

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Biochemische Charakterisierung der Lon-Protease
aus
Thermoplasma acidophilum

Henrike Christine Besche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 28. Juni 2004 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 1. September 2004
angenommen.

Abkürzungen

AAA ⁺	“ATPases associated with diverse cellular activities”
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AMPPNP	Adenosin-5'-(β,γ-Imido)-Triphosphat
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase (ATP-hydrolysierendes Enzym)
ATPγS	Adenosin-5'-(γ-Thio)-Triphosphat
bp	Basenpaar
D	Dalton (1 D = 1 g/mol)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (“deoxyribonucleic acid”)
<i>E. coli</i> oder <i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskop(ie)
g	Gramm
×g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein
Glt	Glutaryl
h	Stunde(n)
His ₆	Hexahistidin
k	kilo (10 ³)
kb	Kilobasenpaare
KMK	kritische Micellenkonzentration
λ	Wellenlänge
l	Liter
LN ₂	flüssiger Stickstoff
μ	micro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
min	Minute(n)
MNA	4-Methoxy-β-Naphthylamid
M _w	Molekulargewicht
mRNA	“messenger“-RNA (Boten-RNA)
n	nano (10 ⁻⁹)
nm	Nanometer

NTP	Nukleosid-5'-Triphosphat
OD	optische Dichte
Protease	Polypeptid-hydrolysierendes Enzym
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hydroxid-Ionen in wässriger Lösung
psi	"pounds per square inch" (1000 psi ~ 70 bar)
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SPase	Signal-Peptidase
Suc	Succinyl
SV	Säulenvolumen
<i>Ta</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
<i>tag</i>	loses Ende, hier kurzes Peptid
<i>Tk</i>	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
tRNA	"transfer"-RNA
<i>Tt</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
UV	Ultraviolettes Licht
(v/v)	Volumen pro Volumen ("volume per volume")
(w/v)	Gewicht pro Volumen ("weight per volume")
wt	Wildtyp

Aminosäuren				Nukleobasen	
Ala, A	Alanin	Leu, L	Leucin	A	Adenin
Arg, R	Arginin	Lys, K	Lysin	C	Cytosin
Asn, N	Asparagin	Met, M	Methionin	G	Guanin
Asp, D	Aspartat	Phe, F	Phenylalanin	T	Thymin
Cys, C	Cystein	Pro, P	Prolin		
Gln, Q	Glutamin	Ser, S	Serin		
Glu, E	Glutamat	Thr, T	Threonin		
Gly, G	Glycin	Trp, W	Tryptophan		
His, H	Histidin	Tyr, Y	Tyrosin		
Ile, I	Isoleucin	Val, V	Valin		

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassungen	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summary	2
2. Einleitung	5
2.1 Protein-Qualitätskontrolle durch ATP-abhängige Proteasen.....	5
2.2 Substraterkennung	8
2.3 Die AAA ⁺ -Familie	10
2.4 AAA ⁺ -Proteasen.....	15
2.5 Die lösliche Lon-Protease.....	17
2.6 Membranständige AAA ⁺ -Proteasen.....	20
2.7 Aufgabenstellung	25
3. Material und Methoden	26
3.1 Chemikalien	26
3.2 Geräte	28
3.3 Mikroorganismen	29
3.4 Vektoren/Plasmide	30
3.5 Medien	30
3.6 Puffer und Lösungen.....	31
3.7 Molekularbiologische Methoden.....	34
3.7.1 Kultivierung <i>Thermoplasma acidophilum</i>	34
3.7.2 <i>Thermoplasma</i> -Dauerkultur	34
3.7.3 CaCl ₂ -kompetente <i>E.-coli</i> -Zellen	34
3.7.4 MnCl ₂ -kompetente <i>E.-coli</i> -Zellen	34
3.7.5 <i>E.-coli</i> -Dauerkulturen	35
3.7.6 Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen	35
3.7.7 Transformation MnCl ₂ -kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen	35
3.7.8 Überexpression in <i>E. coli</i>	35
3.7.9 Ortsspezifische Mutagenese	36
3.7.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
3.7.11 Restriktionsverdau	39
3.7.12 Agarose-Gele.....	39
3.7.13 Klonierung von <i>talon</i> in pET22b(+).	40
3.8 Biochemische Methoden	40
3.8.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	40

3.8.2	Coomassie-Färbung	41
3.8.3	Proteintransfer auf Nitrocellulose („Western-Blot“)	41
3.8.4	Antikörper-Detektion	41
3.8.5	Zellfraktionierung von <i>Thermoplasma acidophilum</i>	42
3.8.6	Expression und Aufreinigung von <i>TaLon</i> _{His6}	42
3.8.7	Überexpression und Aufreinigung von <i>EcLon</i>	43
3.8.8	Überexpression und Aufreinigung von His ₆ -GFP-Calmodulin	43
3.8.9	Proteinbestimmung	44
3.8.10	Elektronenmikroskopie (EM)	44
3.9	Enzymatische Charakterisierung	44
3.9.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität.....	45
3.9.2	Bestimmung der Peptidase-Aktivität	45
3.9.3	Bestimmung der Protease-Aktivität	46
3.9.4	Bestimmung der Entfaltungs-Aktivität.....	46
3.9.5	Abbau von Insulin-B	46
3.9.6	Abbau von β -Casein	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Sequenzvergleiche	48
4.2	Lon in <i>Thermoplasma acidophilum</i>	51
4.3	Rekombinante Expression und Aufreinigung von <i>TaLon</i> in <i>E. coli</i>	52
4.4	ATPase-Aktivität	56
4.5	Peptidase-Aktivität.....	60
4.6	Abbau von Insulin-B	63
4.7	Protease-Aktivität.....	65
4.8	Abbau und Entfaltung von GFP-Calmodulin	70
4.9	AAA ⁺ -Mutanten.....	72
4.10	S/K-Diade	78
5.	Diskussion.....	81
5.1	Rekombinante Expression eines archaealen Membranproteins in <i>E. coli</i>	81
5.2	Enzymatische Charakterisierung von <i>TaLon</i> _{wt}	83
5.3	Prozessivität	84
5.4	AAA ⁺ -Mutanten.....	85
5.5	Entfaltungs-Aktivität	86
5.6	S/K-Diade	87
5.7	Ausblick.....	89
6.	Literatur	91

1. Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

AAA⁺-Proteasen sind ATP-abhängige Proteasen mit einer N-terminalen AAA⁺- („ATPases associated with various cellular activities“)-Domäne und einer C-terminalen Protease-Domäne. AAA⁺-Proteasen findet man in allen Bereichen des Lebens von Archaeobakterien bis zu eukaryontischen Zellorganellen. Entgegen der bakteriellen und eukaryontischen Lon-Protease, die im Cytosol lokalisiert ist, enthält die archaeale Lon-Protease zwei potentielle Transmembranregionen. In diesem Sinne ähnelt die Topologie der archaealen Lon-Protease eher der bakteriellen Protease FtsH, einer ATP-abhängigen Metalloprotease, die in der Membran von Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten nicht aber in Archaeen vorkommt.

Obwohl bakterielle und eukaryontische AAA⁺-Proteasen in den letzten beiden Jahrzehnten Gegenstand zahlreicher physiologischer und biochemischer Untersuchungen waren, ist über die Struktur und den Mechanismus dieser Proteasen nur wenig bekannt. Zu Beginn dieser Studie lagen über archaeale Lon-Proteasen nur Sequenzinformationen vor. Die Lon-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* (*TaLon*) wurde ausgewählt, um archaeale Lon-Proteasen als funktionale AAA⁺-Proteasen zu etablieren und die Familie der AAA⁺-Proteasen um ein Modellenzym für mechanistische und strukturelle Studien zu erweitern.

Zuerst wurde die Expression von *TaLon* in *Thermoplasma acidophilum* überprüft und die vorhergesagte Membranlokalisation bestätigt. Anschließend wurde *TaLon* in *Escherichia coli* (*E. coli*) überexprimiert und als hochmolekularer Komplex aus *E.-coli*-Membranen gereinigt. *TaLon* benötigte kein Nukleotid zur Oligomerisierung und zeigte eine für AAA⁺-ATPasen typische ATPase-Aktivität. Die Nukleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität konnte durch ADP inhibiert werden, und Proteinsubstrate wurden von *TaLon* in Gegenwart von ATP in prozessiver Art und Weise abgebaut. Die Analyse der Abbauprodukte ergab eine Substratspezifität von *TaLon* für aliphatische Aminosäuren, die eine hohe Ähnlichkeit zur Spezifität der membrangebundenen AAA-Protease FtsH aus *E. coli* aufwies. Zusammengenommen konnte die Lon-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* als funktionale AAA⁺-Protease charakterisiert werden.

AAA⁺-Proteine gehören zur Superfamilie der P-Loop ATPasen. Die klassischen Nukleotid-bindemotive Walker-A und Walker-B werden in der AAA⁺-Domäne durch zusätzliche konservierte Aminosäuren ergänzt, die diese Familie von anderen P-Loop ATPasen abgrenzen. Zu diesen Resten gehören ein Arginin-Finger, der in die benachbarte ATP-Bindetasche zeigt, und zwei weitere Reste, Sensor-1 und Sensor-2, die an der Koordination des γ -Phosphats von ATP beteiligt sein könnten. Bei Sequenzvergleichen wurde in archaealen Lon-Proteasen ein

weiterer konservierter Rest entdeckt, der wegen seiner räumlichen Nähe zum Sensor-2 Sensor-2' genannt wurde.

Zur Untersuchung der intramolekularen Regulation von *TaLon* wurden die konservierten AAA⁺-Reste durch ortsspezifische Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht und die betreffenden Mutanten enzymatisch charakterisiert. Unter den konservierten Aminosäuren wurden das Lysin in Walker-A, das Aspartat in Walker-B, der Sensor-1 und der Sensor-2' als essentiell für die ATPase-Aktivität von *TaLon* identifiziert, ohne die Peptidase-Aktivität maßgeblich zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu trugen der Arginin-Finger und der Sensor-2 in geringerem Ausmaß zur ATPase-Aktivität bei, waren aber essentiell für die Nukleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität. Der Vergleich der Peptidase- und Protease-Aktivität von Wildtyp-*TaLon* und den AAA⁺-Mutanten spiegelte eine Schlüsselfunktion dieser beiden Reste in der intramolekularen Kommunikation zwischen ATPase- und Protease-Domäne.

Beim Vergleich der Entfaltungs-Aktivität von *TaLon* und seinen AAA⁺-Mutanten zeigte sich, dass die Entfaltungs-Aktivität linear mit der ATPase-Aktivität des Enzyms korrelierte. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit einem Model der Entfaltung durch iterative Folgen ATPase-gesteuerter Arbeitshübe, das allgemein für AAA⁺-Proteine diskutiert wird.

Neben ATPase-defizienten Mutanten von *TaLon* wurden auch zwei Protease-defiziente Mutanten generiert, denen der katalytische Serin- bzw. Lysin-Rest der Protease-Domäne fehlte. Beide Mutanten zeigten weder Peptidase- noch Protease-Aktivität, entsprechend einer S/K-Diade als Mechanismus der Peptidhydrolyse.

Über zielgerichtete Mutagenese und anschließende enzymatische Charakterisierung der Mutanten wurden erste Einblicke in den Mechanismus der archaealen Lon-Protease gewonnen. Die erhaltenen Daten wurden sorgfältig mit Arbeiten an anderen AAA⁺-Proteasen verglichen und in Hinblick auf gemeinsame mechanistische Aspekte dieser molekularen Maschinen diskutiert.

1.2 Summary

AAA⁺ proteases are one-component ATP-dependent proteases, where the ATP-hydrolysing AAA⁺ (ATPase associated with various cellular activities) domain and the proteolytic domain are fused consecutively in a single polypeptide chain. AAA⁺ proteases are found in all three domains of life. Unlike the bacterial or eukaryotic Lon proteases, which are cytosolic, the archaeal Lon protease contains two putative transmembrane regions, suggesting membrane-association. Therefore the overall topology of the archaeal Lon resembles the eubacterial protease FtsH, an ATP-dependent metalloprotease that is present in the membrane of bacteria, mitochondria and chloroplasts, but not in archaea.

At the beginning of this study only sequence information on the archaeal Lon protease was available. Lon from *Thermoplasma acidophilum* (*TaLon*) was chosen to prove the predicted activity and function of an archaeal Lon protease on the protein level. In a first step expression of Lon in *T. acidophilum* was verified and found to be membrane-associated as predicted. Since *TaLon* was found to have a low expression level in *T. acidophilum* expression and purification of the recombinant enzyme in *Escherichia coli* was established.

