommt es zu einer Bindung von ATP an den *trans*-Ring. ADP löst sich vom *cis*-Ring. Gleichzeitig wird die Dissoziation von GroES induziert. Das Substrat entweicht der *cis*-Kavität.

Die Interaktion zwischen GroEL und GroES ist dynamisch und wird durch die ATPase von GroEL reguliert (Hartl 1996; Bukau and Horwich 1998; Sigler *et al.* 1998). Auf Grund der negativen Allosterie zwischen den beiden Ringen bindet ATP bevorzugt nur an einen der beiden GroEL Ringe (siehe Abbildung 4). Nach der Bindung von Substrat sowie der Bindung von 7 ATP an den selben Ring interagiert ein GroES mit diesem Ring (dem sogenannten *cis*-Ring). Es wurden allerdings auch Komplexe mit GroES an beiden Seiten

beschrieben (Grallert and Buchner 2001). Die Bindung von GroES und ATP ist durch deutliche konformationelle Änderungen innerhalb des cis-Ringes gekennzeichnet, wobei das Volumen der cis-Kavität etwa um ein zweifaches zunimmt (Roseman *et al.* 1996; Xu *et al.* 1997). Der somit entstehende „geschlossene“ Raum, der sogenannte „Anfinsen-Käfig“ (engl.: *Anfinsen cage*, so benannt von Ellis, siehe Kapitel 1.1) kann Substrate bis zu einer Größe von etwa 60 kDa aufnehmen (Brinker *et al.* 2001; Ellis 2001). Die konformationelle Änderung führt dazu, dass die hydrophoben Seitenketten der apikalen Domäne nicht mehr mit dem Substratprotein in Kontakt stehen und sich ein hydrophiles Milieu ergibt (Roseman *et al.* 1996; Xu *et al.* 1997). Daraus resultiert ein Ablösen des an diese Seitenketten gebundenen Substrates, wodurch dieses in die hauptsächlich hydrophile Kavität wandert (Mayhew *et al.* 1996; Weissman *et al.* 1996). Es kommt nun zur Hydrolyse von ATP zu ADP. Der Vorgang von der ATP-Bindung bis zur ATP-Hydrolyse dauert 10 - 15 Sekunden bei 25 °C (Hayer-Hartl *et al.* 1995; Rye *et al.* 1997). Während dieser Zeit hat das Substrat die Möglichkeit innerhalb der cis-Kavität zu falten. Die Dissoziierung der 7 ADP und des Kofaktors GroES vom cis-Ring wird nach Bindung von 7 ATP an den trans-Ring ausgelöst. Die Ablösung von GroES öffnet die cis-Kavität und ermöglicht somit dem Substrat GroEL zu verlassen. Sollte das Substrat nach einem GroEL-vermittelten Faltungszyklus noch nicht vollständig gefaltet sein, also weiterhin hydrophobe Seitenketten exponieren, kommt es zu einer wiederholten Bindung an ein GroEL, bis die native Konformation erreicht ist. Während einige Substrate bereits nach einem Reaktions-Zyklus gefaltet sind, benötigen manche Proteine, deren Faltung stringent von GroEL abhängig ist, mehrere Zyklen bis eine korrekte Faltung erreicht ist. Bisher ist es nicht möglich, zuverlässig nachzuweisen, ob GroEL die Faltung von Substraten aktiv unterstützt, etwa durch eine teilweise Entfaltung von kinetisch gefangenen Faltungsintermediaten, um somit dem Substrat die korrekte Faltung zu ermöglichen. Es ist auch vorstellbar, dass bereits das Einschließen des Substrates in eine abgeschlossene Umgebung, die der Faltung förderlich ist, hierfür ausreichend ist. Dieser Punkt ist nach wie vor umstritten (Fenton and Horwich 1997; Brinker 2001). In jedem Fall liefert GroEL keine spezifischen sterischen Informationen für das zu faltende Substrat. In Abwesenheit von zellulären Stressbedingungen nehmen 10 - 15%

aller cytosolischen *E.coli* Proteine das GroEL-ES System in Anspruch (Ewalt *et al.* 1997). Die natürlichen GroEL-Substrate erfüllen ein breites Spektrum zellulärer Funktionen von grundlegenden Stoffwechsellleistungen bis zur Transkriptionsregulation (Houry *et al.* 1999). Strukturell fallen sie durch einen statistisch erhöhten Gehalt an $\alpha\beta$ -Faltungseinheiten auf (Houry *et al.* 1999).

1.4.4. Funktionsmechanismus der Gruppe II Chaperonine

Obwohl auch die Anzahl der Studien, die sich mit dem Faltungsmechanismus der Gruppe II Chaperonine beschäftigt, stetig zunimmt, ist der exakte Faltungsmechanismus, der durch diese Chaperonine vermittelt wird, noch ungeklärt. Allerdings war es möglich mit Hilfe von Neutronenstreuungs-Experimenten (Gutsche *et al.* 2000a; Gutsche *et al.* 2000b) den Einfluss von ATP auf das Thermosom von *Thermoplasma acidophilum* zu beobachten. Auf diese Weise konnte jeder einzelne Schritt des ATP-Zyklus nachvollzogen werden. Die ATP-Bindung und Hydrolyse sowie die Dissoziation von ADP induziert konformationelle Änderung des Chaperonins. Auf Grundlage dieser Ergebnisse war es möglich, ein Model für den ATP-Zyklus des Gruppe II Chaperonins Thermosom der Archaea vorzuschlagen (Abbildung 5).

Analog zu den Gruppe I Chaperoninen führt auch hier Bindung von ATP zu einer Einkapselung des Substrates (Llorca *et al.* 2000; Llorca *et al.* 2001). Dies geschieht allerdings nicht mit Hilfe eines Kofaktors wie im Falles des GroEL/ES Chaperoninsystems, sondern beruht auf einer Besonderheit der Gruppe II Chaperonine.

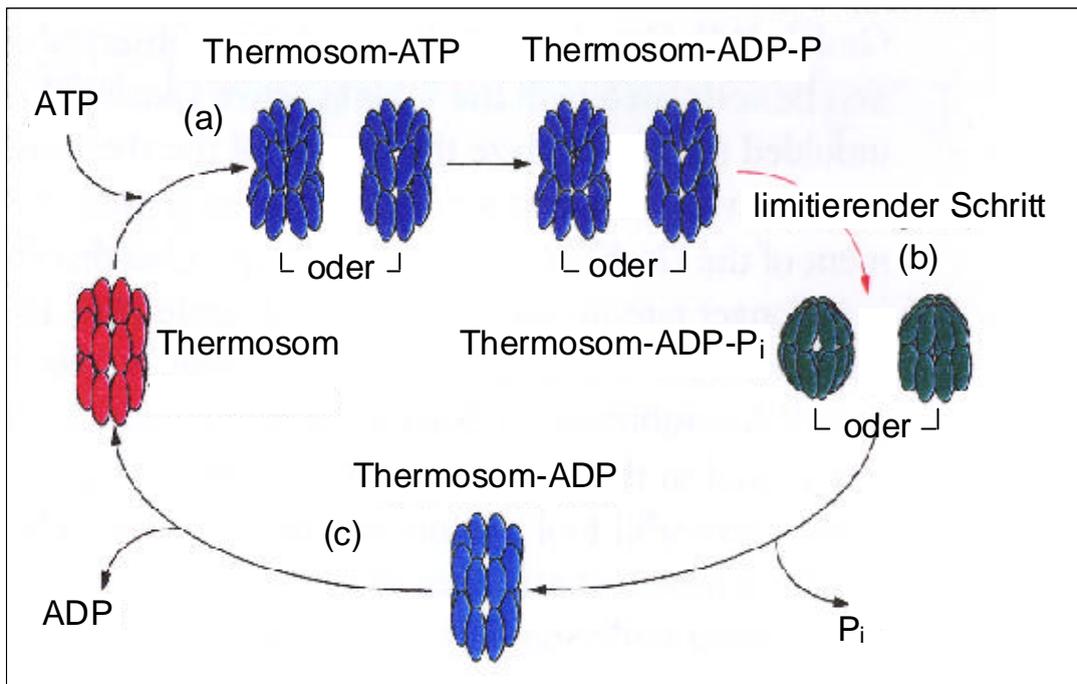


Abbildung 5. ATP-Zyklus des Thermosom

Das offene sogenannte apo-Chaperonin dehnt sich nach ATP-Bindung leicht aus (a). Während der Hydrolyse kommt es zu einem Übergang von der gedehnten Konformation zu einer „Entspannung“, wobei das Chaperonin dabei eine bauchige Form bekommt. Nach vollständiger Hydrolyse, im ADP-gebundenen Status kommt es wieder zu einer Dehnung (b) und schließlich zur Dissoziation von ADP (c). Abbildung nach (Gutsche *et al.* 2000a).

Die Einkapselung wird durch eine konformationelle Änderung der helikalen Ausstülpung an den apikalen Domänen (Abbildung 6) gesteuert. Dadurch wird die Faltung initiiert (Klumpp *et al.* 1997; Ditzel *et al.* 1998; Gutsche *et al.* 2001; Llorca *et al.* 2001). Die Struktur des eingebauten „Deckels“ ermöglicht es den Gruppe II Chaperoninen, im Gegensatz zu den Gruppe I Chaperoninen, auch kotranslational zu wirken. So können zum Beispiel einzelne Domänen eines Proteins gefaltet werden, das zu groß ist, um als Ganzes in der Kavität eingeschlossen zu werden (Frydman *et al.* 1994).

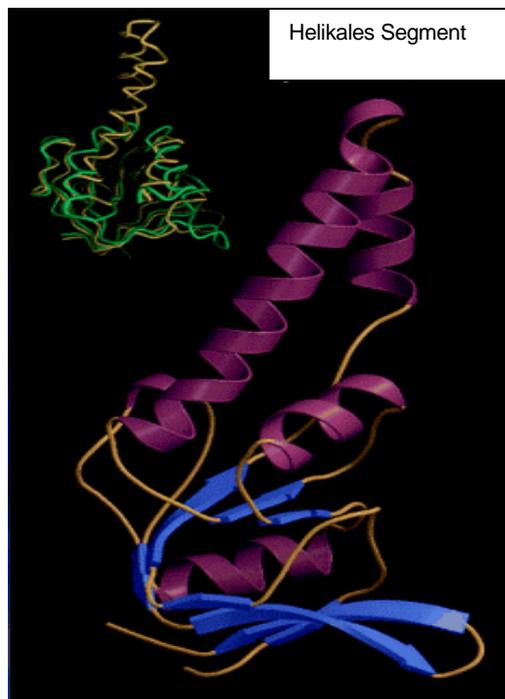


Abbildung 6. Helikales Segment der apikalen Domäne

Schemazeichnung der Thermosom- α Untereinheit (Klumpp *et al.* 1997). Links oben ist eine Übereinanderlagerung mit einer GroEL-Untereinheit (grün) gezeigt, die das Ausmaß der Ausstülpung verdeutlicht.

Die Heterogenität der Untereinheiten bei TRiC ließ vermuten, dass dieses Chaperonin darauf angelegt ist, nur wenige spezifische Substrate wie Aktin und Tubulin zu erkennen und zu falten. Dennoch konnte kürzlich in Säugetierzellen nachgewiesen werden, dass TRiC mit einem wesentlich breiterem Spektrum von neu synthetisierten Proteinen interagiert (Thulasiraman *et al.* 1999). Die Ergebnisse zeigten, dass immerhin ca. 12 % der insgesamt synthetisierten Proteinen mit TRiC interagieren, wobei die Molekulargewichte dieser Proteine im Bereich von 30 - 120 kDa liegen (Thulasiraman *et al.* 1999). Als Modells substrate für TRiC werden neben Aktin und Tubulin unter anderem auch Luziferase, α -Transducin und das "von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein" experimentell untersucht (Sternlicht *et al.* 1993; Kubota *et al.* 1995; Hynes *et al.* 1996; Lewis *et al.* 1996; Thulasiraman *et al.* 1999, Frydman 2001). Eine Faltung dieser Proteine durch Gruppe I Chaperonine ist nicht möglich (Tian *et al.* 1995). Für das archaeele Thermosom sind noch keine spezifischen Substrate bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass hier das Substratspektrum ähnlich breit ist wie bei den Gruppe I Chaperoninen.

1.5. Der Gim-Komplex: Aufgabe und Funktion

Erst kürzlich ist es gelungen, eine neue Chaperon Familie in Eukaryonten zu beschreiben: GimC bzw. Prefoldin (Geissler *et al.* 1998; Vainberg *et al.* 1998; Hansen *et al.* 1999; Siegers *et al.* 1999). Bei Untersuchungen eines Stammes von *S.cerevisiae*, der eine Mutation in γ -Tubulin aufwies, wurden einige Gene identifiziert, deren Deletion für die Zellen letal war (Geissler *et al.* 1998). Unter anderem konnten Gene isoliert werden, die für eine Familie von *coiled-coil*-Proteinen kodieren. Auf Grund ihrer nachgewiesenen Beteiligung an der Synthese von Mikrotubuli wurden die Gene fortan *GIM* genannt (**G**enes **i**n**v**olved in **m**icrotubule biogenesis). Erste Analysen dieser Gim-Proteine zeigten, dass diese zu hetero-oligomeren Komplexen (GimC, engl.: *complex*) assemblieren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl GimC aus *S.cerevisiae* (Geissler *et al.* 1998) als auch Prefoldin aus *B.bovis* (Vainberg *et al.* 1998) sechs evolutionär konservierte Untereinheiten aufweisen. Die exakte Zusammensetzung der Untereinheiten wurde nicht definiert. Erste funktionelle Studien zeigten, dass dieses Chaperon sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eng mit dem Gruppe II Chaperonin TRiC kooperiert (Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). Damit übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *GIM*-Genen in *S.cerevisiae* zu einem Zytoskelett-defektivem Phänotyp führte, der weitestgehend den bereits für TRiC-Mutanten gezeigten Effekt entsprach (Stoldt *et al.* 1996; Geissler *et al.* 1998; Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). Siegers und Kollegen konnten schließlich zeigen, dass ein Stamm von *S.cerevisiae*, bei dem eines oder mehrere *GIM*-Gene deletiert wurden, eine 5-fach niedrigere TRiC-vermittelte Aktin-Faltung im Vergleich zum Wildtyp aufwies (Siegers *et al.* 1999). Die niedrigere Aktinfaltungsrate ging einher mit einer verlangsamten Ablösung des Aktins von TRiC und einer erhöhten Aggregation von falsch gefaltetem Aktin. Die funktionelle Kooperation zwischen GimC und TRiC ließ vermuten, dass es sich um ein ähnlich obligates Zusammenspiel wie zwischen GroEL und GroES handelt, wenn auch die Interaktion eher transient ist. Im übrigen hat GroES keine Chaperon-Eigenschaft, wogegen GimC ungefaltetes Aktin und Tubulin binden kann (Siegers *et al.* 1999). Demnach übt GimC wohl eine aktivere Rolle bei

der Chaperonin-vermittelten Proteinfaltung aus als GroES, obwohl dies eventuell auf bestimmte Substrate beschränkt ist. Für Aktin konnte gezeigt werden, dass GimC für dessen Bindung an TRiC nicht essentiell ist (Sieggers *et al.* 1999). Dennoch wurde vorgeschlagen, dass GimC eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von ungefalteten Substraten an TRiC ausübt (Vainberg *et al.* 1998) Hansen *et al.* 1999).

1.6. Entwicklung der drei Lebensdomänen, Archaea, Eukarya, Bakteria

Strukturvergleiche auf molekularer Ebene zeigen, dass sich die Lebewesen in drei Gruppen einteilen lassen. Hierbei unterscheidet man die Domäne der Eukaryonten von den beiden prokaryontischen Domänen Archaea und Bakteria (Woese *et al.* 1990).

Die Prokaryonten stellen die Gruppe mit der größten organismischen und stoffwechselphysiologischen Vielfalt unter den Lebewesen dar. Sie sind maßgeblich an den wichtigsten Stoffkreisläufen, wie dem Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Kreislauf beteiligt. Innerhalb der Biosphäre sind sie zugleich die am wenigsten verstandene Gruppe (DeLong 1998).

Archaea sind im Allgemeinen weniger als 1 Mikrometer groß und haben keine inneren Membranen. Die DNA liegt in zirkulärer Form im Zytoplasma vor (Doolittle 1992). Es lässt sich somit sagen, dass Archaea hinsichtlich der Morphologie Ähnlichkeiten zu Bakterien aufweisen. Viele grundlegende Prozesse wie Transkription oder Translation zeigen dagegen Parallelen zu eukaryontischen Abläufen (Deppenmeier *et al.* 2002; Jain *et al.* 2002).

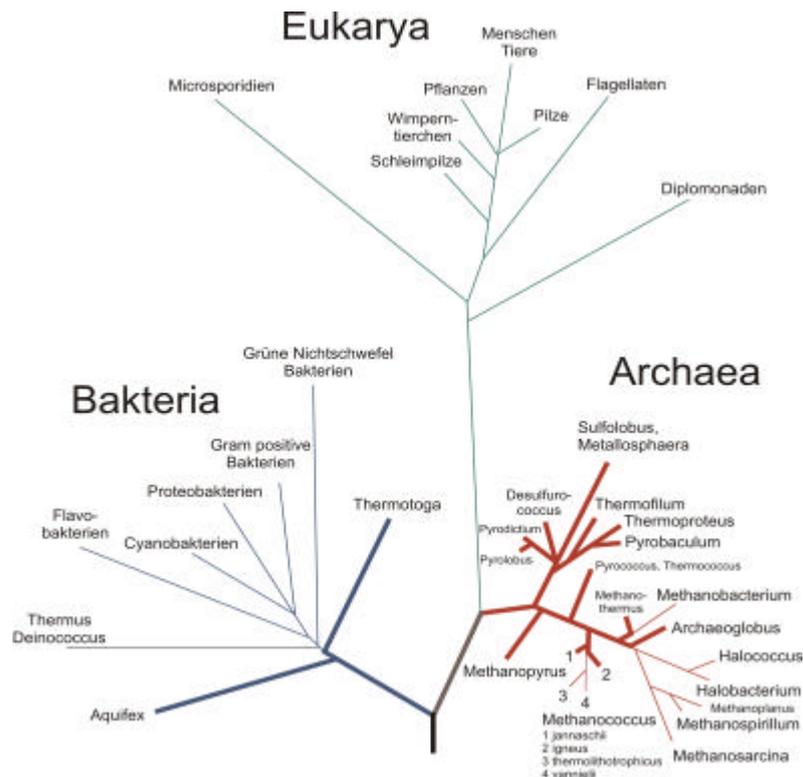


Abbildung 7. Phylogenetische Entwicklung der drei Lebensdomänen Bakteria, Eukarya und Archaea (blau: Bakteria, grün: Eukarya, rot: Archaea; dickgedruckt: thermophile Organismen).

Bezeichnend für viele Archaea ist das Vorkommen in extremen, scheinbar lebensfeindlichen Biotopen (Rothschild and Mancinelli 2001; Thomas and Dieckmann 2002). Hyperthermophile Archaea besiedeln natürliche oder künstlich geschaffene Hochtemperaturgebiete. Andere Archaea leben in Gebieten extremer pH-Werte oder extremer Salzgehalte. Im Laufe der Evolution haben sich somit Organismen entwickelt, die aufgrund eines relativ niedrigen Selektionsdruckes zum Teil sehr primitive Mechanismen aufweisen können (Woese *et al.* 1990). Zugleich war jedoch durch den Rückzug in bestimmte ökologische Nischen eine extreme Spezialisierung notwendig, um sich den außergewöhnlichen Lebensumständen anzupassen (Rothschild and Mancinelli 2001). Diese Eigenschaften machen deutlich, dass Untersuchungen der molekularen und biochemischen Mechanismen innerhalb der Archaea nicht nur für wissenschaftliche Erkenntnisse ein hohes Potential darstellen, sondern sicherlich auch für industrielle, biotechnologische Anwendungen (Deppenmeier 2001).

1.6.1. Molekulare Chaperone in Archaea

Die Erkenntnisse, die heutzutage über Eigenschaften und das Zusammenspiel von molekularen Chaperonen im Bereich der Proteinfaltung vorliegen, beruhen zu einem großen Teil auf Untersuchungen in Organismen aus dem Bereich der Eukarya und Bakteria. Das Spektrum der Chaperone innerhalb der Domäne der Archaea ist dagegen wesentlich weniger untersucht (siehe auch Tabelle 1). Dies liegt daran, dass die Forschung an Archaea insgesamt ein vergleichsweise junges Gebiet ist. Erst in den letzten Jahren ist es auf Grund der zunehmenden Anzahl von Genom-Sequenzierungen von Vertretern der Archaea möglich, deren Chaperongehalt zumindest auf genetischer Ebene zu untersuchen (Macario *et al.* 1999; Deppenmeier 2001; Leroux 2001; Galagan *et al.* 2002). Man erwartet sich davon neue Erkenntnisse, zum Beispiel auch bezüglich der Evolution von Chaperonen.

1.7. Das Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophikum*

1.7.1. Eigenschaften und Lebensraum

Der Organismus *Methanobacterium thermoautotrophikum* ist ein recht gut untersuchtes Archaeon, das unter anaeroben Umweltbedingungen allgegenwärtig ist (www.biosci.ohio-state.edu). Es ist ein moderat thermophiler Organismus dessen Temperaturoptimum bei 65 - 70 Grad liegt. Er ist absolut autotroph und braucht lediglich CO₂, H₂ und Salze zum Leben. Die Zellen sind stäbchenförmig mit einem Durchmesser von 0.2 – 1.0 µm und 1.2 - 120 µm Länge (Smith *et al.* 1997). Der optimale pH-Wert liegt bei 6.0 - 8.5. *M.thermoautotrophikum* kann Schwefel, Sulfit, Thiosulfat oder Ammoniumsulfide als Schwefelquelle nutzen. Glutamin und Harnstoff können als Stickstoffquellen dienen.

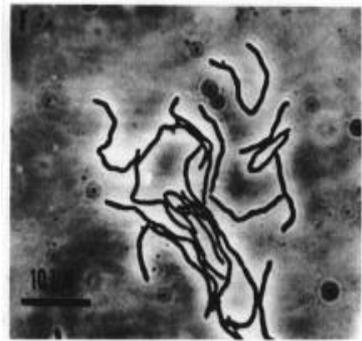


Abbildung 8. *M.thermoautotrophikum* aus www.biosci.ohio-state.edu

1.7.2. Wissenschaftlicher Nutzen

M.thermoautotrophikum gilt als der am besten untersuchte methanproduzierende Organismus und war einer der ersten Archaea, dessen Genom sequenziert wurde (Smith *et al.* 1997). Vor allem die hohe Temperaturtoleranz der Enzyme dieses Organismus und deren eventuelle Verwendung für industrielle Zwecke waren ein Anreiz, diesen Organismus besser zu verstehen. Man kann annehmen, dass diese Enzyme industrielle chemische und biochemische Prozesse besser überstehen als die herkömmlich genutzten Proteine aus mesophilen Organismen.

Das Genom von *M.thermoautotrophikum* besteht aus 1.751.377 Basenpaaren (Smith *et al.* 1997). Der G+C Gehalt ist 48 %. Zusätzlich ist ein zirkuläres Plasmid von 4.4 kb Größe enthalten. Der thermophile Charakter dieses Organismus macht ihn zu einem interessanten Studienobjekt, auch was die Regulierung der Stressantwort angeht. Die zur Verfügung stehende komplette Genomsequenz erlaubt eine Untersuchung der an der Proteinfaltung beteiligten Chaperone. Hier ist besonders hervorzuheben, dass dieser Organismus ein Gim-Komplex enthält, der mit dem beschriebenen eukaryontischen Gim-Komplex sehr Homolog ist. In der vorliegenden Arbeit

werden strukturelle sowie funktionelle Studien mit diesem archaeelle Gim-Komplex (*MtGimC*) dargestellt.

1.8. Das Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1

1.8.1. Eigenschaften und Lebensraum

Wie *M.thermoautotrophikum* ist auch das Archaeon *M.mazei* ein methanogener Organismus. *M.mazei* bildet irreguläre Kokken von ca. 1-3 μm Durchmesser und liegt, je nach Umweltbedingungen, als Einzeller, Mehrzeller oder in Form von Lamina vor (Macario 1995; Lange *et al.* 1997).

M.mazei lässt sich bei einem pH-Wert von 7.0 - 7.2 und einer Salzkonzentration von 0.5 M optimal kultivieren, wobei er je nach eingesetzter Kohlenstoffquelle eine Generationszeit von 9 h (CO_2), 17 h (Aceton) bzw. 7 - 15 h (Methanol oder Methylamine) hat (Baumer *et al.* 2000).

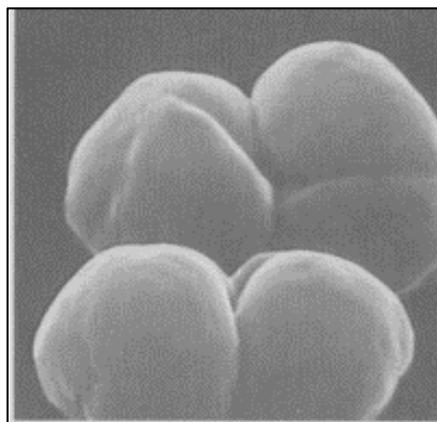


Abbildung 9. *Methanosarcina mazei* aus www.ucmp.berkeley.edu

1.8.2. Wissenschaftlicher Nutzen

Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei ca. 37 °C. Diese Eigenschaft macht dieses Archaeon besonders interessant für funktionelle Analysen, da die verhältnismäßig niedrige Temperatur leicht bei *in vitro* Experimenten nachzustellen ist und somit das *in vitro* Verhalten von untersuchten Enzymen nahe an physiologischen Bedingungen liegt. Wie bereits oben geschildert

verändert sich *M.mazei* den Wachstumsbedingungen entsprechend morphologisch (Boone and Mah 1987; Mayerhofer *et al.* 1992). Dieses Archaeon stellt demnach einen einzigartigen Modelorganismus dar, um die Entwicklung von komplexen multizellulären Strukturen in Reaktion auf Umweltveränderungen zu erforschen. Morphologischen Veränderungen spielten im Laufe der Evolution eine große Rolle und wurden sicherlich oft durch Stressfaktoren in der Umwelt hervorgerufen.

Diese deutliche Reaktion auf Umweltfaktoren macht es besonders interessant, diesen Organismus im Hinblick auf die zelleigene Stressantwort und eventuell beteiligte Chaperone zu untersuchen. Conway de Macario und Kollegen ist es gelungen, die Komponenten der archaeellen Hsp70 Familie aus *M.mazei* zu klonieren und zu sequenzieren (Clarens *et al.* 1995; de Macario *et al.* 1995). Die Ergebnisse der vollständigen Genomsequenzierung von *M.mazei* wurden kürzlich von Deppenmeier und Kollegen veröffentlicht (Deppenmeier 2001). *M.mazei* besitzt ein zirkuläres Chromosom das 4.096.345 Basenpaare enthält. Die Anzahl von tRNAs (58 ORFs) übersteigt bei weitem die von anderen Methanogenen. 2.450 ORFs von insgesamt 3.371 ORFs konnte eine Funktion zugeordnet werden. Nur 75.15 % der Sequenzen sind kodierend und damit deutlich weniger als bei anderen Genomen (Deppenmeier 2001). Der interessanteste Befund war jedoch die Tatsache, dass 1192 Gene, also ein Drittel aller Gene, bakteriellen Ursprungs sind. Diese weisen überwiegend Homologien zu mesophilen Bakterien auf. Interessanterweise liegen teilweise Homologe bakteriellen und archaeellen Ursprungs von ein und dem selben Protein vor (Deppenmeier *et al.* 2002). Auch aufgrund dieser Eigenschaft könnte sich *M.mazei* zu einem Modellorganismus innerhalb der Archaea entwickeln, da er ganz neue Möglichkeiten bietet, solche homologen Proteine innerhalb des selben Organismus zu vergleichen. Dazu wird besonders der Befund beitragen, der in dieser Arbeit beschrieben wird: Im Genom dieses Organismus konnte ein Gruppe I Chaperonin identifiziert werden. Die hier vorliegenden strukturellen und biochemischen Daten beschreiben ein funktionelles Gruppe I Chaperonin-System (*MmGroEL* / *MmGroES*) mit breitem Substratspektrum.

1.9. Zielsetzung

Die Organismen *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanosarcina mazei* gehören zu den ersten Vertretern der Archaea dessen Genome sequenziert wurden. Dies ermöglicht erstmalig eine detaillierte Bestimmung und Charakterisierung von Chaperonen in Archaea.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit einer detaillierten biochemischen sowie funktionellen Analyse von Gim-Proteinen in dem Archaeon *M.thermoautotrophikum*. Die Familie der Gim-Proteine ist bisher erst sehr unzureichend analysiert worden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Beteiligung dieser Chaperon-Familie während der Chaperonin-vermittelten Proteinfaltung zu klären, sowie ein mögliches Strukturmodell dieses Chaperons zu entwickeln.

Inhalt des zweiten Teiles der hier vorliegenden Arbeit ist eine ausführliche biochemische und funktionelle Untersuchung des archaeellen Gruppe I Chaperonins aus dem mesophilen Archaeon *M.mazei*. Da es sich hier um den ersten Nachweis eines Gruppe I Chaperonins in Archaea handelt, war es von besonderem Interesse dieses Chaperonin in einer vergleichenden Analyse mit dem bakteriellen GroE-System aus *E.coli* zu studieren.

2. Material und Methoden

2.1. Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Enzyme)

Amersham/Pharmacia (Freiburg, BRD):

ECL (Blot-Entwicklungskit), Pro-Mix ³⁵S-Methionin/Cystein,
Proteinmarker für Gelfiltration,

Abgen (Hamburg, BRD):

PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml

BIAcore (Freiburg, BRD):

Biosensor Chips B1, CM5, SA, Maintenance Kit

BioMol (Hamburg, BRD):

IPTG, HEPES

Bio-Rad (Herkules, USA):

Ethidiumbromid, Affigel 15 Säulen

BMA (Rockland, USA):

LE Agarose

Difco (Detroit, USA):

Baktotrypton, Baktoyeast Extrakt, Bactoagar

Eppendorf (Hamburg, BRD):

Reaktionsgefäße

Fluca (Deisenhofen, BRD):

TB/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, Natriumhydroxid

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 Pufer, T7-DNA-Polymerase

Novagen (Bad Soden, BRD):

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

Perkin Elmer (Weiterstadt, BRD):

ABI Prism Big Dye Cycle Sequencing Kit

Pierce (Rockford, USA):

Sulfa-NHS-LC-LC-Biotin, SULFO-GMBS, EDC, Bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS³)

Promega (Mannheim, BRD):

Pfu-DNA-Polymerase

Quiagen (Hilden, BRD):

Ni-NTA-Agarose, 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):

Polyachrylamid/Bisacrylamid 40%, SDS

Schleicher & Schuell (Dassel, BRD):

Nitrozellulosemembran BA85

Serva (Heidelberg, BRD):

Aceton

Sigma (Deisenhofen, BRD):

Kanamycin, Proteinstandardmarker, Lysozym, Didesoxynukleosidtriphosphat-Kit, Ethanol, Glukose, Magnesiumacetat, PMSF

Stratagene (La Jolla, USA):

E.coli XL1-Blue Superkompetente Zellen

Uelzena (Uelzen, BRD):

Magermilchpulver

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, Gelfiltrationssäulen HiLoad 26/60 Superdex 200, HighPrep 26/60 S300, Superdex200 PC 3.2/10, Superose 6 PC 3.2/10, S-100 HR (High Resolution),

Säulenmaterialien: 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, CH):

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

Fuji (Tokio, J):

FLA 2000 Phosphoimager, Evaluationssoftware

Life Science (Freiburg, BRD):

Geltrockner SGD2000, Lyophilisator

Kodak (Stuttgart, BRD):

Filmentwickler X-Omat

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

Agarosegel-Elektrophoresekammern

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 Cycler480 Thermocycler

Savant (Holbrook, USA):

Geltrockner SGD300

2.3. Bakterienstämme, Plasmide, Proteine

Bakterienstämme:

DH5aF' (Novagen)

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

BL21 DE3 (Novagen)

BL21 DE3 (pLys) (Novagen)

Archaea :

***-Methanobacterium thermoautotrophikum* D H**

Zellpellets und genomische DNA (Dr.R Thauer, J.Pennings (Leroux *et al.* 1999))

***-Methanosarcina mazei* Gö1**

Lysat und genomische DNA (Dr. Andre Johann, Dr. U. Deppenmeier, Göttingen Genomics Laboratory)

Plasmide:

pRSET6a (Novagen)

für die Konstrukte von *MtGim α* und *MtGim β*

pET22b (Novagen)

für die Konstrukte von *MmGroEL* und *MmGroES*

Primer:

MtGim α

5'-CACTACATATGGAAGACCAGCAGAGGCTCGAGGAGATAGTG-3'

5'-CACTAGGATCCTTACTCTCCACTTCCCCTTACCTTTTTGAGGAG-3'

MtGim β

5'-CACTACATATGGAAGTCCACAAATGTACAGCACCAG-3'

5'-CACTACATATGGAAGTCCACACATCCCAGGATGATACCCGC-3'

MmGroEL

5'-TAACATATGGCTTCAAAGCAGATAATGTTTG-3'

5'-TACGGATCCTTAGATAATGATTGCGCGTGTCTTTC-3'

MmGroES

5'-TAACATATGATTGTCAAACCTATTGGC-3'

5'-TTACGAATTCTTATTCTTCACAACTGTTGCCAGC-3'

Proteine:

Folgende Proteine stammten aus dem Proteinstock der Abteilung Zelluläre Biochemie des MPI für Biochemie, Martinsried (BRD):

GroEL aus *E.coli*

GroES aus *E.coli*

TRiC aus Rinderhoden

Thermosom (Dr.Irina Gutsche, MPI für Biochemie, Martinsried (BRD))

Gekaufte Proteine:

Rhodanese (hoch aufgereinigt, Sigma)

Lysozym (Sigma)

Malate Dehydrogenase (Sigma)

Kulturmedien:

Luria-Bertani (LB) Medium pro Liter: 10g Baktotrypton, 5g Baktoyeast Extrakt, 5g NaCl auf 1000ml mit H₂O auffüllen und pH auf 7.0 einstellen

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

Puffer:

2X 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, 1mM EDTA, pH 8.0

PBS: 137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.4 mM Na₂HPO₄ x H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄ mit HCl_{aq} einstellen auf pH 7.4

TB1: 100mM 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 3M KOH, Sterilfiltration, Lagerung bei -20°C

2.4. Molekularbiologische Methoden

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

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen wurden ca. 55 ml LB Medium mit einer Einzelkolonie von Zellen angeimpft und diese Kultur bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0.25-0.5 herangezogen. Die Zellen wurden pelletiert (10min, 2.500xg, 4°C), in eisgekühltem TB1-Puffer resuspendiert, weitere 5 min auf Eis gehalten und erneut 10 min bei 2.500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in 2 ml eisgekühltem TB2 Puffer aufgenommen, auf Eis aliquotiert, in N₂ (flüssig) schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden ~ 50 µl kompetente *E.coli* Zellen mit ~ 0.2 - 0.4 µg DNA aus Ligationsreaktionen oder ~ 0.05 - 0.2 µg DNA aus gereinigten Plasmidpräparationen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 sec bei einer Temperatur von 42°C inkubiert und anschließend weitere 3 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 1 ml LB Medium erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf Antibiotika-haltige LB Agarplatten ausgestrichen und bis zur Entstehung von gut sichtbaren einzelnen Bakterien-Kolonien für ~ 10-16 h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

2.4.2. DNA-analytische Methoden

DNA-Konzentrationen wurden durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestimmt, wobei für eine ~ 50 µg/ml haltige Lösung doppelsträngiger DNA eine $OD_{260} = 1$ angenommen wurde.

Agarose Gelelektrophorese wurde in TAE Puffer bei 50 – 100 V durchgeführt (Ausubel *et al.* 1992). Die Gele enthielten 1-2% Agarose und 0.5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Größe linearer DNA Fragmente wurde durch Vergleich mit DNA Standardmarkern bestimmt.

2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.* 1988) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden (*Primer*)

Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer, 15 pmol *Primern*, je 0.25 mM dATP, dCTP, dGTP sowie dTTP, 50 ng Matrizen-DNA (genomischer DNA) und 2.5 U Pfu-DNA Polymerase oder Vent-Polymerase durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierungsphase bei 96°C wurde folgender Zyklus 20-30 mal wiederholt:

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

Anschließend wurde die Reaktion nochmals 10 min bei 72°C inkubiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

2.4.4. Oligonukleotide (*Primer*)

Die Synthese der *Primer* wurde von der Firma Metabion, Martinsried durchgeführt.

2.4.5. Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden als zyklische Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Hierzu wurde das *Cycle Sequencing Kit* von Perkin Elmer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung und Fluoreszenzdetektion der entstandenen DNA-Fragmente wurde von der Firma Medigenomix, Martinsried durchgeführt. Die vergleichende Sequenzanalyse erfolgte durch BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1. Gelelektrophorese

Proteine wurden durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt (Laemmli 1970). Je nach

Größe des interessierenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 8%, 10%, 12% oder 16% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Das Verhältnis des Quervernetzers Bisacrylamid zu Polyacrylamid betrug in 8%, 10%- und 12%-Gelen 1:19, in 16%-Gelen 1:29. Die Elektrophorese wurde mit 150-250V in einer Elektrophorese-Kammer durchgeführt.

Native PAGE wurde mit folgendem Puffer durchgeführt:

80 mM MOPS-KOH, pH 7.0. Die Gele enthalten 4.5% Polyacrylamid.

2.5.2. Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde mittels der berechneten molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt (ProtParam Tool). Zusätzlich wurde der Proteingehalt der Proben nach der Bradford-Methode ermittelt (Bradford 1976). 5 µl der Probe wurden 30 min bei 37°C mit 745 µl Bradfordreagenz (0.01% Coomassie Brilliant Blue G –250, 5 % Ethanol, 8.5 % Phosphorsäure) inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gegen eine Leerprobe ermittelt. Parallel wurden BSA-Standards mit einer Konzentration von 0.25; 0.5; 1; 2.5; und 5 mg/ml gemessen und eine Eichkurve erstellt.

Die Konzentration von Protein im Lysat wurden mittels BioRad-Assay ermittelt, wobei IgG als Standard verwendet wurde. Die Reinheit von Proteinpräparationen wurde durch SDS-PAGE analysiert. 5 – 10 µl der Proben wurden mit 5 µl 2x Gelladepuffer versetzt, für 1-3 min auf 95°C erhitzt und auf SDS-Page aufgetragen. Zur Identifizierung der Proteinbanden wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 0.25% Coomassie Blau in H₂O) inkubiert und daraufhin mit Entfärbelösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure in H₂O) gewaschen

2.5.3. Herstellung polyklonaler Antikörper

0.5 mg *MmGroEL* und 0.5 mg *MmGroES* wurden in Kaninchen injiziert als 1:1 Emulsion mit Titer-Max Classic Adjuvant (Sigma). Die Intervalle betragen 4

Wochen, die Reaktivität der Seren wurden durch Cross-Reaktion mit *M.mazei* Gö1 Lysat getestet, wobei gereinigte Proteine als Standard verwendet wurden. Jeweils 0.5 mg *MtGim α* und *MtGim β* wurden in Kaninchen injiziert. Bei der ersten Injektion wurde *Freund's complete adjuvant* verwendet. Bei den folgenden Injektionen wurde *incomplete adjuvant* (beide Sigma) verwendet. Die Injektionen fanden im Abstand von 2 - 3 Wochen statt. Das Serum wurde jeweils auf Bindungsreaktion gegen Lysat von *M.thermoautotrophikum* getestet, wobei die gereinigten Proteine als Standard verwendet wurden. Die Antikörper wurden mittels Affi-Gel 15 Säulen (Bio-Rad), die mit den entsprechenden Proteinen gekoppelt waren, Affinitäts-gereinigt. Dabei wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers (BioRad) verfahren.

2.5.4. Westernblot Analysen

Proteine wurden zum Zwecke der Immunodetektion mit Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0.01% SDS, 20% Methanol) auf Nitrozellulose-Membranen der Porengröße 0.45 μ m transferiert (Towbin *et al.* 1979).

Die Immunodetektion wurde mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Membranen wurden 1 h in TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20) mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde im gleichen Puffer mit einer 1000-fachen Verdünnung (oder je nach Angabe) des polyklonalen Antikörpers inkubiert. Die Membranen wurden drei mal 10 min in TBS-T gewaschen und 40 min mit dem sekundären, HRP-gebundene (engl.: *horse-radishperoxidase*) Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma) in 1000-facher Verdünnung in frischer TBS-T-Lösung inkubiert. Die Membranen wurden drei mal gewaschen und 1 min mit ECL inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

2.5.5. Gelfiltrationsanalysen

50 oder 100 μ l Aliquots der Reaktionslösung wurden auf eine Superdex 200 PC3.2/30 Säule bei Raumtemperatur aufgetragen. Die Flussrate betrug 40 μ l/min, bzw. im Ergebnisteil genannte Raten. Die Größe der Fraktionen ist 50 oder 100 μ l, wie im Ergebnisteil beschrieben. Die Säule wurde mit folgenden Standard-Proteinmarkern kalibriert: Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA (67 kDa), Karbon-Anhydrase (29 kDa) und α -Lactalbumin (14 kDa) (alle Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Rohzelleextrakt wurde durch Resuspension von *M.thermoautotrophikum* oder *M.mazei* Zellen in folgendem Puffer hergestellt: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 x complete Protease Inhibitor (Roche). Zellbestandteile wurden bei 4000 x g abzentrifugiert. 300 μ g Proteinlysate (Rohextrakt) wurden als Kontrolle auf die Säule aufgetragen.

2.5.6. Assemblierung der aufgereinigten Gim-Untereinheiten

Die aufgereinigten Gim-Untereinheiten wurden entweder getrennt in Konzentrationen zwischen 10 und 100 μ M oder zusammen in verschiedenen Verhältnissen rückgefaltet indem sie in folgendem Puffer bei 4°C dialysiert wurden: 20 mM Tris, pH 8.0

Es wurden jeweils Proben von 50 μ l entnommen und mittels Gelfiltration analysiert, wobei der oben genannte Dialyse-Puffer zur Equilibrierung und für den Lauf verwendet wurde. Eine Aufbereitung größerer Mengen des Gim-Komplexes wurde erreicht, indem *MtGim β* (100 μ M) in einem 2:1 molaren Verhältnis zu *MtGim α* ? gegeben wurde. Eine anschließende Dialyse in oben genanntem Puffer ermöglichte eine Assemblierung bis ein Gleichgewicht von *MtGim*-Komplexen entstand. *MtGimC* wurde anschließend mit einem Centiprep 30 (Amicon) konzentriert und über eine S-200HR 26/60 Säule (in 20 mM Tris, pH 8.0) gereinigt. Die *MtGimC* enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE ermittelt und bei -80°C in Puffer in 20 mM Tris, pH 8.0 mit 30% Glycerol gelagert.

Vor Gebrauch wurde der Komplex in entsprechendem Puffer dialysiert.

2.5.7. Analyse der Chaperonine im Cytosol von *M.mazei*

M.mazei Gö1 Zellen wurden bei 37°C beziehungsweise 42° (Hitzeschockexperimente) in einem Medium kultiviert das 100 mM Methanol enthält (Deppenmeier *et al.* 1989). Bei einer Dichte von OD₆₆₀ 0.2 – 0.5, die der frühen exponentiellen Phase entspricht, wurden die Zellen geerntet und bei 4°C mit 4900 x g 10 min lang abzentrifugiert. Die Zellen wurden 1 h lang in folgendem Puffer durch leichtes Schwenken bei 4° lysiert:

25 mM MOPS-NaOH pH 7.5, 1 mM EDTA, 1x Complete Protease Inhibitor (Roche) und 10 µg/ml DNase I

Die Zellsuspension wurde anschließend bei 20800 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand (Rohextrakt, engl.: *crude extract*) wurde anschließend mittels 16% SDS-PAGE aufgetrennt und gegen entsprechende Antikörper immuno-geblottet. Die Identität der Proteine wurde durch N-terminales Sequenzieren sowie Massenspektrometrie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Friedrich Lottspeich am Max-Planck-Institut für Biochemie nachgewiesen.

Um die relative Abundanz der Chaperonin-Komplexe zu bestimmen, wurde das Rohextrakt auf einer Größenaufschluss-Säule aufgetrennt (Superdex S-200 PC3.2/30, Pharmacia) die mit folgenden Markern kalibriert wurde: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Bovin Serum Albumin (67 kDa). Die Fraktionen wurden sodann mit 16% SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, welche hochmolekulare Proteine enthielten, wurden gesammelt und anschließend auf einer 4.5% nativen-PAGE analysiert. Die Banden, die den Chaperoninen entsprachen, wurden durch Gelaufschluss und Trypsin-Verdau behandelt und durch MALDI-Massenspektrometrie (Decker 2000) identifiziert.

2.5.8. Autoradiogramme

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden 30 min fixiert (40% Methanol, 7% Essigsäure) und 30 min mit Amplify inkubiert. Auf einem Whatman-Papier

wurden sie dann in einem Geltdrockner für 2 h bei 50°C unter Vakuum getrocknet. Die markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms oder mittels Phosphoimaging visualisiert.

2.5.9. Phosphoimaging

Eine computergestützte Visualisierung und Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine wurde mittels Phosphoimaging durchgeführt. Auf getrocknete Gele wurde für 2 bis 48 h ein Phosphoimaging-Schirm aufgelegt. Die Signale wurden von einem Phosphoimager (Fuji-FLA2000) ausgelesen und mit dem Programm AIDA (raytest) am Computer ausgewertet.

2.6. Klonierung und Expression von *MtGim α* und *MtGim β*

Die Nukleotidsequenzen für *MtGim α* und *MtGim β* sind im Internet unter den Zugangsnummern (accession numbers) gi2622734 (*MtGim α*) und gi2621763 (*MtGim β*) zugänglich (DDBJ/EMBL/GenBank). Auf Grundlage dieser Sequenzen wurden entsprechende Primer entworfen (siehe 2.3), die *Nde*I und *Bam*HI Schnittstellen besitzen. Die PCR zur Amplifizierung der *MtGim α* und *MtGim β* Gene wurde unter Verwendung von genomischer DNA von *M.thermoautotrophikum* Δ H durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET6a subkloniert, der mittels *Nde*I geschnitten wurde. BL21 (DE3) (Schoepfer et al 1990) Zellen wurden mit den beiden Konstrukten transformiert und bei 30°C (*MtGim α*) oder 37°C (*MtGim β*) in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von ~ 0.7 wurden die Kulturen mit isopropyl- β -D-galactose (IPTG) in einer Endkonzentration von 1mM induziert und nach 3 - 5 h mit 4000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in folgendem Lysierungspuffer resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert:

50 mM Tris pH 8.0, 10 mM NaCl, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 1 x Complete Protease Inhibitor, 0.1 mg/ml of 46.400 U /mg Lysozym

Die Zellsuspension wurde auf Eis durch Ultraschall (Sonifikator, Misonix) auf Position 4 mit (50% Leistung) pulsierend behandelt. Anschließend wurde mit 0.1 µl/ml Benzonase (250 U/µl; Merck) bei 4°C für 20 min inkubiert.

2.7. Aufreinigung von *MtGim α* und *MtGim β*

Sämtliche Reinigungsschritte wurden mittels einer FPLC-Anlage (Pharmacia) bei 4°C durchgeführt. *MtGim α* war in löslicher Form exprimiert. Die Zellsuspension wurde auf eine DE52 (Whatman)-Säule aufgetragen, die in folgendem Puffer equilibriert war:

8 M Urea, 30 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT

Um das Protein zu binden und anschließend auszuwaschen wurde ein NaCl-Gradient von 0 - 1 M gefahren. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und die Elution von *MtGim α* durch 16% SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf eine Q-Sepharose aufgetragen, die in 3 M Urea 30 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT equilibriert war. Auch hier wurde ein Gradient von 0 - 1 M NaCl gefahren. Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE ermittelt, gesammelt und auf Phenyl-Sepharose aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte analog den vorangegangenen Schritten. Nach Auftrag der gesammelten Fraktionen auf eine Heparinsäule konnte das Protein im Durchfluss abgetrennt werden und wurde für eine letzte Reinigung über eine S-100 HR (Pharmacia) Säule aufgetrennt. Die Proteine wurden aufkonzentriert und bei -80°C gelagert.

MtGim β lag nach Expression in Einschlusskörpern (engl.: *inclusion bodies*) vor. Sämtliche Reinigungsschritte wurden in folgendem Puffer unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt:

8 M Urea, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0

Nach Resuspendierung in diesem Puffer wurde *MtGim β* über eine Q-Sepharose wie oben beschrieben aufgereinigt. Anschließend folgte eine

Gelfiltration mit einer S-100 HR (Pharmacia) Säule. Die Reinheit der Proteine wurde mit 16% SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung ermittelt. Durch N-terminale Sequenzierung, Aminosäuren-Analyse sowie Massenspektrometrie konnte die Identität der Proteine nachgewiesen werden.

2.8. Klonierung und Expression der Chaperonine aus *M.mazei*

Zur Amplifizierung der kodierenden Regionen von *MmGroEL* und *MmGroES* wurden Primer auf Grundlage der Genomsequenz von *M.mazei* (Deppenmeier et al 2002) erstellt. Die PCR Produkte wurden in den pET22b Vektor (Novagen) inseriert, wobei *NdeI* und *BamHI* Schnittstellen verwendet wurden. BL21 (DE3) Zellen (Studier et al) wurden mit den entsprechenden Konstrukten transformiert und bei 37°C in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Bei einer Dichte von OD₆₀₀ ~ 0.7 wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von 1mM isopropylthio-β-D-galactose (IPTG) für 3 – 4 Stunden induziert. Zellen wurden in folgendem Puffer lysiert:

50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 x Complete™ protease inhibitor (Roche), 0.1 mg/ml Lysozym (46.400 U/mg, Sigma)

Die Zellsuspension wurde durch Sonifikation (Misonix sonifier) auf Position 4 bei 50% Leistung im Puls-Modus aufgeschlossen. Um nun freigewordene DNA zu verdauen wurde 0.1 µl/ml Benzonase (250 U/ml, Merck) zugegeben und bei 4°C während 20 min inkubiert. Durch zwei Zentrifugationschritte von 20 min bei 4°C mit 50000 x g und 1 h bei 4° und 100000 x g wurden Zellbestandteile und Membrane pelletiert und das Protein im Überstand in mehreren chromatographischen Schritten gereinigt.

2.9. Reinigung von *MmGroEL* und *MmGroES*

Der Überstand aus 2.8 wurde auf eine DE52-Säule (Whatman) aufgetragen, die in folgendem Puffer equilibriert war:

30 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT

Um das Protein zu binden und anschließend auszuwaschen, wurde ein NaCl-Gradient von 0 - 1 M gefahren. Die Fraktionen wurden mit 16% SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf eine Source30Q-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die in folgendem Puffer equilibriert war:

25 mM Histidin-HCl pH 5.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

Mittels eines Gradienten von 10 - 500 mM wurden die Proteine über diese Säule gereinigt. Die hier gesammelten Fraktionen wurden auf eine Heparin-HiTrap-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die in folgendem Puffer equilibriert war:

30 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM DTT

Es wurde ein Gradient von 0 -1 M NaCl gefahren. Als letzter Reinigungsschritt wurden die gesammelten Fraktionen über eine Gelfiltrationssäule (S-300 HR 26/60, Pharmacia) aufgetrennt, die in 20 mM MOPS-NaOH pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol equilibriert war.

Die Fraktionen der letzten Säule, die gereinigtes Protein enthielten, wurden gesammelt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

2.10. Funktionelle Analysen

2.10.1. Cross-linking Analyse

Jeweils 20 μ M *MtGim α* und *MtGim β* wurden in folgendem Puffer dialysiert:

50 mM NaPO₄ pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT.

Durch einstündige Inkubation mit 1 mM BS³ (Bis-sulfosuccinimidyl-suberate, Pierce) bei Raumtemperatur wurden die beiden Proteine gekoppelt. Die Reaktionen wurden anschließend mittels 16% SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert.

2.10.2. Ermittlung der Chaperon-Eigenschaft von *MtGimC*

Hierfür wurden folgende Proteine getestet:

- Rhodanese (Bovine Rhodanese, highly purified, Sigma)
- Lysozym (Hühner-Eiweiß, Sigma)

Alle Proteine wurden in denaturierendem Puffer (6 M Guanidium Hydrochlorid, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur 30 min inkubiert, im Falle des Proteins Lysozym enthielt der Puffer zusätzlich 50 mM DTT. Die ungefalteten Proteine wurden anschließend 100-fach in folgenden Puffer verdünnt:

20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂

Dieser Versuch diente als Kontrolle, um einen Wert für maximale Aggregation zu erhalten. Für die Messung der Chaperon-Eigenschaft von *MtGimC* wurden die denaturierten Proteine in oben genannten Puffer verdünnt, der bereits unterschiedliche Konzentrationen von *MtGimC* enthielt. Als Kontrolle der Chaperon-Eigenschaft der einzelnen Gim-Untereinheiten wurden diese separat in den Puffer gegeben, ebenso IgG für die negative Kontrolle der Chaperon-Eigenschaft.

Die Aggregatbildung wurde anschließend bei 25°C während 10 min analysiert. Dabei wurde die Lichtstreuung bei 320 nm in einem Spektrophotometer-DU640 Beckmann) gemessen.

2.10.3. Analyse der *MtGimC*-Rhodanese Komplexe sowie der Protease-Resistenz

200 µM Guanidium-Hydrochlorid-denaturierte Rhodanese wurde 100-fach in folgenden Puffer verdünnt:

20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂

Der Puffer enthielt 2 µM *MtGimC*. Es wurde 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei 14000 rpm zentrifugiert, um

eventuell gebildete Aggregate zu pelletieren. Parallel wurde als Kontrolle 200 μM denaturierte Rhodanese 100-fach in Puffer verdünnt. Ebenfalls als Kontrolle wurde native Rhodanese in Puffer auf eine Konzentration von 2 μM verdünnt. Sämtliche Reaktionsansätze (800 μl) wurden mittels eines Centricon (Amicon) auf 50 μl konzentriert, um ein Volumen zu erhalten, das eine chromatographische Analyse mittels SMART (Pharmacia) zu ermöglichen. Die Konzentrate wurden auf eine Superdex 200 PC3.2/30 Säule aufgetragen, die in folgendem Puffer equilibriert wurde:

20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2

Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen auf Protease-Resistenz getestet. Dazu wurden die Fraktionen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (Roche) auf Eis 10 min inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma) gestoppt. Die Reaktionen wurden durch 16% SDS-PAGE und Westernblot mit anti-Rhodanese Antikörper (1:1000) analysiert.

2.10.4. Rückfaltungsversuche von Aktin und Rhodanese

Denaturierte, ^{35}S -markiertes Aktin (D-*Aktin) wurde entsprechend etablierter Methoden hergestellt (Sieggers *et al.* 1999).

D-*Aktin (ca. 13 μM) wurde 100-fach in Puffer verdünnt, der entweder gereinigtes IgG, *MtGimC* oder TRiC (Bovine testis, (Frydman *et al.* 1992)) enthält. Die Endkonzentrationen betragen 6 μM IgG, 2 μM *MtGimC*, 0.3 μM TRiC. Die Reaktionsansätze wurden bei 30°C für 15 min inkubiert. Entsprechend der Beschreibung im Ergebnisteil wurde bei bestimmten Ansätzen IgG, *MtGimC* oder TRiC erst später zugefügt. Die Faltungsreaktionen wurden dann durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet und für 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden Aggregate durch Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert und die Reaktionen mittels 4.5% nativer PAGE analysiert (4.5% Polyacrylamid, 80 mM MOPS-KOH pH 7.0, 1 mM Mg-ATP). Als Kontrolle wurde 2 μg DNaseI mit rückgefaltetem Aktin 5

min inkubiert bevor diese Reaktion unter den oben genannten Bedingungen analysiert wurde.

2.10.5. Substrat-Transfer von *MtGimC* auf ein Chaperonin

Komplexe aus *MtGimC* und Aktin wurden wie oben beschrieben hergestellt. Zu dem Puffer, der die Komplexe enthielt wurde anschließend das Chaperonin GroEL aus *E.coli* oder Thermosom von *T.acidophilum* (je 3 μM Endkonzentration) zugegeben und für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden dann mittels nativer PAGE wie oben beschrieben analysiert.

2.10.6. Chaperonin-vermittelte Rückfaltung von *MtGimC* gebundener Rhodanese

Chemisch denaturierte Rhodanese (100 μM) wurde 100-fach in Rückfaltungspuffer verdünnt (20 mM MOPS-KOH pH 7.4, 100 mM KCl, 2 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$, 5 mM DTT). Der Puffer enthielt entweder 2 μM *MtGimC* oder 0.5 μM GroEL, wie im jeweiligen Experiment spezifiziert. Nach 15 min Inkubation bei 25°C, wurde GroEL in einer Endkonzentration von 0.5 μM zu bestimmten Reaktionsansätzen gegeben, wie im Ergebnisteil erläutert. Daraufhin wurde die entsprechenden Ansätze für weitere 10 min inkubiert. Aggregate wurden abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min, Raumtemperatur) und ein Teil der Ansätze entweder mittels nativer PAGE (siehe oben) oder mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert. Zu dem verbleibenden Teil der Ansätze wurde GroES in einer Endkonzentration von 1 μM zugegeben und die Rückfaltungsreaktion schließlich durch Zugabe von ATP in einer Endkonzentration von 5 mM gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und auf Rhodanese Aktivität getestet (Horowitz 1995). Die Ergebnisse sind im Verhältnis zu einem Kontrollexperiment mit nativer Rhodanese angegeben.

2.10.7. Messung der ATPase-Aktivität

GroEL wurde in einer Endkonzentration von 1 μM in Puffer (20 mM MOPS, pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) gegeben, der wahlweise 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthielt, wie in den Experimenten erläutert. Der Startzeitpunkt ("0") wurde nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C genommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ATP in einer Endkonzentration von 2 mM gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mit CDTA (Endkonzentration 2 mM) gestoppt. Die Hydrolyse-Rate wurde durch Zugabe von 3 Volumen des Farbstoffes Malachit-Grün ermittelt. Nach einer Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 Volumen 37% Zitronensäure gestoppt (Lanzetta 1978). Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 640 nm spektrometrisch ermittelt.

2.10.8. Rückfaltung von Rhodanese

Chemisch-denaturierte Rhodanese wurde in Puffer (20 mM MOPS pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) auf eine Konzentration von 500 nM verdünnt, der je nach Angabe 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie 500 nM *EcGroEL* enthielt. Der Ansatz wurde 3 min bei 37°C inkubiert, um eine Bindung des Substrates an GroEL zu ermöglichen. GroES wurde in einer Endkonzentration von 1 μM zugegeben und die Reaktion mit 2 mM ATP gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf Rhodanese-Aktivität getestet, indem die Absorption bei 460 nm spektrometrisch ermittelt wird (Horowitz 1995). Die Ergebnisse sind als Prozentsatz eines Kontroll-Experimentes mit nativer Rhodanese angegeben.

2.10.9. Rückfaltung von Malatdehydrogenase (MDH)

Dieser Versuch entspricht weitestgehend dem Rückfaltungsexperiment für Rhodanese. Allerdings wurde hier eine Endkonzentration von 1 μM GroEL

sowie 2 μM GroES und 1 μM MDH verwendet. Auch hier wurde je nach Angabe Puffer verwendet, der 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthielt. Zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und sofort (direkte Messung) oder nach einer Stunde spektrometrisch vermessen. In diesem Fall wurde 2 mM CDTA zugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Dies ermöglicht die GroEL-GroES Dissoziation und die Freilassung des Substrates in die Lösung. Die enzymatische Aktivität von MDH wurde ermittelt, indem ein Reaktionsmix (220 μM β -NADH, 550 μM Oxalacetat) zugegeben wurde (Hayer-Hartl 1999). Die Messung erfolgte spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 320 nm während 50 sec bei 25 °C. Die Abnahme der Absorption wurde als Funktion der Oxidation von β -NADH berechnet. Bei einzelnen Experimenten wurde entweder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (500 mM Endkonzentration) oder 1 μM *Ec*GroEL und 2 μM *Ec*GroES zu einem späteren Zeitpunkt zu einer *Mm*GroE-vermittelten MDH-Rückfaltungsreaktion gegeben.

2.10.10. Gelfiltrationsexperimente

Wie im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben, wurden sowohl Rhodanese- als auch MDH-Rückfaltungsexperimente durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Zu den in den Abbildungen genannten Zeitpunkten wurden Aliquots von 50 μl aus den Reaktionsansätzen entnommen. Um eine Dissoziation der Chaperonin-Substrat-Komplexe zu unterbinden, wurde Glukose in einer Endkonzentration von 25 mM sowie Hexokinase in einer Endkonzentration von 0.3 U/ μl zugegeben. Dadurch wird ATP zu ADP hydrolysiert und somit gewährleistet, dass das Substrat in der GroEL-Kavität festgehalten wird. Die Proben wurden anschließend auf eine Superose 6 3.2/30 Säule (Pharmacia) aufgetragen, die in 20 mM MOPS pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 equilibriert war. Die Proteinelution wurde mittels UV bei 280 nm ermittelt. Die Fraktionen (100 μl) wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Durch Coomassie-Färbung oder Western Blot konnten die Chaperonine beziehungsweise das Substrat in den einzelnen

Fraktionen nachgewiesen werden. Die Substrataktivität im Falle von Rhodanese wurde ermittelt, in dem 50 µl pro Fraktion nach der oben beschriebenen Methode einem Aktivitätsassay unterzogen wurden.

2.10.11. Protease Resistenz

Denaturierte MDH in einer Endkonzentration von 0.5 µM wurde mit einer equimolaren Konzentration von GroEL in Puffer bei 37 °C inkubiert. Der Puffer enthielt fallweise 500 mM (NH₄)₂SO₄, sowie 20 mM MOPS pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. Nach Inkubation wurde der Reaktionsansatz 10 min mit 10.000 x g zentrifugiert. GroES (1 µM) wurde zu dem Überstand gegeben und der Ansatz für weitere 5 min bei 25 °C inkubiert. Der Verdau wurde schließlich durch Zugabe von Proteinase K (*Tritirachium album*, Roche) in einer Endkonzentration von 0.5 µg/ml bei 25°C gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der Verdau durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) gestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und der MDH-Verdau durch Western Blot mit einem spezifischen MDH Antikörper nachgewiesen.

2.11. Bioinformatische Methoden

2.11.1. Multialignment und BLAST-Suche

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 (National Centre of Biological Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Dadurch ist es möglich auch Verwandtschaften zu Spezies zu finden, die lediglich Ähnlichkeiten in einzelnen isolierten Regionen der gesuchten Sequenz aufweisen.

Die Sequenzen wurden anschließend mittels MACAW (Schuler *et al.*, 1991) hierarchisch angeglichen.

Das Alignment der GroE-Proteine wurde mit der *multialin interface page* mit dem Programm „Blosom62-12-2“ (Henikof and Henikoff, 1992) durchgeführt. Multialin erstellt einen multiplen Sequenzvergleich von einer Gruppe verwandter Sequenzen, indem es progressiv paarweise Alignments durchführt (Corper, 1988).

2.11.2. Strukturvorhersagen

Mittels des JPred Servers (<http://circinus.ebi.ac.uk8081/submit.html>) wurden die Vorhersagen der Sekundärstruktur ermittelt. Die Information zur Coiled-coil Bildung innerhalb der Gim-Proteine konnte mit dem COILS Server bestimmt werden (https://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html); (Lupas *et al.* 1991).

2.11.3. Phylogenetische Analysen

Die im Ergebnisteil dargestellten phylogenetischen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andrei Lupas zusammengestellt. Die Daten beruhen

auf einer Distanz-Analyse, die mittels PROTDIST und NEIGHBOR – Modulen des Phylip 3.572 Programmes durchgeführt wurde (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Zusätzliche Informationen konnten mit der *maximum likelihood*-Methode durch Nutzen des *Puzzle3.1* gewonnen werden (<http://www.zi.biologie.uni-muenchen.de/~strimmer/puzzle.html>). Alle Messungen wurden sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung von sogenannten Lücken (*gapped positions*) durchgeführt.

Für Abbildung 26 (Phylogenetische Analyse der GroEL-Proteine) wurden Gruppe I Chaperonine folgender Organismen verwendet:

Domäne	Gruppe			Species		
Archaea	Methanosarcinales			<i>Methanosarcina mazei</i>	<i>Mma</i>	
	Gram +	niedriger GC-Gehalt		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bst</i>	
				<i>Thermophilic bacterium PS3</i>	<i>Ps3</i>	
				<i>Lactobacillus zeae</i>	<i>Lze</i>	
				<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Cth</i>	
				<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	<i>Tbr</i>	
				<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bsu</i>	
				<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lla</i>	
				<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Cac</i>	
				<i>Clostridium difficile</i>	<i>Cdi</i>	
				<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Ljo</i>	
		hoher GC-Gehalt		<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Mbo</i>	
				<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Mle</i>	
				<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Sco</i>	
				<i>Streptomyces albus</i>	<i>Sal</i>	
		Cyanobacteria		<i>Synechococcus vulcanus</i>	<i>Svu</i>	
				<i>Synechocystis sp.</i>	<i>Ssp</i>	
		Deinococci		Thermotogales	<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Tma</i>
				Aquificales	<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>Aae</i>
Green BS bacteria	partiell			<i>Cloroflexus aurantiacus</i>	<i>Cau</i>	
	<i>Thermus thermophilus</i>			<i>Tth</i>		
	<i>Thermus aquaticus</i>			<i>Taq</i>		

Bakteria	Gram-			<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Dra</i>	
		Spirochaetes		<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Lin</i>	
				<i>Treponema pallidum</i>	<i>Tpa</i>	
				<i>Burellia burgdorferi</i>	<i>Bbu</i>	
		Chlamydiales		<i>Chlamydiophila pneumoniae</i>	<i>Cpn</i>	
				<i>Chlamydiophila psittaci</i>	<i>Cps</i>	
				<i>Chlamydia muridarum</i>	<i>Cmu</i>	
				<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Ctr</i>	
		Proteobacteria	α		<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Sme</i>
					<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Rle</i>
					<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bja</i>
					<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Pde</i>
					<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Rsp</i>
					<i>Brucella abortus</i>	<i>Bab</i>
					<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Zmo</i>
					<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>Rca</i>
					<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Atu</i>
			β		<i>Bartonella quintana</i>	<i>Bqu</i>
					<i>Bartonella henselae</i>	<i>Bhe</i>
					<i>Bartonella bacilliformis</i>	<i>Bba</i>
					<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Ngo</i>
			γ		<i>Fransisella tularensis</i>	<i>Ftu</i>
					<i>Xylella fastidioas</i>	<i>Xfa</i>
					<i>Vibrio Cholerae</i>	<i>Vco</i>
					<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vpa</i>
					<i>Escherichia coli</i>	<i>Eco</i>
					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pae</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>			<i>Hin</i>		
δ			<i>Lawsonia intracellularis</i>	<i>Lint</i>		
ϵ			<i>Helicobacter pylorii</i>	<i>Hpy</i>		
			<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Cje</i>		
Bacteroides			<i>Rhodothermus marinus</i>	<i>Rma</i>		
			<i>Bacteriodes forsythes</i>	<i>Bfo</i>		
			<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Pgi</i>		
Chloro-plast			<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Stu</i>		
Mito-			<i>Zea mays</i>	<i>Zmam</i>		
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Athm</i>		

chondria					
				<i>Mus musculus</i>	<i>Mmu</i>
				<i>Homo sapiens</i>	<i>Hsa</i>
Eukarya	Pilze			<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Spo</i>
				<i>Candida albicans</i>	<i>Cal</i>
	Pflanzen			<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Athcr</i>

2.12. Biophysikalische Methoden

2.12.1. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *MmGroEL* wurden in Zusammenarbeit mit Günther Pfeiffer, Max-Planck-Institut für Biochemie, durchgeführt. *MmGroEL* wurde auf 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aufkonzentriert und mit 2% (Gewicht/Volumen) Uranyl Acetat markiert. Die Bilder wurden mit einem CM 20 FEG Philips Elektronen Mikroskop aufgenommen. Dieses war mit einer 2k x 2k CCD-Kamera mit einer nominalen 47,000-fachen Vergrößerung ausgestattet. Um Standard-Korrelation-Methoden anwenden zu können, wurden 785 einzelne *MmGroEL* Moleküle ausgewählt. Der Durchschnitt dieser Korrelation ergab eine 7-fache Symmetrie. Um strukturelle Variationen innerhalb der Bilder zu erkennen, wurden die angeglichenen Moleküle einer Klassifizierungsprozedur unterzogen, die auf einer Eigenvektor-Eigenwert Analyse beruht.

2.12.2. Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Sämtliche Oberflächenplasmonresonanzexperimente (engl.: *Surface Plasmon Resonance*, SPR) wurden in Zusammenarbeit mit Michael Kerner (MPI für Biochemie) mit einem BIAcore2000 Gerät durchgeführt. Es wurden NTA-

Chips verwendet (Nieba-Axmann *et al.* 1997). Die Experimente wurden bei 37°C und einer Flussrate von 20 µl/min durchgeführt.

Verwendete Puffer:

A: 20 mM MOPS, 100 mM KCl, 2 mM ATP, pH 7.4

B: 20 mM MOPS, 100 mM KCl, 500 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM ATP, pH 7.4

Getestete Proteine:

-*EcGroES* mit C-terminalem 6-fachen His-Tag

-*MmGroES* mit C-terminalem 6-fachen His-Tag

-*EcGroEL*

-*MmGroEL*

Nach jeder Messung wurde 3 min mit 350 mM EDTA, pH 8.3 gewaschen, anschließend 1 min mit 0.5 mM NiCl₂.

30 nM GroES-His6 wurden 1-2 min bis zu einer "Bindungsstärke" von 25 RU (engl.: *response units*) immobilisiert, wobei *MmGroES* und *EcGroES* auf verschiedene Flusszellen aufgetragen wurden.

GroEL (von *E.coli* oder *M.mazei*) wurde in Puffer A oder Puffer B (wie im Ergebnisteil erläutert) über die Flusszellen geleitet, wobei die Assoziation 8 min betrug, die Dissoziation 15 min.

3. Ergebnisse

3.1. **MtGimC, ein neuartiges Chaperon in Archaea**

3.1.1. **Gim-Untereinheiten sämtlicher Spezies weisen eine verwandte Struktur auf und lassen sich zwei Klassen zuordnen**

Wie bereits in der Einleitung geschildert, wurde kürzlich ein molekulares Chaperon, der sogenannte Gim Komplex (**G**enes **i**nvolved in **m**icrotubule biogenesis), in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Aufgrund der Erkenntnisse bisheriger Studien wird dem Gim Komplex eine bedeutende Rolle im Bereich der Proteinfaltung zugeschrieben. So deuten die Experimente von Siegers und Kollegen (Siegers *et al.* 1999) daraufhin, dass dieser Komplex eng mit dem Chaperonin der Gruppe II kooperiert.