TaLon was found to be membrane-localised also when over-expressed in *E. coli* and could be purified as a stable homooligomeric complex of probably six subunits. No nucleotide was needed for assembly. *TaLon* showed a nucleotide independent peptidase activity that could be inhibited by ADP and degraded proteins processively cleaving preferentially after small hydrophobic residues. With increasing substrate length degradation became more dependent on ATPase activity. Elongated peptides could still be degraded without nucleotide, but addition of ATP or non-hydrolysable analogues enhanced the reaction twofold - implying that a nucleotide-dependent opening of the proteolytic core alleviates substrate access by diffusion. Degradation of protein substrates was totally dependent on ATP-hydrolysis - most likely reflecting the necessity to transport longer substrates actively into the proteolytic chamber. In summary we established the Lon protease from *T. acidophilum* as an characteristic ATP-dependent protease.

AAA⁺ domains are defined by a set of highly conserved residues that distinguish the family from other P-loop ATPases. The nucleotide binding pocket is lined by the Walker A and B motifs, and two sensor residues, sensor 1 and sensor 2, are supposed to sense the nucleotide state of the domain and might consecutively mediate conformational changes. Additionally, an Arg-residue protrudes into the ATP binding pocket of the neighbouring subunit (Arg-finger) and might contribute to the allosteric regulation of the ATPase cycle.

By sequence alignments the respective residues were identified in *TaLon* whereupon an additional conserved residue in close proximity to the sensor 2 was observed among archaeal Lon proteases and named sensor 2'. For detailed analysis of the regulatory mechanisms within *TaLon*, active site mutants of all the described conserved residues were generated and analysed with respect to their specific activities.

Among the highly conserved AAA⁺ residues the lysine residue in Walker A, the aspartate residue in Walker B, and the sensor 1 and sensor 2' residues were found to be essential for the ATPase activity without influencing the peptidase activity. In contrast to this, the Arg-finger and sensor 2 were found to contribute to a minor extent to the overall ATPase activity but were essential for the nucleotide independent peptidase activity. Careful comparison of wt and mutant activities in presence of various nucleotides revealed a key function of sensor 2 and Arg-finger in coupling protease and ATPase activity.

Additionally analysis of the unfolding activity of *TaLon* and the AAA⁺ active site mutants revealed that the unfoldase activity of *TaLon* linearly correlated with the ATPase activity. The dependence of the unfoldase on the overall ATPase activity of the enzyme is in accordance with a power stroke model of unfolding, a model that is generally discussed among AAA⁺ unfoldases.

The characterisation of active site mutants of *TaLon* also included the protease deficient mutants lacking the catalytic serine or lysine residue. Analysis of their ATPase activity and comparison with the corresponding mutants of Lon from *E. coli* revealed a total lack of proteolytic activity establishing the S/K-dyad mechanism among archaeal Lon proteases.

In summary this study presents a functional characterisation and a comprehensive mutational dissection of the archaeal AAA⁺ protease Lon along with a careful discussion of mechanistic implications.

2. Einleitung

Der Begriff Protein-Qualitätskontrolle beschreibt ein für Zellen lebenswichtiges Gleichgewicht von Proteinsynthese, Faltung und Entsorgung beschädigter Polypeptide. Ein System von Faltungshelfern, auch Chaperone genannt, konkurriert dabei mit Proteasen, die fehlgefaltete Proteine wieder in Peptide und Aminosäuren zerlegen. Versagt dieses System, entstehen Proteinaggregate, die für die Zelle nicht nur Energieverschwendung in Form eines nutzlos gewordenen Pools von Aminosäuren bedeuten, sondern im Fall von Aggregaten wie Prionen oder Amyloidfasern schwerwiegende Konsequenzen für den ganzen Organismus haben können (Wickner et al., 1999).

Die Lebensdauer einzelner Proteine in der Zelle wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. Der erste kritische Moment ist die Bildung der richtigen dreidimensionalen Struktur nach bzw. während der Synthese der Polypeptidkette, ein Schritt der in der Zelle durch mehrere Chaperon-Systeme abgesichert wird (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Misslingt dieser Reifungsprozess oder unterlaufen bei der Proteinsynthese Fehler, wird dies von der Zelle erkannt und das entsprechende Protein entsorgt. Auch reife Proteine sind einem ständigen Alterungsprozess durch Oxidation oder Stressfaktoren, wie z. B. Hitze ausgesetzt, die zur langsamen Denaturierung der Moleküle beitragen. Einige Modelle zu Alterungsprozessen werden mit einer nachlassenden Fähigkeit der Zellen in Verbindung gebracht, diese „gealterten“ Proteine zu beseitigen. Eine weitere wichtige Rolle spielt der Abbau von regulatorischen Proteinen, die nur für einen bestimmten Zeitraum und Zweck in der Zelle benötigt werden und bei längerer Anwesenheit Schaden verursachen würden (Goldberg, 2003).

2.1 Protein-Qualitätskontrolle durch ATP-abhängige Proteasen

Die meisten abnormal oder unvollständig synthetisierten Proteine werden von so genannten Adenosintriphosphat-(ATP)-abhängigen Proteasen abgebaut (Abbildung 2.1). In Eukaryonten ist das 26S Proteasom die wichtigste ATP-abhängige Protease im Cytosol und im Zellkern. Das 26S Proteasom ist ein Komplex von ca. 2,5 MDa bestehend aus mindestens 32 verschiedenen Untereinheiten, die unter Eukaryonten streng konserviert sind. Das 26S Proteasom ist aus zwei Subkomplexen aufgebaut, dem 20S Kernpartikel (KP) und dem 19S regulatorischen Partikel (RP). Der 20S Partikel bildet eine tonnenförmige Struktur zusammengesetzt aus vier Ringen zu je sieben α - bzw. β -Untereinheiten. Die beiden α -Ringe umklammern die aus zwei β -Ring gebildete zentrale Kammer mit den proteolytischen Zentren. Binden auf einer oder beiden Seiten 19S Partikel an die äußeren α -Ringe entsteht das 26S Proteasom. Das 19S regulatorische Partikel besteht aus wenigstens 18 verschiedenen Untereinheiten mit einer absolu-

ten Masse von ca. 1 MDa und kann in zwei weitere Subkomplexe unterteilt werden. Sechs homologe ATPasen (Rpt1-6 für „Regulatory particle triple-A protein“) bilden zusammen mit drei Nicht-ATPase Untereinheiten (Rpn1, 2 und 10 für „Regulatory particle non-ATPase“) den Basiskomplex („base“), der direkt mit den α -Ringern assoziiert. Acht weitere Rpn Untereinheiten (Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12) bilden einen 400-kDa-Komplex, genannt „lid“ (Deckel), der mit dem Basiskomplex assoziiert und für den Abbau von polyubiquitinierten Proteinen (Abschnitt 2.2) notwendig ist. Die proteolytischen Zentren im zylinderförmigen 20S Partikel sind nur durch einen zentralen Kanal entlang der Achse des Partikels zugänglich. Dieser Kanal ist zu eng für globuläre Proteine und der Zugang für entfaltete Substrate wird über die ATPasen im 19S Basiskomplex reguliert (Voges et al., 1999; Glickman und Ciechanover, 2002).

Wie Eukaryonten enthalten Archaeen ein 20S Proteasom, doch statt des komplexen 19S Partikels wird der Abbau von Proteinen durch eine einzige ATPase reguliert. Die archaeale ATPase PAN, für „Proteasome Activating Nucleotidase“ ist homolog zu den sechs Rpts im eukaryontischen 19S Partikel und bildet einen homooligomeren 650 kDa-Komplex (Zwickl et al., 1999). Aufgrund seiner geringeren Komplexität und höheren Stabilität im Vergleich zum eukaryontischen 26S Proteasom eignet sich der archaeale PAN-20S-Komplex besonders für mechanistische Studien zur Energieabhängigkeit von proteasomalem Proteinabbau. Für PAN aus *Methanococcus jannaschii* konnte gezeigt werden, dass PAN sowohl Proteine entfalten als auch Aggregation von Proteinen verhindern kann (Benaroudj und Goldberg, 2000), und dass Substrate erst entfaltet und anschließend in das 20S Proteasom transloziert werden (Navon und Goldberg, 2001).

Neben dem 26S Proteasom findet man in Prokaryonten und/oder in Organellen endosymbiontischen Ursprungs noch andere ATP-abhängige Proteasen, wie Lon, ClpXP, ClpAP, HslUV (auch ClpYQ) und FtsH (zur Übersicht siehe Abbildung 2.1).

Die ClpP-Proteasen weisen keine Sequenzhomologie zum Proteasom auf, folgen aber dem gleichen Aufbau aus regulierendem ATPase-Komplex und Proteasekammer. ClpP besteht aus zwei Ringen zu je sieben identischen Untereinheiten, die eine proteolytische Kammer mit vierzehn Reaktionszentren bilden. ClpP wird von den regulatorischen ATPasen ClpX oder ClpA flankiert (Wickner et al., 1999). HslUV (auch ClpYQ) unterscheidet sich von den anderen Proteasen dadurch, dass sowohl Protease (HslU) als auch ATPase (HslV) Hexamere bilden. Der HslUV Komplex weist somit eine 6:6 Symmetrie auf und nicht wie im Fall von ClpP-Proteasen und dem Proteasom eine 6:7 Symmetrie. Dies deutet darauf hin, dass die 6:7 Symmetrie keine funktionale Bedeutung für die Mechanik des ATP-abhängigen Abbaus hat (Bochtler et al., 2000; Sousa et al., 2000). ClpX, ClpA und HslU werden auch als Entfalter („Unfoldases“) bezeichnet und gehören zu den Clp/Hsp100-Proteinen. Sie bestehen aus einer N-terminale Domäne, die in Zusammenhang mit Substratbindung und/oder Bindung von spe-

zifischen Adaptorproteinen gebracht wird, und einer (ClpX und HslU) bzw. zwei (ClpA) C-terminalen ATPase-Domänen, die die Entfaltungs-Aktivität vermitteln (Dougan et al., 2002).

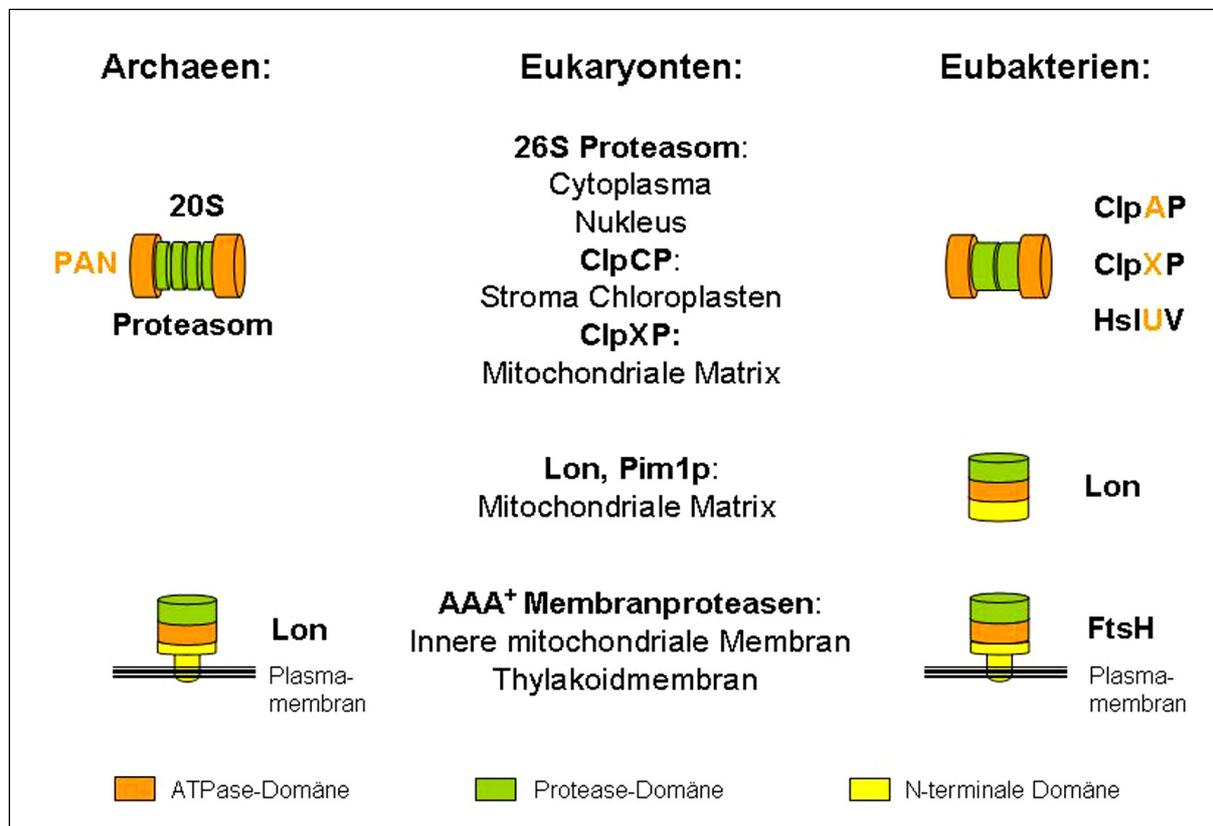


Abbildung 2.1: Schematische Zusammenstellung ATP-abhängiger Proteasen aus allen drei Bereichen des Lebens.

Eine Schnittstelle zwischen eukaryontischer und prokaryontischer Proteolyse bilden Mitochondrien und Chloroplasten. Der Abbau von mitochondrialen Matrixproteinen wird von der sogenannten Lon-Protease (in Hefe auch Pim1p) vermittelt. Diese gehört zur Familie der AAA⁺-Proteasen (Abschnitt 2.4) und findet sich auch im Cytosol von Prokaryonten. In Säugerzellen findet man zusätzlich zur Lon-Protease auch eine Variante der ClpXP-Protease (Käser und Langer, 2000). Chloroplasten enthalten eine eigene Variante der Clp-Protease, ClpCP, und neueste Untersuchungen am Genom von *Arabidopsis* haben vier Lon-Proteasen identifiziert, von denen zwei in Mitochondrien lokalisiert sind und die anderen beiden im Stroma von Chloroplasten vermutet werden (Adam und Clarke, 2002).

Insbesondere der Abbau von Membranproteinen ist konserviert zwischen Prokaryonten und Organellen endosymbiontischen Ursprungs. Etwa 30% aller Proteine sind Membranproteine und die Qualitätskontrolle von Proteinen in der Membran ist genauso lebenswichtig wie die cytosolischer Proteine. Der Abbau von Membranproteinen verläuft über etwas andere Wege

als der Abbau löslicher Proteine. In Eukaryonten werden Proteine aus der Plasmamembran ubiquitiniert, internalisiert und im Lysosom abgebaut. Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) werden über das Sec61-Translokon ins Cytosol rückgeführt, ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut (Arnold und Langer, 2002). Die Proteine der inneren Mitochondrienmembran und der Thylakoidmembran in Chloroplasten sind dagegen vom Cytosol aus nicht zugänglich und enthalten membranständige ATP-abhängige Proteasen, die den Abbau von Membranproteinen katalysieren. Diese gehören wie die Lon-Protease zur Familie der AAA^+ -Proteasen. AAA^+ -Proteasen bilden eine eigene Gruppe von ATP-abhängigen Proteasen, da sie ATPase- und Protease-Aktivität auf einer Polypeptidkette vereinen. Membrangebundene AAA^+ -Proteasen finden sich nicht nur in der Membran von Mitochondrien und Chloroplasten, sondern auch in der Plasmamembran von Bakterien und in der Zellmembran von Archaeen (siehe Abbildung 2.1).

Trotz ihrer Vielfalt weisen alle hier beschriebenen ATP-abhängigen Proteasen Gemeinsamkeiten auf. Durch die Bildung von homo- und/oder heterooligomeren, hochmolekularen Komplexen werden die proteolytischen Zentren vom Cytosol abgegrenzt und die Zelle vor unspezifischem Proteinabbau bewahrt. Dieses Prinzip der „Selbst-Kompartimentalisierung“ ist allen ATP-abhängigen Proteasen gemeinsam (Baumeister et al., 1998; De Mot et al., 1999). Der spezifische Abbau von Substraten wird durch die assoziierten ATPasen bzw. im Fall von AAA^+ -Proteasen durch die ATPase-Domänen reguliert, die Substrate erkennen, entfalten und in die Protease translozieren. Alle ATPasen/ATPase-Domänen gehören zur AAA^+ -Familie (Neuwald et al., 1999), eine Proteinfamilie deren Mitglieder die Assoziation oder Dissoziation von makromolekularen Komplexen katalysieren (siehe Abschnitt 2.3).

2.2 Substraterkennung

Der Proteinabbau durch das 26S Proteasom verläuft über zwei aufeinander folgende Schritte: zuerst werden die abzubauenen Proteine durch die Verknüpfung mit Polyubiquitinketten für den Abbau markiert und anschließend vom Proteasom verdaut, wobei das Ubiquitin (Ub) unbeschädigt wieder freigesetzt wird. Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Polypeptid bestehend aus 76 Aminosäuren mit einer kompakten Struktur aus einem β -Faltblatt und drei α -Helices. Die Kopplung von Ubiquitin an Substrate erfolgt über eine Kaskade aus drei Schritten. Zuerst reagiert die Thiolgruppe eines aktivierten Cysteins des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 in einer ATP-abhängigen Reaktion mit einem Ubiquitinmolekül zu einem energiereichen Thioester-Intermediat, E1-S~Ub. Darauf transferiert eines von 20-40 verschiedenen E2-Enzymen der Zelle („ubiquitin-carrier proteins“ oder UBCs) das aktivierte Ubiquitin über ein zweites Thioester-Intermediat, E2-S~Ub, zum Substrat, welches spezifisch an ein Mitglied der Ubi-

quitin-Ligase Familie, E3, gebunden ist. Die E3-Proteine vermitteln die Substratspezifität im Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau und Säugerzellen enthalten viele hundert verschiedene E3-Enzyme. Die Kopplung von Ubiquitin an seine Zielproteine erfolgt über eine Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des betreffenden Proteins. Durch das sukzessive Koppeln von aktivierten Ubiquitin-Molekülen entstehen Polyubiquitinketten, die vom 26S Proteasom erkannt werden. Die strukturellen Motive, die insbesondere E3-Ligasen erkennen und ein Protein für den Abbau markieren, sind vielfältig und oft nicht genau charakterisiert. Bekannte Beispiele reichen von Phosphorylierung der E3-Ligase über Phosphorylierung des Substrats bis hin zu Konformationsänderungen, induziert durch Cofaktoren, sowie die selektive Markierung von mutierten, ungefalteten, missgefalteten oder unvollständig translatierten Polypeptidketten (Glickman und Ciechanover, 2002).

Eine spezifische Gruppe von E3-Ligasen erkennt basische oder hydrophobe N-terminale Reste. Das so genannte „N-End“-Gesetz (Varshavsky, 1992) verbindet die Halbwertszeit eines Proteins in der Zelle mit der Identität seines N-terminalen Restes. In der Bäckerhefe wird ein Protein mit N-terminalem Lysin oder Phenylalanin über 600 mal schneller abgebaut als mit N-terminalem Methionin. Das „N-End“-Gesetz gilt in allen bisher untersuchten Spezies von Pilzen über Säugern bis hin zu Bakterien, wenn auch mit leichten Modifikationen in der Bedeutung der jeweiligen Aminosäure. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass *clpA*⁻ Mutanten „N-End“-Substrate nicht abbauen können, wobei noch nicht geklärt ist, ob ClpA für die Erkennung dieser Substrate ausreicht oder weitere Komponenten notwendig sind (Varshavsky, 1995). Auch C-terminale Erkennungssequenzen spielen in Prokaryonten eine wichtige Rolle. Bakterien enthalten ein besonderes RNA-Molekül, auch bekannt als SsrA-RNA, das als tRNA und mRNA fungiert und zur direkten Modifikation von Proteinen führt, deren Biosynthese blockiert oder unterbrochen wurde. Stoppt die Translation einer mRNA z. B. durch Mangel an Aminosäure-gekoppelten-tRNAs oder durch eine Mutation, führt dies zu einer Konformationsänderung am Ribosom, welche die Bindung der mit Alanin beladenen SsrA-RNA erlaubt. Nach Transfer der Polypeptidkette an die SsrA-RNA unterläuft diese eine Konformationsänderung, bei der die ursprüngliche mRNA das Ribosom verlässt und die SsrA-tRNA zur mRNA wird. Die SsrA-mRNA kodiert zehn weitere Aminosäuren, so dass das entsprechende Polypeptid mit einer zusätzlichen C-terminalen Sequenz von elf Aminosäuren das Ribosom verlässt (AANDENYALAA). Diese C-terminale Sequenz wird auch als „SsrA-Tag“ bezeichnet und so gekennzeichnete Proteine werden in der Zelle sehr schnell abgebaut, wobei ClpXP in Bakterien die zentrale Rolle im SsrA-vermittelten Abbau zu spielen scheint (Karzai et al., 2000; Dougan et al., 2002).

In Prokaryonten scheinen ATP-abhängige Proteasen direkt mit Chaperonen um Proteine mit exponierten hydrophoben Bereichen, ein Merkmal das ungefaltete von nativen Proteinen un-

terscheidet, zu konkurrieren (Wickner et al., 1999). Diese direkte Kopplung von Proteinfaltung und Abbau könnte auch in Eukaryonten von Bedeutung sein, erst kürzlich wurde ein E3 identifiziert, das an Chaperone gebundene Proteine ubiquitiniert (Goldberg, 2003).

Im Bereich der Archaeobakterien ist bisher keine spezifische Form von Substrat-Markierung für den proteasomalen Abbau bekannt. Weder Ubiquitin, noch Ubiquitin-ähnliche Proteine oder die SsrA-RNA konnten in den bisher sequenzierten Genomen identifiziert werden (Ruepp et al., 2000).

2.3 Die AAA⁺-Familie

Proteine, die Nukleosidtriphosphate binden und hydrolysieren (NTPasen), spielen bei allen Prozessen des Lebens eine entscheidende Rolle. P-Loop-NTPasen bilden die populärste Gruppe von NTPasen und machen 10-18% aller vorhergesagten Genprodukte bei Prokaryonten und Eukaryonten aus (Koonin et al., 2000).

P-Loop-NTPasen hydrolysieren die β - γ -Phosphatbindung eines gebundenen Nukleosidtriphosphat-(NTP)-Moleküls. Die Struktur der NTPase-Domäne besteht aus einem α/β -Sandwich mit einem zentralen β -Faltblatt, das auf beiden Seiten von α -Helices flankiert wird. Auf Sequenzebene werden P-Loop-NTPasen durch zwei stark konservierte Motive charakterisiert, Walker-A und Walker-B. Das Walker-A-Motiv bildet einen flexiblen N-terminalen Loop („P-Loop“), der einen β -Strang mit einer α -Helix verbindet. Dieser Loop ist durch eine Glycinreiche Sequenz konserviert (GxxxxGK[S/T]) und dient der Orientierung der Phosphatgruppen eines gebundenen Nukleotids. C-terminal vom Walker-A-Motiv befindet sich die Walker-B-Sequenz, die ein hydrophobes β -Faltblatt bildet, an dessen Ende ein konservierter Aspartat- oder Glutamatrest über ein Wassermolekül ein Mg^{2+} -Ion koordiniert, welches wiederum die β/γ -Phosphate des Nukleotids stabilisiert. Darüber hinaus sichert eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Walker-B-Aspartat (bzw. Glutamat) und dem Serin/Threonin-Rest aus dem P-Loop die richtige relative Orientierung der beiden Phosphatbindemotive (Walker et al., 1982; Iyer et al., 2004).

Anhand von Strukturmerkmalen werden P-Loop-NTPasen in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I besteht aus Nukleotidkinasen und GTPasen, bei denen der β -Strang, der zum P-Loop führt, und der Walker-B-Strang direkt benachbart sind. In Gruppe II, bestehend aus SF1/2- und SF3-Helikasen, AAA⁺, ABC- und RecA/F1-ATPasen, befindet sich ein zusätzlicher β -Strang zwischen P-Loop und Walker-B- β -Strang (Leipe et al., 2002; Leipe et al., 2003). Auf diesem β -Strang ist ein polarer Rest (N oder T) konserviert, der in die Nukleotidbindetasche zeigt und über Wasserstoffbrückenbindungen das γ -Phosphat von ATP koordinieren könnte (Neuwald et al., 1999). Für RecA (Story und Steitz, 1992; Story et al., 1992) und SF1/2-

Helikasen (Subramanya et al., 1996) wurde vorgeschlagen, dass dieser Rest der Unterscheidung zwischen verschiedenen Nukleotidzuständen dient, was ihm den Namen Sensor-1 eingebracht hat. Diese Funktion konnte bisher für kein AAA⁺-Protein belegt werden, stattdessen scheint Sensor-1 eine katalytische Rolle bei der Nukleotidhydrolyse zu spielen (Iyer et al., 2004).