GimC wurde bisher nur in Eukarya (Geissler *et al.* 1998; Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999; Siegers and Schiebel 2000) ausführlich untersucht. Es handelt sich dabei um hoch molekulare Komplexe, die aus sechs verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind, Gim1 – Gim6 in *Saccharomyces cerevisiae* (Siegers *et al.* 1999) sowie PFD1 – PFD6 in *Bos bovis* (Vainberg *et al.* 1998). Dies führte zu der Vermutung, dass dieses Chaperon innerhalb der Eukaryonten stark konserviert ist. Eine detaillierte Datenbank-Suche nach weiteren GimC innerhalb der bisher sequenzierten Spezies brachte eine interessante Erkenntnis. Der Gim Komplex liegt in allen drei Lebensdomänen vor: Archaea, Eukarya und Bakteria (Abbildung 10).

Hier ist anzumerken, dass sämtliche untersuchten eukaryontischen Spezies jeweils 6 Gim Untereinheiten enthalten, wohingegen in allen bisher sequenzierten Archaea lediglich zwei Untereinheiten nachgewiesen werden konnten (Abbildung 10 und 11). Es gibt eine Ausnahme: *Aeropyrum pernix*. Dieses Archaeon codiert für nur eine Untereinheit. In der Domäne der Bakterien ist *Aquifex aeolicus* der einzige Vertreter, der ein Gim-Protein aufweist. Auch dessen Genom codiert nur für eine Gim-Untereinheit.

Eine detaillierte vergleichende Homologie-Studie der Gim-Proteine wurde mit den Gim-Sequenzen folgender Spezies durchgeführt:

- Eukarya: *Homo sapiens* (Hs)
 Cenorhaptis elegans (Ce)
 Saccharomyces cerevisiae (Sc)
- Archaea: *Methanobakterium thermoautotrophikum* (Mt)
 Methanococcus jannaschii (Mj)
 Aeropyrum pernix (Ap)
 Archaeoglobus fulgidus (Af)
 Pyrococcus horikoshii (Ph)
- Bakteria: *Aquifex aeolicus* (Aa)

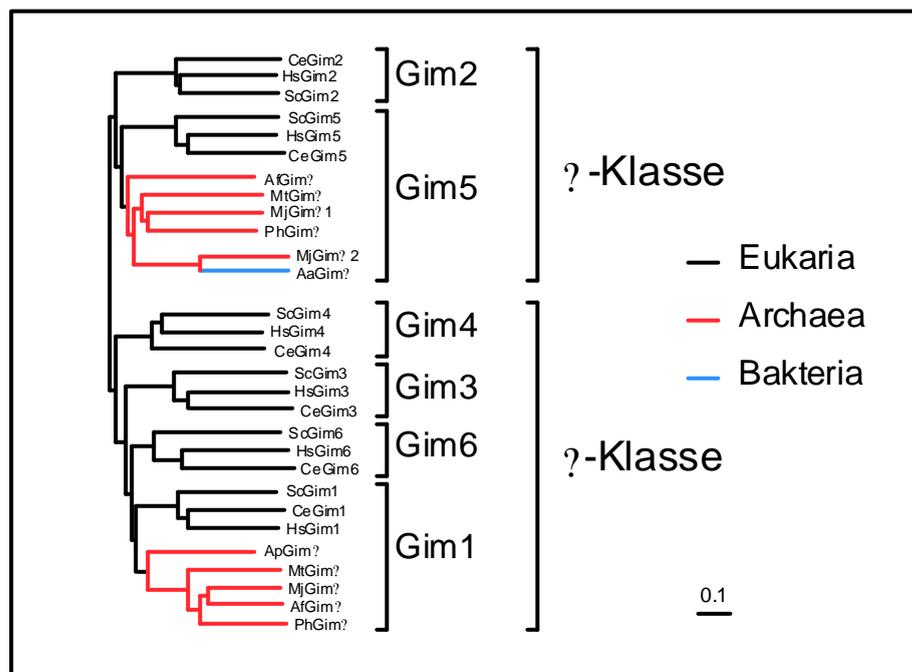


Abbildung 10. Distanz-basierte phylogenetische Studie der Gim-Proteine .
 Phylogenetische Verwandtschaften wurden auf Basis der maximalen Wahrscheinlichkeit (likelihood) erstellt. Die Scala markiert eine Distanz von PAM10 (0.1). Auf Grundlage dieser vergleichenden Studie ist es möglich, sämtliche Gim-Proteine zwei Klassen zuzuordnen: α -Klasse und β -Klasse.

Der phylogenetische Vergleich der Gim-Proteine macht deutlich, dass sämtliche Gim-Untereinheiten zwei konservierten Klassen, α und β , zugeordnet werden können. Anhand dieses Stammbaums wird nochmals die bereits dargestellte Besonderheit der archaeellen GimC hervorgehoben:

Während eukaryontische Spezies 6 verschiedene Gim Untereinheiten besitzen (schwarze Markierung in Abbildung 10), können in den archaeellen Spezies lediglich maximal zwei Untereinheiten (rote Markierung) nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen einfacheren Aufbau des Gim Komplexes in Archaea hin und legt es nahe, hiermit detaillierte strukturelle Studien durchzuführen. Die phylogenetische Analyse beruht auf den Ergebnissen mit zwei verschiedenen Methoden, wobei die Sequenzen entweder direkt miteinander verglichen wurden oder an bestimmten Stellen Leerstellen (engl.: *gaps*) eingefügt wurden, um somit höhere Homologien zu erhalten (siehe Material und Methoden). Beide Methoden kommen zu dem gleichen Ergebnis. Daher lässt sich sagen, dass der so erstellte Stammbaum „robust“ ist.

In Abbildung 11 ist ein weiterer Sequenzvergleich dargestellt. Hier wird nochmals verdeutlicht, dass innerhalb der Gim-Klassen eine hohe Homologie besteht.

Algorithmische Strukturvorhersagen mittels MACAW (Corpet 1988) ergaben schließlich Aufschluss bezüglich der Sekundärstruktur der Gim Proteine, die ebenfalls innerhalb beider Klassen konserviert ist (Abbildung 11 A). Man kann hier zwischen drei ausgeprägte Domänen innerhalb der Gim-Proteine unterscheiden. Eine zentrale Region, die eine β -Faltblatt Struktur aufweist, sowie zwei flankierende Regionen, die reich an α -Helixen sind. Diese flankierenden Regionen bestehen aus jeweils etwa 45 Aminosäuren und bilden sehr wahrscheinlich sogenannte Coiled-coil Strukturen, also ineinander gewundene Helixen (Lupas *et al.* 1991).

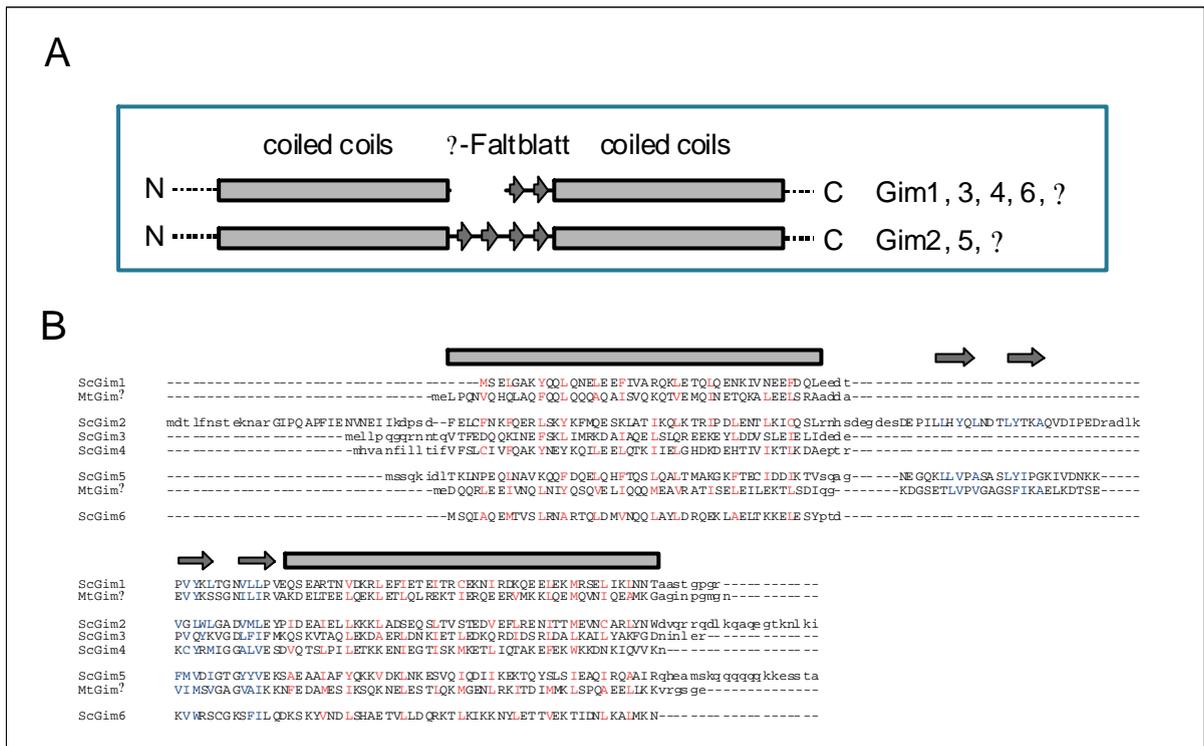


Abbildung 11. α - und β - Klassen der Gim-Proteine weisen in sich eine hohe Homologie auf.

(A) Schematische Darstellung der Gim-Klassen basierend auf dem Sequenzvergleich von 3.1 und den Strukturvorhersagen in (B). Gestrichelte Linie: variable Region; Rechtecke: coiled-coil Regionen; Pfeile: β -Faltblätter. Hervorzuheben ist, dass die Faltblattregion in den Gim-Proteinen der β -Klasse dupliziert ist. (B) Sequenzvergleich der 6 Gim-Untereinheiten von *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) mit den beiden Gim-Untereinheiten von *Methanobacterium thermoautotrophikum*. Hydrophobe Aminosäuren, die innerhalb der Coiled-coil Regionen sind rot, innerhalb der β -Faltblätter blau. Die vorhergesagte Sekundärstruktur ist oberhalb der Sequenzblöcke angegeben: Rechtecke: Coiled-coil Regionen; Pfeile: β -Faltblätter.

Diese interagierenden Helices können zwischen allen Gim-Proteinen angeglichen werden, sie sind also stark konserviert. Die vergleichende Sequenzanalyse lässt innerhalb der Kernregion der beiden Gim-Proteine einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Klassen erkennen. Die Proteine der α -Klasse weisen in der zentralen Region eine innerhalb dieser Klasse konservierte Insertion von 25 Aminosäuren auf, die in keinem der Proteine der β -Klasse vorkommt. Diese Insertion zeigt eine sehr hohe Homologie zu einem daran anschließenden Sequenz-Bereich auf, der wiederum in beiden Klassen konserviert ist. Sowohl die Insertion als auch der darauf folgende Bereich bildet in der Sekundär-Struktur β -Faltblätter. Offensichtlich ist dies auf eine Duplikation des intermediären

Sequenzbereiches zurückzuführen, der nur in der α -Klasse vorkommt. Das ist ein erster Hinweis auf unterschiedliche Tertiärstrukturen beider Klassen.

3.1.2. Die beiden Gim-Untereinheiten von *Methanobacterium thermoautotrophikum* bilden hochmolekulare Komplexe im Zytoplasma

Die in Abbildung 11 B dargestellte Sequenzanalyse zeigt auf, dass die archaeeellen Gim-Untereinheiten eine hohe Homologie zu den eukaryontischen Gim-Untereinheiten von *S.cerevisiae* aufweisen. Die Erkenntnisse bezüglich der Funktion des GimC waren bisher sehr begrenzt. Es gab Hinweise, dass GimC als hochmolekularer Komplex in der Chaperonin-vermittelten Faltung eine Rolle spielt (Siegers, Vainberg). Detaillierte biochemische oder auch strukturelle Daten lagen jedoch zu diesem neuartigen Chaperon kaum vor. Die einfachere Zusammensetzung des archaeeellen GimC, der nur aus zwei Untereinheiten besteht legte es nahe, weitere Studien an diesem neuen Chaperon am Beispiel eines archaeeellen Vertreters durchzuführen. GimC des Archaeons *Methanobacterium thermoautotrophikum* erschien als ein geeigneter Vertreter, da mit diesem Organismus bereits zahlreiche Studien durchgeführt wurden und dessen Genom bereits komplett sequenziert war.

Die kodierenden Regionen der beiden Gim-Gene konnten in bakterielle Expressionsvektoren kloniert werden. Beide Gim-Untereinheiten wurden in *E.coli* exprimiert und konnten erfolgreich aufgereinigt werden (Abbildung 12 A). Gegen diese aufgereinigten Proteine konnten nun Antikörper hergestellt werden, die eine hohe Spezifität zu den entsprechenden Untereinheiten aufwiesen. Dadurch war es möglich, die Gim Untereinheiten im Lysat von *Methanobacterium thermoautotrophikum* nachzuweisen (Abbildung 12 B). Mit quantitativer Immunoblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass *MtGim β* etwa doppelt so stark exprimiert wurde wie *MtGim α* . Als Komplex macht GimC etwa 0.4% der löslichen Proteine aus. Ausgehend von einer Gesamtproteinkonzentration von ~ 200 g/L, ergibt sich somit eine zytoplasmatische GimC Konzentration von ~ 10 μ M.

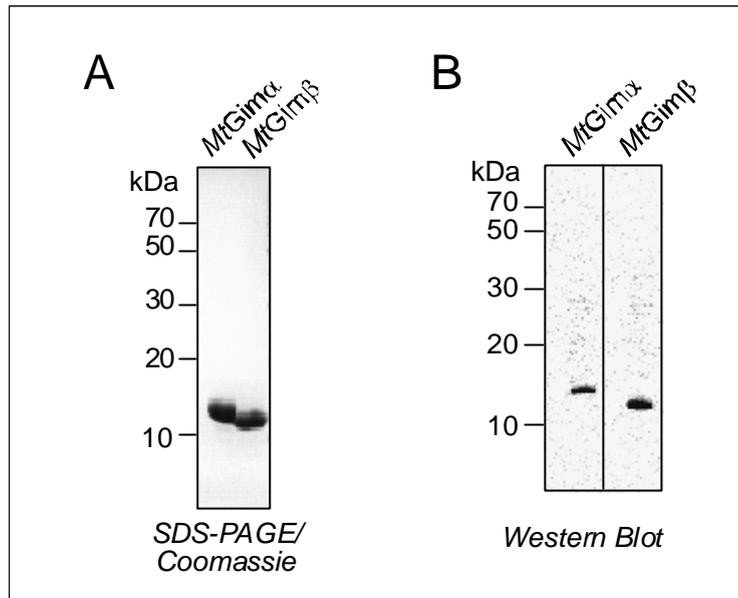


Abbildung 12. Die Expression der beiden Gim-Untereinheiten im Lysat von *M.thermoautotrophikum* konnte mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

(A) Rekombinante Gim-Proteine aus E.coli aufgereinigt. (B) Nachweis der Gim-Proteine im Rohextrakt (Lysat) von *M.thermoautotrophikum* mit Antikörpern, die gegen die rekombinanten Proteine in (A) hergestellt wurden.

MtGim α hat ein Molekulargewicht von 15.7 kDa, *MtGim β* ist 13.9 kDa schwer. Um die hochmolekulare Struktur des GimC zu analysieren, wurde Lysat von *Methanobakterium thermoautotrophikum* über eine Größenausschluss-Chromatographie aufgetrennt.

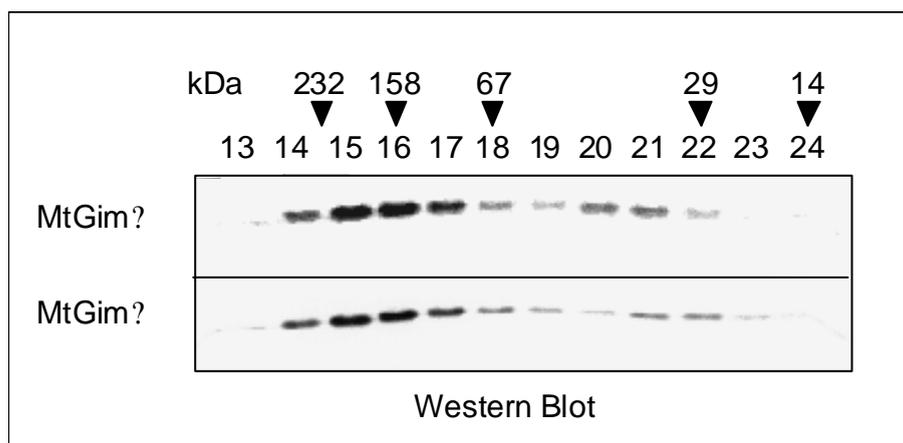


Abbildung 13. *MtGimC* liegt im Cytoplasma als hochmolekularer Komplex vor.

Gezeigt ist eine Fraktionierung auf einer Superdex 200 Säule. Die Fraktionen wurden auf SDS-PAGE analysiert, die Proteine konnten mit Western Blot nachgewiesen werden. Die Standardmarker-Proteine sind oberhalb der Blots dargestellt und erlauben eine ungefähre Einordnung der Größe von GimC.

Eine Western Blot-Analyse der Fraktionen zeigte, dass GimC auch in archaeellem Zytoplasma als hochmolekularer Komplex vorliegt (Abbildung 13).

Obwohl die Untereinheiten nur 15.7 und 13.9 kDa Masse besitzen, eluierten sie zusammen bei einer Masse von ungefähr 190 kDa.

Dies entspricht dem Elutionsprofil von eukaryontischem Gim Komplex in Hefe (170 – 230 kDa) (Siegiers *et al.* 1999) bzw. auch in Rinderhoden (Vainberg *et al.* 1998).

3.1.3. *MtGim α* und *MtGim β* bilden einen hexameren Komplex

Bisher war wenig über die oligomere Struktur von GimC bekannt. Die genetischen Analysen der eukaryontischen Gim-Proteine lassen auf einen Aufbau aus mindestens 6 Untereinheiten schließen, da man annehmen kann, dass sämtliche Gim Untereinheiten im Komplex vertreten sind. Die Größenvorstellung von ca. 200 kDa ist etwas ungenau, da diese Daten auch bei den anderen Studien (Vainberg *et al.* 1998; Siegiers *et al.* 1999) auf Gelfiltrations-Analysen beruhen, die keinen exakten Rückschluss auf das tatsächliche Molekulargewicht sowie den Aufbau des Komplexes ermöglichen, da sie möglicherweise stark von der Form des Komplexes beeinflusst werden. Um die Zusammensetzung des Komplexes *in vitro* zu bestimmen, wurden beide Untereinheiten in renaturierter und gereinigter Form einzeln inkubiert und anschließend das Laufverhalten der gebildeten oligomeren Komplexe mittels einer Gel Chromatographie studiert. Die Fraktionen der Gelfiltration wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese untersucht.

Auf Abbildung 14 ist zu erkennen, dass nur dann keine freien Gim-Untereinheiten vorliegen, wenn doppelt soviel *MtGim β* wie *MtGim α* eingesetzt wurde (Bande 4). Jedes andere Verhältnis führte dazu, dass nicht alle Untereinheiten als Komplex vorliegen. Geht man davon aus, dass die Untereinheiten einen hexameren Komplex bilden, lässt sich somit sagen, dass *MtGimC* aus 4 β -Untereinheiten und 2 α -Untereinheiten besteht.

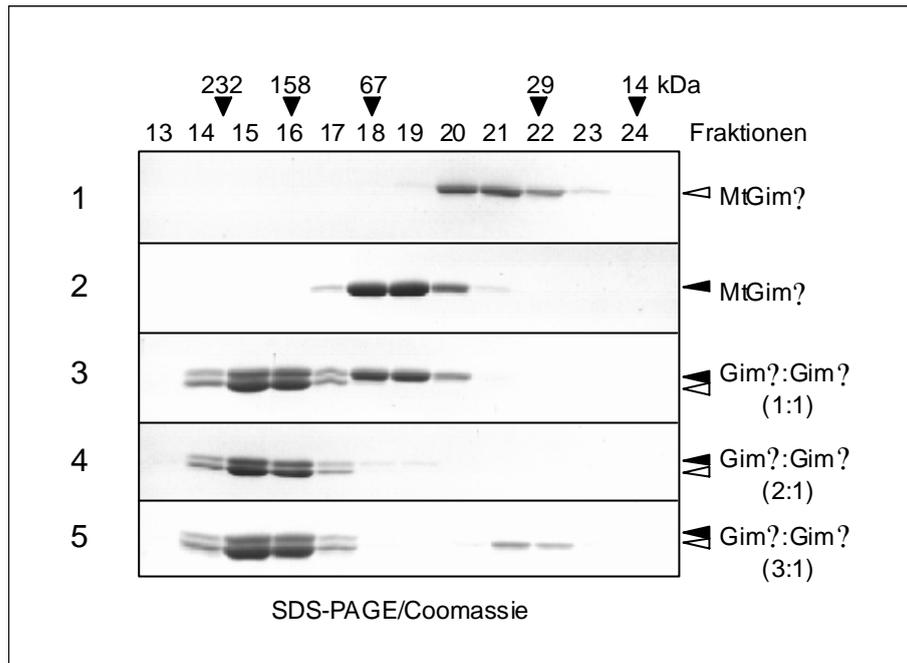


Abbildung 14. Gim-Untereinheiten assemblieren zu einem Hexamer aus 4 β -Untereinheiten und 2 α -Untereinheiten.

50 μ l Reaktionsansatz wurde auf einer Superdex 200 Säule aufgetrennt. (1) aufgereinigtes *MtGim β* ; (2) aufgereinigtes *MtGim α* ; (3) *MtGim β* und *MtGim α* im Verhältnis 1:1; (4) *MtGim β* und *MtGim α* im Verhältnis 2:1; (5) *MtGim β* und *MtGim α* im Verhältnis 3:1. In Bande 4 sind keine freien Gim-Untereinheiten zu erkennen. Das heißt, der Komplex besteht aus doppelt so vielen β - wie α -Untereinheiten. Geht man von 6 Untereinheiten je Komplex aus, kommt man also auf ein Verhältnis 4 β -Untereinheiten und 2 α -Untereinheiten je GimC.

Ein Vergleich von Bande 1 und 2 in Abbildung 14 zeigt, dass *MtGim α* wesentlich früher (ungefähr bei 60 kDa) von der Säule eluiert als *MtGim β* (35 kDa). Dies ist nicht auf den nur geringen Größenunterschied der beiden Proteine zurückzuführen. Es deutet vielmehr auf eine höhere Strukturordnung der α -Untereinheiten im Vergleich zu den β -Untereinheiten hin.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Experimente mit dem Cross-Linker bis-(sulfosuccinimidyl)Suberat (BS^3) durchgeführt. In Abbildung 15 sind Bindungsexperimente dargestellt, die durch Inkubation der einzelnen Gim-Untereinheiten mit dem Cross-linker BS^3 durchgeführt wurden. Banden 1 und 3 zeigen die Gim-Untereinheiten ohne Cross-Linker. In Bande 2 ist zu sehen, dass *MtGim α* komplett zu Dimeren assembliert. Eine Dimerisierung von *MtGim β* -Untereinheiten kann dagegen nicht gezeigt werden (Bande 4).

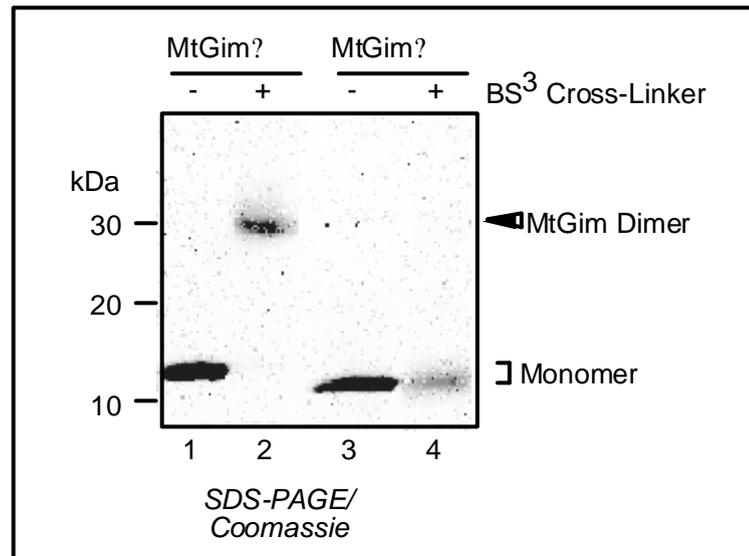


Abbildung 15. α -Untereinheiten haben die Tendenz Dimere zu bilden, β -Untereinheiten liegen als Monomere vor.

Die Bindungsexperimente wurden mit dem Cross-Linker bis-(sulfosuccinimidyl)Suberat (BS^3) durchgeführt. Je $20 \mu M$ $MtGim\alpha$ oder $MtGim\beta$ wurden mit $1 mM$ BS^3 für 1 h inkubiert und anschließend mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert.

In den vorangegangenen Studien (siehe Abbildung 12 und 13) konnte bereits gezeigt werden, dass sich sämtliche Gim-Untereinheiten zwei Klassen zuordnen lassen. Die α -Klasse schließt auch die eukaryontischen Untereinheiten 2 und 5 ein, die Untereinheiten 1, 3, 4 und 6 lassen sich der β -Klasse zuordnen. Dies unterstreicht die evolutionäre Konservierung dieser beiden Klassen: Für GimC aus *Methanobacterium thermoautotrophikum* konnte hier nachgewiesen werden, dass der Komplex aus doppelt so vielen Gim-Proteine der β -Klasse besteht wie der α -Klasse. Dieses Verhältnis lässt sich auf GimC in Eukarya übertragen. Diese bestehen aus 6 Untereinheiten, wobei immer doppelt so viele der β -Klasse angehören.

3.1.4. Untersuchung der Chaperon Eigenschaft von *MtGimC*

In früheren funktionellen Studien wurde beschrieben, dass Hefestämme, in denen einzelne oder mehrere Gim-Untereinheiten eliminiert wurden, spezifische Defekte in der Biogenese von Microtubuli sowie Aktin zeigten (Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). Weitere Studien zeigten, dass mehrere Proteine, die nicht am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, nicht

mit TRiC oder GimC interagieren (Hansen *et al.* 1999). Dies ist ein Hinweis, dass GimC eine ähnliche Substrat-Spezifität aufweist wie das eukaryontische Gruppe II Chaperonin TRiC. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Vermutung geäußert, dass TRiC und GimC bei der Proteinfaltung in gekoppelten Prozessen aktiv sind. Dies würde GimC von anderen molekularen Chaperonen unterscheiden, die in der Regel relativ unspezifisch mit verschiedenen ungefalteten Proteinen interagieren.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde die Chaperon-Eigenschaft von *MtGimC* mit verschiedenen ungefalteten Substrat-Proteinen unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen studiert.

Es konnte gezeigt werden, dass *MtGimC* ungefaltetes Aktin bindet (siehe Abbildung 16). Dies ist eine Eigenschaft, die auch für eukaryontisches GimC nachgewiesen werden konnte (Vainberg *et al.* 1998). Radioaktiv markiertes (³⁵S) denaturiertes Aktin von *Mus musculus* wurde in eine Pufferlösung verdünnt, die *MtGimC* enthielt. Die Lösung wurde auf einem 4.5% nativen Polyacrylamid Gel untersucht. Auf Abbildung 16 in Laufbahn 1 ist eine deutliche Bande in Höhe des *MtGimC*-Aktin-Komplexes zu erkennen, dessen Position zuvor durch Coomassie-Färbung bestimmt wurde. Das deutet darauf hin, dass *MtGimC* und Aktin miteinander interagieren und somit als Komplex in der nativen Gelelektrophorese migrieren. Wenn nun das Laufverhalten von denaturiertem und markiertem Aktin ohne Chaperon untersucht wird (Laufbahn 2) kann keine scharfe Bande erkannt werden, es kommt lediglich zu einer unscharfen Bande (Schmier), da das denaturierte Aktin aggregiert (Melki and Cowan 1994). Auch bei einer Inkubierung von denaturiertem Aktin mit je einer der beiden Gim Untereinheiten, *MtGimα* und *MtGimβ* (Laufbahnen 3 und 4), ändert sich nichts am Laufverhalten von Aktin. Auch hier ist auf dem Gel ein Schmier zu erkennen. Das heißt, die Untereinheiten alleine haben keine Chaperon Eigenschaft, die Komplexbildung ist essentiell für die Funktion als Chaperon.

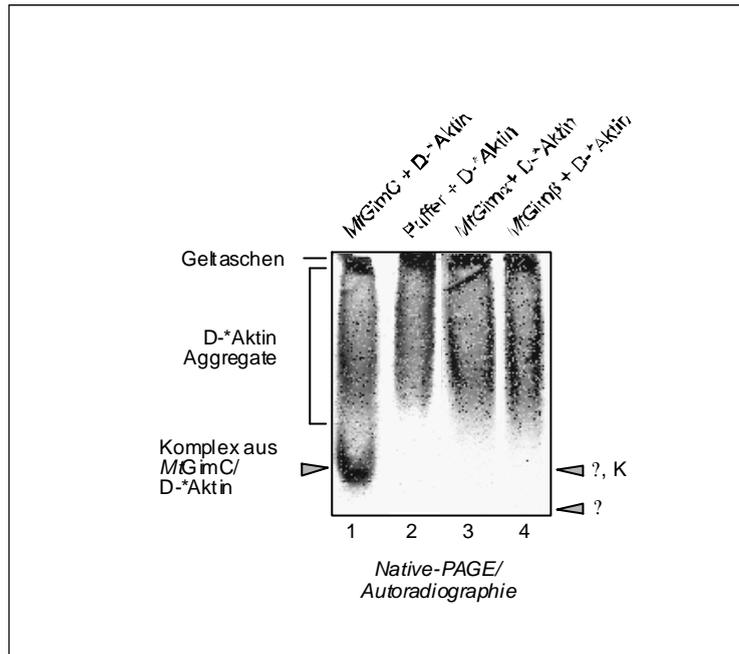


Abbildung 16. *MtGimC* bindet ungefaltetes Aktin.

Mit Harnstoff denaturiertes und ^{35}S -markiertes Aktin (D- $^*\text{Aktin}$) wurde 100-fach in Puffer verdünnt, der ca. $3\ \mu\text{M}$ *MtGimC* enthielt (Laufbahn 1) und wurde bei 30°C 15 min inkubiert. Wird D- $^*\text{Aktin}$ ohne Chaperon im Puffer inkubiert, aggregiert es. Auf dem Gel ist dies als Schmier zusehen (Laufbahn 2). Auch eine Inkubation mit $10\ \mu\text{M}$ *MtGim* α (Laufbahn 3) oder $10\ \mu\text{M}$ *MtGim* β (Laufbahn 4) kann die Aggregation von D- $^*\text{Aktin}$ nicht verhindern. Die Positionierung der Komplexe und einzelnen Untereinheiten wurde durch Coomassie-Färbung des Gels identifiziert, bevor die Autoradiographie durchgeführt wurde.

Das Laufverhalten von *MtGimC* sowie dessen Untereinheiten ist auf der Abbildung mit Pfeilen dargestellt und verdeutlicht somit nochmals die Komplexbildung von Aktin mit *MtGimC* sowie die unzureichende Chaperon-Eigenschaft der Untereinheiten, da in Höhe dieser Proteine kein Aktin nachgewiesen werden konnte. Die Chaperon Eigenschaft von *MtGimC* wurde nun anhand weiterer möglicher Substrat-Proteine getestet: Lysozym vom Huhn (14 kDa), Rhodanese aus Mitochondrien vom Rind (33 kDa). Die Bindungseigenschaften wurden in einem Lichtstreuungsexperiment untersucht. Dabei nutzt man die Eigenschaft von Protein Aggregaten, die bei einer bestimmten Wellenlänge (320 nm) eine Streuung des eingestrahlen Lichtes auslösen, wohingegen Proteine in Lösung, also auch zum Beispiel geordnete Proteinkomplexe bestehend aus Chaperon und gebundenem, ungefaltetem Protein, nur zu einer geringen Lichtstreuung führen. Die

Experimente wurden bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 10 min in einem Photometer durchgeführt (siehe Abbildung 17).

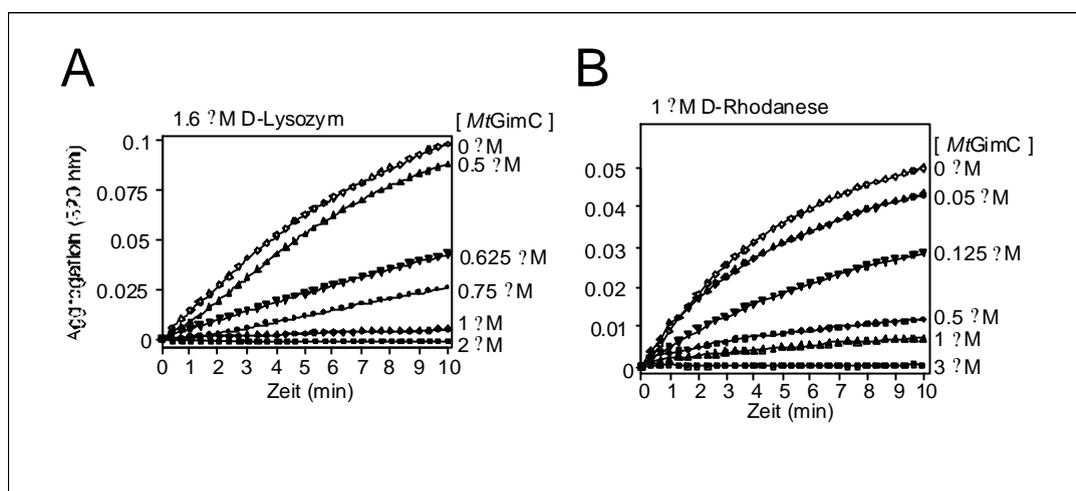


Abbildung 17. *MtGimC* verhindert die Aggregation von D-Lysozym und D-Rhodanese.

(A) 160 µM chemisch denaturiertes Lysozym wurden 100-fach in Puffer verdünnt, der unterschiedliche Konzentrationen von *MtGimC* enthielt. Die Aggregation wurde nachgewiesen, indem die Lichtstreuung bei 320 nm während 10 min bei Raumtemperatur gemessen wurde. (B) 100 µM chemisch denaturierte Rhodanese wurde wie unter (A) beschrieben 100-fach in Puffer verdünnt, der verschiedene Konzentrationen von *MtGimC* enthielt. Messung erfolgte wie in (A).

Lysozym wurde in 6 M Guanidium Hydrochlorid unter reduzierenden Bedingungen denaturiert und anschließend 100-fach in Puffer verdünnt, der entweder kein Chaperon (Kontrolle der Aggregatbildung), oder verschiedene Konzentrationen von *MtGimC* enthielt (wie in Abbildung 17 A bezeichnet). Es ist deutlich zu erkennen, dass *MtGimC* in einer Konzentrations-abhängigen Weise die Aggregatbildung von denaturiertem Lysozym in Lösung verhindert. Eine vollständige Verhinderung der Aggregation von Lysozym konnte bei einer equimolaren Konzentration von *MtGimC* und Lysozym beobachtet werden.

Die gleiche Chaperon Aktivität von *MtGimC* konnte auch für chemisch denaturierte Rhodanese festgestellt werden (Abbildung 17 B). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass *MtGimC* bei einem breiten Spektrum von ungefalteten Proteinen die Aggregation verhindern kann und somit die Eigenschaften eines relativ unspezifischen molekularen Chaperons aufweist.

3.1.5. *MtGimC* gebundenes Protein ist nicht Protease-resistent

Für eine weitere funktionelle Charakterisierung von *MtGimC* war es von Interesse, den Komplex mit gebundenem Substrat zu untersuchen. Dies sollte Rückschlüsse ermöglichen, ob das Chaperon *MtGimC* die Eigenschaft besitzt, ungefaltetes Protein nicht nur zu binden, sondern auch zu falten.

Der Zustand *MtGimC*-gebundenen Substrates wurde analysiert, indem die Resistenz gegenüber einer Protease getestet wurde. Die Abbildung 18 zeigt die Fraktionierung von nativer (1) und denaturierter Rhodanese (2) sowie des *MtGimC*-Rhodanese Komplexes (3). In allen drei Fällen wurden die Proteine in Puffer inkubiert und anschließend auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, bei der die Proteine nach Masse getrennt werden, wobei gebildete Proteinkomplexe erhalten bleiben. Die Elution von Rhodanese wurde durch Western Blot mit spezifischem Rhodanese Antikörper nachgewiesen. Auf der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass native Rhodanese später eluiert als denaturierte Rhodanese, die mit *MtGimC* vorinkubiert wurde und nun als Komplex mit dem Chaperon zusammen migriert. Denaturierte Rhodanese alleine aggregiert und ist nicht nachweisbar (Abbildung 18 Lauf 2), da Aggregate vor dem Auftragen auf die Säule abzentrifugiert wurden. In den anderen Ansätzen wurde ebenso verfahren, daher ist davon auszugehen, dass nur entweder *MtGimC*-gebundene Rhodanese oder freie native Rhodanese in den Fraktionen vorhanden ist.

Um den Faltungszustand der gebundenen Rhodanese zu untersuchen, wurde sowohl eine Fraktion, die native Rhodanese enthält (Abbildung 18; Fraktion 10, Lauf 1) sowie eine Fraktion, die *MtGimC*-gebundene Rhodanese enthält (Abbildung 18; Fraktion 7, Lauf 3) je zur Hälfte mit Proteinase K inkubiert. Diese Ansätze wurden auf ein Gel aufgetragen und mit Rhodanese Antikörpern analysiert. Native Rhodanese ist bei der eingesetzten Proteinase Konzentration weitestgehend resistent gegen proteolytischen Abbau. *MtGimC*-gebundene Rhodanese hingegen scheint in einem ungefaltetem Zustand vorzuliegen, da dieses Substrat von der Protease vollständig verdaut wird.

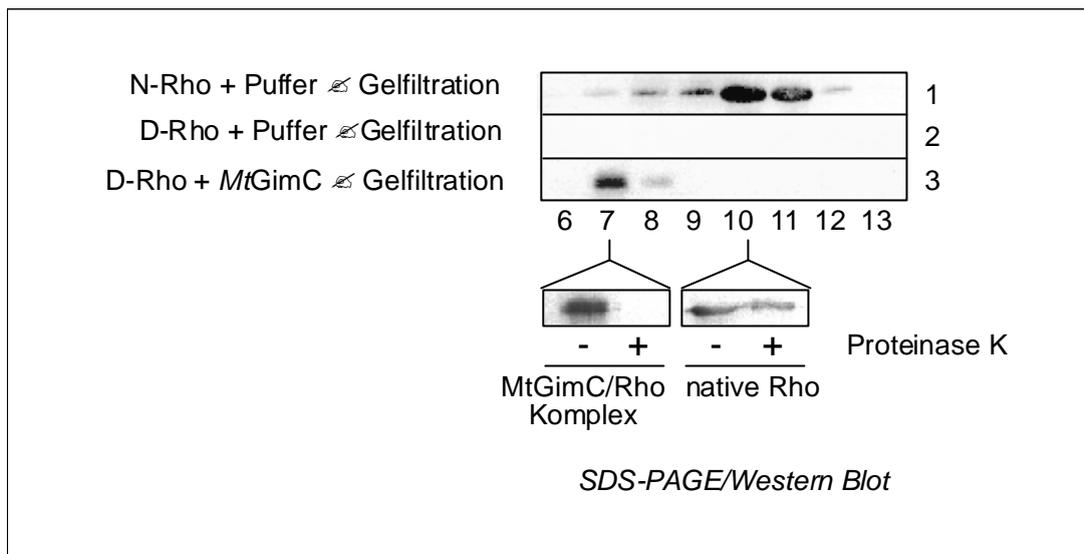


Abbildung 18. *MtGimC*-gebundene Rhodanese ist Protease-sensitiv.

Reaktionsansätze mit nativer Rhodanese (1), denaturierter Rhodanese (2) und des Rhodanese-*MtGimC*-Komplexes (3) wurden über eine Superdex 200-Säule fraktioniert und mit SDS-PAGE analysiert. Das Elutionsprofil von Rhodanese wurde mit Western Blot nachgewiesen. Fraktion 7 aus Lauf 3 enthält den Rhodanese-*MtGimC*-Komplex, Fraktion 10 aus Lauf 1 enthält native Rhodanese. Beide Fraktionen wurden je zu Hälfte wie 10 μ g/ml Proteinase K inkubiert (10 min auf Eis).

Es ist somit festzustellen, dass *MtGimC* eine ausgeprägte Chaperon-Eigenschaft hat, indem es ein breites Spektrum von ungefalteten Proteinen bindet und deren Aggregation verhindert. Allerdings ist dieses molekulare Chaperon nicht im Stande, das gebundene ungefaltete Protein weiter zu falten.

Dieses Ergebnis ist wiederum konsistent mit der Annahme, dass *MtGimC* als Kofaktor eines Chaperonins fungiert. Bisher bekannte molekulare Chaperone haben oft die Eigenschaft, gebundene ungefaltete Protein zur vollständigen Faltung an ein Chaperonin zu übergeben. Dieses zu untersuchen war Gegenstand der folgenden Experimente.

3.1.6. *MtGimC* stabilisiert nicht-natives Aktin und vermittelt den Transfer an ein Gruppe II Chaperonin zur vollständigen Faltung

Vainberg und Kollegen konnten in ihren Studien nachweisen, dass eukaryontisches GimC/Prefoldin ungefaltetes Aktin unter *in vitro* Bedingungen bindet und an TRiC transferiert (Vainberg *et al.* 1998). TRiC vermittelt anschließend die korrekte Faltung. Diese Funktion wurde GimC auf Grund des Nachweises einer spezifischen Bindung an TRiC zugeschrieben.

Es war bisher nicht möglich, eine Interaktion von *MtGimC* mit einem archaeeellen Chaperonin nachzuweisen. Das mag darauf zurückzuführen sein, dass diese Interaktion bei Archaea eher transient ist und daher mit herkömmlichen Methoden nicht nachweisbar ist. Eventuell ist diese bei Eukarya beobachtete Eigenschaft erst im Laufe der Evolution entstanden.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *MtGimC*-gebundenes, ungefaltetes Substrat, an ein Chaperonin weitergeleitet wird (Abbildung 19).

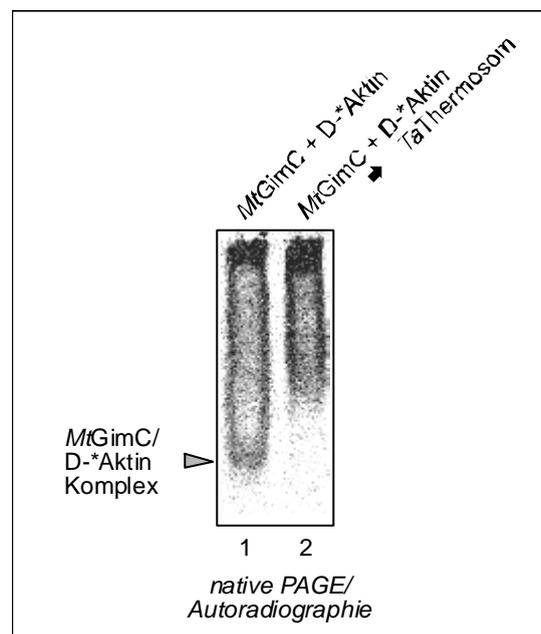


Abbildung 19. *MtGimC* überträgt D-Actin auf ein Gruppe II Chaperonin.

MtGimC-D-Actin Komplexe wurden gebildet wie in Abbildung 3.7 beschrieben. Die Komplexe wurden mit 3 μ M Thermosom von *Thermoplasma acidophilum* (*Ta*) für 15 min bei 30°C inkubiert und auf einer 4.5% nativen PAGE analysiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Bande in Höhe des *MtGimC*-D-Actin Komplexes (Bahn 1) nach Inkubation mit *Ta*Thermosom verschwindet (Bahn 2).

Dazu wurde D-*Aktin in Puffer verdünnt, der *MtGimC* enthielt, wie in Abbildung 17 beschrieben. Anschließend wurde zu einem Teil des Ansatzes Thermosom von *Thermoplasma acidophilum* (*Ta*Thermosom) zugegeben und 15 min bei 30°C inkubiert, um einen Transfer des Substrates zu ermöglichen. Wenn *MtGimC* und D-*Aktin inkubiert werden, ist eine Komplexbildung zu beobachten (Abbildung 19, Bahn 1). Wurde der Komplex mit Thermosom inkubiert, verschwindet diese Bande (Abbildung 19, Bahn 2). Das lässt darauf schließen, dass ein Transfer des Substrates von *MtGimC* auf *Ta*Thermosom stattgefunden hat.

Es war allerdings nicht möglich, eine Rückfaltung von D-*Aktin mit Hilfe des Chaperonins Thermosom nachzuweisen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich hier nicht um ein endogenes Substrat handelt. Da jedoch bisher keine endogenen Substrate des archaellen Chaperonins Thermosom bekannt sind, lag es nahe, sich auf die nahe Verwandtschaft und hohe Homologie der archaellen und eukaryontischen Gruppe II Chaperonine Thermosom und TRiC zu berufen. Aktin ist ein wichtiges Modells substrat für das eukaryontische Gruppe II Chaperonin TRiC, selbst wenn die Rückfaltungsreaktion *in vitro* nicht so effektiv ist wie *in vivo* (Frydman and Hartl 1996; Vainberg *et al.* 1998; Siegert *et al.* 2000). Die Effizienz der Rückfaltung von D-*Aktin kann *in vitro* mittels einer nativen Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Dabei nutzt man die Eigenschaft, dass nur natives Aktin an DNaseI bindet (Gao *et al.* 1992). Die Bindung ist mit $> 10^{-9}$ M sehr hoch (Lazarides and Lindberg 1974) und sehr beständig und kann daher auch durch eine native Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Das durch die DNaseI-Bindung veränderte Laufverhalten bei einer Gelelektrophorese ist ein Nachweis für natives Aktin (Melki and Cowan 1994). Für eine Chaperonin-vermittelte Aktin-Rückfaltung wurde nun TRiC aus Rinderhoden (*Bos bovis*) verwendet. IgG wurde als Kontrollprotein (kein Chaperon) verwendet, um die Chaperon-Eigenschaft von *MtGimC* zu bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass IgG kein Aktin bindet. Die Aggregation von D-*Aktin ist als unscharfe Bande (Schmier) zu erkennen (Abbildung 20 Laufbahn 1). Auch nachträglich zugegebenes TRiC konnte kein Aktin binden und falten, da es komplett aggregiert war (Abbildung 20, Laufbahn 2).

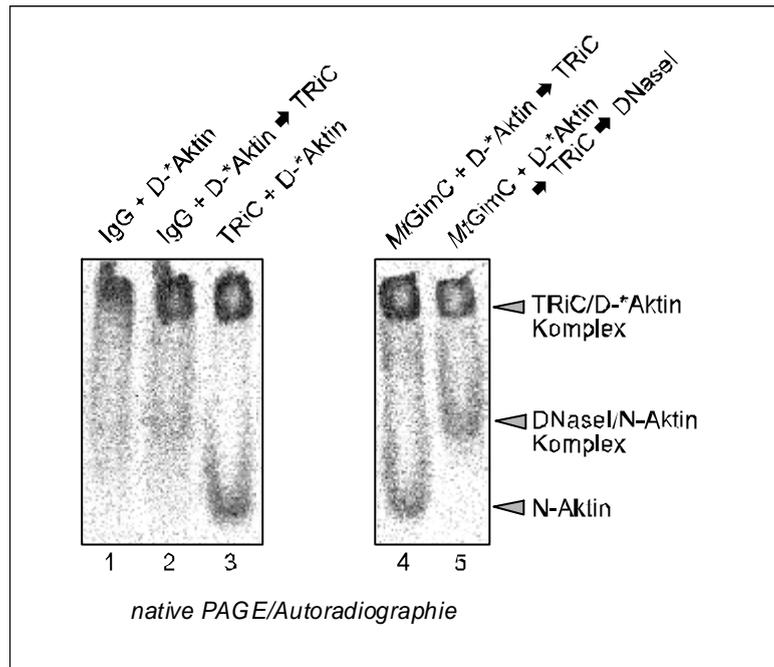


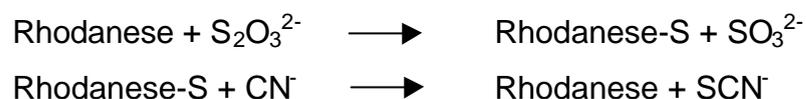
Abbildung 20. *MtGimC* bindet D-³⁵S-Aktin und überträgt es auf TRiC für eine erfolgreiche Chaperonin-vermittelte Faltung.

D-³⁵S-Aktin (13 μ M) wurde 100-fach in Puffer verdünnt, der entweder 6 μ M IgG enthielt (Laufbahn 1 und 2), oder 0.3 μ M TRiC (Laufbahn 3), oder 2 μ M *MtGimC* und anschließend 0.3 μ M TRiC (Laufbahn 4). Inkubiert wurde 15 min bei 30°C, Analyse mit nativer PAGE und Autoradiographie. Faltungsreaktionen wurden durch Zugabe von 1 mM Mg-ATP gestartet und nach 60 min Inkubation bei 30°C analysiert. Zum Nachweis der Bildung von nativem Aktin wurde zu der Reaktion in Laufbahn 5 DNaseI zugegeben und inkubiert, bevor der Ansatz per nativer PAGE und Autoradiographie analysiert wurde.

Als Kontrolle der Funktion des Chaperonins ist in Laufbahn 3 ein Rückfaltungsexperiment von TRiC und D-³⁵S-Aktin dargestellt. Eine Bande in Höhe von nativem Aktin ist deutlich zu erkennen. Wurde nun anstelle von dem Kontrollprotein IgG das Chaperon *MtGimC* eingesetzt, kam es nach Zugabe von TRiC zur Rückfaltung von Aktin (Abbildung 20, Laufbahn 4). Offensichtlich wurde D-³⁵S-Aktin von *MtGimC* in löslicher Form stabilisiert und konnte anschließend auf TRiC übertragen werden. Die erfolgreiche Rückfaltung durch TRiC in Anwesenheit von ATP konnte nun durch Inkubation mit DNaseI nachgewiesen werden. Die Bindung an DNaseI zeigt, dass Aktin in gefalteter Form und als Monomer vorliegt (Lazarides and Lindberg 1974; Kabsch *et al.* 1990).

3.1.7. Das Gruppe I Chaperonin GroEL aus *E.coli* vermittelt die Faltung von *MtGimC* gebundener nicht-nativer Rhodanese

Die vorangegangenen Experimente zeigten das erfolgreiche Zusammenspiel des molekularen Chaperons *MtGimC* mit einem Gruppe II Chaperonin bei der Faltung eines obligaten Gruppe II Chaperonin Substrates. Im weiteren Verlauf war nun zu klären, ob *MtGimC* auch eine vermittelnde Rolle bei der Gruppe I Chaperonin-assistierten Proteinfaltung ausüben kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *MtGimC* die Aggregatbildung von denaturierter Rhodanese verhindert und eine Komplexbildung beobachtet werden kann (Abbildungen 17 B und 18). Rhodanese wurde in vielen Studien als Substrat des Gruppe I Chaperonin GroEL aus *Escherichia coli* (*EcGroEL*) eingesetzt, unter anderem, um den Funktionsmechanismus des Chaperonins zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Rückfaltung denaturierter Rhodanese strikt von GroEL und dem Kofaktor GroES sowie ATP abhängig ist (Martin and Hartl 1997). Des weiteren wurde nachgewiesen, dass das bakterielle Hsp70 System, DnaK/J und GrpE, ungefaltete Rhodanese in einem faltungsaktiven Zustand zur vollständigen Faltung an das Gruppe I Chaperonin System weiterleiten kann (Langer *et al.* 1992). Die korrekte Rückfaltung des Substrates Rhodanese kann mittels eines enzymatischen Assays ermittelt werden. Das Enzym Rhodanese vermittelt den Schwefel-Transfer von Thiosulfat auf Zyanid nach der folgenden Formel:



Das entstehende Thiozyanid (Rhodanid) war der Namensgeber für dieses Enzym. Der systematische Name ist *Thiosulfat:Zyanit-Sulfurtransferase*. Rhodanese aus Mitochondrien von *Bos bovis* ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. Es besteht aus zwei Domänen mit ähnlichem Faltungsmuster, aber niedriger Homologie (Ploegman 1978). Die katalytische Stelle wird zwischen beiden Domänen durch ein Cystein (Cys

247) gebildet (Ploegman 1978). Rhodanese-Aktivität konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden (Lang 1933).

Die Rückfaltungsrate von denaturierter Rhodanese kann durch spektrometrische Messung der wiederhergestellten Rhodanese-Aktivität nachgewiesen werden. Um den Einfluss von *MtGimC* in der Gruppe I Chaperonin-vermittelten Proteinfaltung zu testen, wurde denaturierte Rhodanese in Puffer verdünnt, der *MtGimC* enthielt, und 15 min inkubiert, um eine Bildung der Chaperon-Substrat Komplexe zu gewährleisten. Zu diesem Ansatz wurde nun das Chaperonin *EcGroEL* gegeben und weitere 10 min inkubiert, um einen Transfer des ungefalteten Substrates von *MtGimC* auf *EcGroEL* zu ermöglichen.

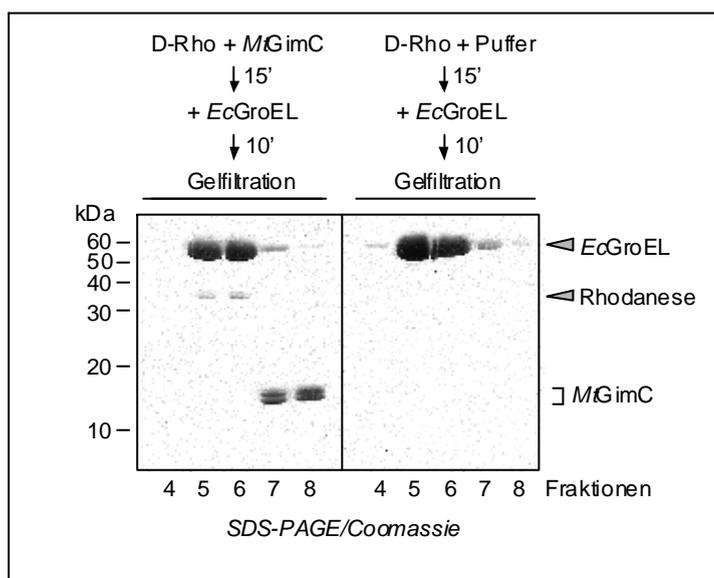


Abbildung 21. *MtGimC* verhindert die Aggregation von D-Rho und transferiert das Substrat auf *EcGroEL*.

100 μ M chemisch denaturierte Rhodanese (D-Rho) wurde 100-fach verdünnt in Puffer, der 2 μ M *MtGimC* enthielt und 15 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde *EcGroEL* (1 μ M) hinzugegeben und nach weiterer Inkubation wurde der Reaktionsansatz über eine Gelfiltrations-Säule (Superdex 200) aufgetrennt. Rhodanese koeluiert mit *EcGroEL* (linke Seite, Fraktionen 5 und 6). Alternativ wurde D-Rho ohne Chaperon in Puffer inkubiert und anschließend genauso verfahren. Eine Bindung von D-Rho an *EcGroEL* ist hier nicht zu beobachten (rechte Seite).

Anschließend wurde die Reaktionslösung mittels einer Gelfiltrations-Chromatographie aufgetrennt. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, migriert

Rhodanese mit *EcGroEL* (Fraktionen 5 und 6), jedoch nicht mit *MtGimC* (Fraktionen 7 und 8). Das heißt, hier hat ein erfolgreicher Transfer stattgefunden.

Wenn nun unter den gleichen Bedingungen denaturierte Rhodanese in Puffer verdünnt wurde und anschließend, nach entsprechender Inkubation, *EcGroEL* zugegeben wurde, konnte bei der folgenden Fraktionierung keine Ko-Elution von Rhodanese und *EcGroEL* festgestellt werden. Offensichtlich aggregiert Rhodanese in letzterem Fall bei der Inkubation ohne Chaperon. Eine Bindung an das Chaperonin war somit nicht mehr möglich.

Es galt nun herauszufinden, ob das ungefaltete Substrat, das von *MtGimC* auf *EcGroEL* transferiert wurde, durch das Chaperonin gefaltet werden kann. Dazu wurden Rückfaltungs-Experimente durchgeführt, die Aufschluss über die Rhodanese Aktivität unter verschiedenen experimentellen Bedingungen geben sollten. Um die spontane Rückfaltung zu untersuchen, wurde chemisch denaturierte Rhodanese in Puffer verdünnt, der kein Chaperon enthielt. Nach 1 h bei 37°C ist lediglich etwa 10 % der denaturierten Rhodanese spontan rückgefaltet. Auch wenn *MtGimC* im Puffer vorhanden ist und die Reaktion mit ATP gestartet wird, ist keine höhere Rückfaltungsrate zu erkennen. Dies stimmt mit den vorangegangenen Aktin-Rückfaltungsexperimenten überein, die bereits zeigten, dass *MtGimC* alleine keine Faltungsaktivität aufweist. Wird nun denaturierte Rhodanese mit *MtGimC* vorinkubiert und erst anschließend *EcGroEL* zugegeben, kann ein Transfer auf das Chaperonin stattfinden wie in Abbildung 21 gezeigt ist. Addiert man nun das Kochaperonin *EcGroES* und ATP zu diesem Ansatz und inkubiert für 1 h bei 37°C, wird etwa 50% der denaturierten Rhodanese rückgefaltet. Das bedeutet, dass *MtGimC* das ungefaltete Substrat in einem Faltungs-kompetenten Zustand bindet. Wenn das denaturierte Substrat mit *EcGroEL* vorinkubiert wird und das Chaperons *MtGimC* erst anschließend, gleichzeitig mit *EcGroES* und ATP, zugegeben wird, ist die Rückfaltung sogar effizienter als mit dem bakteriellen Chaperonin-System alleine.

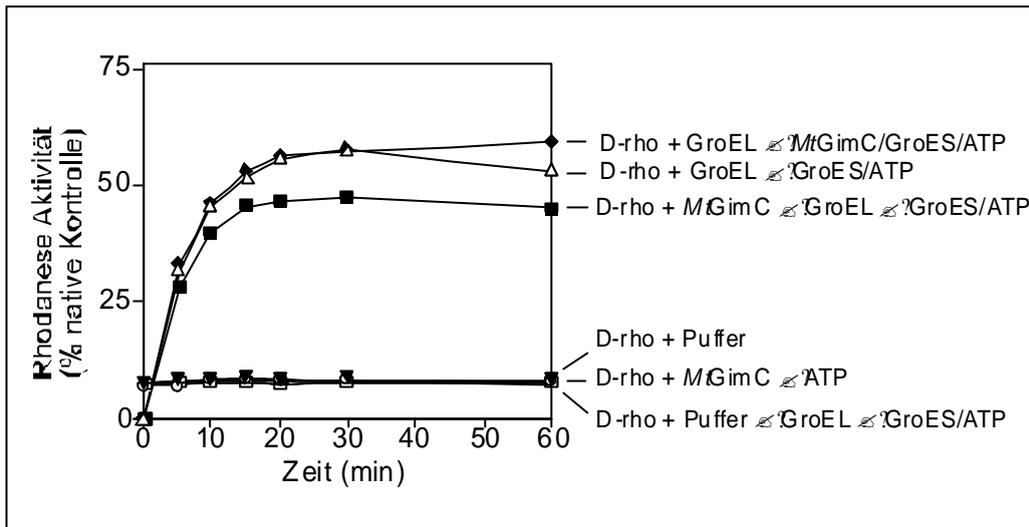


Abbildung 22. Die von *MtGimC* auf *EcGroEL* transferierte Rhodanese kann effizient rückgefaltet werden.

Chemisch denaturierte Rhodanese (100 μM) wurde 100-fach in Puffer verdünnt (spontane Rückfaltung), oder in Puffer der 2 μM *MtGimC*, bzw. 500 nM *EcGroEL* enthielt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 25°C wurden eventuell entstandene Rhodanese-Aggregate abzentrifugiert. Dann wurde *MtGimC* oder *EcGroEL* zu den entsprechenden Ansätzen zugegeben (wie in der Abbildung dargestellt) und die Reaktionen durch Zugabe von 5 mM ATP und/oder GroES (1 μM) gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und einem Aktivitätsassay zugeführt. Die Aktivität ist angegeben als Prozentsatz der Aktivität nativer Rhodanese (% Kontrolle).

Um den Effekt von *MtGimC* noch besser herauszustellen, wurde ein Reaktionsansatz, bestehend aus Puffer und denaturierter Rhodanese, inkubiert, bevor *EcGroEL* und anschließend *EcGroES* und ATP zugegeben wurden. Hier war wiederum lediglich eine Aktivität auf dem Niveau der spontanen Rückfaltung zu beobachten.

3.1.8. Zusammenfassung

Es konnte hier erstmals nachgewiesen werden, dass sich sämtliche Gim-Proteine in zwei Klassen gruppieren lassen, die stark konserviert sind. Die biochemischen Studien ergaben, dass GimC aus *Methanobakterium thermoautotrophikum* einen hexameren Komplex aus zwei α -Untereinheiten und vier β -Untereinheiten bildet. Die hier vorgestellten Daten zur funktionellen Untersuchung dieses neuen archaeellen Chaperons ergaben, dass MtGimC ein breites Spektrum ungefalteter Proteine stabilisiert. Bei Rückfaltung von denaturiertem Aktin und denaturierter Rhodanese kann das Chaperon erfolgreich vermitteln. Es bindet ungefaltetes Aktin und Rhodanese und stabilisiert die Substrate in einem nicht-nativen, aber faltungs-kompetenten Zustand. Die Substrate können anschließend entweder auf ein Gruppe I oder ein Gruppe II Chaperonin übertagen werden. Zugabe von ATP führt dann zu einer korrekten Faltung.

3.2. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung eines Gruppe I Chaperonins in Archaea

3.2.1. Das Genom des mesophilen Archaeon *Methanosarcina mazei* kodiert für Gruppe I und Gruppe II Chaperonin Systeme

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde beschrieben, wie das neue archaeelle Chaperon GimC an den Funktionsmechanismen archaeeller Proteinfaltung beteiligt ist. Die Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass es möglich ist, auf Grundlage der Erkenntnisse über molekulare Mechanismen in Archaea weitere Aufschlüsse auch in Bezug auf die homologen Mechanismen in Eukaria zu bekommen. Es ist jedoch anzumerken, dass bisherige Erkenntnisse auf Studien mit thermophilen Archaea beruhen. Insbesondere funktionelle enzymatische *in vitro* Untersuchungen sind schwer unter physiologischen Bedingungen durchführbar. Es war somit für weitere Untersuchungen empfehlenswert, mit mesophilen Archaea zu arbeiten.

Zu Beginn des hier beschriebenen Projektes wurde in der Arbeitsgruppe von Uwe Deppenmeier (Goettingen Genomics Laboratory) gerade begonnen, das Genom des mesophilen Archaeons *Methanosarcina mazei* zu sequenzieren. Diese Arbeitsgruppe konnte für eine Zusammenarbeit gewonnen werden. Somit war es möglich, bereits vor der Veröffentlichung der Genomsequenz eine Suche nach Chaperon-codierenden Sequenzen durchzuführen. Die Blast-Suche wurde mittels geeigneter archaeeller sowie eukaryontischer Sequenzen durchgeführt. Dabei konnte unter anderem ein Homolog des im ersten Teil beschriebenen Chaperons GimC nachgewiesen werden. Der interessanteste Befund war jedoch, dass zusätzlich zu den drei Untereinheiten des Gruppe II Chaperonins Thermosom, auch ein Vertreter eines GroEL-ähnlichen Gruppe I Chaperonins sowie eines GroES-ähnlichen Kofaktors nachgewiesen werden konnten. Dies war der erste Nachweis eines Gruppe I Chaperonin-Systems in Archaea. Eine Besonderheit der zwei Chaperonin Gruppen liegt in der unterschiedlichen Lokalisierung. Wie in der Einleitung geschildert, ist das Gruppe I Chaperonin bisher nur im Cytosol von

Bakterien sowie in den eukaryontischen Organellen Mitochondrium und Chloroplast beschrieben worden (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Gruppe II Chaperonine hingegen wurden bisher nur im eukaryontischen Zytoplasma (TRiC/CCT) sowie in Archaea (Thermosom) nachgewiesen (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Beide Chaperonine kommen also nach bisherigen Erkenntnissen niemals im gleichen zellulären Milieu vor. Archaea besitzen keine interzellulären Organellen. Somit liegen die beiden Chaperonine, die in dem Archaeon *Methanosarcina mazei* identifiziert wurden, im gleichen zellulären Kompartiment. *M.mazei* ist somit der erste Organismus, indem eine solche Koexistenz nachgewiesen werden konnte.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden diese archaeellen Chaperonine als *MmTHS* (Thermosom von *Methanosarcina mazei*) sowie als *MmGroEL* mit dem Kofaktor *MmGroES* (GroEL- bzw. GroES-ähnliches Protein aus *Methanosarcina mazei*) bezeichnet.

3.2.2. Die Gene, die für das archaeelle Gruppe I Chaperonin-System kodieren sind im archaeellen Genom eingebettet.

Um auszuschließen, dass die Identifizierung der beiden Gruppe I Chaperonin-Gene auf eine bakterielle Kontamination während des Sequenziervorgangs zurückzuführen ist, wurden die flankierenden Genbereiche untersucht.

Eine Analyse der flankierenden Genbereiche zeigte, dass das GroE-Operon von ORFs (engl.: *open reading frames*, offene Leserahmen) eingerahmt ist, die archaeellen Ursprungs sind (Abbildung 23).

Studien zur Sequenzhomologie ergaben zudem, dass GroES von *M.mazei* die höchste Homologie zu dem GroES des thermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* aufweist, das GroEL zeigt hingegen die höchste Verwandtschaft zu dem GroEL des thermophilen Bakteriums *Bacillus stearothermophilus* (Abbildung 23). Das spricht für einen bakteriellen Ursprung des archaeellen GroELs. Es ist somit zu vermuten, dass die Gene durch einen lateralen Gentransfer aufgenommen wurde.

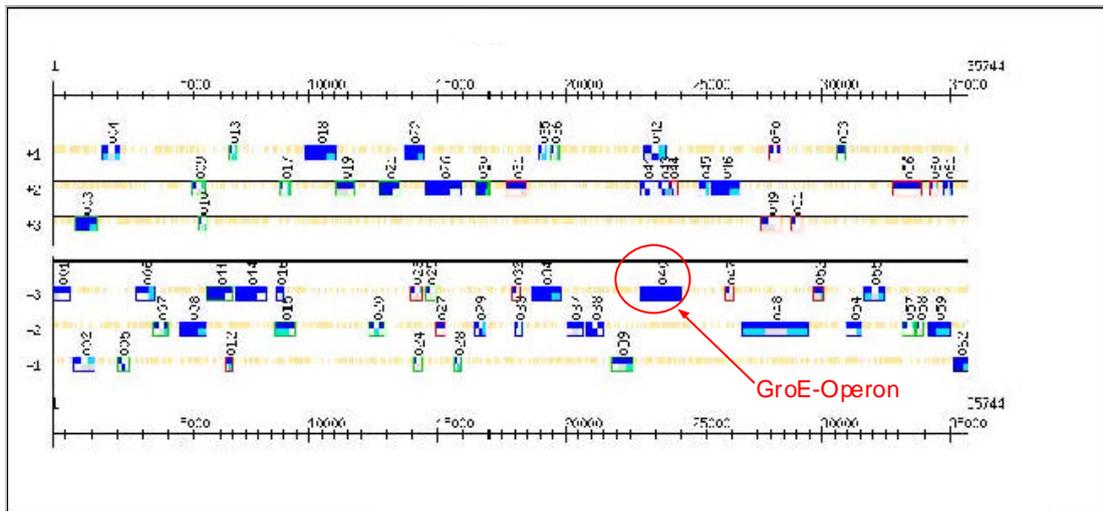


Abbildung 23. GroEL/GroES-Operon und flankierende Gene

Zum Nachweis der korrekten Einbettung der GroEL und GroES Gene wurden die flankierenden Gene mit Blast-Suche auf deren phylogenetischen Ursprung hin untersucht. 030: Ruberythrin (*Methanobacterium thermoautotrophikum*); 34: Aspartat Transaminase, (*Methanococcus janaschii*); 040: GroE-Operon, GroES (*Thermotoga maritima*), GroEL (*Bacillus stearothermophilus*); 046: Ferredoxin-enhaltendes Protein (*Methanobacterium thermoautotrophikum*); 055: nicht definiertes Protein (*Archaeoglobus fulgidus*). In Klammern angegebene Organismen: jeweils höchste Homologie zu den entsprechenden Genen von *M.mazei*.

Eine Analyse des GroE-Operons aus *M.mazei* zeigte eine deutliche Analogie zum bakteriellen GroE-Operon aus *E.coli*: beide sind polycistronisch reguliert (Abbildung 24).

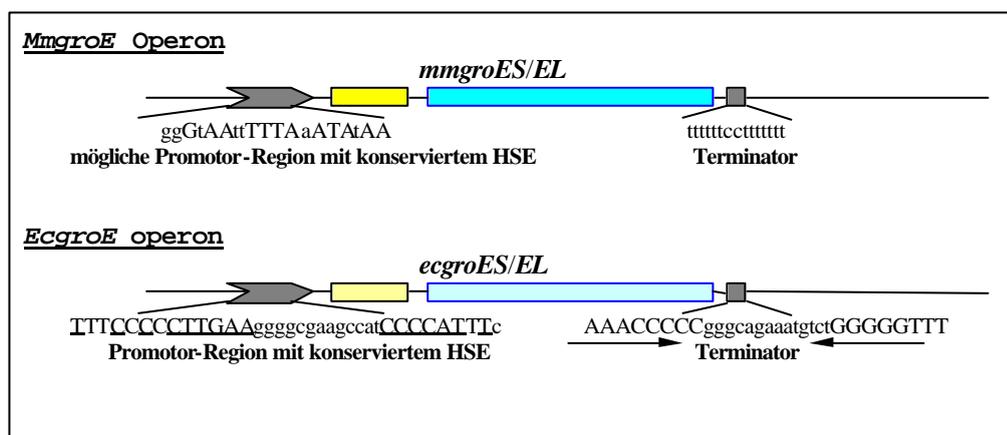


Abbildung 24. Vergleich der GroE-Operons von M.mazei und E.coli

Sowohl das archaelle als auch das bakterielle GroE-System werden von einem polycistronischen Operon reguliert. Beide Promotorregionen beinhalten ein Hitzeschockelement (HSE) und weisen hohe Homologien zu den archaellen bzw. bakteriellen Konsensussequenzen auf (siehe Erläuterung im Text).