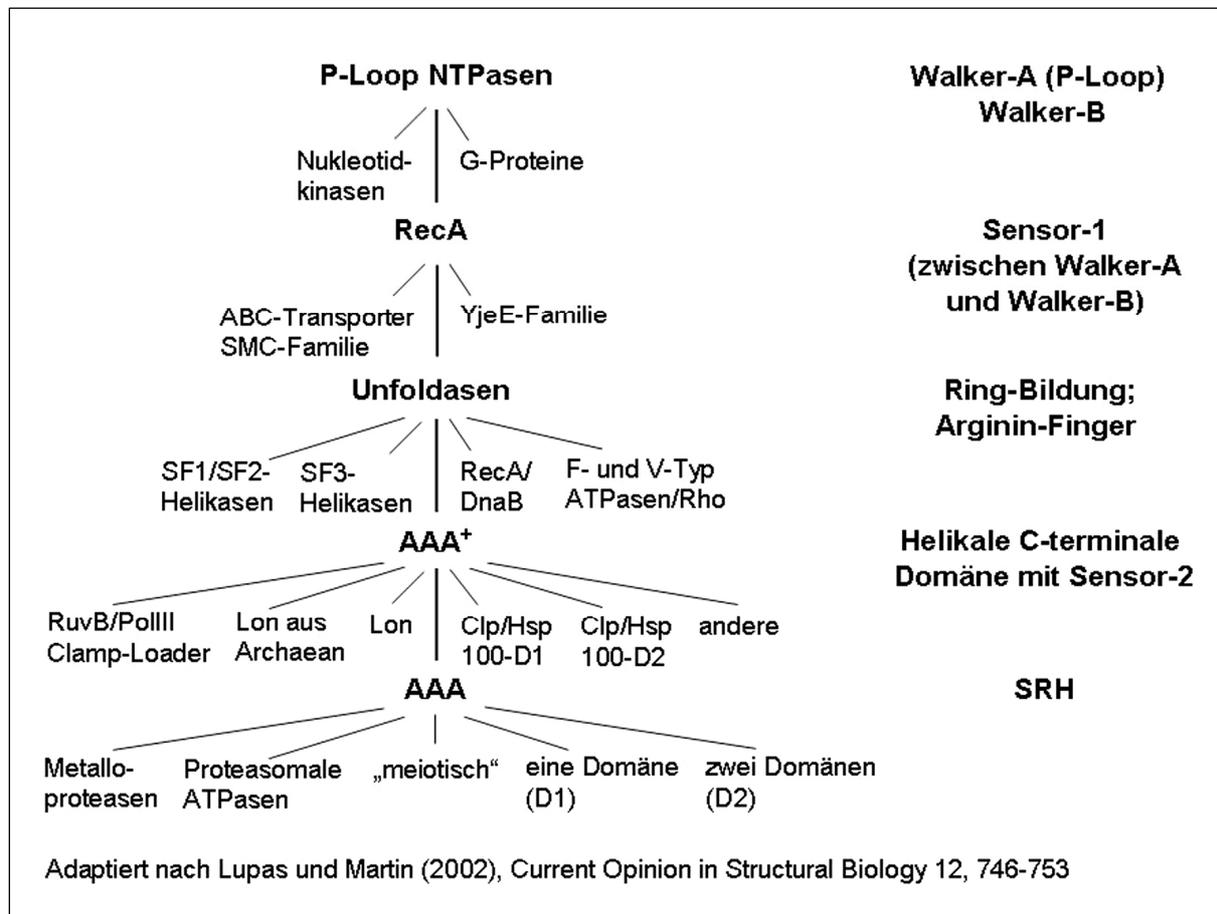


Abbildung 2.2: Phylogenetische Klassifizierung der AAA⁺-Proteine innerhalb der P-Loop-Superfamilie. Die Kriterien für die Klassifizierung sind rechts aufgelistet und werden im Text erläutert (zur Übersicht siehe auch Tabelle 2.1).

Im Gegensatz zu Nukleotidkinasen oder G-Proteinen, die als Monomere aktiv sind, bilden die in Gruppe II zusammengefassten Proteine häufig oligomere Strukturen aus. RecA ist ein bakterielles Motorprotein, das den zentralen Schritt homologer DNA-Rekombination katalysiert. RecA bildet an DNA helikale Filamente und vermittelt über einen noch nicht geklärten Mechanismus den DNA-Strang-Austausch (Cox, 2003). Helikasen wie DnaB, Rho oder Mitglieder der SF3-Familie bilden ringförmige Hexamere und entwinden DNA- oder RNA-Doppelstränge. Eine Ausnahme bilden die SF1/2-Helikasen, die keine Ringe bilden, allerdings

aus zwei ATPase-Domänen bestehen und ohne die Assoziation mit weiteren Faktoren keine volle Helikase-Aktivität entwickeln (Caruthers und McKay, 2002).

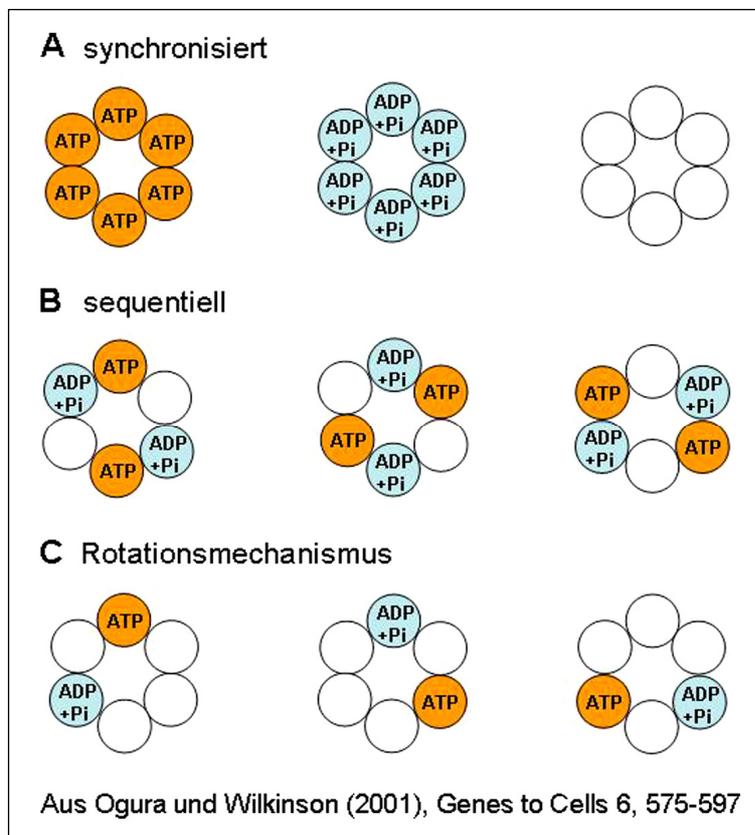


Abbildung 2.3: Modelle zum Mechanismus der ATP-Hydrolyse von AAA^+ -Proteinen.

Schematisch wird die Hydrolyse von ATP in drei Schritte unterteilt: (I) ATP-Bindung (orange), (II) Hydrolyse zu ADP + Pi (hellblau) und (III) die nach Freisetzung der Reaktionsprodukte leere Nukleotidbindestelle (weiß). (A) Im synchronisierten Modell sind alle Untereinheiten aktiv und arbeiten parallel. (B) Bei einem sequentiellen Mechanismus sind auch alle Untereinheiten aktiv, aber nacheinander, d. h. benachbarte Untereinheiten

befinden sich nie im selben Nukleotidzustand. (C) Das Rotationsmodell geht von drei aktiven und drei inaktiven Untereinheiten aus, wobei sich die aktiven jeweils in einem anderen Nukleotidzustand befinden.

Die Struktur einer DnaB-homologen Helikase aus dem Bakterienphagen 7 wurde als Hexamer mit vier gebundenen AMPPNP-Molekülen gelöst. Daraufhin wurde ein sequentieller Mechanismus für die ATP-Hydrolyse postuliert, auch „binding-change-mechanism“ genannt, bei dem immer nur zwei ATPasen im Ring denselben „ATP-Zustand“ einnehmen können. Dabei stimuliert der jeweilige Nukleotidzustand einer Nukleotidbindestelle, den jeweils nächsten Katalyseschritt der Nachbaruntereinheit (siehe Abbildung 2.3 B und Singleton et al., 2000). Vorbild für diesen Mechanismus ist die F_0F_1 -ATP-Synthase, die das elektrochemische Potential an der Membran von Zellen, Mitochondrien oder Chloroplasten zur Synthese von ATP nutzt. Die F_0 -Einheit der ATP-Synthase ist ein Membranproteinkomplex der als passiver H^+ -Transporter fungiert. F_1 besteht aus fünf Untereinheiten, zwei ATPasen α und β , die ein alternierendes Hexamer bilden, und $\gamma\delta\epsilon$, die eine mechanische Verbindung zwischen dem katalytisch aktiven $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer und der Protonenpumpe F_0 herstellen. Angetrieben vom Protonenfluss rotiert die γ -Untereinheit und induziert dabei Konformationsänderungen in β , die

nacheinander ADP- und P_i -Bindung, ATP-Synthese und ATP-Freisetzung stimulieren. Die α -Untereinheiten können zwar Nukleotide binden, sind aber katalytisch inaktiv, so dass die ATP-Synthase insgesamt über drei aktive Taschen verfügt, die sich im Rotationsprinzip bei der ATP-Synthese abwechseln (siehe Abbildung 2.3 C und Boyer, 2002). Für AAA^+ -Proteine sind bisher keine Details über den Mechanismus von ATP-Bindung und Hydrolyse bekannt. Mehrere AAA^+ -Proteine wurden als Hexamere mit sechs identischen Nukleotiden kristallisiert (Lenzen et al., 1998; Yu et al., 1998; Zhang et al., 2000; Sousa et al., 2000). Diese Beobachtung lässt sich am einfachsten mit einem synchronen Mechanismus vereinbaren, bei dem alle Nukleotidbindestellen parallel arbeiten (siehe Abbildung 2.3 A). Es sind aber auch Mechanismen nach Muster der F_0F_1 -ATP-Synthase oder den Helikasen denkbar. AAA^+ -Proteine mit verschiedenen Funktionen könnten auch nach verschiedenen Mechanismen arbeiten. NSF z. B. ist ein AAA -Protein, das die Dissoziation eines α -helikalen Proteinkomplexes katalysiert, der bei der Fusion von Vesikeln mit der präsynaptischen Membran entsteht. Während diese Funktion gut mit einem synchronen Mechanismus vereinbar wäre, scheinen ATP-abhängige Proteasen, die Proteine entfalten und Stück für Stück in die Protease transportieren müssen, eher einen sequentiellen Mechanismus zu verlangen (Ogura und Wilkinson, 2001).

Alle vorgestellten Mechanismen implizieren die Notwendigkeit von Kommunikation zwischen den einzelnen ATPase-Untereinheiten. Tatsächlich enthalten SF1/2- und SF3-Helikasen, AAA^+ , ABC- und RecA/F1-ATPasen einen weiteren konservierten Arginin-Rest, der in Richtung des γ -Phosphats der benachbarten Untereinheit zeigt (Neuwald et al., 1999). Dieser ist N-terminal durch eine kurze α -Helix mit dem polaren Sensor-1-Rest verbunden, der das γ -Phosphat der eigenen Untereinheit koordiniert. Diese Anordnung um eine stabile helikale Achse könnte als mechanischer Hebel wirken, der Nukleotidbindung und Hydrolyse benachbarter Untereinheiten miteinander koordiniert (Lupas und Martin, 2002). Die Interaktion mit dem γ -Phosphat der Nachbaruntereinheit ähnelt stark dem Mechanismus, mit dem GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), an kleine G-Proteine binden und durch Insertion eines Arginin-Restes in die Nukleotidbindetasche die Hydrolyse von GTP stimulieren. Der entsprechende Arginin-Rest wird Arginin-Finger genannt (Ahmadian et al., 1997). Für einige AAA^+ -Proteine konnte die katalytische Rolle des Arginin-Fingers durch Analyse von Mutanten bestätigt werden (Ogura et al., 2004).

Verallgemeinert scheint die Fähigkeit zur Oligomerisierung eine notwendige Voraussetzung für Entfaltungs-Aktivität im weitesten Sinne zu sein. Die parallele Entwicklung von Sequenzmotiven, die Kommunikation zwischen den jeweiligen Untereinheiten ermöglichen, führt zu ringförmigen Maschinen, die chemische Energie in mechanische Disassemblierungsprozesse überführen können.

Das Kriterium, welches AAA⁺-Proteine von anderen „Unfoldasen“ unterscheidet, ist eine C-terminale Erweiterung der ATPase-Domäne durch ein Bündel aus meist vier α -Helices, die an der Peripherie des ATPase-Rings anliegen. Diese Struktur enthält einen weiteren konservierten Arginin-Rest, Sensor-2, der in Richtung Nukleotidbindetasche orientiert ist (Neuwald et al., 1999). In Anlehnung an den Mechanismus der Adenylat-Kinase wird vermutet, dass dieser Rest in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand die Konformation der helikalen Domäne verändern kann (Guenther et al., 1997). Obwohl keine Sequenzhomologie besteht, ähnelt die Anordnung der helikalen Domäne im Verhältnis zum P-Loop der Anordnung von „Lid“-Domäne und NTPase in der Adenylat-Kinase. Diese enthält statt der helikalen Domäne eine kleine flache Domäne, die sich bei Bindung der Substrate ATP und ADP wie ein Deckel („Lid“) über die Nukleotidbindetasche schiebt. Diese Konformationsänderung wird ebenfalls durch Arginin-Reste im Deckel katalysiert, die durch Koordination der Phosphatgruppen von ATP und ADP die Nukleotidbindetasche verschließen und dabei das Wasser aus der aktiven Tasche verdrängen (Müller und Schulz, 1992; Gerstein et al., 1993). In den bisher untersuchten AAA⁺-Proteinen scheint der Sensor-2 sowohl an Nukleotidbindung als auch Hydrolyse beteiligt zu sein (Ogura et al., 2004).