Eine detaillierte Untersuchung der Promotorregion zeigte schließlich, dass das archaeelle GroE-Operon von einem Promotorelement reguliert wird, das eine hohe Homologie zu der folgenden archaeellen Promotor Konsensus-Sequenz aufweist:

AAANNTTTATATA (Brown *et al.* 1989; Baumer *et al.* 2000)

Die archaeelle Promotorsequenz des GroE-Operons wurde durch Sequenzvergleich mit der entsprechenden archaeellen Konsensussequenz ermittelt. Die in der Abbildung 24 wiedergegebene Sequenz stellt den wahrscheinlichen Promotor dar, da er die höchste Homologie mit der Konsensus-Sequenz aufweist. Auch die Terminator-Sequenz ist eindeutig archaeellen Ursprungs (Brown *et al.* 1989). Der Nachweis der genetischen Information für ein Gruppe I Chaperonin System im Genom von *M.mazei* ist somit eindeutig nicht auf eine bakterielle Kontamination während des Sequenzierungsprozesses zurückzuführen. Interessanterweise birgt die archaeelle Promotorsequenz auch ein Hitzeschockelement (HSE), das eine hohe Homologie zu der archaeellen Konsensus-Sequenz für Hitzeschockelemente aufweist:

CCGAAAAGTTTATATAGAA (Brown *et al.* 1989; Gelfand *et al.* 2000)

Dies ist ein Hinweis, dass der archaeelle GroE-Operon analog zum bakteriellen GroE-Operon Hitze-induzierbar ist.

Zwischenzeitlich wurden die Genome zweier weiterer Vertreter der Familie der *Methanosarcinales*, zu denen auch der hier untersuchte Organismus *Methanosarcina mazei* gehört, sequenziert. Eine Analyse der Genome ergab, dass sowohl das Archeaon *Methanosarcina barkeri* (www.jgi.doe.gov) als auch *Methanosarcina acetivorans* (Galagan *et al.* 2002) die genetische Information für das Gruppe I Chaperonin System besitzen. Ein Vergleich der GroEL und GroES Sequenzen dieser Spezies ergab eine Homologie von über 90 %. Dies legt nahe, dass sämtliche GroE-Proteine einen gemeinsamen Vorfahren haben.

3.2.3. Das archaeele GroEL weist eine hohe Homologie zu anderen Gruppe I Chaperoninen auf

Für einen detaillierten Sequenzvergleich wurden die Hsp60 - und Hsp10 Proteine der folgenden Organismen miteinander verglichen (Abbildung 25).

Archaea:

- *Methanosarcina mazei* (METMA), Zytosol
- *Methanosarcina barkeri* (METBA), Zytosol
- *Methanosarcina acetivorans* (METAC), Zytosol

Bakteria:

- *Escherichia coli* (ECOLI), Zytosol

Eukarya:

- *Homo sapiens* (HUMAN), Mitochondrium
- *Arabidopsis thaliana* (ARATH), Chlorplast

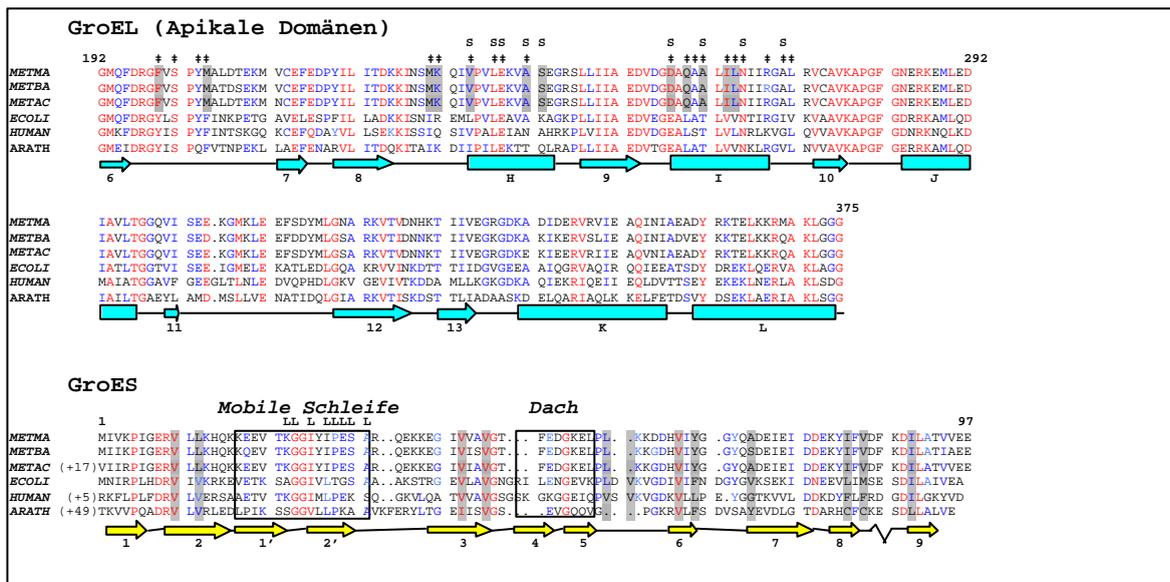


Abbildung 25. Sequenzvergleich von GroEL- und GroES-Proteinen

Die archaeele GroEL und GroES-Proteine weisen eine hohe Homologie zu den anderen Vertretern auf. Stark konservierte Aminosäuren sind rot, ähnliche Aminosäuren sind blau gefärbt. S: Substrat-Bindestelle (Chen and Sigler 1999; Farr *et al.* 2000); ‡ GroES-Bindestelle (Fenton *et al.* 1994; Buckle *et al.* 1997; Brocchieri and Karlin 2000). L: GroEL-Bindestelle (Brocchieri and Karlin 2000). Nummern an den Sequenzen geben die Position der Aminosäuren des *E.coli* GroEL bzw. *E.coli* GroES wieder. Grau unterlegte Aminosäuren innerhalb der GroEL-Sequenzen unterstreichen die Konservierung funktioneller Aminosäuren innerhalb der archaeele GroEL-Sequenzen. Bei dem Vergleich der GroES-Sequenzen sind hydrophobe Reste durch Graufärbung gekennzeichnet. Pfeile bezeichnen β-Faltblätter, Rechtecke α-Helices (Xu *et al.* 1994; Hunt *et al.* 1996). Die Kästen rahmen die mobile Schleife sowie die Dachregion innerhalb der GroES-Proteine ein.

Der hier dargestellte Sequenzvergleich zeigt eine hohe Homologie der apikalen Domänen, insbesondere im Bereich der funktionellen Aminosäuren. Dies deutet auf eine starke Konservierung der GroEL-Proteine in sämtlichen Organismen hin. Hervorzuheben ist die besonders starke Konservierung innerhalb der drei archaeellen Sequenzen. Diese hohe Homologie lässt vermuten, dass es einen gemeinsamen Ursprung der archaeellen GroE-Proteine gibt.

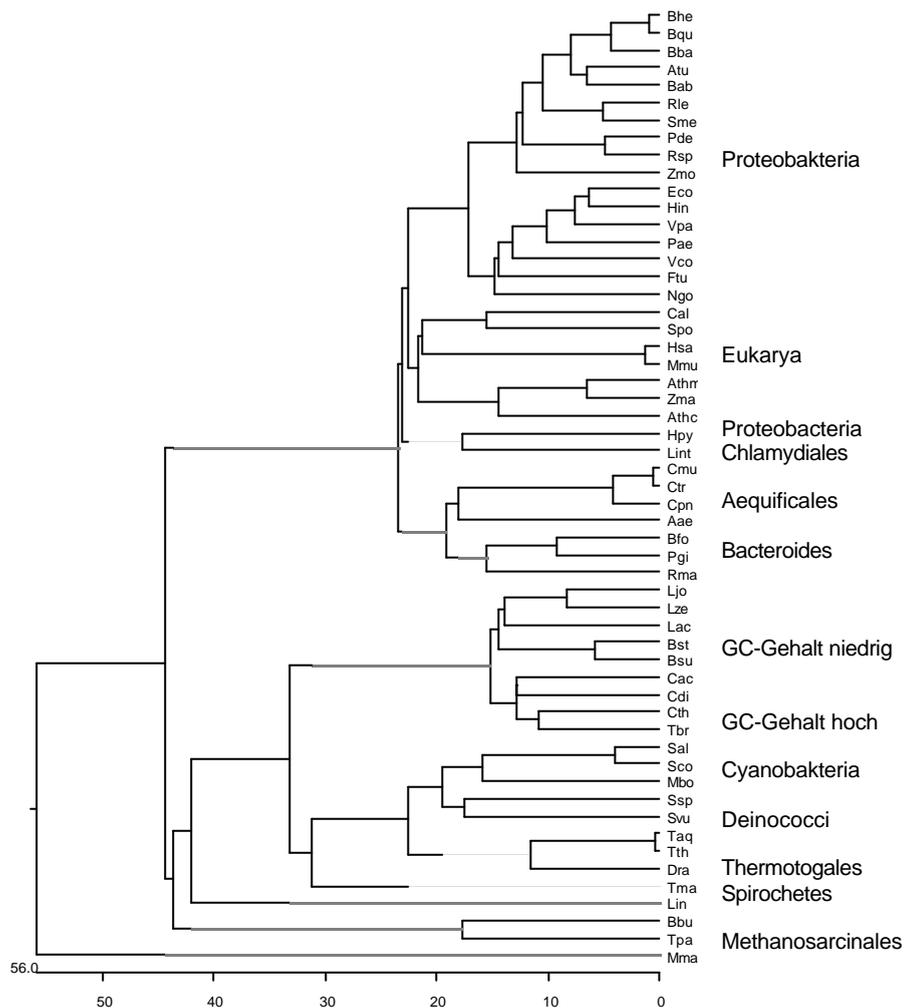


Abbildung 26. Phylogenetische Analyse des *Methanosarcina mazei* Gö1 GroEL
 Durch Erstellung eines Stammbaumes mit ausgewählten GroEL-Proteinen verschiedener Spezies aus allen Organismen-Reichen war es möglich, nachzuweisen, dass das archaeelle GroEL von *M.mazei* (Mma) seinen Ursprung sehr früh in der Evolution hat. Dieser Stammbaum wurde mit den kompletten GroEL-Sequenzen der nebenstehenden Organismen durchgeführt. (siehe 2.11.3, Material und Methoden).

3.2.4. *MmGroEL* und *MmTHS* sowie die Kofaktoren *MmGroES* und *MmGimC* sind im Zytoplasma exprimiert

Das Genom eines Organismus enthält immer auch Gene, die nicht zu funktionellen Proteinen übersetzt werden. Es handelt sich um sogenannte „stille Gene“. Da alle drei beschriebenen methanogenen Archaea auch das Gruppe II Chaperonin Thermosom besitzen, war es durchaus naheliegend, dass die Gruppe I Chaperonine lediglich als „stilles Gen“ vorlagen. Um dies zu klären, wurde *Methanosarcina mazei* kultiviert und in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet und lysiert. Das Lysat wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 27). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine spezifischen Antikörper gegen die archaeellen Proteine zur Verfügung standen, wurde der Western Blot mit Antikörpern durchgeführt, die gegen GroEL und GroES aus *E.coli* sowie Thermosom aus *T.acidophilum* und GimC aus *M.thermoautotrophikum* hergestellt wurden.

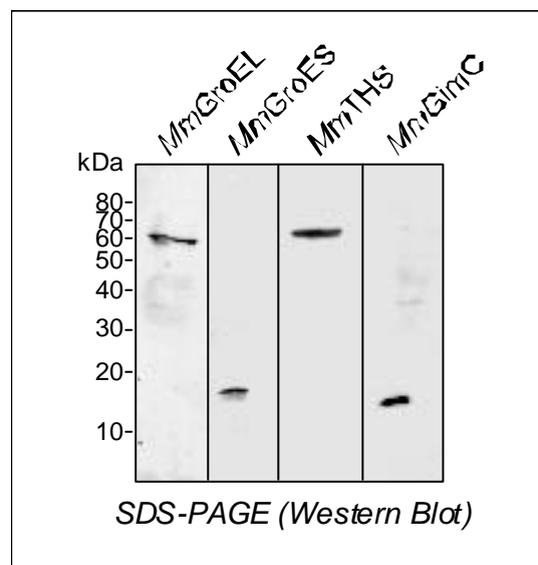


Abbildung 27. Beide Chaperonine und Kofaktoren werden in *M.mazei* exprimiert
M.mazei Zellen wurden lysiert und zentrifugiert. Das Lysat wurde chromatographisch per SDS-PAGE analysiert. Durch Western Blot mit entsprechenden Antikörpern war es möglich die Expression von GroEL (*MmGroEL*), GroES (*MmGroES*), Thermosom (*MmTHS*) sowie GimC (*MmGimC*) im Lysat von *M.mazei* nachzuweisen.

Auf Grund der hohen Homologie der Chaperone *MmGroEL* und *MmTHS* sowie *MmGroES* und *MmGimC* mit den entsprechenden bakteriellen und

archaeellen Proteinen ist davon auszugehen, dass auch diese Proteine als Oligomere in der Zelle vorliegen. Um dies zu testen, wurde Lysat auf eine Gelfiltrations-Chromatographiesäule aufgetragen, die vorher mit entsprechenden Markern kalibriert wurde (Abbildung 28). Auf diese Weise konnte die ungefähre Größe der Proteine ermittelt werden.

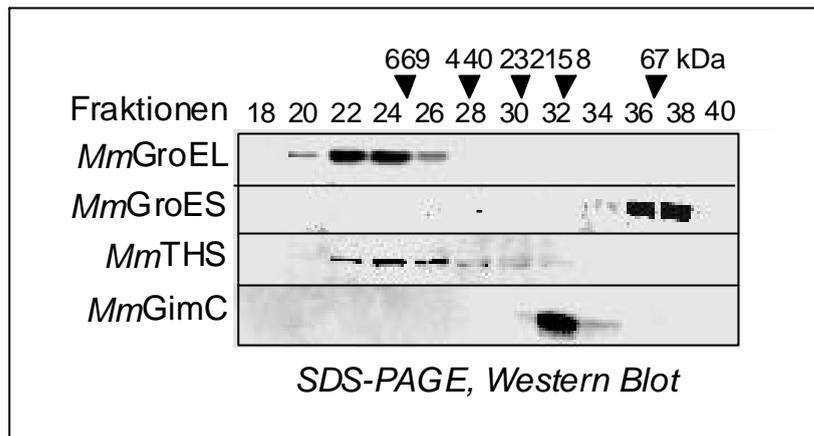


Abbildung 28. Die Chaperonine und Kofaktoren sind oligomere Proteine

Lysat von *M.mazei* wurde über eine Größenausschluss-Chromatographie aufgetrennt und die Fraktionen mit SDS-PAGE analysiert. Die Proteine konnten durch Western Blot mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit den Standardmarkern zeigt, dass *MmGroEL*, *MmGroES*, *MmTHS* und *MmGimC* in der Zelle zu oligomeren Komplexen assemblieren.

Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, eluieren beide Chaperonine früh von der Säule. Dies lässt eine hochmolekulare Struktur vermuten. In der Tat lässt ein Vergleich der Elutionsprofile aller hier getesteten Proteine mit den Standardmarkern darauf schließen, dass alle vier Proteine zu oligomeren Komplexen assemblieren, analog zu dem Verhalten der homologen Proteine aus Archaea und Bakteria.

Die elektronen-mikroskopische Aufnahme (Abbildung 29) zeigt eine siebenfache Symmetrie des archaeellen GroEL. Das deutet darauf hin, dass die Struktur des archaeellen Gruppe I Chaperonins konserviert ist, denn auch das bakterielle GroEL weist eine siebenfache Symmetrie auf (Abbildung 3).

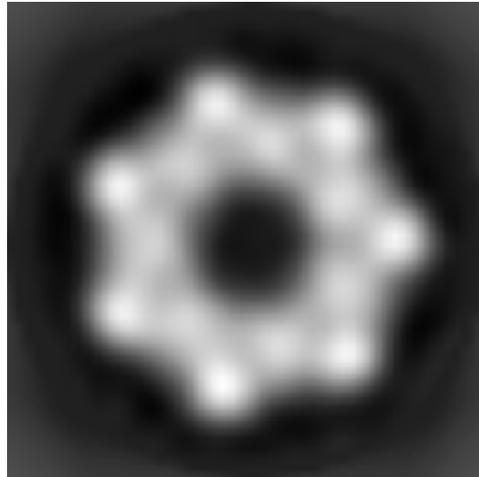


Abbildung 29. EM-Aufnahme des archaeellen GroEL

Eine siebenfache Symmetrie ist deutlich zu erkennen. Demnach assemblieren die Untereinheiten des archaeellen GroEL zu einem heptameren Ring, analog dem bakteriellen GroEL. *MmGroEL* wurde auf 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aufkonzentriert und mit 2% (Gewicht/Volumen) Uranyl Acetat markiert. Gezeigt ist eine Mittellung aus 785 Molekülen.

3.2.5. *MmGroEL* und *MmTHS* sind abundante, Stress induzierbare Proteine

Die Koexistenz von Gruppe I und Gruppe II Chaperoninen in ein und demselben zellulären Kompartiment eines Organismus ist so bisher noch nicht beschrieben worden. Dies wirft folgende Fragen auf: Gibt es zwei verschiedene Gruppen von Substraten, die entweder GroEL oder Thermosom zur Vermittlung der korrekten Faltung benötigen, oder spielt hier die Wachstums-Situation eine Rolle? Ist beispielsweise eines der beiden Chaperonine nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen, zum Beispiel Stress, exprimiert oder liegen beide Chaperone in gleichen Expressionsniveaus vor? Um dieser Frage nachzugehen, wurden nun die hochmolekularen Fraktionen, die beide Chaperonine enthalten, gesammelt

und auf ein natives Gel aufgetragen, um deren Abundanz zu vergleichen (Abbildung 30).

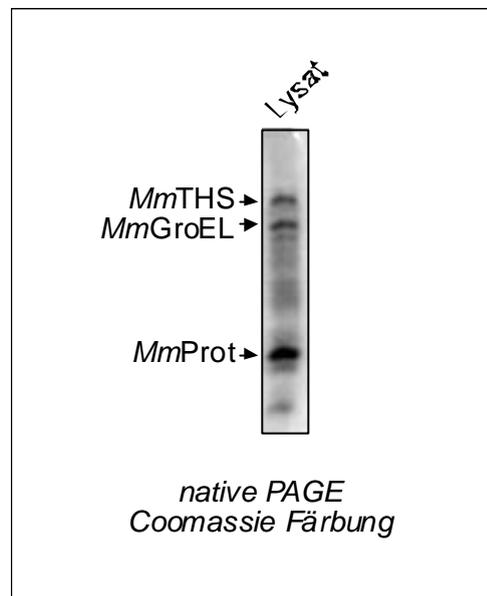


Abbildung 30. Die beiden Chaperonine sind equimolar exprimiert

Eine Analyse der hochmolekularen Fraktionen des Lysat von *M.mazei* mittels nativer PAGE (4.5%) ergab, dass beide Chaperonine equimolar exprimiert sind und zusammen mit dem Proteasom (*MmProt*) zu den abundantesten hochmolekularen Proteinen gehören.

Beide Chaperone liegen unter den getesteten Standard-Wachstumsbedingungen ungefähr equimolar in der Zelle vor. Die in Abbildung 30 gezeigten Banden wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und den entsprechenden Proteinen zugeordnet. Beiden Chaperoninen kommt offensichtlich eine entscheidende Bedeutung in der Zelle zu, da sie zusammen mit dem Proteasom zu den abundantesten hochmolekularen Proteinkomplexen gehören.

Um nun zu testen, ob beide Chaperonine Stress-induzierbar sind, wurden Zellen in der frühen exponentiellen Phase hitzeinduziert (45°C) und nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert sowie auf einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 31).

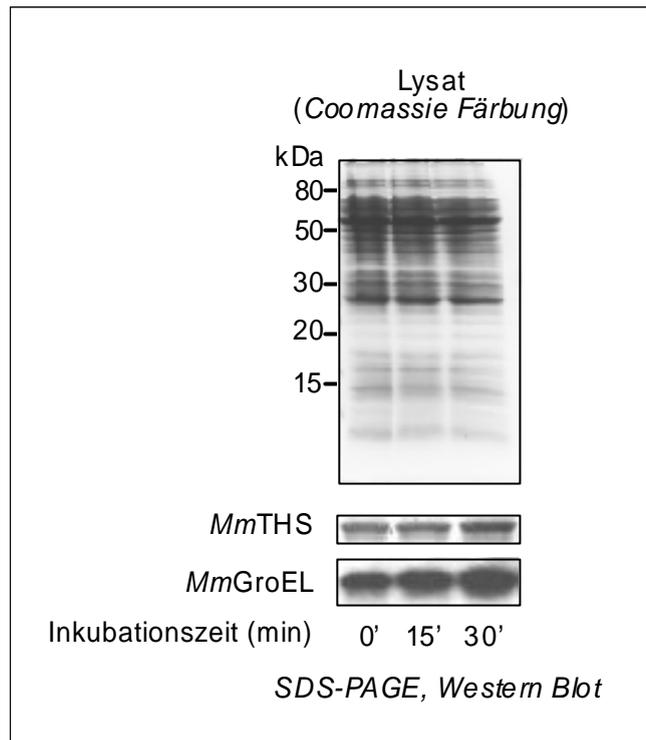


Abbildung 31. Hitzeinduktion der Chaperonine

Eine *M.mazei* Kultur wurde unter Standard-Wachstumsbedingungen bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen. Anschließend wurde die Kultur bei 45°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und nach Lyse sowie Zentrifugation chromatographisch mittels SDS-PAGE analysiert. Die Expression beider Chaperonine wurde durch Western Blot nachgewiesen.

Die Coomassie-Färbung zeigte keine Änderung der Intensität der dominanten Banden. Ein Western Blot mit Antikörpern gegen die Chaperonine ergab allerdings, dass beide Chaperonine nach Inkubation bei 45 °C bereits nach 15 Minuten zunehmend exprimiert werden. Nach 30 Minuten konnte eine 2 bis 3-fache Induktion nachgewiesen werden. Demnach sind beide Chaperonine in gleichem Maße Hitze-induzierbar.

3.2.6. Klonierung und Expression von rekombinanten Gruppe I Chaperonin-System aus *Methanosarcina mazei*

Um funktionelle Studien mit dem archaellen Gruppe I Chaperonin-System durchführen zu können, wurden *MmGroEL* und *MmGroES* mittels geeigneter Primer durch PCR amplifiziert. Dabei wurde genomische DNA von

Methanosarcina mazei als Matrize verwendet. Die so erhaltenen Kopien der GroEL und GroES Gene wurden zur Vervielfältigung in entsprechende Klonierungsvektoren integriert. Anschließend wurden die Kopien in Expressions-Plasmide integriert. Nach Transformation in *E.coli* konnte die Expression der beiden Proteine induziert werden und die Proteine aus dem Zytoplasma aufgereinigt werden. Auf diese Weise konnten ausreichende Mengen an rekombinantem Protein hergestellt werden. Beide Proteine waren nach Inkubation oligomer und konnten zur funktionellen Analyse verwendet werden.

3.2.7. Das archaeele Gruppe I Chaperonin *MmGroEL* hat eine Aggregations-hemmende Eigenschaft

Das mitochondriale Enzym Rhodanese vom Rind gilt als Modellsubstrat für funktionelle Analysen von Chaperonen und Chaperoninen, wie in Kapitel 3.17 beschrieben. Eine funktionelle Untersuchung des Gruppe I Chaperonin Systems aus dem Archaeon *Methanosarcina mazei* wurde mit Hilfe dieses Substrates durchgeführt. Die Stabilisierung von nicht gefalteten Proteinen und die Prävention der Aggregatbildung gelten als die allgemeinen Merkmale molekularer Chaperone. Aggregationsassays dienen daher dem Nachweis der Chaperonaktivität. Die Bildung von Proteinaggregaten kann durch Lichtstreuung ermittelt werden, die beim Durchstrahlen einer Reaktionslösung verursacht wird. Eine Lichtstreuung führt zu einer Abnahme der Lichtintensität, die spektrometrisch gemessen werden kann. Die Verhinderung der Lichtstreuung hängt bei einem Aggregationsassay von der Konzentration von Substrat und Chaperon ab. Denaturierte Rhodanese wurde in einer Pufferlösung verdünnt, die unterschiedliche Konzentrationen von *MmGroEL* enthielt. Bei einer equimolaren Konzentration von archaeelem Chaperonin und dem denaturierten Substrat wurde die Aggregation komplett verhindert (siehe Abbildung 32).

Somit ist gezeigt, dass *MmGroEL* eine ausgeprägte Chaperon-Eigenschaft hat.

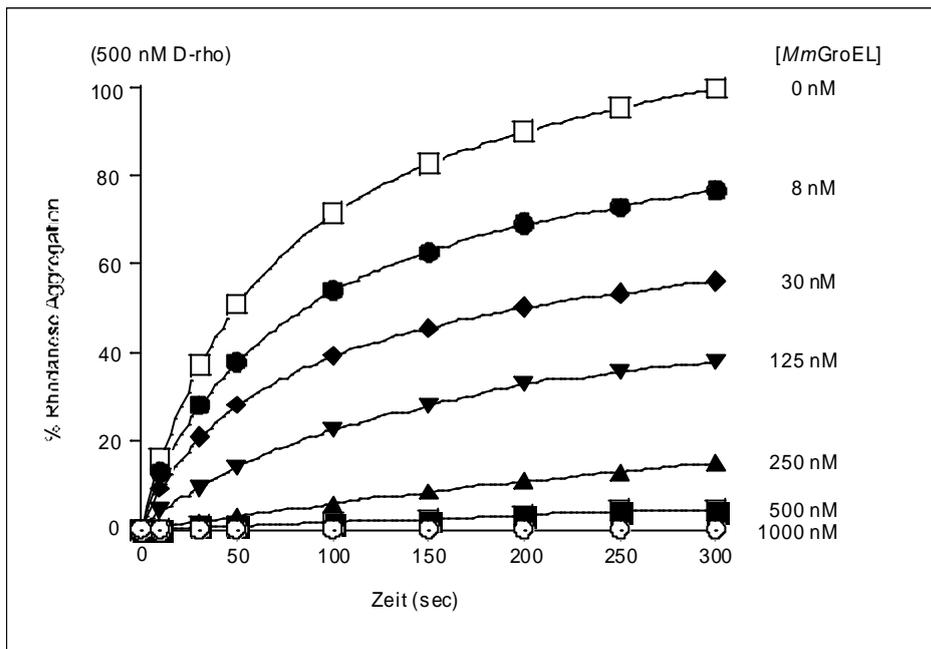


Abbildung 32. *MmGroEL* verhindert die Aggregation von denaturierter Rhodanese
 Die Aggregation von denaturierter Rhodanese (D-Rho) wird in einer Konzentrations-abhängigen Weise von *MmGroEL* verhindert. 500 nM D-Rho wurden in Puffer verdünnt der unterschiedliche Konzentrationen des Chaperonins *MmGroEL* enthielt. Die Aggregatbildung wurde durch Messung der Lichtstreuung bei 320 nm spektrometrisch berechnet und ist als Prozentsatz von 500 nM aggregierter Rhodanese wiedergegeben.

3.2.8. Das archaeele Chaperonin-System *MmGroEL*/*GroES* vermittelt die Faltung denaturierter Rhodanese in einer ATP-abhängigen Reaktion

GroEL aus *Escherichia coli* gilt als das am besten untersuchteste Gruppe I Chaperonin. Die Eigenschaften dieses Chaperonins wurden vor allem mit Hilfe des Substrates Rhodanese ermittelt. *EcGroEL* vermag nicht nur die Aggregation von denaturierter Rhodanese und anderen Substraten zu hemmen, sondern zusammen mit dem Kofaktor *EcGroES* auch die Faltung zu funktionsfähigen Proteinen zu vermitteln. Diese Eigenschaft, die letztlich ein Chaperonin auszeichnet, sollte nun auch für das archaeele Gruppe I Chaperonin getestet werden.

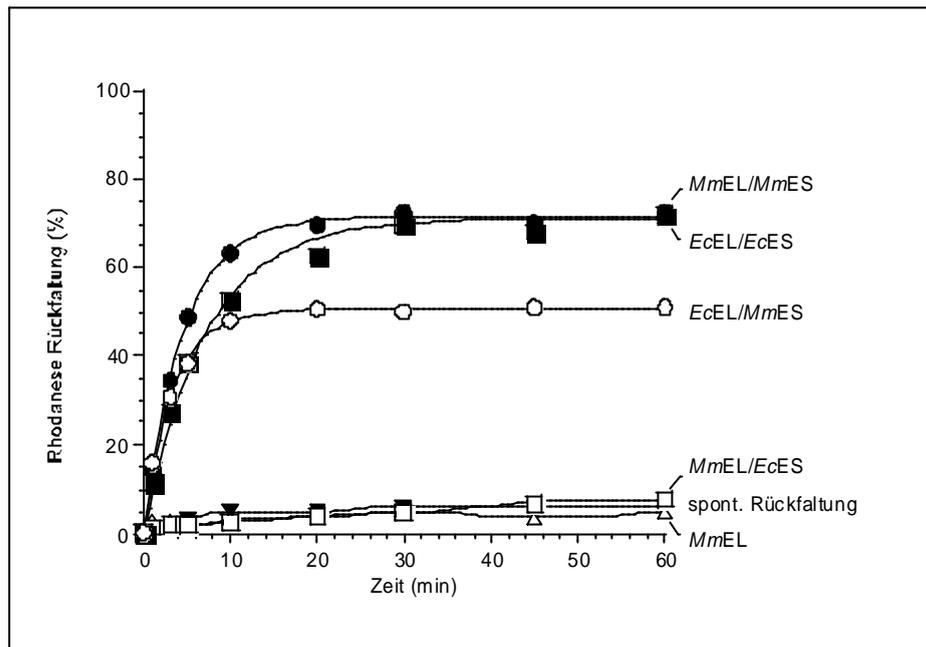


Abbildung 33. Das archaeelle *MmGroE*-System vermittelt die Faltung von denaturierter Rhodanese

MmGroEL faltet nur in Kooperation mit dem endogenen *MmGroES* in einer ATP-abhängigen Reaktion. 500 nM D-rho wurde mit 500 nM GroEL inkubiert. Die Faltungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 μ M GroES und 5 mM ATP gestartet. Die Rhodaneseaktivität wurde spektrometrisch gemessen und ist als Prozentsatz der Aktivität von 500 nM nativer Rhodanese wiedergegeben.

Dazu wurde Rhodanese entsprechend der oben definierten Bedingungen in eine Pufferlösung verdünnt, die *MmGroEL* in gleicher Molarität enthielt. Eine Zugabe des Kochaperonins GroES führt nun dazu, dass das Substrat in die zylinderförmige Kavität desjenigen Ringes verdrängt wird, an den das GroES bindet. Die Rückfaltungsreaktion wird nun durch Zugabe von ATP gestartet.

Die Ergebnisse zeigten, dass das archaeelle Gruppe I Chaperonin System in der Lage ist, Rhodanese mit der gleichen Effizienz zu falten wie bakterielles GroEL (Abbildung 33). Allerdings ist der kinetische Verlauf der Rückfaltung geringfügig langsamer. Da die Sequenzvergleichsanalysen eine hohe Homologie sowohl der GroEL Proteine als auch der GroES Proteine aufwiesen, war es naheliegend zu untersuchen, ob ein Austausch der Kochaperonine auch zu aktiven Rückfaltungssystemen führt. In Abbildung 33 ist zu sehen, dass ein System, bestehend aus *MmGroES* und *EcGroEL* aktiv ist, und zwar mit der gleichen Kinetik wie das homologe bakterielle Chaperonin System. Allerdings ist zu beobachten, dass hier nicht der gleiche

Ertrag an rückgefalteter Rhodanese erreicht wurde. Im Gegensatz dazu ist das Chaperonin von *M.mazei* zusammen mit dem GroES von *E.coli* nicht aktiv. Es ist hier keine Rhodanese-Aktivität zu erkennen. Auch das archaeelle Chaperonin alleine ist nicht faltungsaktiv. Daraus wird deutlich, dass *MmGroEL* nur mit dem endogenen Kochaperonin *MmGroES* funktionsfähig ist. Die Aktivität eines Chaperonin Systems hängt also von der Zusammenwirkung des Chaperonins mit dem endogenen Kochaperonin ab. Offensichtlich bestehen hier Unterschiede zwischen den beiden Systemen. Parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Costa Georgopoulos (Universität Genf) *in vivo* Substitutionsversuche durchgeführt. Dabei wurde ein Plasmid, das den archaeellen GroE-Operon enthielt, in *E.coli* Zellen transfiziert, deren GroE-Operon deletiert war. Die Experimente zeigten interessanterweise, dass die Zellen mit dem exogenen GroE-Operon aus dem Archaeon nicht überlebensfähig waren (C.Georgopoulos, persönliche Kommunikation). Die hohe Homologie ließ ein solches Ergebnis nicht vermuten. Eine detaillierte Analyse der funktionellen Bereiche von GroEL und GroES, also solchen Aminosäureresten, die bei der Interaktion der beiden Proteine involviert sind, zeigt, dass hier nur geringfügige Unterschiede bestehen (siehe Abbildung 25). Ein Vergleich der mobilen Schleifen innerhalb der GroES-Proteine ergab allerdings eine höhere Hydrophobizität bei *EcGroES* (+ 0.580) als bei *MmGroES* (- 0.567).

<i>M.mazei</i> :	KEEVTKGGIYPESA	(4 hydrophobe Aminosäuren)
	Hydrophobizität:	- 0.567
<i>E.coli</i> :	VETKSAGGIVLTGSA	(6 hydrophobe Aminosäuren)
	Hydrophobizität:	+ 0.580

Abbildung 34. Hydrophobizität der mobilen Schleifen innerhalb der GroES-Proteine
EcGroES ist innerhalb der Region, die an GroEL bindet (mobile Schleife) hydrophober als *MmGroES*. Berechnet mit ProtScale Tool (Kyte and Doolittle 1982).

3.2.9. Das archaeele Chaperonin-System weist eine langsame Dissoziationsrate auf

Bei einem Chaperonin-vermittelten Faltungszyklus ist der Prozess der GroES-Dissoziation von GroEL limitierend, da dies die Freisetzung des Substrates verhindert und somit auch die Möglichkeit neues Substrat zu binden. Auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse war es von Interesse, diesen Faltungszyklus genauer zu untersuchen. Eine Technik, die es ermöglicht Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu analysieren ist die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (BIAcore-Analyse). Hier wird ein Protein auf einem Chip immobilisiert, während das andere in einer flüssigen Phase über diesen Chip geleitet wird. Eine Interaktion der Proteine führt nun zu einer stärkeren Plasmonresonanz auf dem Chip, das somit eine Funktion der Bindungsstärke ist.