Bezüglich der Vermutung, dass die helikale C-terminale Domäne ATP-abhängige Konformationsänderungen durchläuft, ist besonders interessant, dass dieser Bereich für einige ATP-abhängige Proteasen als Substratbindedomäne identifiziert wurde (Smith et al., 1999). Zusammen mit der Annahme eines sequentiellen Mechanismus ergibt sich daraus eine Hypothese für den Mechanismus des Proteinabbaus durch ATP-abhängige Proteasen. An die helikale Domäne gebundene Proteinsubstrate könnten durch Konformationsänderungen während des ATPase Zyklus mechanisch entfaltet und dabei Stück für Stück in die Proteasekammer transloziert werden. Untersuchungen am archaealen PAN-Proteasom-System haben gezeigt, dass die Entfaltung von Proteinsubstraten tatsächlich auf der Oberfläche von PAN erfolgt (Navon und Goldberg, 2001).

AAA-Proteine unterscheiden sich von AAA⁺-Proteinen durch einen weiteren konservierten Bereich, der SRH genannt wird (für „Second Region of Homology“). Dieser umfasst die Region zwischen Sensor-1 und Arginin-Finger und dient der weiteren Klassifizierung von AAA-Proteinen (siehe Abbildung 2.2 und Beyer, 1997). Im Gegensatz zu AAA⁺-Proteinen enthalten die meisten AAA-Proteine einen Alanin-Rest anstelle des Sensor-2-Arginins (Iyer et al., 2004). Umgekehrt enthalten AAA-Proteine zwei weitere konservierte Arginin-Reste, die in AAA⁺-Proteinen nicht konserviert sind. Das so genannte Position-2-Arginin befindet sich zwei Aminosäuren N-terminal vom Arginin-Finger (oft durch Prolin-Glycin getrennt) und Arginin-4 befindet sich einige Aminosäuren C-terminal vom Walker-B-Motif. (Innerhalb dieser Nomenklatur entspricht der Arginin-Finger Position-1 und Sensor-2 dem Arginin an Posi-

tion-3, diese Bezeichnungen sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt, werden aber im weiteren Text nicht verwendet (Ogura et al., 2004)).

Motiv	Konsensussequenz	Struktur	Literatur
Walker-A	GxxxxGK[S/T]	Flexibler Loop; Glycin-reich; koordiniert β/γ -Phosphate von ATP.	Walker et al., 1982
Walker-B	hhhhDE	Der konservierte Glutamatrest aktiviert ein Wassermolekül für den nucleophilen Angriff auf das γ -Phosphat; Koordination von Mg^{2+} .	Walker et al., 1982
Sensor-1	N/T	Koordiniert γ -Phosphat; eventuell Sensor für Nukleotidzustand.	Guenther et al., 1997
Sensor-2	G/PxhRxh	ATP-abhängige Bewegung der helikalen Subdomäne?	Guenther et al., 1997
Arginin-Finger	R	Koordiniert γ -Phosphat der Nachbaruntereinheit.	Guenther et al., 1997

Tabelle 2.1: Übersicht AAA^+ -Motive. In der Tabelle wurden Konsensussequenzen und die zugehörigen strukturellen Erläuterungen zusammengefasst. Abbildung 2.8 zeigt eine typische AAA -Domäne mit Verweisen auf die hier beschriebenen Sequenzmerkmale. x = jede Aminosäure; h = hydrophobe Aminosäure.

2.4 AAA^+ -Proteasen

Als AAA^+ -Proteasen bezeichnet man eine Gruppe von ATP-abhängigen Proteasen, deren Protease- und AAA^+ -Domäne auf einer Polypeptidkette kodiert sind (siehe auch Abschnitt 2.1). Aufgrund von Sequenzhomologie und Topologie lassen sich drei Klassen von AAA^+ -Proteasen unterscheiden (Abbildung 2.4).

Die lösliche Lon-Protease besteht aus einer N-terminalen Domäne mit bisher ungeklärter Funktion, einer AAA^+ -Domäne und einer C-terminalen Protease-Domäne (Abbildung 2.4). Lon ist eine Serin-Protease und wurde als erste ATP-abhängige Protease aus dem Cytosol von *E. coli* isoliert (Charette et al., 1981; Chung und Goldberg, 1981; Swamy und Goldberg, 1981). Lon findet sich nicht nur in Bakterien, sondern auch in der Matrix von Mitochondrien (Suzuki et al., 1994; Van Dyck et al., 1994) und im Stroma von Chloroplasten (Adam et al.,

2001). Sogar in Peroxisomen, die nicht endosymbiontischen Ursprungs sind, wurde mittels Proteom-Analyse eine spezifische Isoform von Lon identifiziert (Kikuchi et al., 2004).

Im Unterschied zu Lon ist die bakterielle Protease FtsH eine membranständige Metalloprotease und die einzige essentielle ATP-abhängige Protease in *E. coli* (Tomoyasu, Yuki et al., 1993; Tomoyasu, Yamanaka et al., 1993). Die N-terminale Domäne von FtsH enthält zwei Transmembranhelices (TM), gefolgt von einer klassischen AAA-Domäne und der C-terminalen Protease-Domäne mit der charakteristischen Zink-Bindesequenz HExxH (x = ungeladene Aminosäure; Abbildung 2.4). Obwohl die meisten Bakterien nur eine FtsH-Protease enthalten, wurden drei verschiedene Homologe in den Mitochondrien der Hefe identifiziert – YTA10, YTA11 und YTA12. Alle drei Enzyme sind in der inneren mitochondrialen Membran verankert, wobei der YTA10-12-Komplex in die mitochondriale Matrix ragt, während YTA11 in den Intermembranbereich zeigt (Leonhard et al., 1996). In Pflanzen ist FtsH integraler Bestandteil der Thylakoidmembran mit ATPase- und Protease-Domäne auf Seiten des Stromas. In *Arabidopsis thaliana* wurden insgesamt 12 FtsH-Gene identifiziert, von denen acht in Chloroplasten und vier in Mitochondrien vermutet werden (Adam und Clarke, 2002).

Die dritte Gruppe von AAA⁺-Proteasen bildet die archaeale Lon-Protease. Diese wurde aufgrund der Sequenzhomologie ihrer Protease-Domäne zur löslichen Lon-Protease identifiziert. Genauere Sequenzanalysen zeigten allerdings, dass die archaeale Lon-Protease keine lösliche Protease ist, sondern zwischen den Motiven Walker-A und -B eine insertierte Transmembrandomäne besitzt (Ruepp et al., 2000). Die Membranlokalisierung der archaealen Lon-Protease wurde in *Thermococcus kodakarensis* bestätigt (Fukui et al., 2002). Da Archaeen kein FtsH-Homolog enthalten, liegt die Vermutung nahe, dass die archaeale Lon-Protease die Funktion von FtsH in Archaeen ausübt (Ruepp et al., 2000).

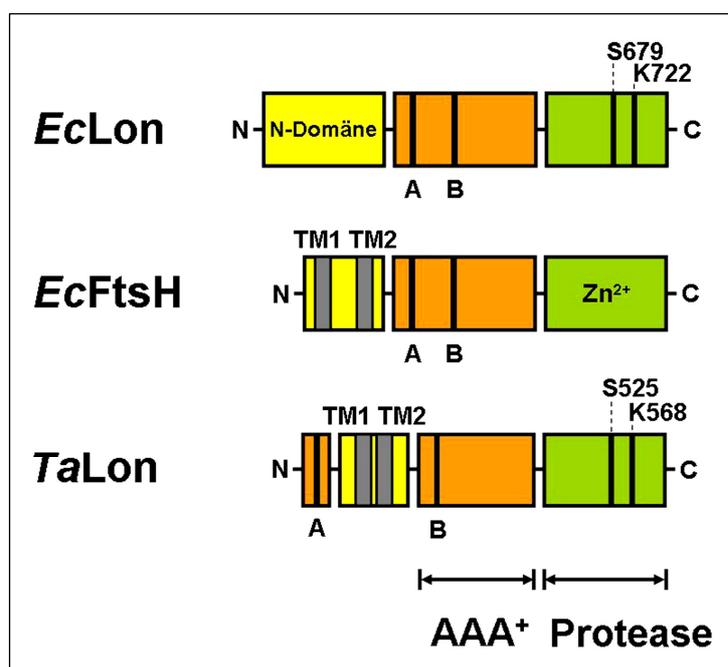


Abbildung 2.4:

Schemadarstellung der drei unterschiedlichen Klassen von AAA⁺-Proteasen anhand von prokaryontischen Beispielen.

Die Walker-Motive in den AAA⁺-Domänen sind mit A und B, Transmembranbereiche mit TM gekennzeichnet.

Lon aus *E. coli* (*EcLon*); FtsH aus *E. coli* (*EcFtsH*), Lon aus *T. acidophilum* (*TaLon*).

Im Vergleich zum Proteasom oder den Clp-Proteasen stehen AAA⁺-Proteasen vor besonderen mechanischen Herausforderungen, da sie Protease- und ATPase-Domäne auf einer Polypeptidkette vereinigen. Eine interessante Überlegung ist, dass für diese Klasse von Proteasen ein Rotationsmechanismus für Proteinfaltung und -abbau nicht in Frage kommt, da Protease- und ATPase-Domäne nicht unabhängig gegeneinander verschiebbar sind (Ogura und Wilkinson, 2001). Eine weitere interessante Frage ist, wie diese Enzyme den Zugang von Substraten zur Protease-Domäne regulieren. Das eukaryontische Proteasom ist durch eine N-terminale Sequenz in der α -Untereinheit autoinhibiert, die den Zugang zum 20S Partikel blockiert (Groll et al., 1997). Eine der sechs ATPasen im 19S Basiskomplex reguliert den Zugang von Substraten in die proteolytische Kammer, ein Prozess der auch als „gating“ bezeichnet wird (Köhler et al., 2001). Im Gegensatz dazu findet man in den α -Untereinheiten des archaebakteriellen Proteasoms eine offene Pore, die nicht durch PAN reguliert zu sein scheint (Groll et al., 2003). Für die bakterielle Protease HslUV wurde gezeigt, dass HslV durch Assoziation mit der ATPase HslU aktiviert wird, allerdings nicht wie im Fall des Proteasoms durch Öffnung einer Pore, sondern durch Konformationsänderungen in der aktiven Tasche von HslV (Sousa et al., 2000). AAA⁺-Proteasen scheinen den Zugang zur Protease-Domäne direkt über den Nukleotidzustand ihrer AAA⁺-Domäne zu regulieren. In Abwesenheit von Nukleotid zeigen Lon und FtsH aus *E. coli* nur geringe bis keine proteolytische Aktivität (Goldberg et al., 1994; Karata et al., 2001).

Beim Sequenzvergleich von HslU mit den proteasomalen ATPasen Rpt1-6, den Hsp100/ClpP-ATPasen und den AAA⁺-Proteasen Lon und FtsH wurde ein weiteres konserviertes Motiv entdeckt, das in Zusammenhang mit einem gemeinsamen Translokationsmechanismus von Substraten in die Protease diskutiert wird. Das sogenannte „Pore-1“-Motiv enthält die konservierte Sequenz [F/Y/W]xG und befindet sich neben dem P-Loop, welcher die Phosphate des Nukleotids koordiniert. Es wird vermutet, dass der konservierte aromatische Rest über Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen das Substrat in die ATPase hineinzieht (Wang et al., 2001). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese inhibiert die Mutation der entsprechenden Reste den Proteinabbau durch ClpXP bzw. FtsH *in vivo* und *in vitro* (Kenniston et al., 2004; Yamada-Inagawa et al., 2003).

2.5 Die lösliche Lon-Protease

Die Funktionen von Lon in *E. coli* (*EcLon*) sind vielfältig. *EcLon* ist verantwortlich für den Abbau verschiedener regulatorischer Proteine wie zum Beispiel dem Zellteilungsinhibitor SulA (Mizusawa und Gottesman, 1983) und zeigt überlappende Substratspezifität mit HslUV (Wu et al., 1999). Ketten aus anorganischem Phosphat, die *E. coli* im Hungerzustand bildet,

stimulieren den Abbau ribosomaler Proteine durch Lon (Kuroda et al., 2001) und es gibt Hinweise auf eine Rolle von Lon während der Replikation von Plasmid-DNA (Maas, 2001). Ursprünglich wurde Lon sogar als DNA-bindendes Protein isoliert (Zehnbauer et al., 1981) und zeigt eine unter ATP-abhängigen Proteasen einzigartige Stimulation der ATPase- und Protease-Aktivität durch Einzelstrang-DNA (Chung und Goldberg, 1982).

Eine ähnliche Aktivität wurde für humanes Lon aus Mitochondrien gezeigt, das spezifisch an Einzelstrang-Regionen mitochondrialer Promotoren bindet und an der Replikation der mitochondrialen DNA beteiligt sein könnte (Fu und Markovitz, 1998). Lon aus Hefe-Mitochondrien wird auch als Pim1p bezeichnet und im Kern kodiert. Deletion von Lon in Hefe inhibiert den Abbau mitochondrialer Matrix-Proteine, beeinträchtigt die Atmung (Suzuki et al., 1994) und führt zum Verlust des mitochondrialen Genoms (Van Dyck et al., 1994). Versuche an Säugerzellen haben gezeigt, dass Lon in Mitochondrien für den Abbau von oxidierten Proteinen sorgt (Bota und Davies, 2002), ein Prozess der bei der Alterung von Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Bota et al., 2002; Bakala et al., 2003).