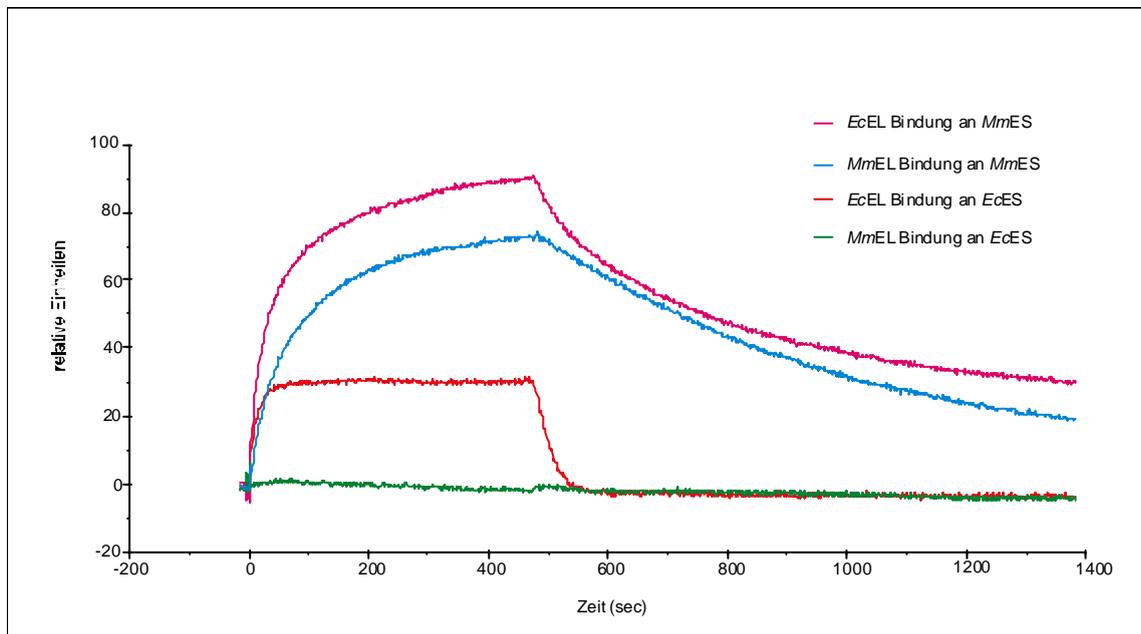


Abbildung 35. Oberflächen-Plasma-Resonanz zum Nachweis der GroEL-GroES Wechselwirkungen.

Die Experimente wurden bei 25°C durchgeführt. Auf dem Chip war entweder *MmGroES* (—, —) oder *EcGroES* (—, —) immobilisiert. Im Puffer befand sich *MmGroEL* oder *EcGroEL*, wie angegeben. Dargestellt ist die Dissoziation der GroEL-Proteine (lösliche Phase) von GroES (feste Phase).

Auf Abbildung 35 ist die GroES-Assoziation und -Dissoziation in beiden Chaperonin-Systemen gegenübergestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Dissoziation von GroES im bakteriellen System wesentlich schneller stattfindet als im archaeellen System. Darin könnte der Grund liegen, dass das archaeelle Chaperonin-System in *E.coli* nicht funktionell ist. Aus Abbildung 35 geht auch hervor, dass *MmGroES* wesentlich langsamer von *EcGroEL* dissoziiert als dies im endogenen bakteriellen System der Fall ist. Dies ist ein Hinweis auf eine stärkere Bindung des archaeellen Kofaktors an GroEL aus *E.coli*. Schließlich ist gezeigt, dass *MmGroEL* nicht an *EcGroES* bindet. Das erklärt warum ein Chaperonin-System bestehend aus *MmGroEL* und *EcGroES* nicht funktionell ist. Offenbar kommt es zwischen diesen beiden Proteinen zu keinerlei Wechselwirkung.

3.2.10. *MmGroEL* hat eine schwache ATPase-Aktivität

Es wurde bereits erwähnt, dass die Rückfaltung eines Substrates durch das Chaperonin zusätzlich auch durch dessen ATPase Aktivität bestimmt wird. Die Geschwindigkeit mit der ATP zu ADP hydrolysiert wird, ist demnach ein Parameter, der die Effizienz eines Chaperonins beeinflusst.

Die ATPase Aktivität wird durch einen Versuch bestimmt, bei dem die Bildung von Malachit-Grün spektroskopisch nachgewiesen wird. Die Versuche ergaben, dass das archaeelle GroEL eine wesentlich geringere ATPase Aktivität als das bakterielle GroEL besitzt.

In der geringeren ATPase-Aktivität von *MmGroEL* liegt möglicherweise der Grund für die langsamere Dissoziation im Chaperonin System von *M.mazei*.

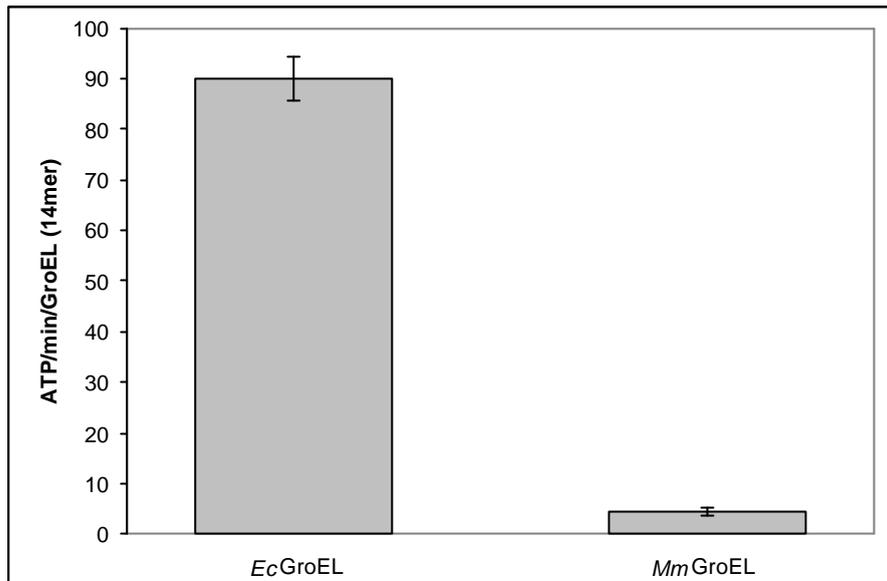


Abbildung 36. *MmGroEL* hat eine schwächere ATPase-Aktivität als *EcGroEL*

1mM GroEL wurde vorinkubiert und die Reaktion mit 2 mM ATP gestartet. Die Hydrolyserate wurde nach Stopp der Reaktion mit CDTA und Zugabe von Malachit-Grün durch Absorptionmessung bei 640 nm ermittelt. Die Versuche zur Messung der ATP Hydrolyse wurden bei 37°C durchgeführt.

Betrachtet man allerdings die Ergebnisse des Rhodanese Rückfaltungsexperimentes, die eine annähernd übereinstimmende Effizienz beider Chaperonin Systeme vermuten ließen (Abbildung 33), schien jedoch eine weitere Untersuchung notwendig. Hier ist anzumerken, dass Rhodanese ein monomeres Substrat ist. Das heißt, es ist auch als Monomer aktiv. Da die Substrate des Enzyms Rhodanese, Thiosulfat und Zyanit, in die Kavität des Chaperonins eindringen können, ist die Aktivität der Rhodanese auch dann nachweisbar, wenn sich das Enzym noch in der Kavität des Chaperonins befindet. Die im Rhodanese-Rückfaltungs Versuch (Abbildung 33) gemessene Aktivität kann somit zum Teil von noch gebundenem, aber bereits gefalteten Substrat stammen. Insofern gibt der Rückfaltungsversuch lediglich einen Aufschluss über den Prozentsatz gefalteter Rhodanese, nicht aber über dessen Status, also ob das Substrat bereits frei in Lösung vorliegt.

3.2.11. Das archaeele Chaperonin-System entlässt das gefaltete Substrat mit deutlicher Verzögerung

Um die Kinetik der Substratfreilassung zu bestimmen, ist es nötig den Substrat-Chaperonin Komplex zu definierten Zeitpunkten zu untersuchen. Es ist also erforderlich diesen Komplex quasi „einzufrieren“, um bei einer Analyse sicher zu gehen, dass es zu keiner weiteren Faltung kommt. Dazu ist es nötig, das die Faltungsreaktion treibende ATP schnellst möglich zu hydrolysieren. Im ADP-gebundenem Zustand ist der Komplex stabil, vorausgesetzt es ist kein weiteres ATP in Lösung, das durch Bindung an den trans-Ring die Dissoziation von GroES und damit die Freilassung des Substrates auslöst. Dies kann durch Zugabe von Glukose und Hexokinase erreicht werden.



Bei einer *MmGroE*-vermittelten Rhodanese-Rückfaltung führte die Zugabe von Glukose und Hexokinase zu einem sofortigen Stopp der Rückfaltungsreaktion (Abbildung 37 A). Dieser Effekt konnte nun genutzt werden, um anschließend die Reaktionslösung mittels einer Größenaufschluss-Chromatographie (Gelfiltration) aufzutrennen (Abbildung 37 B).

Nach Zugabe von Glukose und Hexokinase (5 min nach Start) wurde ein Aliquot aus der Reaktionslösung entnommen und mittels Gelfiltration aufgetrennt. Die entsprechenden Fraktionen wurden auf Rhodanese-Aktivität getestet. Ein Vergleich der Gelfiltrations-Analysen zwischen dem bakteriellen und dem archaeele Systemen zeigt deutliche Unterschiede.

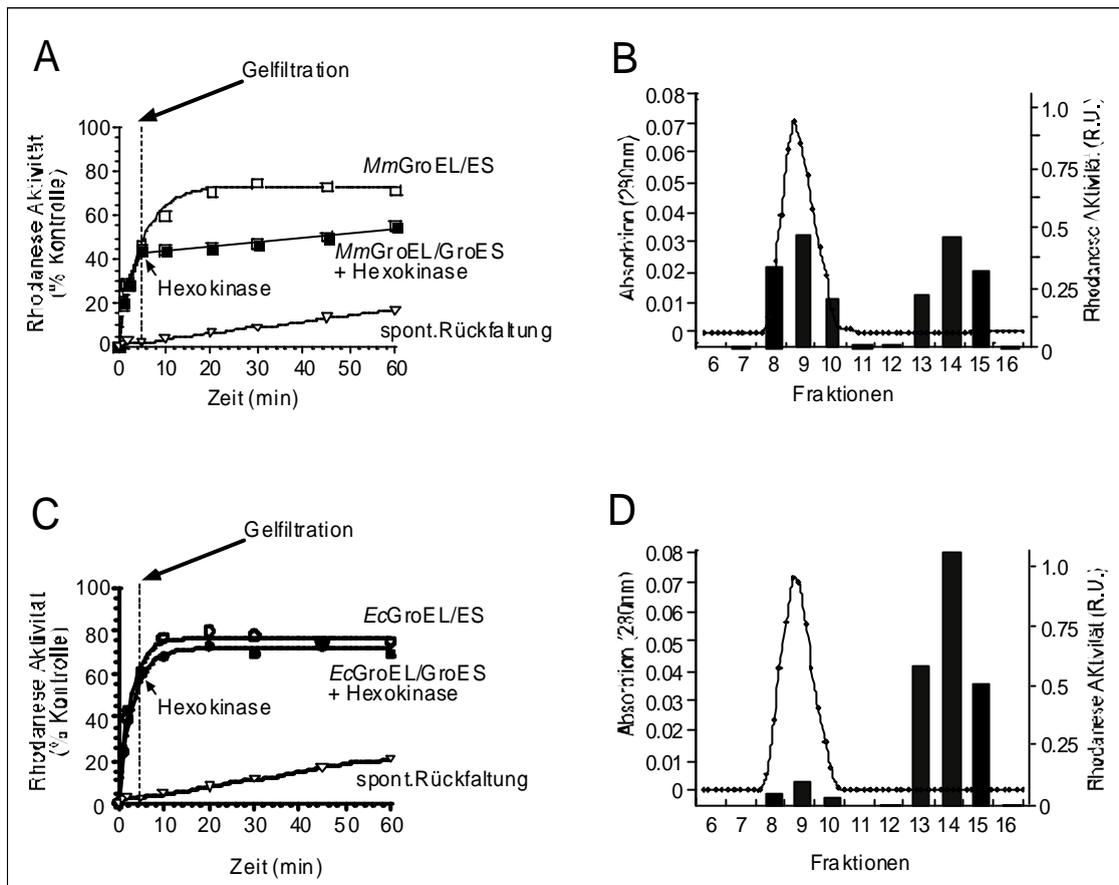


Abbildung 37. Substratzyklus von *MmGroEL* im Vergleich zu *EcGroEL*

Eine Chaperonin-vermittelte Rhodanese-Rückfaltungsreaktion wurde mit Hexokinase gestoppt und der Substrat-Chaperonin-Komplex mittels Gelfiltrationsanalyse untersucht. (A) Rhodanese Rückfaltung mit *MmGroEL/MmGroES* wie in Abbildung 4.10 beschrieben; der Graph beschreibt die Rhodanese-Aktivität als Prozentsatz der Aktivität nativer Rhodanese (% Kontrolle) in Funktion der Zeit (min); (B) Gelfiltration von 100 μ l des Reaktionsansatzes aus (A) zum Zeitpunkt 5 min nach Stopp mit Glukose (25 mM) und Hexokinase (0,3 U/ μ l); Die linke Achse beschreibt die Elution von *MmGroEL* als Absorption bei 280 nm; die rechte Achse beschreibt die Rhodanese Aktivität in den einzelnen Fraktionen (R.U., engl.: *response unit*, relative Einheiten bei der Rhodanese Aktivitätsmessung); (C) Rhodanese Rückfaltung mit *EcGroEL/GroES*; (D) Gelfiltration des Reaktionsansatzes aus (C).

Bei der Rhodanese-Rückfaltung, die durch das bakterielle GroE-System vermittelt wurde, sind nach nur 5 Minuten bereits etwa 90% der gefalteten Rhodanese frei in Lösung. Bei einer Rückfaltung mit dem archaeellen System sind zu dem gleichen Zeitpunkt noch 50% des gefalteten Substrates gebunden (Abbildung 37 B,D)

Es ist hier anzumerken, dass im Falle der Rhodanese-Rückfaltung mit dem bakteriellen Chaperonin-System keine Hemmung der Faltungsreaktion nach

Zugabe von Glukose und Hexokinase zu beobachten ist (Abbildung 37 C). Eine Faltung innerhalb der GroEL-Kavität kann somit selbst nach Zugabe von Glukose/Hexokinase theoretisch noch erfolgen. Der geringe Anteil aktiver, also gefalteter Rhodanese in der Kavität (Abbildung 37 D) deutet jedoch darauf hin, dass der weitaus größte Teil des Substrates bereits vor der Analyse das Chaperonin verlassen hat. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das bakterielle GroE-System gefaltetes Substrat wesentlich schneller entlässt als das archaeelle System.

3.2.12. Ammoniumsulfat stimuliert die ATPase-Aktivität von GroEL

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigten, dass das *MmGroE*-System einen langsameren Substratzyklus aufweist als das bakterielle System. Es wurde bereits geschildert, dass die ATPase Aktivität eines Chaperonins letztlich der limitierende Faktor in einer Substrat-Rückfaltung ist, da nur eine hohe ATPase Aktivität eine schnelle Dissoziation von GroES und somit eine Freilassung des Substrates ermöglicht.

Es galt nun zu untersuchen, ob der langsamere Substratzyklus des archaeellen GroE-System tatsächlich auf der geringeren ATPase-Aktivität beruht, und nicht in einem unterschiedlichen Faltungsmechanismus begründet ist. Dazu wurden die Pufferbedingungen geändert, in dem Ammoniumsulfat zugegeben wurde. Dies ist eine Substanz, deren ATPase-stimulierende Wirkung bereits für bakterielles GroEL sowie für andere Chaperonine nachgewiesen wurde (Kusmierczyk and Martin 2000). Diese Wirkung wurde nun auch für das Chaperonin von *M.mazei* getestet. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass Ammoniumsulfat auch auf *MmGroEL* stimulierend wirkt. Wie auch im Falle des bakteriellen GroEL führte eine Zugabe von Ammoniumsulfat zu einer Verdopplung der ATPase Aktivität von *MmGroEL* (Abbildung 38).

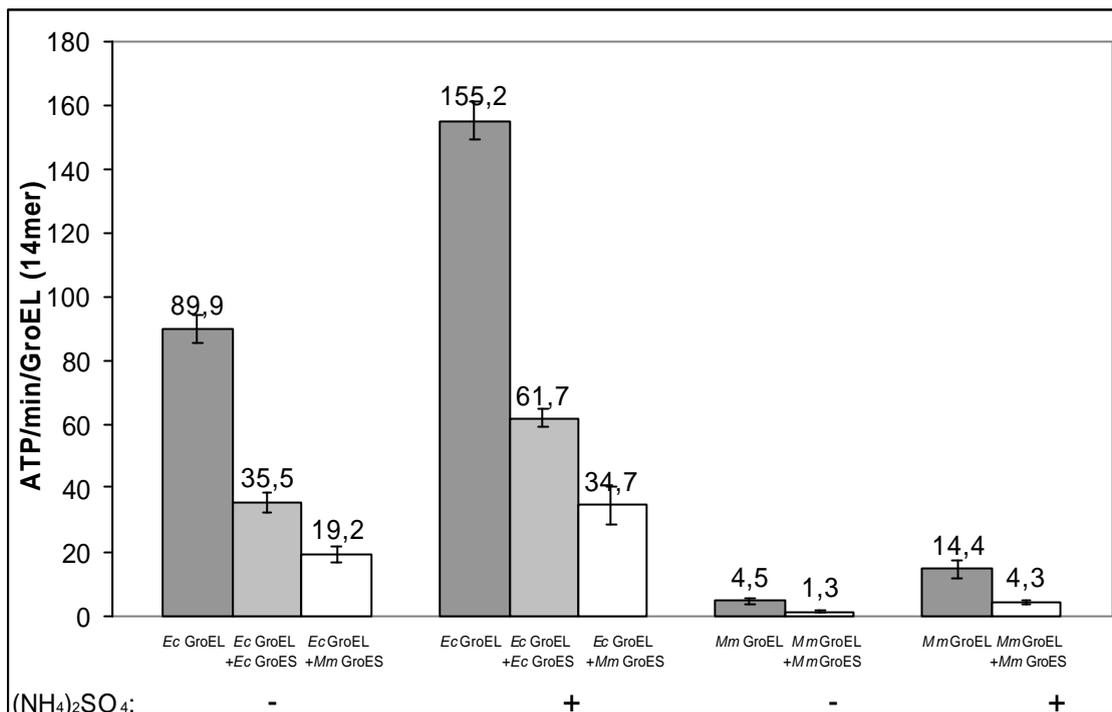


Abbildung 38. Ammoniumsulfat stimuliert die ATPase-Aktivität

Die Messung der ATPase-Aktivität von GroEL wurde durchgeführt wie in Abbildung 4.13 beschrieben. Die Reaktionen fanden unter Standardbedingungen oder in Anwesenheit von 0.5 M (NH₄)₂SO₄ und/oder 2 µM GroES statt.

Hier ist auch die ATPase-hemmende Wirkung des Kofaktors GroES wiedergegeben. Hervorzuheben ist, dass die Bindung von *MmGroES* an *EcGroEL* dessen ATPase-Aktivität stärker hemmt als der endogene Kofaktor *EcGroES*. Dies bestätigt die bereits beobachtete stärkere Bindung zwischen *EcGroEL* und *MmGroES*. Die stimulierende Wirkung von Ammoniumsulfat auf die ATPase-Aktivität beider GroEL-Proteine wird unter allen getesteten Bedingungen deutlich.

Dass sich diese Stimulierung auch auf die GroES-Dissoziation positiv auswirkt, konnte mit BIAcore-Versuchen unter diesen geänderten Reaktionsbedingungen, nachgewiesen werden (Abbildung 39).

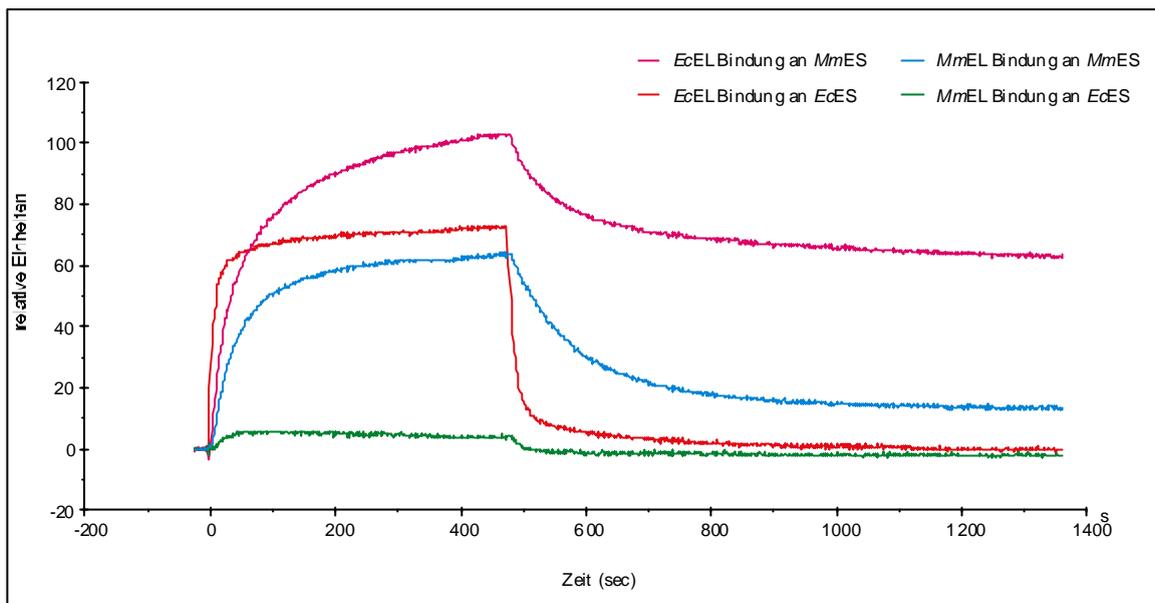


Abbildung 39. Oberflächen-Plasma-Resonanz mit 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Die Experimente wurden bei 25°C durchgeführt. Auf dem Chip ist entweder *MmGroES* (— , —) oder *EcGroES* (— , —) immobilisiert. Im Puffer befindet sich GroEL wie angegeben. Dargestellt ist die Assoziation und Dissoziation der GroEL-Proteine (lösliche Phase) von den GroES-Proteinen (feste Phase).

Ein Vergleich mit Abbildung 35 macht deutlich, dass GroEL wesentlich schneller von GroES dissoziiert. Dies ist sowohl innerhalb der endogenen, als auch der „gemischten“ Chaperonin-Systeme zu beobachten.

3.2.13. Ammoniumsulfat beschleunigt die Substratfreisetzung aus der Kavität von *MmGroEL*

Eine *MmGroE*-vermittelte Rückfaltung von denaturierter Rhodanese unter diesen neuen Bedingungen zeigte, dass das gefaltete Substrat das archaeele Chaperonin tatsächlich schneller verlässt.

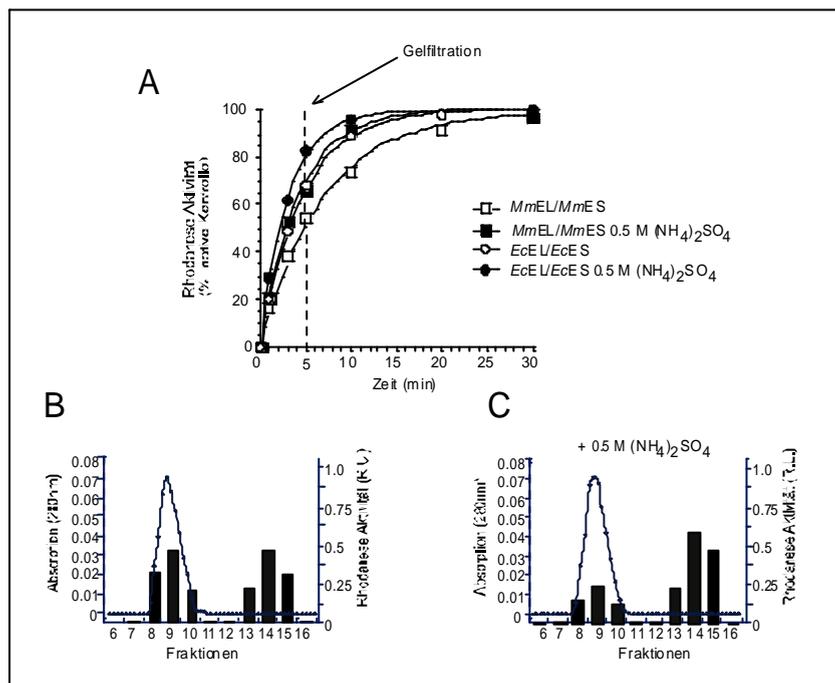


Abbildung 40. Ammoniumsulfat stimuliert den Substrat-Faltungszyklus von archaeellem Chaperonin

Denaturierte Rhodanese (500 nM) wurde unter Standardbedingungen sowie mit 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ rückgefaltet (A). Zum Zeitpunkt 5 min wurden Aliquots aus der Reaktionslösung entnommen und behandelt wie in Abbildung 4.14 beschrieben. (B) Ergebnisse der Gelfiltration unter Standardbedingungen. (C) Substratfreilassung wird durch 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stimuliert.

Auch bei diesen Experimenten wurde die Reaktion nach 5 min durch Zugabe von Glukose und Hexokinase gestoppt, um eine weitere Substratfaltung in der GroEL-Kavität zu unterbinden. Wurde das Experiment unter Pufferbedingungen durchgeführt, die Ammoniumsulfat enthalten, war nach 5 Minuten bereits 70% des gefalteten Substrates aus der Kavität entlassen, während unter den Standardbedingungen zu diesem Zeitpunkt noch 50 % des gefalteten Substrates an das Chaperonin gebunden ist. Addiert man nun

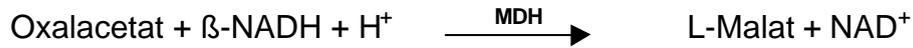
gebundenes und freies Substrat, so ist festzustellen, dass in beiden Fällen nahezu die gleiche Menge gefalteter Rhodanese vorliegt. Dies stimmt mit den Messungen im ersten Teil des Experimentes überein (Abbildung 40 A). So lässt sich zusammenfassend sagen, dass Ammoniumsulfat zwar nachweislich eine stimulierende Wirkung bezüglich der Substratfreilassung besitzt, jedoch wird der generelle Ertrag an rückgefaltetem Protein, zumindest im Falle des Substrates Rhodanese, nicht verändert.

Hier wird nun eine besondere Eigenschaft dieses Modellsubstrates deutlich. Rhodanese ist ein monomeres Protein, das bereits innerhalb der GroEL-Kavität seine native und damit aktive Struktur einnimmt. Demnach kann es seine enzymatische Aktivität bereits in der Kavität des Chaperonins ausüben. Dies war für die bisherigen Erkenntnisse nützlich. Die beobachtete langsame Freilassung von gefaltetem Substrat kann allerdings *in vivo* eine erhebliche Wirkung haben, da dies die Vorgänge in der Zelle beträchtlich beeinflussen kann. Hier müssen Proteine, die über einen Chaperonin-vermittelten Vorgang gefaltet werden auch unmittelbar nach Erreichen der nativen Struktur frei in Lösung sein, um ihre biologische Funktion ausüben zu können. Anhand eines dimeren Substrat-Proteins sollte es möglich sein, die verlangsamte Wirkung des archaeellen Chaperonins genauer zu untersuchen.

3.2.14. Das archaeelle Chaperonin-System erlaubt die Faltung des dimeren Substrats Malat Dehydrogenase nur in Anwesenheit von Ammoniumsulfat

Das aus Schweineherz isolierte dimere Enzym Malat Dehydrogenase (MDH) wurde bereits in zahlreichen Rückfaltungs-Versuchen mit verschiedenen Chaperonen getestet (Ranson *et al.* 1995; Rye *et al.* 1997; Veinger *et al.* 1998) und erschien daher geeignet den Substratzklus des *MmGroE*-Systems genauer zu studieren. MDH ist aus zwei gleichen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 35 kDa (Devenyi *et al.* 1966) zusammengesetzt. Jedes Dimer besitzt zwei Koenzym-Bindestellen (Eberhardt and Wolfe 1975), wobei jede Untereinheit unabhängig funktioniert und keine Kooperativität vorliegt

(McEvily *et al.* 1985). MDH katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu L-Malat. β -Nikotinamid Adenindinukleotid wird als Koenzym verwendet.



Ein Rückfaltungsexperiment mit diesem Protein erlaubt es, die Kinetik der Substratfreilassung des *MmGroE*-Systems genauer zu studieren, da hier die enzymatische Aktivität erst nach Freilassung und nachfolgender Dimerisierung messbar wird.

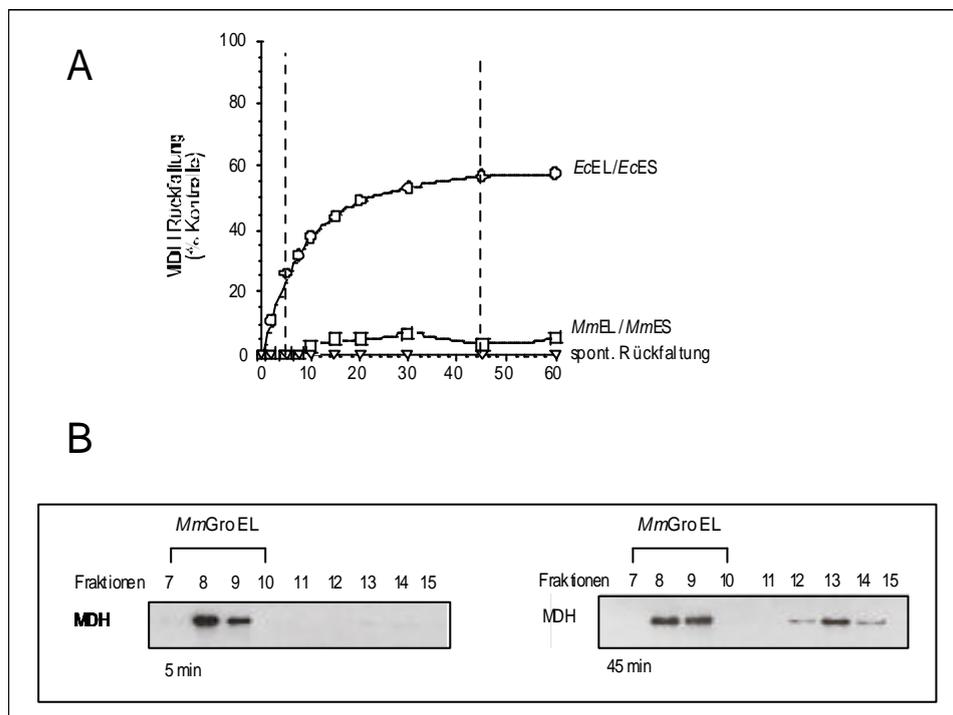


Abbildung 41. Denaturierte MDH bindet an *MmGroEL*, wird aber nicht funktionell rückgefaltet

(A) 1 μM denaturierte Malat Dehydrogenase (D-MDH) wurde in Puffer verdünnt der 1 μM GroEL enthält. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μM 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 Klammer), freie und gebundene MDH konnte mit Western Blot nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Rückfaltungsstudien mit MDH (Abbildung 41 A) zeigten eine weitere Besonderheit des archaeellen Gruppe I Chaperonin-Systems auf: Wenn Pufferbedingungen gewählt wurden, die für Rückfaltungsreaktionen mit

bakteriellem GroEL optimiert waren (Hayer-Hartl 1999), wurde MDH von archaeellem GroEL nicht rückgefaltet. Selbst nach 45 min, einer Zeitspanne, die im Falle des bakteriellen Systems bereits zu einer Plateaubildung in Höhe von ca. 60% der Aktivität der nativen Kontrolle führt (Abbildung 41 A), war bei der *MmGroEL*-vermittelten Rückfaltung lediglich ca. 5% MDH-Aktivität erreicht.

Eine Untersuchung der Reaktionslösung mittels einer Größenaufschluss-Chromatographie analog zu den Versuchen mit Rhodanese (Abbildung 41 B) zeigte jedoch, dass es auch hier zu einer Chaperonin-Substrat Komplexbildung kommt. Dabei wurden die Fraktionen durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Elution des Chaperonins (Klammer in Abbildung 41 B) konnte durch Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Das freie oder gebundene Substrat wurde durch Western-Blot mit einem MDH-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Zum Zeitpunkt 5 Minuten ist die gesamte MDH an *MmGroEL* gebunden, wogegen nach 45 Minuten bereits etwas freie MDH zu sehen ist. Es wird also deutlich, dass MDH nicht aggregiert, wie auf Grund des Ergebnisses der Rückfaltungsreaktion zu vermuten wäre, sondern tatsächlich an *MmGroEL* bindet.

3.2.15. MDH wird von archaeellem Chaperonin-System gefaltet, wenn Ammoniumsulfat im Puffer vorhanden ist

Die Wirkung des Salzes Ammoniumsulfat sollte nun auch für das Substrat MDH getestet werden. Die Vermutung lag nahe, dass MDH unter diesen geänderten Pufferbedingungen auch durch das archaeelle Chaperonin-System gefaltet werden kann. In der Tat konnte gezeigt werden, dass das archaeelle Chaperonin System voll funktionsfähig ist und denaturierte MDH mit ähnlicher Effizienz faltet wie das bakterielle GroE-System (Abbildung 42 A). Auch eine Untersuchung der Substratfreilassung durch eine Gelfiltrationsanalyse zeigte hier eindeutig den Einfluss von Ammoniumsulfat (42 C).