Während physiologische Studien zur Funktion der Lon-Protease eine große Bandbreite haben, ist über den Mechanismus und die Struktur der Lon-Protease nur wenig bekannt. Die Angaben über den Oligomerisierungszustand dieser AAA⁺-Protease variieren von Tetramer bis Oktamer (Goldberg et al., 1994) und elektronenmikroskopische Aufnahmen der mitochondrialen Lon-Protease zeigen ein ringförmiges Heptamer (Stahlberg et al., 1999). Sequenzvergleiche von Lon-Protease-Domänen aus verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass Lon keine klassische Serin-Protease ist, sondern eine Serin-Lysin-(S/K)-Diade enthält (Birghan et al., 2000). Dieses Modell wurde für Lon aus *E. coli* anhand von Mutagenese Experimenten bestätigt (Rotanova et al., 2003). Klassische Serin-Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin aber auch ClpP enthalten eine konservierte Triade aus Serin-Histidin-Aspartat. Die Hydroxylgruppe des Serin wird durch das Histidin in der Funktion einer allgemeinen Base aktiviert und führt einen nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung aus, während das Aspartat den Übergangszustand stabilisiert (Hedstrom, 2002). Bei S/K-Peptidasen arbeitet Lysin anstelle von Histidin als allgemeine Base, der grundsätzliche Mechanismus von Peptidhydrolyse als Acylierungs-Deacylierungsreaktion über einen negativ geladenen, tetraederförmigen Übergangszustand bleibt aber bei allen Serin-Proteasen erhalten (Paetzel et al., 2002; Hedstrom, 2002). Die am besten charakterisierte S/K-Peptidase ist die Typ-I-Signal-Peptidase aus Bakterien, die nach der Sekretion von Proteinen ins Periplasma deren Signalpeptide entfernt. Signal-Peptidasen (SPasen) sind membranständige, ATP-unabhängige Proteasen, die ubiquitär nach der Translokation von Proteinen über Membranen die Spaltung der entsprechenden Signalpeptide katalysieren. Die S/K-Diade ist dabei nicht in allen Klassen von SPasen konserviert (Paetzel et al., 2002). Abbildung 2.5 zeigt ein Modell der S/K-katalysierten Peptidhydrolyse am Beispiel der Signal-I-Peptidase aus *E. coli*.

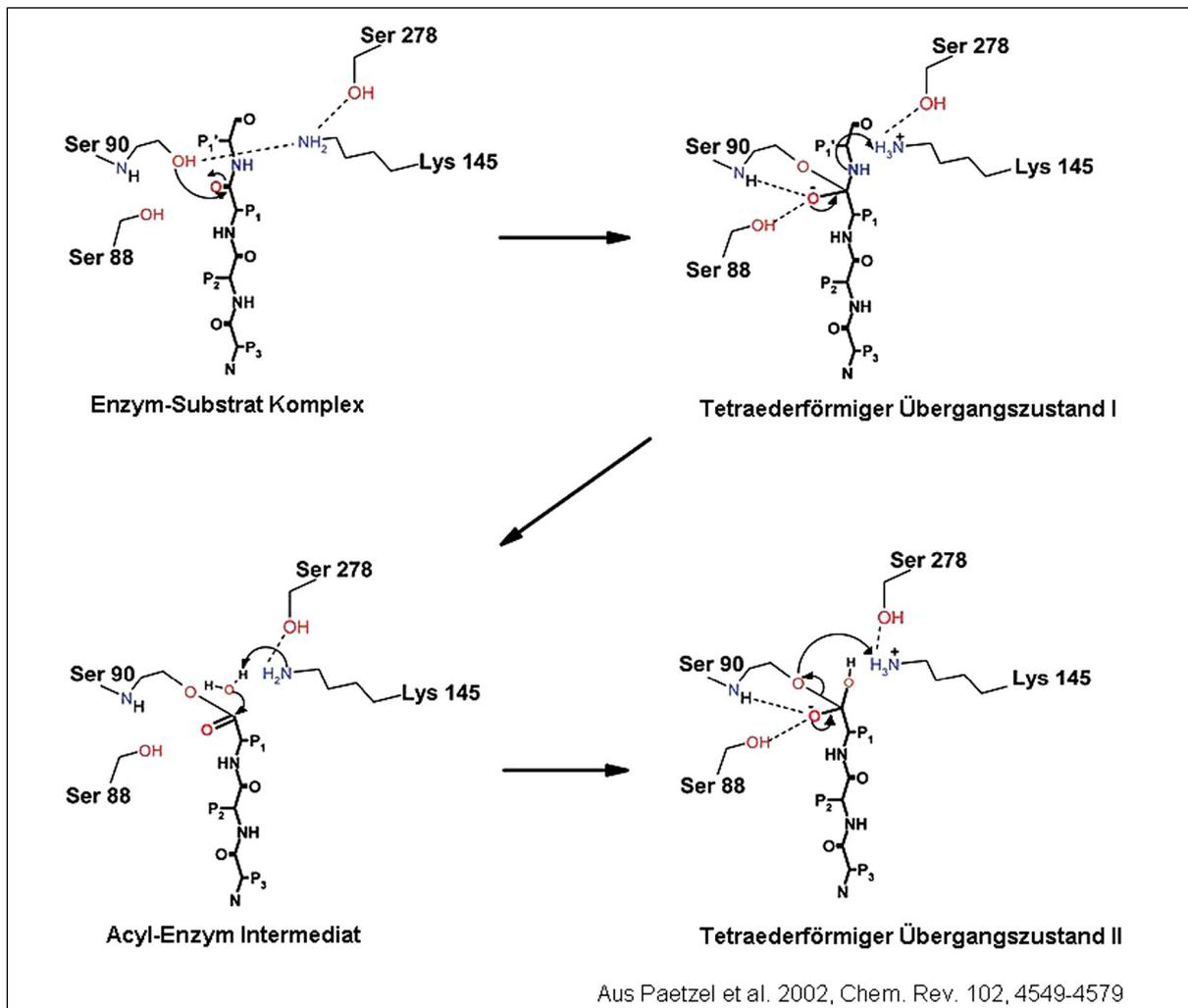


Abbildung 2.5: Die Serin-Lysin-Diade: Die Hydrolyse von Peptidbindungen erfolgt nach einem allgemeinen Säure-Base Mechanismus (hier am Beispiel der S/K-Signal-I-Peptidase aus *E. coli*). Die Hydroxylgruppe (allgemeine Säure) des katalytischen Serins (Ser 90) wird durch das ϵ -Amin des katalytischen Lysins (Lys 145) aktiviert (allgemeine Base). Nach dem nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung bildet sich ein tetraederförmiger Übergangszustand, dessen negative Ladung in der Oxyanionentasche mit Hilfe eines weiteren Serin-Restes (Ser 88) stabilisiert wird. Katalysiert durch Lysin- ϵ -NH₃⁺ (allgemeine Säure) wird die Peptidbindung gespalten und der N-terminale Teil verbleibt als Acyl-Intermediat in der aktiven Tasche, während der C-terminale Teil des Substrats die aktive Tasche verlässt. In einer zweiten Runde wird ein Wassermolekül (allgemeine Säure) durch das ϵ -Amin des Lysins aktiviert (allgemeine Base) und führt nach nukleophilem Angriff auf die Acylgruppe über einen zweiten tetraederförmigen Übergangszustand zur Spaltung des Acyl-Enzym-Intermediats. Ein weiterer konservierter Serin-Rest (Ser 278) dient zur Stabilisierung der geladenen Aminogruppe im Übergangszustand und der Positionierung des Wassermoleküls für den nukleophilen Angriff auf das Acyl-Enzym-Derivat.

Eine kürzlich gelöste Kristallstruktur der Protease-Domäne von Lon aus *E. coli* bestätigte den S/K-Mechanismus für die Lon-Protease-Domäne (Botos et al., 2004). Die Faltung der Lon-Domäne ist nicht mit der von anderen Serin-Proteasen oder der Signal-I-Peptidase verwandt und bildet eine eigene topologische Klasse (Abbildung 2.6). Die Protease-Domäne wurde als Hexamer kristallisiert, was die Vermutung zulässt, dass auch das gesamte Molekül ein Hexamer bilden könnte.

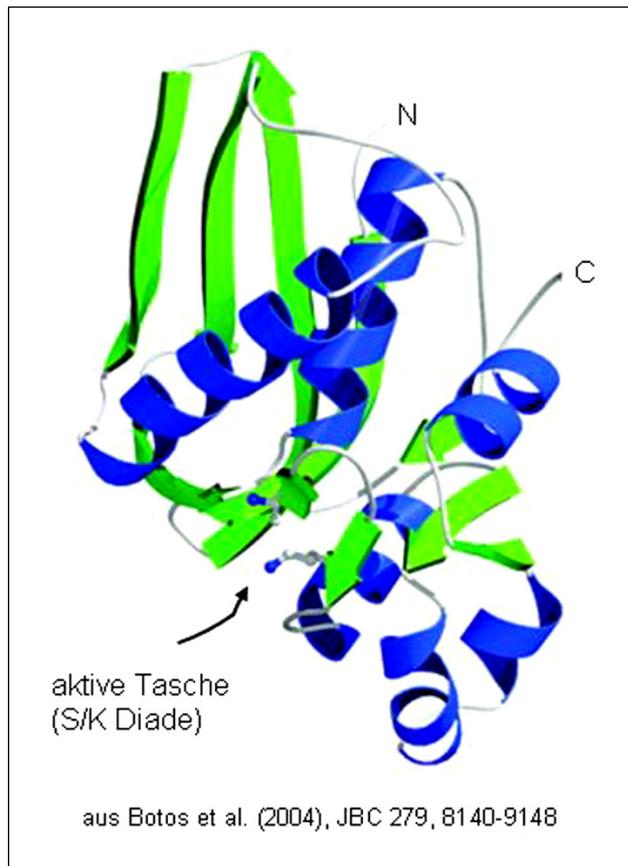


Abbildung 2.6: Kristallstruktur der Protease-Domäne der löslichen AAA⁺-Protease Lon aus *E. coli*.

Die Lon-Domäne bildet eine neue Faltung bestehend aus sechs α -Helices und zehn β -Faltblattsträngen. Helix eins und zwei interagieren mit dem ersten β -Faltblatt und bilden eine N-terminale Subdomäne. Die C-terminale Subdomäne ist weniger kompakt organisiert und besteht aus sich abwechselnden kurzen α -Helices und β -Strängen. Zwischen den beiden Subdomänen liegt eine Spalte, an deren dem C- und N-Terminus abgewandten Ende die beiden katalytischen Reste Serin (Ser 679) und Lysin (Lys 722) lokalisiert sind. Im Unterschied zur SPase I scheint ein konservierter Threonin-Rest (Thr 704) das katalytische Lysin 722 im Übergangszustand zu stabilisieren während Aspartat 676 über ein Wassermolekül die negative Ladung koordiniert (vergleiche Ser 278 und Ser 88 in Abbildung 2.5).

servierter Threonin-Rest (Thr 704) das katalytische Lysin 722 im Übergangszustand zu stabilisieren während Aspartat 676 über ein Wassermolekül die negative Ladung koordiniert (vergleiche Ser 278 und Ser 88 in Abbildung 2.5).

2.6 Membranständige AAA⁺-Proteasen

Bakterielles FtsH ist die am besten charakterisierte membranständige AAA⁺-Protease und die einzige essentielle ATP-abhängige ATPase in *E. coli* (Tomoyasu et al., 1993). FtsH ist verantwortlich für den Abbau regulatorischer cytosolischer Proteine wie dem Hitzeschock Transkriptionsfaktor σ^{32} (Tomoyasu et al., 1995) oder die Phagen-Proteine λ CII (Shotland et al., 1997) und λ CIII (Herman et al., 1997). Tatsächlich wurde FtsH ursprünglich in Zellen entdeckt, die eine Mutation im Gen-Lokus *hflB* trugen und durch ihre hohe Lysirrate bei In-

fektion mit dem Bakteriophagen λ auffielen (*hfl* = *high frequency of lysogenization*). Der Name FtsH geht auf eine Gruppe zurück, die eine Zelllinie mit temperatursensitivem Wachstumsdefekt isolierte. Bei der restriktiven Temperatur bildeten die Zellen lange Filamente, was auf eine Mutation im Gen-Lokus *ftsH* zurückgeführt wurde (*filamentation temperature-sensitive*). Später stellte sich heraus, dass der entsprechende Phenotyp auf eine zusätzlich Mutation in einem anderen Gen zurückging und mit *ftsH* nichts zu tun hatte, trotzdem hat sich der Name durchgesetzt (Schumann, 1999).