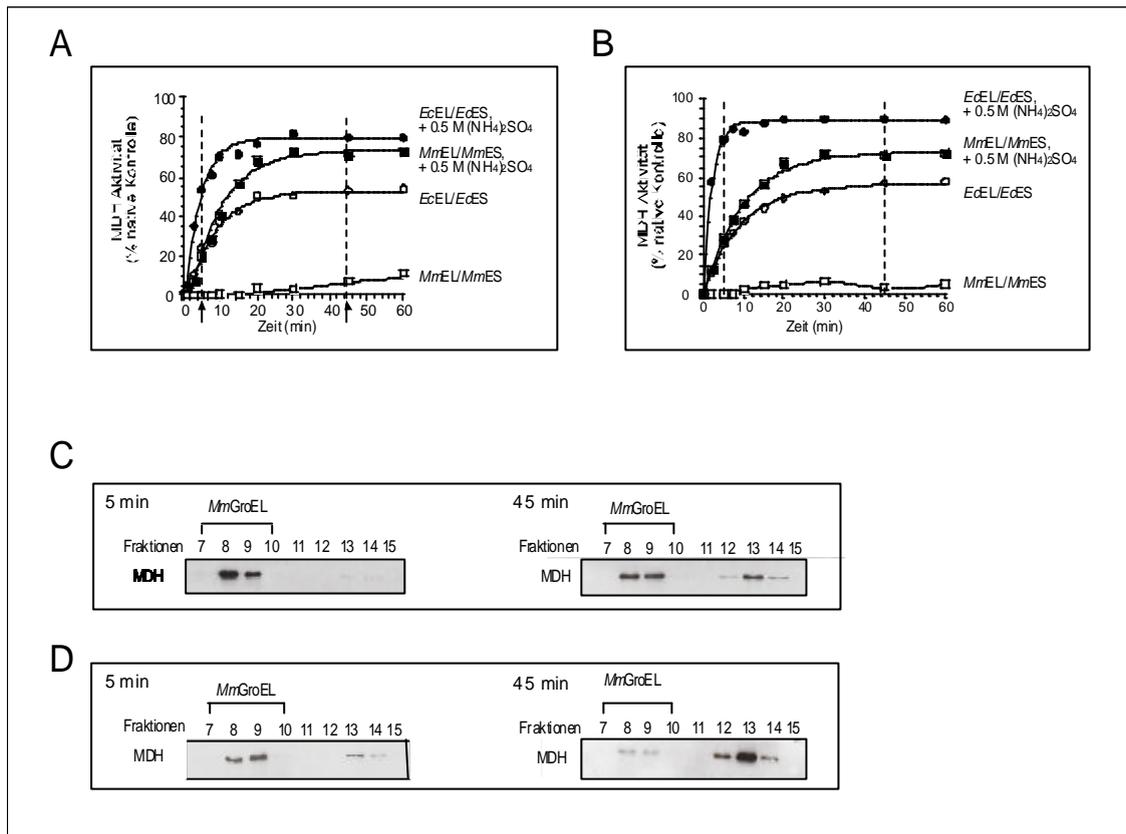


Abbildung 42. Ammoniumsulfat ermöglicht die korrekte Faltung von MDH durch das archaelle Chaperonin-System

(A) MDH-Rückfaltungsexperiment mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wie in Abbildung 4.18 beschrieben. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt für den Start der Gelfiltration. (B) MDH-Rückfaltungsexperiment wie in (A). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und 1 h mit CDTA inkubiert. Dadurch wurde die Faltung gestoppt und die Freilassung und Dimerisierung des Substrates wurde ermöglicht (C). Gelfiltration des Experimentes aus (A) unter Standardbedingungen. SDS-PAGE der Fraktionen 7-15, Western Blot mit MDH-Antikörper. Die Klammer bezeichnet die Elution von GroEL. (D) Gelfiltration des Experimentes aus A mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Wenn das Salz im Reaktionspuffer vorhanden ist, wird bereits fünf Minuten nach Start der Reaktion MDH freigesetzt, wobei immer noch ein Grossteil gebunden ist. Zum Zeitpunkt 45 Minuten ist dann allerdings MDH weitestgehend in Lösung (Abbildung 42 C). Dies ist nur ein Nachweis der Freisetzung. Es war allerdings möglich auch die Aktivität freier oder noch gebundener MDH indirekt nachzuweisen. Dazu wurde während des Rückfaltungsexperimentes zu den entsprechenden Zeitpunkten jeweils eine zweite Probe entnommen, die nicht sofort auf MDH Aktivität getestet wird (A), sondern erst mit CDTA inkubiert wurde (B). Diese Substanz komplexiert Magnesium, dass für die ATP Hydrolyse notwendig ist. Eine Zugabe dieses

Chelators zu einer Chaperonin-vermittelten Substratrückfaltung führt zu der Dissoziation von GroES und somit zum Freilassen des Substrates. Während der Inkubation ist es somit möglich, dass bereits gefaltetes Substrat nun dimerisiert und damit aktiv ist. Diese Eigenschaft wurde hier genutzt, um die Faltung von MDH während der Rückfaltungskinetik zu beobachten. Bei einem Vergleich der Graphen A und B in Abbildung 4.14 ist zu erkennen, dass sich der Kurvenverlauf nach Inkubation mit CDTA verändert. Bei der sofortigen Messung (A) ist bei allen Ansätzen eine kurze „lag-Phase“ zu beobachten, bei der keine Aktivität messbar ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass MDH zwar schon gefaltet war, aber noch in der Kavität eingeschlossen war und somit nicht zu einem aktiven Dimer komplexieren konnte. Werden nun die Proben der gleichen Messpunkte nach entsprechender Inkubation ausgewertet, war diese „lag-Phase“ nicht mehr nachzuweisen. Gefaltete Substratmoleküle hatten hier die Möglichkeit zu dimerisieren und wurden enzymatisch aktiv. Eine Gegenüberstellung beider Messungen (Abbildung 42 A und B) zeigt, dass die Substratfreilassung und die Dimerisierung der limitierende Schritt während der Rückfaltung von MDH ist. Der Einfluss von Ammoniumsulfat ist hier deutlich zu erkennen, denn nur im Beisein dieses Salzes kommt es zu einer Faltung. MDH wurde ohne Ammoniumsulfat zwar gebunden, konnte aber nicht gefaltet werden. Es sollte jetzt analysiert werden, ob diese *MmGroEL*-gebundene MDH in einem faltungskompatiblen Zustand ist. Zu einer *MmGroEL/ES* vermittelten MDH-Rückfaltung wurde Ammoniumsulfat erst zu einem späteren Zeitpunkt zugegeben. In Abbildung 4.20 ist gezeigt, dass die Zugabe von Ammoniumsulfat nach 15 min bewirkte, dass MDH gefaltet werden konnte. Das heißt, *MmGroEL*-gebundene MDH war vor Zugabe des Salzes in einem ungefalteten, aber faltungskompetenten Zustand (Abbildung 43).

Auch eine nachträgliche Zugabe des bakteriellen GroE-Systems bewirkte eine Weiterfaltung der gebundenen MDH, allerdings mit einem wesentlich geringeren Ertrag. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass MDH bei Standardpufferbedingungen nicht in der cis-Kavität des Chaperonins eingeschlossen ist, sondern in der trans-Kavität gebunden ist. Somit könnte das bakterielle GroEL, eventuell auf Grund einer höheren Affinität zu

ungefalteter MDH, dieses Substrat binden und durch Kooperation mit dem bakteriellen GroES

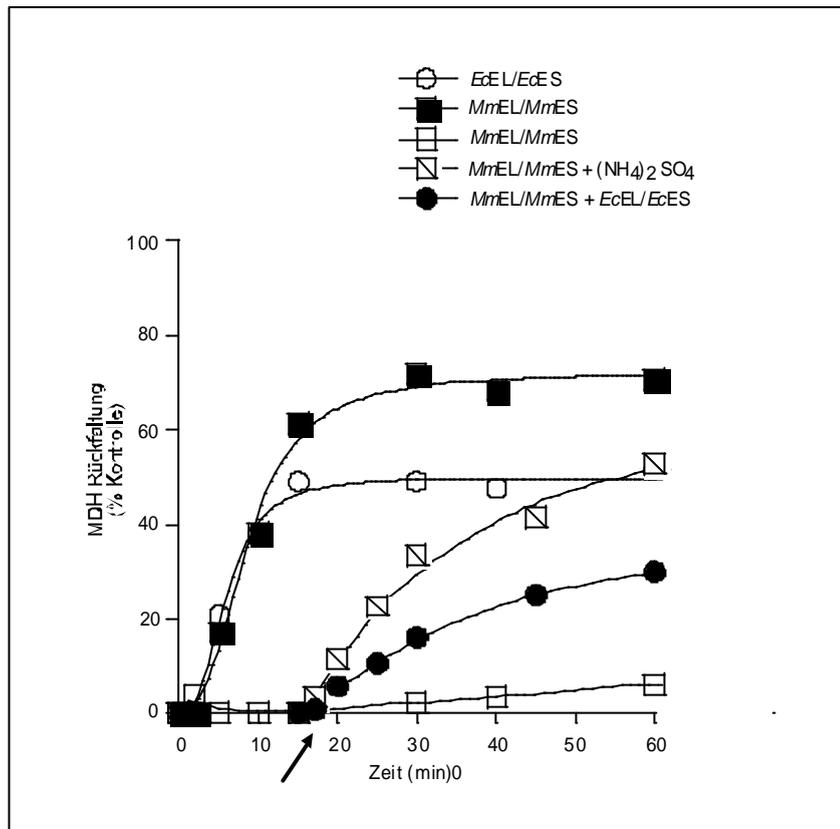


Abbildung 43. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat oder bakteriellem Chaperonin kann *MmGroEL*-gebundene ungefaltete MDH reaktiviert werden

Das Rückfaltungsexperiment wurde wie in 4.18 beschrieben durchgeführt. Zum Zeitpunkt 15 min (Pfeil) wurde zu einer *MmGroE*-vermittelten Rückfaltungsreaktion in Standardpuffer entweder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 M Endkonzentration) oder *EcGroEL* (1 μM Endkonzentration) und *EcGroES* 2 μM Endkonzentration) zugegeben.

rückfalten. Die Tatsache, dass die Zugabe von Ammoniumsulfat eine höhere Rückfaltungsrate ergibt, lässt vermuten, dass diese Substanz erst die korrekte Einkapselung des Substrates ermöglicht.

3.2.16. Ammoniumsulfat vermittelt den Einschluss von ungefalteter MDH in die cis-Kavität von *MmGroEL*

Um diese Vermutung zu bekräftigen wurden GroEL-GroES-Substrat Komplexe mit Proteinase K behandelt (Abbildung 45). Ziel war es, herauszufinden, unter welchen Bedingungen ungefaltete MDH in der cis-

Kavität von GroEL „geschützt“ vorliegt. Es ist durch frühere Studien bekannt, dass bei der nativen Struktur von GroEL die letzten 16 carboxy-terminalen Aminosäuren mit Proteinase K verdaut werden können (1,2). Das teilverdaute GroEL (GroEL Δ C) ist funktionell, wenn auch mit einer um 25% niedrigeren ATPase-Aktivität (Langer *et al.* 1992). Der Größenunterschied zwischen GroEL und GroEL Δ C ist auf einer SDS-PAGE zu erkennen (Abbildung 44).

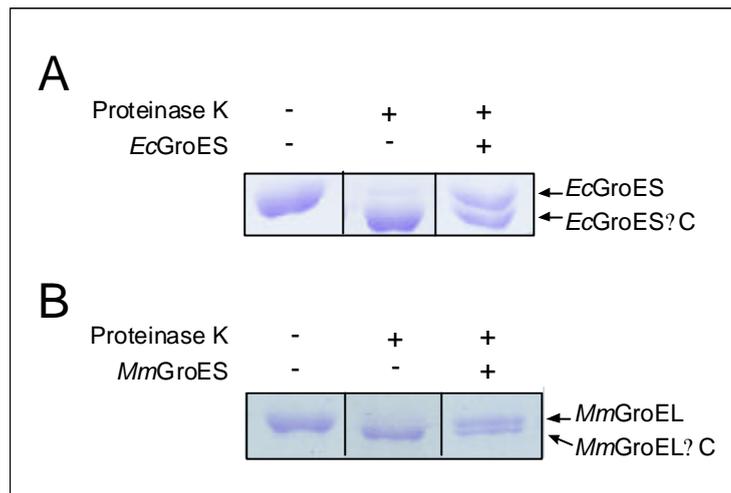


Abbildung 44. Der Verdau des C-Terminus von GroEL wird durch GroES verhindert

(A) Der C-Terminus von 500 nM *EcGroEL* wurde durch Inkubation mit 0.5 μ g/ml Proteinase K verdaut (*EcGroEL* Δ C). Zugabe von 1 μ M *EcGroES* schützt den C-Terminus der cis-Kavität. (B) Auch der C-Terminus in der cis-Kavität von *MmGroEL* wird geschützt, wenn das Chaperonin mit dem Kofaktor *MmGroES* vorinkubiert wurde.

Durch Zugabe des Kofaktors GroES vor der Inkubation mit Proteinase K lässt sich der Verdau hemmen, da das Carboxy-Ende von GroEL innerhalb der Kavität liegt. Der C-Terminus des nicht geschützten trans-Ringes kann jedoch noch verdaut werden. Dies ist auf der SDS-PAGE deutlich zu erkennen, da hier nach Inkubation von GroEL-GroES-Komplexen mit Proteinase K zwei Banden auftauchen (siehe Pfeile Abbildung 44 A und B). Diese Methode wurde nun angewandt, um die Einkapselung von ungefaltetem Substrat nachzuweisen. Dazu wurde denaturierte MDH mit bakteriellem oder archaeellem GroEL inkubiert, und anschließend mit Proteinase K behandelt. In Abbildung 45 A ist gezeigt, dass *EcGroEL*-gebundene MDH verdaut wird, wenn kein GroES gebunden ist.

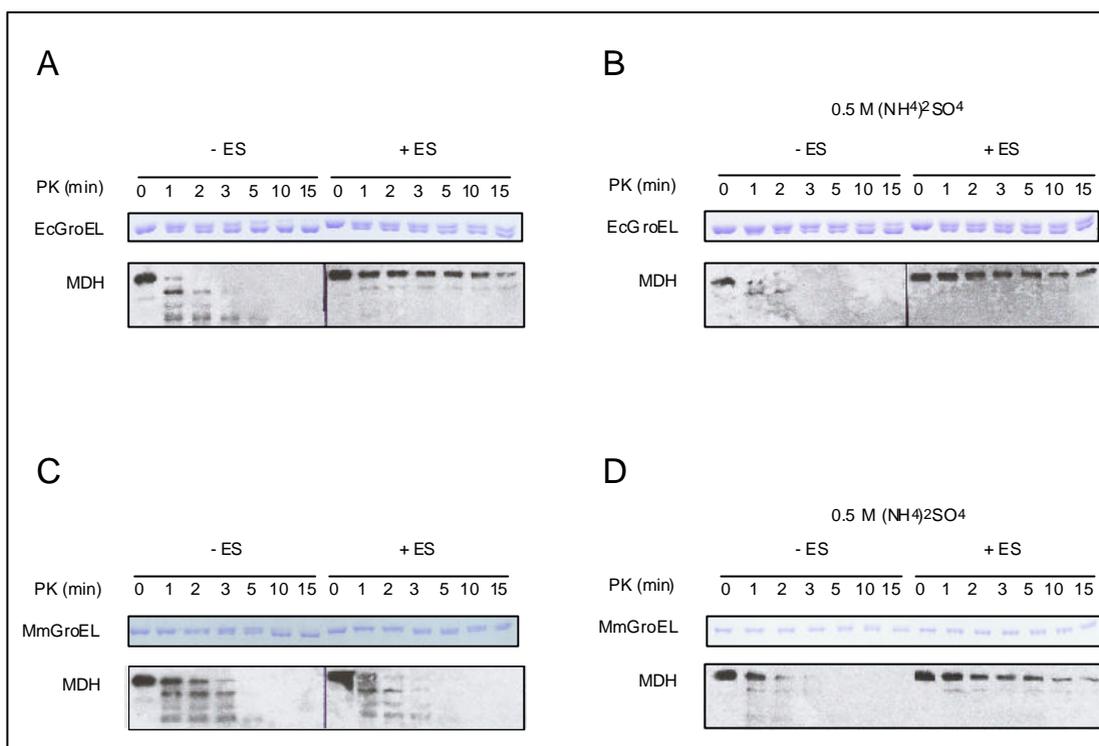


Abbildung 45. Ammoniumsulfat steuert die Einkapselung von ungefaltetem Substrat in die cis-Kavität von *MmGroEL*

(A) 500 nM *EcGroEL* wurde mit denaturierter MDH (500 nM) inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde sofort mit 10 µg/ml Proteinase K behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western Blot (MDH-Antikörper) analysiert. Der zweite Teil wurde mit 1 µM *EcGroES* vorinkubiert, bevor Proteinase K zugegeben wurde. (B) Experiment wie unter (A) beschrieben mit 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Reaktionsansatz. (C) Wie unter (A) beschrieben mit 500 nM D-MDH, 500 nM *MmGroEL*, 1 µM *MmGroES*. (D) Reaktionsansatz wie unter (B) mit archaeellen Proteinen wie unter (C) beschrieben.

Wenn der GroEL-Substrat-Komplex mit GroES inkubiert wurde und erst anschließend Proteinase K hinzu gegeben wurde, ist zu beobachten, dass MDH geschützt ist.

Interessanterweise wird bei Einsatz des archaeellen Chaperonins gebundene MDH selbst in Anwesenheit von *MmGroES* komplett verdaut (Abbildung 45 C). Demnach ist MDH offensichtlich an der „ungeschützten“ trans-Kavität gebunden. Dies erklärt, warum ein Anteil der *MmGroEL*-gebundenen MDH in einer Rückfaltungsreaktion nach Zugabe des bakteriellen GroE-Systems weiter gefaltet werden konnte (vergleiche Abbildung 43). Der oben beschriebene Versuch wurde auch in Anwesenheit von Ammoniumsulfat in der Reaktionslösung durchgeführt. Für das bakterielle Chaperonin-System zeigte der Einsatz von Ammoniumsulfat keine Veränderung (Abbildung 45 B).

Jedoch war dieses System bereits unter den zuvor getesteten Standardbedingungen funktionell. Bei dem archaeellen Chaperonin-System lässt sich nun allerdings eine interessante Beobachtung machen, die die vorangegangenen Ergebnisse erklärt. Denaturierte MDH wurde zusammen mit *MmGroEL* in Puffer inkubiert, der 0.5 M Ammoniumsulfat enthielt. Wenn nun *MmGroES* zu diesem Chaperonin-Substrat-Komplex hinzugegeben wurde, bevor die Reaktion mit Proteinase K behandelt wird, kam es zu einem kompletten Schutz des ungefalteten Substrates. Offenbar ermöglicht erst die Zugabe dieses Salzes eine Einkapselung von ungefalteter MDH. Somit kann die Bindung des Kofaktors *MmGroES* an die gleiche (cis-)Kavität stattfinden und das Substrat vor proteolytischem Verdau geschützt werden.

3.2.17. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie weist erstmals ein funktionelles Gruppe I Chaperonin-System in Archaea nach. Es konnte gezeigt werden, dass das Chaperonin *MmGroEL* und der Kofaktor *MmGroES* aus *Methanosarcina mazei* stark konservierte Proteine sind. Biochemische Daten zeigten, dass beide Proteine aus oligomeren Komplexen bestehen, die aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind. *MmGroEL* hat eine breite Chaperon-Aktivität indem es ungefaltetes Substrat bindet. Es weist eine niedrige ATPase-Aktivität auf und vermittelt daher *in vitro* eine effiziente Rückfaltung denaturierter Proteine nur unter bestimmten Bedingungen. Die hier beschriebenen Ergebnisse belegen, dass Ammoniumsulfat unabläßlich für den funktionellen Ablauf der Proteinfaltung ist. Zwar kommt es auch in Abwesenheit von diesem Salz zu einer Faltung, wie dies zumindest im Falle des monomeren Substrates Rhodanese nachgewiesen werden konnte. Jedoch bewirkt im Fall Malat Dehydrogenase nur eine Zugabe von Ammoniumsulfat die physiologisch notwendige Einkapselung des Substrates in die cis-Kavität. Auch die Dissoziation von GroES und damit die Freilassung des Substrates wird durch Ammoniumsulfat stimuliert. Dabei ist der Effekt von Ammoniumsulfat zum einen auf eine Erhöhung der ATPase Aktivität des archaeellen Chaperonins zurückzuführen. Zum anderen beruht der Effekt aber auch auf einer möglicherweise durch Ammoniumsulfat induzierten konformationellen Änderung des Chaperonins, die beispielsweise erst die korrekte Bindung von MDH veranlasst und somit die Faltung dieses Substrates ermöglicht.

4. Diskussion

Wichtige Vertreter der Chaperon-vermittelten Proteinfaltungsprozesse wurden in den letzten Jahren in Bakterien und Eukaryonten definiert und ihre spezifischen Funktionen sind untersucht worden. Dabei sind deutliche Unterschiede zwischen den drei Lebensdomänen erkennbar geworden, wobei es auf Grund der Endosymbionten-Theorie klare Parallelen zwischen den Proteinfaltungswegen in Bakterien und eukaryontischen Organellen gibt. So kooperiert zum Beispiel in Bakterien das Chaperon *trigger-faktor*, eine Prolyl-cis/trans-Isomerase, mit dem Hsp70-System bei der Stabilisierung und Faltung von neu synthetisierten Proteinen (Deuerling *et al.* 1999; Teter *et al.* 1999). Bei den meisten Proteinen ist diese Assistenz, zusammen mit weiteren molekularen Chaperonen bereits ausreichend, um die native Konformation zu erreichen. Etwa 10 % der neu synthetisierten Proteine benötigen für ihre Faltung jedoch post-translational eine weitere Unterstützung durch das Gruppe I Chaperonin GroEL in einem GroES und ATP-abhängigen Mechanismus (Ewalt *et al.* 1997).

In Eukaryonten sind die Prozesse sehr 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 Eukaria benötigt ein gewisser 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).

Über die Mechanismen der *de novo* Proteinfaltung im Zytosol der Archaea ist im Vergleich dazu bisher nur wenig bekannt (de Macario and Macario 1994; Lange *et al.* 1997; Macario *et al.* 1999). Zu dem Zeitpunkt als die vorliegenden Studien begonnen wurden, war das Gruppe II Chaperonin Thermosom der einzige ausführlich untersuchte Vertreter der molekularen Chaperone in Archaea. Archaeelle NAC oder auch *trigger factor* konnten in keiner der

entsprechenden Datenbanken gefunden werden. Selbst Proteine der Hsp70 Familie konnten nur in etwa einem Drittel der bis dato untersuchten Archaea identifiziert werden. Offensichtlich wurden diese von den entsprechenden Organismen durch lateralen Gentransfer erworben (Macario 1995; Gribaldo *et al.* 1999).

Im Laufe der Evolution sind differenzierte Proteinfaltungsmechanismen entstanden, die auf dem Zusammenspiel verschiedener molekularer Chaperone sowie zwei spezifischer Chaperonin-Systeme beruhen. Insbesondere die beiden Chaperonin-Systeme haben sich in den drei verschiedenen Domänen, Eukarya, Bakteria und Archaea, differenziert entwickelt.

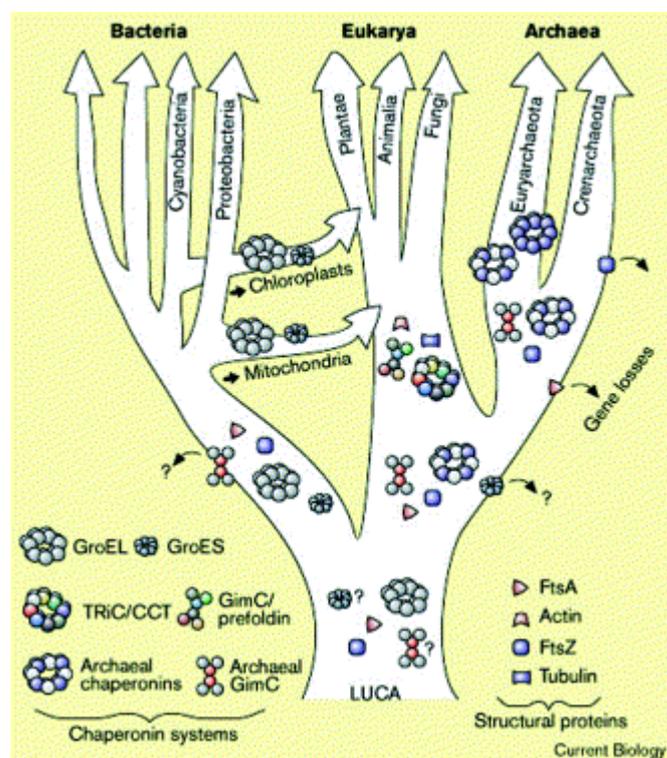


Abbildung 46. Entwicklung der Chaperonine und ihrer Kofaktoren.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der oligomeren Chaperone ist farblich hervorgehoben. Die „höhere“ Entwicklung der Komplexe in Eukarya wird dadurch verdeutlicht. Die beiden Chaperonin-Systeme und ihre Kofaktoren entwickelten sich parallel in den verschiedenen Lebensdomänen und Organellen. Abbildung entnommen aus (Leroux 2001).

Dabei konnte auch gezeigt werden, dass beide Chaperonine mit bestimmten Chaperonen kooperieren, die auch wieder jeweils nur in bestimmten Organismen vorliegen und hier spezifisch in Zusammenhang mit jeweils

einem der beiden Chaperonine vorzufinden sind (siehe Abbildung 5.1 und Tabelle 1). Dies legt die Vermutung nahe, dass es im Zuge der Evolution zu einer parallelen Entwicklung der Chaperonine sowie der jeweils kooperierenden Chaperone kam.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse ermöglichen nun eine Neuordnung der bisherigen Erkenntnisse insofern, als erstmals im Bereich der Archaea ein Chaperon beschrieben werden konnte, das dem eukaryontischen Prefoldin verwandt ist und dem eine wichtige Rolle in der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung zugeschrieben werden kann. Außerdem war es möglich, die anfangs beschriebene These zu widerlegen, dass innerhalb eines zellulären Bereiches immer nur eines der beiden Chaperonine vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass in der Gattung der *Methanosarcinales* nicht nur das Archaea-spezifische Chaperonin Thermosom exprimiert wird, sondern ebenfalls ein dem bakteriellem GroEL verwandtes, funktionelles Gruppe I Chaperonin samt Kofaktor. Da Archaea keine intrazellulären Organellen aufweisen, muss davon ausgegangen werden, dass beide Chaperonine in ein und dem selben zellulären Kompartiment vorliegen. Daraus resultiert die bisher einzigartige Situation, dass ein Substrat theoretisch sowohl durch das Gruppe I als auch durch das Gruppe II Chaperonin gefaltet werden kann.

Die hier geschilderten Ergebnisse veranschaulichen die Bedeutung, die eine Forschung mit Organismen aus dem Bereich der Archaea für das Verständnis der Abläufe sowohl in Eubakteria als auch in Eukarya darstellen.

4.1. Das molekulare Chaperon *MtGimC* in Archaea

Im ersten Teil dieser Arbeit wird das Chaperon *MtGimC* funktionell und strukturell charakterisiert. Die hier gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Vermutungen, dass dem Chaperon *GimC* eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung zukommt (Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999; Siegers

and Schiebel 2000). Zusätzlich konnten Erkenntnisse gewonnen werden, die es letztlich ermöglichten ein Strukturmodell des Gim-Komplexes zu entwickeln.

4.1.1. Strukturvorhersage des Gim-Komplexes

Die im Ergebnisteil geschilderten Daten lassen darauf schließen, dass der Gim-Komplex ein Hexamer ist, der aus zwei α -Untereinheiten und vier β -Untereinheiten besteht (siehe Abbildung 12). Es konnte gezeigt werden, dass sämtliche Gim-Proteine zwei konservierten Klassen zugeordnet werden können. Die Proteine innerhalb der beiden Klassen α und β weisen eine sehr hohe Homologie auf, wogegen die Homologie zwischen beliebigen Vertretern jeweils einer der beiden Klassen gering ist. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass die Proteine der α -Klasse eine Duplikation aufweisen, die sich in der Strukturvorhersage in Form von zwei zusätzlichen β -Faltblättern äußert. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die N- und C-terminalen Bereiche der Gim-Proteine beider Klassen α -Helixes bilden und ineinandergewundene, sogenannte *coiled-coil*-Strukturen bilden. Diese Vorhersagen wurden durch Analysen von GimC mittels Zirkulardichroismus (Abbildung 47) bestätigt, die in Zusammenarbeit mit Markus Fändrich erstellt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass *MtGimC* einen Gehalt an α -Helixes von ca. 85% aufweist.

Die Ergebnisse der Rekonstitution von GimC (Abbildung 14) zeigten, dass der Komplex aus doppelt so vielen β -Untereinheiten wie α -Untereinheiten besteht. Zusätzlich konnte anhand der *cross-linking* Experimente gezeigt werden, dass α -Untereinheiten die Tendenz haben, zu Dimeren zu assoziieren (Abbildung 15).

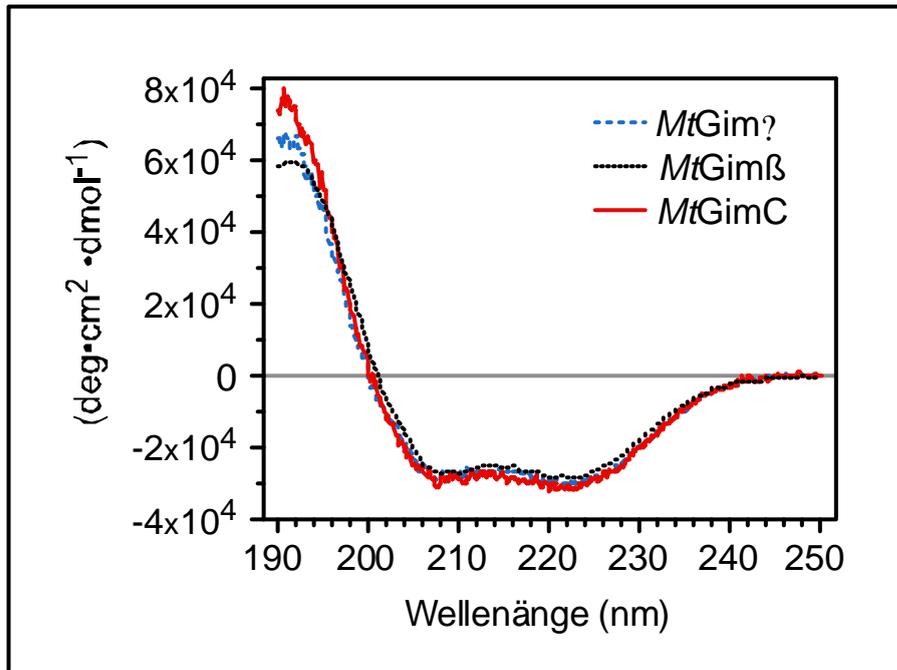


Abbildung 47. Messungen des α -Helix-Gehaltes in Gim-Proteinen

Die Messungen zeigten, dass alle Gim-Proteine einen hohen Gehalt an α -Helixen aufweisen. *MtGimC* hat einen α -Helix-Gehalt von ca. 85% (Abbildung entnommen aus (Leroux *et al.* 1999)).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass zwei α -Untereinheiten eine Art Plattform bilden, an die sich dann vier β -Untereinheiten anlagern. Wenn man davon ausgeht, dass die β -Untereinheiten nicht von alleine assemblieren (wie die *cross-linking* Experimente zeigten), ist anzunehmen, dass der hexamere Komplex entsteht, indem die β -Untereinheiten mit der α -Plattform assoziieren. Die Zusammensetzung der Untereinheiten konnte durch Sedimentierungs-Gleichgewichts-Messung in Zusammenarbeit mit Markus Fändrich (Oxford Centre for Molecular Science) noch genauer bestimmt werden. Mittels dieser Technik kann die genaue Masse eines Proteins unabhängig von dessen Gestalt bestimmt werden. Dies war insofern hilfreich, als die Fraktionierungs-Analysen nur eine ungefähre Masse ergaben (etwa 190 kDa), die mit einer theoretischen Masse von 6 Gim Untereinheiten nicht übereinstimmte.

Die Daten der Gleichgewicht-Sedimentierung ergaben ein Gewicht von GimC von ungefähr 83.7 kDa (Leroux *et al.* 1999). Wenn man nun das beobachtete 2:1 Verhältnis von α - und β -Untereinheiten zu Grunde legt, entspricht dieser Wert unter Berücksichtigung einer eventuellen Fehlerquelle einem hexameren

Komplex bestehend aus 4 β -Untereinheiten und 2 α -Untereinheiten. Zusammen besitzen sie eine molekulare Masse von 86.8 kDa. Ein Vergleich mit der apparenten Masse von 190 kDa (Abbildung 13) lässt drauf schließen, dass GimC keine globuläre Gestalt hat.

Auf Grund der stark konservierten Sequenzen der Gim-Proteine, auch zwischen Archaea und Eukarya, ist diese Berechnung für beide Lebensdomänen anwendbar. In Eukarya konnten 6 Gim-Untereinheiten bestimmt werden. Die Fraktionierung der Komplexe entspricht der von MtGimC (Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). Die vergleichenden Sequenzanalysen (Abbildung 10) ergaben, dass sämtliche Gim-Proteine einer der beiden Klassen, α und β , zuzuordnen sind. Demnach enthält die α -Klasse die eukaryontischen Gim-Proteine 2 und 5. Die Proteine 1, 3, 4, und 6 gehören der β -Klasse an. Diese Daten lassen darauf schließen, dass nicht nur die einzelnen Gim-Untereinheiten eine hohe Homologie aufweisen, sondern dass der gesamte Komplex konserviert ist.

Die Erkenntnisse, die auf Basis der hier beschriebenen Ergebnisse gewonnen wurden, erlauben folgendes Modell vorzuschlagen.

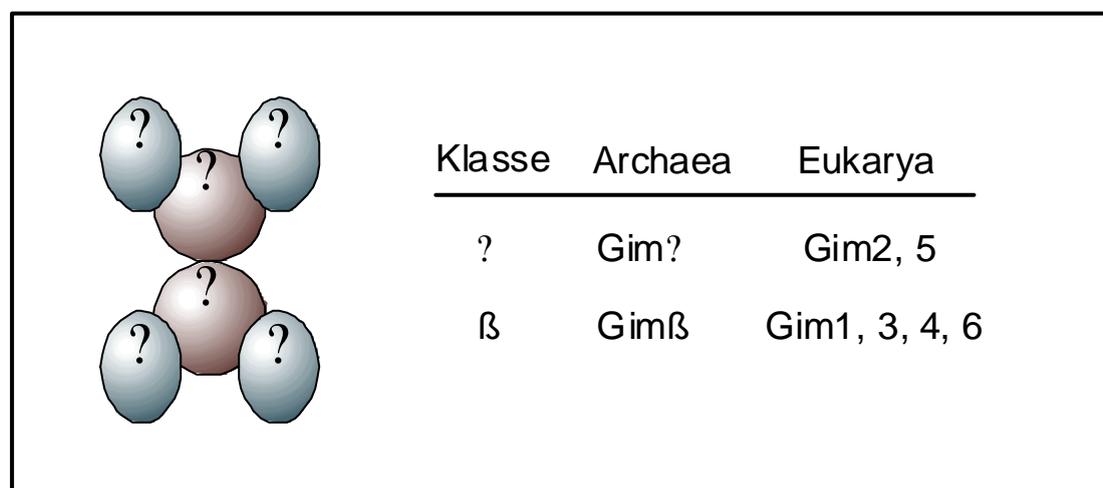


Abbildung 48. Strukturmodell von GimC

Die hexameren GimC in Archaea und Eukarya sind aus Gim-Proteinen zusammengesetzt, die sich zwei Klassen (α und β) zuordnen lassen. Die beiden α -Proteine bilden eine Plattform, auf der sich die vier β -Proteinen gruppieren.

Kürzlich ist es Siegert und Kollegen (Siegert *et al.* 2000) gelungen, eine Kristallstrukturanalyse des GimC aus *Methanobakterium*

thermoautotrophikum zu erstellen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.4 dargestellt und verdeutlicht, dass die Vorhersagen auf Grund der biochemischen und Sequenz-analytischen Daten richtig waren. Der Dimer aus α -Proteinen (gelb) bildet eine Plattform. Die vier β -Proteine (grau) binden daran und strecken die aus α -Helixes bestehenden coiled-coil Regionen nach außen. GimC hat somit keine globuläre Struktur. Das Herausragen der β -Untereinheiten erklärt, warum dieser Komplex auf einer Gelfiltration relativ hochmolekular eluiert.

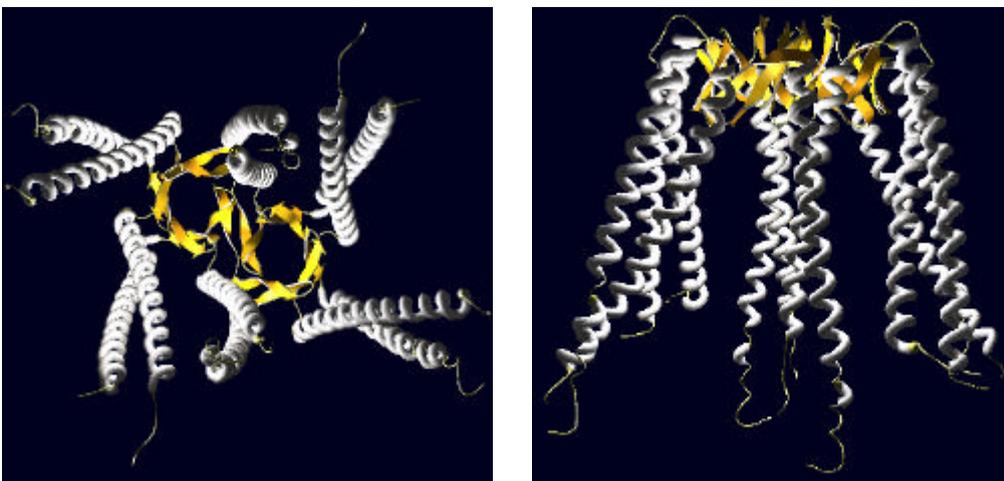


Abbildung 49. Kristallstrukturmodell von *MtGimC*

Zwei α -Untereinheiten bilden ein Dimer, an das sich vier β -Untereinheiten anlagern Abbildung entnommen aus (Siegert *et al.* 2000).

4.1.2. *MtGimC* assistiert bei der Chaperonin-vermittelten Proteinfaltung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen funktionellen Daten stellen deutlich heraus, dass *MtGimC* typische Eigenschaften eines molekularen Chaperons besitzt. Es ist in der Lage, die Aggregatbildung von verschiedenen ungefalteten Proteinen zu verhindern und kann diese in einem nicht-nativen Zustand stabilisieren. Der eukaryontische Gim-Komplex dagegen scheint eine hohe Spezifität nur für Aktin und Tubulin zu haben (Hansen *et al.* 1999; Siegers *et al.* 1999). Diese beiden Proteine gelten als die Hauptsubstrate des eukaryontischen Gruppe II Chaperonin TRiC (Melki *et al.* 1993; Lewis *et al.*

1996; Hansen *et al.* 1999). Allerdings ist GimC alleine nicht in der Lage seine Substrat-Proteine zu falten, wie anhand eines Modellproteins zum Studium der Proteinfaltung, dem monomeren Protein Rhodanese, gezeigt werden konnte (Abbildung 22). Um eine korrekte Faltung zu ermöglichen, muss das Substrat auf ein Chaperonin überführt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass *MtGimC*-gebundene, ungefaltete Rhodanese auf das Chaperonin GroEL übertragen wird und anschließend von diesem Chaperonin mit Hilfe von GroES in einer ATP-abhängigen Reaktion gefaltet werden kann. *MtGimC* hat keine ATPase Aktivität, dadurch besitzt es keinen regulativen Mechanismus zur Substratbindung und zu Freisetzung. Der Rhodanese-Transfer von *MtGimC* auf GroEL ist demnach in erster Linie auf die höhere Affinität von GroEL für ungefaltete Proteine zurückzuführen. *MtGimC* scheint Substrate nur transient zu binden, dies allerdings mit einer hohen Dissoziierungs- und Assoziierungsrate. So ist es möglich, dass zum Beispiel ein langsam faltendes Substrate wie Rhodanese, nach dem es von *MtGimC* dissoziiert, sofort wieder von *MtGimC* gebunden wird, noch bevor es spontan missfaltet oder, aufgrund der hohen Hydrophobizität, im ungefalteten Zustand aggregiert. *In vivo* liegt eventuell eine Situation vor, in der schnell faltende Proteine die Assistenz von GimC benötigen. Diese binden nur transient an *MtGimC* und erreichen, nach eventuell mehreren Interaktionen, eine native Konformation.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse schlagen einen weiteren Mechanismus vor: *MtGimC* überträgt ungefaltetes Substrat auf ein Chaperonin. Dieser Mechanismus scheint von einer starken Interaktion zwischen *MtGimC* und Chaperonin unabhängig zu sein, denn ein ternärer Komplex aus Substrat, *MtGimC* und Chaperonin konnte nicht nachgewiesen werden. GimC aus Eukaria scheint dagegen direkt mit dem Gruppe II Chaperonin TRiC zu interagieren. Die Bindung scheint spezifisch für TRiC zu sein, da eine Interaktion mit dem Gruppe I Chaperonin GroEL nicht nachgewiesen werden konnte (Vainberg *et al.* 1998; Siegers *et al.* 1999). In diesen Studien wird eine enge Kooperation von GimC und TRiC während der Proteinfaltung vorgeschlagen. Eine solche Kooperation konnte in der vorliegenden Arbeit zwischen *MtGimC* und TRiC nicht nachgewiesen werden. Das liegt möglicherweise an der höheren Spezifität des

eukaryontischen GimC für das Gruppe II Chaperonin TRiC. GimC in Eukaryonten besteht aus 6 verschiedenen Untereinheiten, daraus resultiert eine höhere Bindungsspezifität. Hier ist es offensichtlich im Laufe der Evolution zu einer parallelen Entwicklung des Chaperonins und des Gim-Komplexes innerhalb der Archaea beziehungsweise der Eukaria gekommen (siehe Abbildung 46). In Eukarya hat dies zu Proteinen mit wesentlich komplexerem Aufbau beziehungsweise höherer Anzahl der Untereinheiten geführt. Diese Vermutung wird durch folgende Experimente bestätigt: Siegers und Kollegen ist es gelungen *MtGimC* in Hefe zu exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass der Komplex korrekt assembliert, jedoch war es nicht möglich mit dem archaeellen *MtGimC* das endogene GimC funktionell zu ersetzen (Siegers *et al.* 1999).

4.2. Die Entwicklung der Chaperonine in den *Methanosarcinales*

Zu den wenigen eingangs beschriebenen Archaea, deren Genom zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits sequenziert war, sind inzwischen weitere hinzugekommen. Die Genome der drei wichtigsten Vertreter der *Methanosarcinales*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri*, und *Methanosarcina acetivorans*, sind zwischenzeitlich komplett sequenziert worden. Dabei konnte eine Gemeinsamkeit dieser Gruppe festgestellt werden, nämlich dass alle drei ein vergleichsweise großes Genom besitzen, das einen bedeutenden Anteil an Genen aufweist, die bakteriellen Ursprungs sind. Eine detaillierte Untersuchung des Chaperon-Gehalts auf genetischer Ebene bei allen drei Organismen brachte die überraschende Erkenntnis, dass alle drei *Methanosarcinales* zusätzlich zu dem Gruppe II Chaperonin Thermosom auch ein Gruppe I Chaperonin enthalten, das dem bakteriellen GroEL stark verwandt ist. Alle drei archaeellen Gruppe I Chaperonine weisen untereinander eine sehr hohe Homologie von ca. 90 % auf, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen lässt. In sämtlichen anderen bisher sequenzierten Archaeen kann ein Gruppe I Chaperonin nicht nachgewiesen werden. Auffallend in allen drei *Methanosarcinales* ist, dass

das Genom relativ viele Gene bakteriellen Ursprungs besitzt. Somit ist anzunehmen, dass in diesen Organismen nicht nur das Chaperonin bakteriellen Ursprungs vorhanden ist, sondern eventuell auch einige davon abhängige Substrate. Dies eröffnet somit völlig neue Perspektiven, die Substratspezifität beider Chaperonin-Gruppen miteinander in ein und dem selben Organismus zu studieren.

Zusätzlich zu den zwei Chaperoninen konnte in allen drei *Methanosarcinales* auch GimC nachgewiesen werden, bestehend aus zwei Untereinheiten, α und β , die eine hohe Homologie zu GimC aus *Methanobakterium thermoautotrophikum* aufweisen. Dies bestätigt einmal mehr die starke Konservierung dieses neuen molekularen Chaperons, auch innerhalb der Archaea. Zudem erklärt es die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, dass nämlich Substrat von GimC auf GroEL übertragen werden kann. Nach bisherigem Kenntnisstand würde dies keinen Sinn machen, da man annahm, dass diese beiden Chaperone nicht im gleichen Kompartiment vorkommen. Im Falle der hier beschriebenen *Methanosarcinales* könnte dieser Transfer jedoch durchaus vorkommen.

4.2.1. Das archaeelle Gruppe I Chaperonin zeigt eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu bakteriellem GroEL

Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Uwe Deppenmeier (*Goettingen Genomics Laboratory*) war es möglich, bereits vor Fertigstellung der Genom-Sequenzierung von *M.mazei* Gö1 Blast-Suchen des Genoms durchzuführen. Da das GroEL aus *M.mazei* als das bis dahin erste archaeelle Gruppe I Chaperonin entdeckt wurde, führte dies zu der Vermutung, dass dieser Befund Ursache einer bakteriellen Verunreinigung während des Sequenzierungsprozesses war. Diese Vermutung konnte jedoch schnell widerlegt werden, da das GroEL/ES enthaltende Operon von einem archaeellem Promotor reguliert wird. Mittels Antikörper konnte das archaeelle GroEL auf Proteinebene nachgewiesen werden. Das Gruppe II Chaperonin Thermosom konnte auch auf diese Weise identifiziert werden. Es stellte sich

schließlich heraus, dass beide Chaperonine zu den abundantesten hochmolekularen Proteinen im Zytosol von *M.mazei* gehören. Beide Chaperonine lagen zudem in nahezu equimolaren Konzentrationen vor. Dies ist ein Befund, der eine wichtige funktionelle Rolle beider Proteine bei der Proteinfaltung vermuten lässt. Weitere Untersuchungen zeigten schließlich, dass beide Chaperonine als hochmolekulare Komplexe in der Zelle vorlagen. Eine elektronenmikroskopische Analyse erbrachte schließlich den Beweis, dass das archaeelle GroEL analog zum bakteriellen Gruppe I Chaperonin eine sieben-fache Symmetrie aufweist. Aufgrund all dieser genetischen und strukturellen Informationen schien es eindeutig, dass hier ein neuer stark konservierter Vertreter der Gruppe I Chaperonine erstmals in Archaea identifiziert wurde.

4.2.2. Das rekombinante archaeelle Gruppe I Chaperonin ist *in vitro* funktionell

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen Besonderheiten des archaeellen Gruppe I Chaperonins im Vergleich zu dem bakteriellen GroEL auf. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass *M.mazei* GroEL ein funktionelles Chaperon ist, da es ungefaltete Proteine stabilisiert und somit deren Aggregatbildung verhindert. Auch konnte für das monomere Protein Rhodanese nachgewiesen werden, dass das archaeelle Chaperonin I System, bestehend aus *MmGroEL* und *MmGroES*, in einem ATP-abhängigen Mechanismus dessen korrekte Faltung vermittelt. Die Faltung führte zu einem ähnlichen Ertrag wie mit dem bakteriellen System, wenn auch mit einer etwas langsameren Kinetik. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass ein heterologes Chaperonin-System bestehend aus bakteriellem GroEL (*EcGroEL*) und archaeellem GroES (*MmGroES*) deutliche Einbussen im Ertrag an gefaltetem Substrat aufweist. Ein Chaperonin-System bestehend aus *MmGroEL* und *EcGroES* war überhaupt nicht funktionell. Dies deutete auf gewisse funktionelle oder mechanistische Unterschiede zwischen den beiden Chaperonin-Systemen hin. In der Tat konnte auch durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Costa Georgopoulos (Universität Genf) nachgewiesen

werden, dass das archaeelle GroEL/ES-Operon das bakterielle GroEL/ES-System *in vivo* nicht ersetzen kann. Es war nun von Interesse, die Ursache für diese Unterschiede aufzuspüren. Möglicherweise war dies in einer langsameren Dissoziation des gefalteten Substrates vom archaeellen GroEL/ES-System begründet. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Experimente mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik durchgeführt. Es konnte hier tatsächlich gezeigt werden, dass das archaeelle Chaperonin-System eine wesentlich langsamere Assoziations- und Dissoziationsrate aufweist als das bakterielle GroEL/ES-System. Dies führt *in vitro* und *in vivo* dazu, dass gefaltetes Substrat wesentlich langsamer aus der GroEL-Kavität entlassen wird. Das ist möglicherweise die Ursache, weshalb die von Georgopoulos durchgeführte *in vivo* Komplementation mit dem archaeellen GroE-Operon in *E.coli* für die Zellen letztlich letal war. Eventuell waren wichtige Proteine zu lange in der Kavität eingeschlossen und standen somit für wichtige metabolische Vorgänge in der Zelle nicht zur Verfügung. Dieses Verhalten des archaeellen Chaperonin-Systems konnte auch anhand von Gelfiltrationsexperimenten nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Probe aus einer laufenden Chaperonin-vermittelten Rhodanese-Rückfaltungsreaktion entnommen und durch eine Größenausschluss-Chromatographie aufgetrennt. Diese Methode ermöglichte Chaperonin-gebundenes von freiem Substrat zu trennen. Es konnte festgestellt werden, dass in der Tat im Vergleich zu dem bakteriellen GroE-System das Substrat wesentlich langsamer aus der Kavität entlassen wird. Dennoch konnte anhand der enzymatischen Aktivität der verschiedenen Fraktionen gezeigt werden, dass die Faltung von Rhodanese in beiden Systemen etwa gleich schnell abläuft. Demnach scheint tatsächlich das Entlassen des Substrates aus der Chaperoninkavität im Falle des archaeellen GroE-Systems der kritische Faktor zu sein.

Der Funktionszyklus von GroEL hängt, wie eingangs geschildert, von der ATPase-Eigenschaft des Proteins ab. Bei einer Analyse der ATPase-Aktivität des archaeellen Chaperonins konnte für das archaeelle GroEL tatsächlich eine wesentlich niedrigere ATPase Aktivität nachgewiesen werden als für GroEL aus *E.coli*. Hier ist allerdings anzumerken, dass archaeelle ATPasen im allgemeinen wesentlich niedrigere Hydrolyseraten zeigen als homologe

bakterielle und eukaryontische Proteine. Insbesondere die Gruppe der *Methanosarcinales* gilt als Energiesparer. Sie haben im allgemeinen einen sehr niedrigen ATP-Verbrauch. Dies steht sicherlich auch in Zusammenhang mit der sehr langen Generationszeit, die je nach eingesetzter Kohlenstoffquelle 8 bis 15 Stunden und somit ein Vielfaches von *E.coli* beträgt. Der Grund für das langsamere Zyklieren innerhalb des archaeellen GroE-System könnte somit in der niedrigeren ATPase-Aktivität von *MmGroEL* liegen. Es wurde nun Ammoniumsulfat dem Reaktionspuffer beigefügt, da für diese Substanz eine ATP-stimulierende Wirkung nachgewiesen war (Martin and Hartl 1997). In der Tat konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Ammoniumsulfat die ATPase-Aktivität von *MmGroEL* verdoppelt werden konnte. Mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Ammoniumsulfat das Zyklieren des GroEL/ES-Systems beschleunigte. Eine wesentlich schnellere Dissoziation von GroES konnte beobachtet werden. Bei einer Rhodanese-Rückfaltungsreaktion war der Einfluss von Ammoniumsulfat zunächst nicht offensichtlich. Jedoch konnte mit einer chromatographischen Untersuchung der Reaktion festgestellt werden, dass die schnellere Dissoziation von GroES auch zu einer schnelleren Entlassung des gefalteten Substrates 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 sein kann. Es wurde daher für weitere Untersuchungen ein dimeres Substrat, Malat-Dehydrogenase (MDH) gewählt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass *MmGroEL* ungefaltete MDH bindet und damit dessen Aggregation verhindert. Interessanterweise konnte aber unter den Standardversuchsbedingungen keine Rückfaltung von MDH nachgewiesen werden. Eine Rückfaltung war nur zu beobachten, wenn Ammoniumsulfat dem Reaktionspuffer beigemischt wurde. Es konnte zudem festgestellt werden, dass MDH ohne Ammoniumsulfat in einem faltungsfähigen Zustand an GroEL bindet, jedoch erst die Zugabe von Ammoniumsulfat zu einer Faltung führt. Die Versuche zur Protease-Resistenz von ungefalteter, *MmGroEL*-gebundener MDH zeigten, dass das Substrat unter Standardbedingungen verdaut wurde, selbst wenn *MmGroES* anwesend war. Das war ein Hinweis, dass MDH nicht in der cis-Kavität eingeschlossen

war. Im Kontrollexperiment mit dem bakteriellen GroEL/ES-System war MDH unter diesen Bedingungen geschützt. Wurden diese Experimente nun in Anwesenheit von Ammoniumsulfat durchgeführt, war MDH Protease-resistent. Das heisst, offensichtlich kam es unter diesen Bedingungen zu einem Einschluss von MDH in die cis-Kavität. Diese Ergebnisse könnten nun darauf hin weisen, dass das archaeelle GroEL eine andere Substratspezifität als das bakterielle GroEL aufweist, insofern, als MDH nur unter bestimmten Bedingungen gefaltet werden kann. Dies ist eine Vermutung, die durch Rückfaltungsexperimenten mit weiteren Substraten getestet werden müsste. In jedem Fall scheint Ammoniumsulfat nicht nur eine ATP-stimulierende Wirkung zu haben. Möglicherweise erhöht die Anwesenheit von Ammoniumsulfat die Hydrophobizität und führt somit zu einer vorteilhafteren Interaktion von GroEL und MDH. Es ist auch vorstellbar, dass Ammoniumsulfat eine konformationelle Veränderung von MDH oder auch von GroEL hervorruft, wodurch die Einkapselung des Substrates ermöglicht wird.

4.3. Perspektiven der Forschung an molekularen Chaperonen in Archaea

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass die Untersuchung der Konzepte und Mechanismen molekularer Chaperone im Bereich der Archaea von Bedeutung sind, um analoge Mechanismen in Eukarya und Bakteria zu verstehen. Bereits eingangs wurde die einfachere Zusammensetzung der archaeellen Chaperone beschrieben. Das macht sie als Untersuchungsobjekte interessanter als manche bakteriellen oder eukaryontischen Homologe. Die weniger aufwändige Zusammensetzung des GimC aus dem Archaeon *Methanobakterium thermoautotrophikum* ermöglichte somit, viele Erkenntnisse über dieses neue molekulare Chaperon zu gewinnen, die auch auf GimC anderer Organismen übertragbar sind. Somit ist es aussichtsreich, den Polypeptidflux durch das Chaperon-System in Archaea im Detail zu untersuchen. Offene Fragen bleiben hier in Bezug auf die Kooperation von GimC und Chaperonin. Ob zum

Beispiel GimC Polypeptide ko- oder posttranslational bindet, kann eventuell innerhalb der Archaea einfacher untersucht werden als dies bei den Eukaryonten möglich ist. Nicht zuletzt gibt es noch kaum Erkenntnisse über die endogenen Substrate von GimC, auch dies ist eine Fragestellung, die möglicherweise anhand der Archaea leichter zu beantworten ist als mittels Untersuchungen am eukaryontischen System. Die hier beschriebenen Eigenschaften von GimC, nämlich ungefaltete Proteine zu stabilisieren um deren Aggregation zu verhindern, sowie diese Proteine an ein Chaperonin weiterzureichen, weisen eine gewisse Ähnlichkeit mit der Funktion des Chaperons Hsp70 auf. Vor dem Hintergrund, dass manche Archaea kein Hsp70 besitzen, jedoch alle bisher untersuchten Archaea-Genome für ein GimC codieren, könnte man vermuten, dass GimC in Archaea ohne Hsp70 dessen Aufgaben zumindest teilweise übernehmen.

Aufgrund bisheriger Erkenntnisse interagiert GimC in Eukaryonten direkt mit dem Gruppe II Chaperonin TRiC. Dennoch ist die Art der Kooperation zwischen diesen beiden molekularen Chaperonen noch kaum definiert. Hier zeigt sich das Potential, das die *Methanosarcinales* insbesondere im Bereich der Erforschung molekularer Mechanismen der Proteinfaltung haben. Hier ist der einmalige Fall zu beobachten, dass beide Chaperonin-Gruppen sowie GimC und auch DnaK/J (Hsp70) vertreten sind.

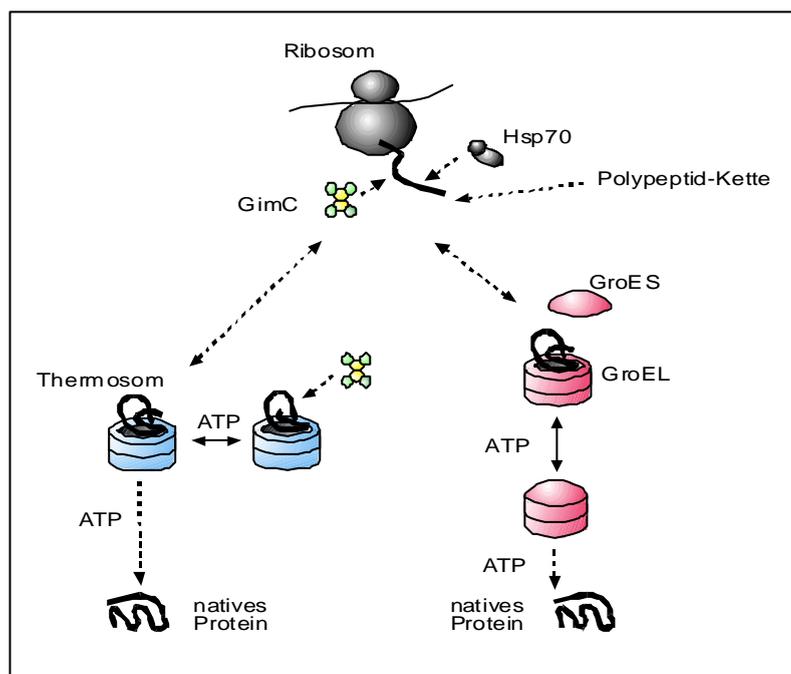


Abbildung 50. Polypeptidfluss durch das Chaperon-System der *Methanosarcinales*

Die Tatsache, dass Archaea keine weiteren Organellen besitzt, führt dazu, dass beide Chaperonine in demselben zellulären Milieu vorkommen. Das heißt hier sind theoretisch Interaktionen zwischen Chaperonen, Chaperoninen und deren Substraten möglich, die in anderen Organismen *in vivo* in dieser Form nicht vorkommen. Eine Untersuchung dieser Interaktionen zum Beispiel durch Ko-Immunopräzipitationen kann neue Einsichten in das Zusammenspiel der verschiedenen Chaperone auf dem Weg von der neu-synthetisierten Polypeptidkette hin zum korrekt gefalteten, aktiven Protein liefern. Eine entscheidende Fragestellung in Bereich der Erforschung der Chaperonin-vermittelten Proteinfaltung bleibt vor allem die Suche nach den Kriterien der Substratspezifität, sowohl bei Gruppe I Chaperoninen, als auch bei Gruppe II Chaperoninen. Die Besonderheit der *Methanosarcinales*, nämlich die Koexistenz beider Chaperonine im gleichen zellulären Kompartiment, bietet nun neue Perspektiven, die Substratspezifität beider Chaperone zu untersuchen.

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.

Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**: 223-30.

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

Baldwin, R. L. (1995). "The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view." NMR **5**: 103-109.

Baldwin, R. L. (1996). "On-Pathway versus off-pathway folding intermediates." Folding & Design **1**: R1-8.

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 Hsp 70 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.

- Boone, D. and R. Mah (1987). "Effects of calcium, magnesium, pH, and extent of growth on the morphology of *Methanosarcina mazei*." Appl Environ Microbiol **53**: 1699-1700.
- 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 Å [see comments]." 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.
- Brocchieri, L. and S. Karlin (2000). "Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution." Protein Science **9**(3): 476-486.
- Brown, J., C. Daniels, et al. (1989). "Gene Structure organization and expression in archaeobacteria." Crit Rev Microbiol **16**(4): 287-338.
- Buckle, A. M., R. Zahn, et al. (1997). "A structural model for GroEL-polypeptide recognition." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 3571-3575.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines." Cell. **92**(3): 351-366.
- Chatellier, J., A. M. Buckle, et al. (1999). "GroEL recognises sequential and non-sequential linear structural motifs compatible with extended beta-strands and alpha-helices." Journal of Molecular Biology **292**(1): 163-172.
- 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.
- Clarens, M., A. J. L. Macario, et al. (1995). "The archaeal DnaK-DnaJ gene cluster: Organization and expression in the methanogen *Methanosarcina mazei*." J Mol Biol **250**(2): 191-201.
- 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.
- Corpet, F. (1988). "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." Nucleic Acids Research **16**(22): 10881-90.
- Decker, G., Wanner, G., Zenk, M.H., Lootspeich, F. (2000). "Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing." Electrophoresis. **21**(16):3500-16
- 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.
- DeLong, E. (1998). "Archaeal means and extremes." Science **280**: 542-543.
- 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*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea." J Mol Microbiol Biotechnol **4**(4): 453-61.

Deppenmeier, U. e. a. (2001). "The genome of *Methanosarcina mazei*, a methanogenic archaeon containing a high percentage of bacterial genes." Submitted.

Deuring, 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.

Eberhardt, N. L. and R. G. Wolfe (1975). "Malate dehydrogenase, circular dichroism difference spectra of porcine heart mitochondrial and supernatant enzymes, binary

enzyme-coenzyme, and ternary enzyme-coenzyme-substrate analog complexes.” Journal of Biological Chemistry **250**(8): 2987-92.

Ellis, J. R. 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.

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 [see comments]." Nature **370**(6485): 111-117.
- Galagan, J. E., C. Nusbaum, 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): 1043-50.
- 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.
- Gelfand, M. S., E. V. Koonin, et al. (2000). "Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach." Nucleic Acids Research **28**(3): 695-705.
- Glover, J. R. and S. Lindquist (1998). "Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins." Cell **94**(1): 73-82.
- Goward, C. R. and D. J. Nicholls (1994). "Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis." Protein Science **3**(10): 1883-8.

Grallert, H., Buchner, J. (2002). "Review: a structural view of the GroE chaperone cycle". J Struct Biol **135**(2): 95-103

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. (2000a). "Conformational rearrangements of an archaeal chaperonin upon ATPase cycling." Current Biology **10**(7): 405-408.

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

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 [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Apr 15;90(8):3775]." 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): 6744-51.

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.
- Jain, R., M. C. Rivera, et al. (2002). "Horizontal gene transfer in microbial evolution." Theor Popul Biol **61**(4): 489-495.
- Jakob, U., W. Muse, et al. (1999). "Chaperone activity with a redox switch." Cell **96**(3): 341-352.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, et al. (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." Nature **347**: 37-44.
- 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.
- 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.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). J Mol Biol **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lang, K. (1933). Biochem Z **259**: 243-256.
- 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. (1978). "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.
- Lazarides, E. and U. Lindberg (1974). "Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **71**: 4747-4746.

- 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). "MtGimC, 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. Martin-Benito, et al. (2001). "The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin." EMBO Journal **20**(15): 4065-4075.
- Llorca, O., J. Martin-Benito, et al. (2000). "Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations." EMBO Journal **19**(22): 5971-5979.
- Lupas, A., D. M. Van, et al. (1991). "Predicting coiled coils from protein sequences." Science **252**(5010): 1162-4.
- 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-+.

- Martin, J., S. Geromanos, et al. (1993). "Identification of nucleotide-binding regions in the chaperonin proteins GroEL and GroES [see comments]." 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 [see comments]." Nature **352**(6330): 36-42.
- Mayerhofer, L. E., M. AJL, et al. (1992). "Lamina, a novel multicellular form of methanosarcina mazei." J Bacteriol **174**: 309-314.
- 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.
- McEvily, A. J., T. R. Mullinax, et al. (1985). "Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase: kinetic modulation independent of subunit interaction." Archives of Biochemistry & Biophysics **238**(1): 229-36.
- Melki, R. and N. J. Cowan (1994). "Facilitated folding of actins and tubulins occurs via a nucleotide-dependent interaction between cytoplasmic chaperonin and distinctive folding intermediates." Mol Cell Biol **14**(5): 2895-904.

- Melki, R., I. E. Vainberg, et al. (1993). "Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and gamma-tubulin." J Cell Biol **122**(6): 1301-10.
- Minton, A. P. (1983). "The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences." Molecular & Cellular Biochemistry **55**(2): 119-40.
- 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 mechanisms." Trends Biochem Sci **23**(2): 68-73.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. Annual Review of Biochemistry. C. C. Richardson, J. N. Abelson, C. R. H. Raetz and J. W. Thorner. Palo Alto, Annual Reviews Inc. **66**: 863-917.
- Nieba-Axmann, S. E., M. Ottiger, et al. (1997). "Multiple cycle sof global unfolding of GroEL-bound cyclophilin a evidenced by NMR." JMB **271**: 803-818.
- Nissen, P., J. Hansen, et al. (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis." Science **289**(5481): 920-930.
- Onuchic, J.N., (1997). "Theory of Proteinfolding" Annu. Rev. Phys. Chem. 48:545-600.

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

Pande, V. S., A. Y. Grosberg, et al. (1998). "Pathways for protein folding: Is a new view needed?" Curr Opin Struct Biol **8**: 68-79.

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

Pfund, C., N. Lopezhojo, 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.

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

Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, W.G., Heinrikson, R.J., Keim, P., Weng, L., and Russell, J. (1978). "The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese." Nature **273**: 124-129.

Prusiner, S. B., M. R. Scott, et al. (1998). "Prion Protein Biology." Cell **93**(3): 337-348.

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): 656-64.

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.

- 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): 646-51.
- 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 [see comments]." Nature **388**(6644): 792-8.
- Saiki, R., D. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.
- Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U. (2002). "Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **99** Suppl 4: 16412-8.
- Sela, M., F. H. White Jr., et al. (1957). "Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease." Science **125**: 691-692.
- 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.

Smith, D. R., L. A. Doucette-Stamm, et al. (1997). "Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics." J Bacteriol **179**(22): 7135-55.

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): 9422-6.

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). "Antartic 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): 4350-4.

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): 490-3.

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): 11032-7.

Viale, A. M. and A. K. Arakaki (1994). "The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles." Febs Lett **341**(2-3): 146-51.

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

Walter, S., Buchner J. (2002). "Molecular chaperones - cellular machines for protein folding." Angew Chem Int Ed Engl **41**(7): 1098-1113

Weber-Ban, E. U., B. G. Reid, et al. (1999). "Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA." Nature. **401**(6748): 90-93.

Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J.M., Horwich, A.L. (1996). "Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction." Cell **84**(3): 481-90

White Jr., F. H. and C. B. Anfinsen (1959). "Some relationships of structure to function in ribonuclease." Annals of the New York Academy of Sciences **81**: 515-523.

Wickner, S., M. R. Maurizi, et al. (1999). "Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins." Science **286**(5446): 1888-1893.

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., 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): 4576-9.

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): 741-749.

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

M.R. Leroux, M. Fandrich*, **D. Klunker***, K. Siegers, A.N. Lupas, J.R. Brown, E.Schiebel, C.M. Dopson, F.U. Hartl (1999). "*MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin.*" EMBO J. **18**(23): 6730-6743. *diese Autoren trugen gleichberechtigt zu dieser Arbeit bei.

D. Klunker, B. Haas, A. Hirtreiter, L. Figueiredo, D.J. Naylor, G. Pfeifer, V. Müller, U. Deppenmeier, G. Gottschalk, F.U. Hartl, M. Hayer-Hartl (2003). "*Coexistence of Group I and Group II Chaperonins in the Archaeon Methanosarcina mazei.*" *JBC* **278**(35):33256-33267.

L. Figueiredo*, **D. Klunker***, D. Ang, D.J. Naylor, M.J. Kerner, C. Georgopoulos, M. Hayer-Hartl, F.U. Hartl (2003). "Functional characterization of an archaeal GroEL-GroES chaperonins system: Significance of substrate encapsulation." *JBC*, e-pub, ahead of print *diese Autoren trugen gleichberechtigt zu dieser Arbeit bei.

6.2. Poster

D. Klunker, M.R. Leroux, M. Fändrich, A.N. Lupas and F.U. Hartl (2000). *Characterization of MtGIMC, an archeal chaperon with ATP-independant, HSP70-like function.*

GBM-Meeting, München

D. Klunker, L. Figueiredo, B. Haas, D.J. Naylor, M.J. Kerner, A. Hirtreiter, G. Pfeiffer, U. Deppenmeier, M.K. Hayer-Hartl and F.U. Hartl (2002). *Identification and functional analysis of the Group I and Group II Chaperonins in the mesophilic archeon M.mazei Gö1.*; FASEB-Meeting, Vermont

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1997 bis November 2003 am Max-Planck-Institut für Biochemie, in Martinsried unter der Betreuung von **Professor Wolfgang Baumeister** angefertigt, dem hierfür mein besonderer Dank gilt.

Das gute Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die hervorragenden Arbeitsbedingungen in der Abteilung Zelluläre Biochemie von **Professor F. Ulrich Hartl** nicht möglich gewesen. Dafür, und für seine hilfsbereite, offene Art und seine stetige fachliche Unterstützung möchte ich ihm besonders danken. Desweiteren geht mein Dank an **Dr. Manajit Hayer-Hartl** für hilfreiche Diskussionen und Ratschläge.

Einzelne Bereiche dieser Arbeit wurden durch erfolgreiche Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen ermöglicht. Insbesondere erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang **Dr. Uwe Deppenmeier** (Göttingen Genomics Laboratory, Göttingen) für die interessante und erfolgreiche Zeit in seinem Labor; **Professor Andrej Lupas** (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) für seine Unterstützung bei phylogenetischen Fragestellungen; **Professor Costa Georgopoulos** (Universität Genf) sowie **Professor Volker Müller** (Ludwig-Maximilians-Universität, München) für fachliche Ratschläge und **Günther Pfeiffer** (MPI für Biochemie, Martinsried) für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Für die freundschaftliche, kollegiale Atmosphäre während der Durchführung der Doktorarbeit möchte ich mich besonders bei **Luis Figueiredo** bedanken, dessen tatkräftige Unterstützung massgeblich zum Gelingen und zur Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenfalls geht mein Dank an **Dr. Bernd Haas, Angela Hirtreiter, Michael Kerner, Dr. Michel Leroux, Dr. Dean Naylor, Dr. Anna Stines** und vielen andere Kollegen für die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit und viele anregende Diskussionen.

Luis Figueiredo, Dr. Ulrich Heller und **Johanna Heske** möchte ich besonders danken für das Korrekturlesen sowie hilfreiche Anregungen beim Zusammenstellen dieser Arbeit und überhaupt für die schöne gemeinsame Zeit am Max-Planck-Institut.

Schliesslich möchte ich besonders meinen Eltern, **Barbara** und **Dr. Jürgen Klunker**, für ihre fortwährende Unterstützung und ihren Glauben an das Gelingen dieser Arbeit danken.

8. Lebenslauf

Name:	Daniel Klunker
Geburtstag:	31.03.1971
Geburtsort:	Karlsruhe
1977-1981	Grundschule Boschetsriederstrasse, München
1981-1990	Dante-Gymnasium, München, Abschluss mit Abitur
1990-1992	Zivildienst am Hauner'schen Kinderspital, München
1992-1994	Diplom-Studium der Biologie an der Universität Bremen
1994	Vordiplom
1994-1997	Trinationaler Studiengang für Biotechnologie an der <i>Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg</i> (Frankreich)
1997	Diplomarbeit am <i>Consiglio Nazionale delle Ricerche di Roma</i> (Italien) unter Anleitung von Prof. M. Gabriella Santoro <u>Thema:</u> Antiproliferative und apoptotische Wirkung von Prostaglandin A ₁
1997-2002	Anfertigung der Dissertation unter Betreuung von Professor Wolfgang Baumeister und Professor F. Ulrich Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried <u>Thema:</u> Chaperon-vermittelte Proteinfaltung in Archaea - Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von MtGimC und MmGroEL/GroES
2003	<i>Projektmanager</i> , Herstellung von Biopharmazeutika, Boehringer-Ingelheim Austria, Wien