FtsH ist eine membranständige, Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease (Abbildung 2.4), die neben regulativen löslichen Proteinen auch Membranproteine abbaut. Die SecY-Untereinheit der bakteriellen Translokase SecYEG, ein integrales Membranprotein bestehend aus elf Membranhelices, wird von FtsH in ATP-abhängiger Weise abgebaut (Kihara et al., 1995; Akiyama et al., 1996). Ebenso ist die Untereinheit a der F_0 -ATP-Synthase in unkomplexierter Form ein Substrat für FtsH, ein Mechanismus der die Zelle vor der Ausbildung unkontrollierter Poren in der Membran bewahrt (Akiyama et al., 1996). YccA ist ein weiteres Membranproteinsubstrat von FtsH mit bisher unbekannter Funktion (Kihara et al., 1998).

Anhand modifizierter SecY- und YccA-Derivate mit zusätzlichen periplasmatischen Domänen konnte gezeigt werden, dass FtsH lose gefaltete periplasmatische Domänen über die Membran translozieren und abbauen kann. Darauf basierend wurde ein Arbeitsmodell mit FtsH als aktiver Translokase entworfen, die autokatalytisch Membranproteinsubstrate aus der Membran herauszieht, entfaltet und abbaut. Hinweise auf eine eventuelle Rolle der SecYEG Translokase in diesem Prozess konnten bisher nicht gefunden werden, können aber nicht ganz ausgeschlossen werden (Kihara et al., 1999). Alternativ ließe sich ein Modell entwerfen, bei dem FtsH Membranproteine durch den Abbau ihrer löslichen Segmente soweit destabilisiert, dass diese zerfallen und etwaige in der Membran verbleibende Segmente von ATP-unabhängigen Intramembranproteasen zerlegt würden. Das letztere Modell ist insbesondere für die mitochondrialen Homologe von FtsH interessant, die in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind und zwei Varianten mit gegensätzlicher Topologie aufweisen. Die m-AAA Proteasen ragen in die mitochondriale Matrix und die i-AAA Proteasen in den Intramembranbereich. Membranproteinsubstrate könnten somit von beiden Seiten gleichzeitig destabilisiert werden (Langer, 2000).

Neben dem *hflB*-Lokus wurden noch zwei weitere *hfl*-Gene entdeckt, *hflC* und *hflK*, die für zwei Membranproteine mit großen periplasmatischen Domänen kodieren (Noble et al., 1993). Aus *E. coli* konnte FtsH im Komplex mit HflCK isoliert werden, der mit einer Größe von ungefähr 1 MDa einer Stöchiometrie von $(FtsH)_6(HflCK)_6$ entspräche (Saikawa et al., 2004). Biochemische Experimente belegen, dass die Assoziation von FtsH mit HflCK den Abbau von Membranprotein verlangsamt und den Abbau von löslichen Substraten beschleunigt (Kihara et al., 1996; Kihara et al., 1998). Die Details dieses Mechanismus sind unbekannt,

aber HflC und HflK zeigen Sequenzhomologie zu Prohibitinen, einer konservierten Proteinfamilie in Eukaryonten. Prohibitine sind integrale mitochondriale Proteine der inneren Membran und bilden große Komplexe mit den mitochondrialen m-AAA-Proteasen. Prohibitine inhibieren den Abbau von Membranproteinen durch m-AAA-Proteasen, scheinen aber i-AAA-Proteasen nicht zu beeinflussen (Steglich et al., 1999).

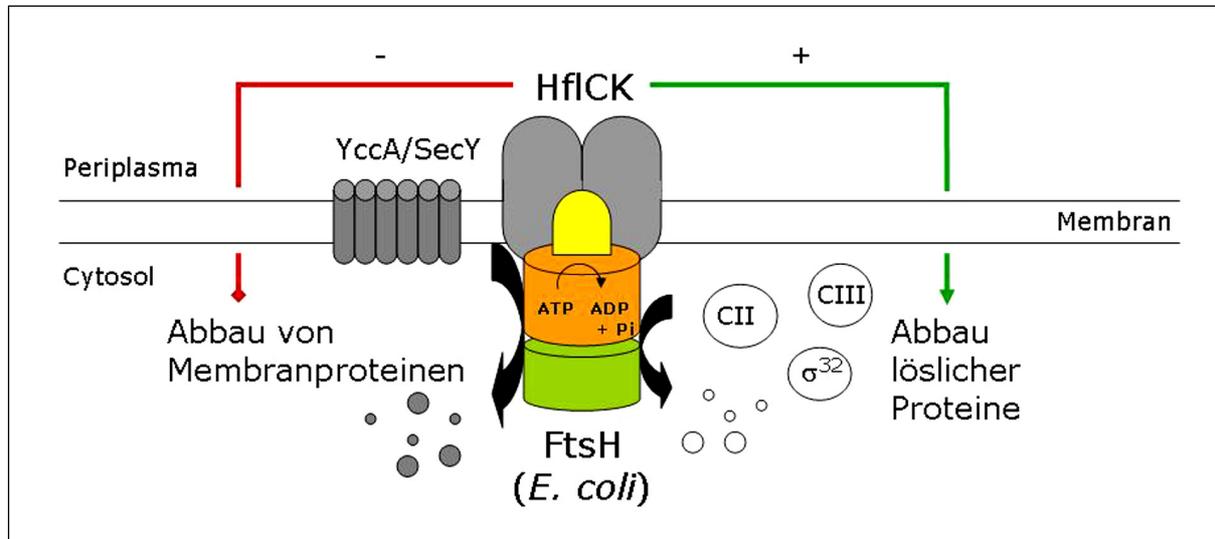


Abbildung 2.7: FtsH aus *E. coli*. FtsH bildet eine oligomere Struktur in der bakteriellen Membran mit der ATPase- und Protease-Domäne auf der cytosolischen Seite. Der Transmembranbereich besteht aus zwei hydrophoben Helices und einem periplasmatischen Loop, der mit den Prohibitinen HflC und HflK assoziiert. Die Assoziation von FtsH mit HfICK stimuliert den Abbau von löslichen Proteinen und inhibiert den Abbau von Membranproteinen über einen unbekanntes Mechanismus.

Die physiologische Relevanz eukaryontischer membranständiger AAA⁺-Proteasen wird durch die Zusammenhänge mitochondrialer AAA⁺-Proteasen mit schweren spastischen Erkrankungen aufgezeigt. Die erbliche spastische Paraplegie (auch HSP für „hereditary spastic paraplegia“) geht mit Schwäche und Spasten in den unteren Körpergliedern einher und gehört zu einer genetisch heterogenen Gruppe neurodegenerativer Krankheiten, die eines von 10.000 Individuen betreffen. Bisher konnten acht Gene mit krankheitsauslösenden Mutationen identifiziert werden, darunter Paraplegin, eine mitochondriale m-AAA-Protease (Casari et al., 1998). Der Verlust dieser Protease beeinträchtigt die Atmungsaktivität der Mitochondrien und erhöht ihre Anfälligkeit für oxidativen Stress (Atorino et al., 2003).

Für ein detailliertes Verständnis membranständiger AAA⁺-Proteasen sind strukturelle Informationen unablässig. FtsH gehört zu den klassischen AAA-Proteinen und kürzlich gelang zwei Gruppen die Kristallisation der isolierten AAA-Domäne (Krzywda et al., 2002; Niwa et

al., 2002). Die AAA-Domäne von FtsH besteht aus einer N-terminalen Subdomäne mit einem zentralen, parallelen β -Faltblatt umgeben von acht α -Helices. Die C-terminale Subdomäne setzt sich aus einem Bündel von vier Helices und einem kurzen parallelen β -Faltblatt zusammen. Die in AAA-Proteinen konservierten Motive und ihre Funktionen wurden bereits in Abschnitt 2.3 beschrieben. Abbildung 2.8 zeigt die Struktur der AAA-Domäne von FtsH und die Lokalisation der besagten Sequenzen. Die Nukleotidbindetasche liegt zwischen den beiden Subdomänen, wobei die Phosphatgruppen des Nukleotids von Walker-A und -B koordiniert werden. Die nukleotidfreie Struktur unterscheidet sich kaum von der AMPPNP-Form, während ADP eine andere Orientierung der SRH induziert. Diese Konformationsänderung wird über den Sensor-1-Rest vermittelt, der durch ein Wassermolekül mit den β - und γ -Phosphaten interagiert (Niwa et al., 2002). Größere Konformationsänderungen, insbesondere der helikalen C-terminalen Subdomäne, konnten nicht beobachtet werden, obwohl biochemische Daten eine Konformationsänderung in FtsH bei Bindung von ATP belegen (Akiyama et al., 1998). Das Fehlen größerer struktureller Veränderungen ist wahrscheinlich auf Gitterkräfte im Kristall zurückzuführen, da die verschiedenen Nukleotide erst nach Kristallisation zugesetzt wurden („Soaking“-Methode).

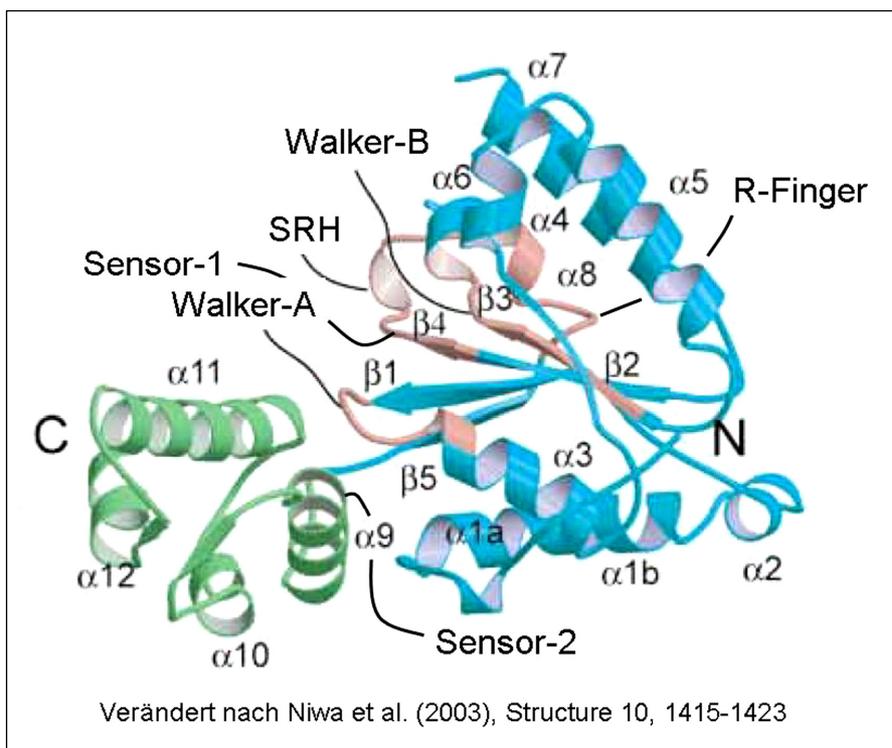


Abbildung 2.8: Struktur der AAA-Domäne von FtsH aus *Thermus thermophilus*. Die ATPase-Domäne von FtsH zeigt die klassische AAA-Faltung mit N-terminaler RecA-Domäne und C-terminaler helikaler Subdomäne. Die Nukleotidbindetasche befindet sich an der Peripherie zwischen den beiden Subdomänen.

Zur Erläuterung von Sequenz und Funktion der gekennzeichneten konservierten Motive siehe Abschnitt 2.3 und Tabelle 2.1. Die Position des Sensor-2-Restes wurde der Vollständigkeit halber angezeigt, FtsH selber besitzt an dieser Stelle ein Alanin (siehe Abschnitt 2.3).

Der genaue Oligomerisierungszustand von FtsH ist bislang unbekannt, man geht von einem homooligomeren Komplex mit ringförmiger Struktur aus (Shotland et al., 1997). Niwa et al. (2002) gelang die Kristallisation der ATPase-Domäne von FtsH als Schraube mit sechsfach Symmetrie, was eine für AAA-Proteine übliche Hexamer-Organisation von FtsH nahe legt. Entsprechend befindet sich der Arginin-Finger jeder Untereinheit in einer Position, die ihm erlaubt, das γ -Phosphat eines in der Nachbaruntereinheit gebundenen AMPPNP-Moleküls zu koordinieren. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, befinden sich Sensor-1 and der Arginin-Finger an entgegengesetzten Enden einer kurzen Helix (hier $\alpha 8$), und bilden damit voraussichtlich eine mechanische Achse, die für Kooperativität im ATPase-Ring bei Bindung und Hydrolyse von ATP sorgt (Lupas und Martin, 2002).

Niwa et al. (2002) präsentieren ein Modell für ein FtsH-Hexamer, das mit den bereits bekannten AAA⁺-Strukturen übereinstimmt (Ogura und Wilkinson, 2001). Die membranzugewandte Seite des Hexamers ist eher ungeladen, während die zur Protease-Domäne orientierte Seite ein positives elektrostatisches Potential besitzt.

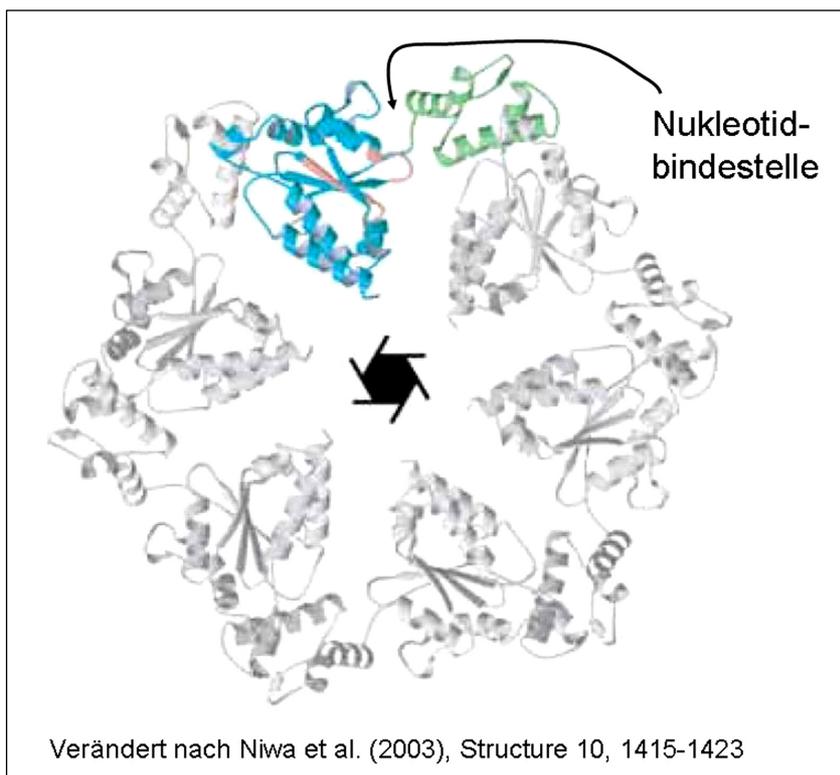


Abbildung 2.9: Hexamer-Modell der ATPase-Domäne von FtsH aus *Thermus thermophilus*.

Die RecA-ähnliche Subdomäne (blau) zeigt keilförmig zur Mitte des Rings, während die α -helikale Subdomäne an der Peripherie zwischen den einzelnen Untereinheiten liegt (grün). Das Modell zeigt den ATPase-Ring mit sechs gebundenen ATP-Molekülen von der membranzugewandten

Seite aus. Das hydrophobe „Pore-1“-Motiv (MFVG) umkleidet den Rand der inneren Pore des Hexamers und spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Translokation von Substraten in die Protease.

Für Yme1p, eine homologe i-AAA-Protease aus Hefe, wurde eine Substratbindestelle identifiziert (Leonhard et al., 1999), deren entsprechender Bereich bei FtsH auf der Membranseite

des Hexamers liegt und sternförmig von der Peripherie des Rings auf die zentrale Pore zu-
läuft. Zusammen mit der Annahme, dass die helikale C-terminale Subdomäne wie für
Clp/Hsp100-AAA⁺-Proteine als Substratbindedomäne fungiert (Smith et al., 1999), ergibt sich
ein Modell, bei dem Substrate am äußeren Ring gebunden und zur inneren Pore des Hexamers
transportiert werden. Am inneren Rand der zentralen Pore befindet sich das konservierte, hy-
drophobe „Pore-1“-Motiv (siehe Abschnitt 2.2), das bereits für HslUV als essentiell für die
ATP-abhängige Translokation von Substraten in die Protease beschrieben wurde (Wang et al.,
2001).

2.7 Aufgabenstellung

Die Gruppe der archaealen Lon-Proteasen ist bislang nicht auf Protein-Ebene untersucht
worden. Ziel dieser Arbeit war es, die archaeale Lon-Protease als funktionale AAA⁺-Protease
zu etablieren und die Familie der AAA⁺-Proteasen um ein Modellenzym für mechanistische
und strukturelle Studien zu erweitern.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Name	Abkürzung	Hersteller
Acrylamid (Protogel 30% (w/v))		National Diagnostics
Adenosin-5'-Diphosphat	ADP	Roche Diagnostocs
Adenosin-5'-(β,γ-Imido)-Triphosphat	AMPPNP	Sigma
Adenosin-5'-Triphosphat	ATP	Sigma
Adenosin-5'-(γ-Thio)-Triphosphat	ATPγS	Sigma
Agarose		Sigma
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Ammoniumhydroxid	NH_4OH	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Merck
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
Ampicillin	Amp	Sigma
Bacto Agar		Difco
Bacto Tryptone		Difco
Bacto Yeast Extract		Difco
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	BCIP	Sigma
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Chloroform		Merck
Citronensäure-Monohydrat		Merck
Cobaltsulfat-Heptahydrat	$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
deionisiertes Wasser	$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	Millipore
Desoxyribonuklease I	DNase I	Sigma
destilliertes Wasser	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	MPI
Dimethylformamid	DMF	Merck
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HP0}_4$	Merck
1,4-Dithiothreitol	DTT	Merck
Dodecyl-β-D-Maltopyranosid	DDM	Anatrace
Eisentrichlorid-Hexahydrat	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Essigsäure, konz.	HAc	Merck

Ethidiumbromid	EtBr	Merck
Ethanol absolut	EtOH	Merck
Glukose		Merck
Glycin		Merck
Glycerin	86-88%	Merck
	100% ultrapure	Sigma
Imidazol		Merck
Isopropanol		Merck
Kaliumacetat		Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
Kupferdichlorid-Dihydrat	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	Sigma
Kaliumhydroxid	KOH	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Sigma
Malachitgrün		Sigma
Mangandichlorid-Tetrahydrat	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	Sigma
β-Mercaptoethanol	β-ME	Sigma
2-Morpholinoethansulfonsäure	MES	Serva
Methanol	MeOH	Merck
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Merck
Natriumlaurylsulfat	SDS	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Sigma
Natriumtetraborat-Dekahydrat	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	Sigma
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Natriumphosphat	Na ₃ PO ₄	Merck
Nitrilotriessigsäure-Agarose (Superflow)	Ni ²⁺ -NTA	Qiagen
4-Nitrotetrazolium-Chloridblau	NTB	Sigma
Orthophosphorsäure	H ₃ O ₄ P	Merck
Piperazin-1,4-Bis-(2-Ethansulfonsäure)	Pipes	Sigma
Ponceau-S		Sigma
Ribonuklease	RNase	Sigma
Salzsäure, konz.	HCl	Merck
Schwefelsäure, konz.	H ₂ SO ₄	Merck

Sulfosalicylsäure		Merck
1-Thio- β -D-Galactopyranosid	IPTG	Biomol
Titriplex	EDTA	Merck
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Tris	Riedel de Haen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	TEMED	Serva
Trichloressigsäure	TCA	Merck
Triton-X100 ultrapure		Sigma
Tween-20		Sigma
Uranylacetat	UAc	Merck
Vanadylsulfat-Pentahydrat	$\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Sigma
Zinksulfat-Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Sigma

3.2 Geräte

Name	Bezeichnung	Firma
Autoklav		Tecnomara
Blockthermostat	TR-L288 BT-200	Liebisch Kleinfeld Labortechnik
Brutschrank		Heraeus
Cell-Disrupter	EmulsiFlex-C5	Avestin
Eismaschine		Ziegra
ELISA-Platte	Microlon, 96K	Greiner
Fraktionssammler	LKB RediFrac	Pharmacia
HPLC	ÄKTA purifier 900	Pharmacia Biotech
Kulturschüttler	Cellstar Innova 3000	Nunc New Brunswick Scientific
Küvetten	1,5 ml PMMA	Roth
Magnetrührer	combimag RCT	Ika Labortechnik
Mikrowelle	Micromat	AEG
MilliQ-Anlage	PLUS Ultra Pure Water System	Millipore
PCR-Thermocycler	PCR System 2400	Perkin Elmer
Peristaltikpumpe	Pump P1	Pharmacia
pH-Meter	pH525	WTW
Photometer	UV/VIS Spectrometer Lambda 40	Perkin Elmer
Pipetten	Pipetman, 10, 20, 100, 200, 1000 μl	Gilson
Power Supply	EPS 301	Pharmacia

Reaktionsgefäße	PowerPak 300 50 mL/15 mL Gamma sterilisiert 1,5/2 ml	Biorad TPP Eppendorf
Schreiber	LKB Rec 101	Pharmacia
Schüttler	Unimax 2010	Heidolph
Sicherheitswerkbank	antair BSK	GLW
Spektrofluorometer	Fluostar Optima	bmg
Thermomixer	5436	Eppendorf
UV-Detektor	Uvicord SII	Pharmacia
UV-Tisch	Transilluminator	Herolab
Vortexer	Vortex Genie 2	Bender&Hobein
Waage		Sartorius
Wasserbad		Haake
Zentrifugen	Avanti J25 (Rotor JA 10) Centrifuge 5417 R (Rotor F45-30-11) Optima LE-80K (Rotor 55.2 Ti) PMC-060 Rotanta 46 RS Sorvall RC-SB (Rotor SS 34)	Beckman Eppendorf Beckman PolyLabo Hettich Du Pont Instruments
Zentrifugenröhrchen		Beckman

Kammern für Agarose-Gele (3.7.12) und Säulenkörper, die nicht näher spezifiziert sind, wurden in der hausinternen Zentralwerksatt angefertigt.

3.3 Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Quelle
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)	Novagen
BL21(DE3)C43	BL21(DE3)-Derivat, genaue Mutationen unbekannt (Miroux and Walker, 1996)	Avidis
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	(Ruepp, Graml et al. 2000)	Prof. Dr. Karl O. Stetter, Universität Regensburg

3.4 Vektoren/Plasmide

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Quelle
pET22b(+)	<i>amp</i>	Novagen
pET22b(+) <i>talonwt</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.13
pET22b(+) <i>talonK63A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonD241A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonN293A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonR305A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonR375A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonR382A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonS525A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>talonK568A</i>	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pLonwt	<i>amp</i>	Fischer und Glockshuber, 1993
pLonS679A	<i>amp</i>	Fischer und Glockshuber, 1993
pLonK362A	<i>amp</i>	Fischer und Glockshuber, 1994
pLonK722A	<i>amp</i>	Abschnitt 3.7.9
pET22b(+) <i>GFP-Cal</i>	<i>amp</i>	Ami Navon, Harvard Medical School, Boston, USA

3.5 Medien

<p>Medium für <i>Thermoplasma acidophilum</i></p> <p>10 ml Lösung A</p> <p>100 ml Lösung B</p> <p>10 ml 20% (w/v) Bacto Yeast Extract (autoklaviert)</p> <p>4 ml 98% H₂SO₄ (~ pH 1)</p> <p>1 g Glukose</p> <p>ad 1 l H₂O_{dest.}</p> <p>Medium A</p> <p>1.93 g FeCl₃·6 H₂O</p> <p>0.18 g MnCl₂·4 H₂O</p> <p>0.45 g Na₂B₄O₇·10 H₂O</p> <p>0.22 g ZnSO₄·7 H₂O</p>	<p>0.5 ml 1% (w/v) CuCl₂·2 H₂O</p> <p>0.3 ml 1% (w/v) Na₂MoO₄·2 H₂O</p> <p>0.3 ml 1% (w/v) VOSO₄·5 H₂O</p> <p>0.1 ml 1% (w/v) CoSO₄·7 H₂O</p> <p>ad 1 l H₂O_{dest.}; sterilfiltrieren (Lagerung bei 4°C)</p> <p>Medium B</p> <p>13.2 g (NH₄)₂SO₄</p> <p>3.72 g KH₂PO₄</p> <p>2.47 MgSO₄·7 H₂O</p> <p>0.74 g CaCl₂·2 H₂O</p> <p>ad 1 l H₂O_{dest.}; sterilfiltrieren (Lagerung bei 4°C)</p>
--	---

<p>LB-(Luria-Bertani)-Medium</p> <p>10 g Bacto Tryptone 5 g Bacto Yeast Extract 10 g NaCl ad 1 l H₂O_{dest.}</p> <p>Sterilisation im Autoklav (20 min, 121°C)</p> <p>Festagarplatten wurden durch Zugabe von 15 g/l Bacto Agar hergestellt. Zu Selektionszwecken wurden sowohl Flüssigmedium als auch Festagarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (3.6) versetzt.</p>	<p>SOC-Medium</p> <p>20 g Bacto Tryptone 5 g Bacto Yeast Extract 0.5 g NaCl 10 ml 250 mM KCl (1.86 g KCl in 100 ml H₂O_{dest.}) ad 1 l H₂O_{dest.}</p> <p>Sterilisation im Autoklav (20 min, 121°C).</p> <p>Dem abgekühlten Medium wurden je 5 ml 2 M MgCl₂ (19 g MgCl₂·6 H₂O in 100 ml H₂O_{dest.}) und 20 ml 1 M Glukose (18 g Glukose in 100 ml H₂O_{dest.}) sterilfiltriert zugegeben.</p>
---	--

3.6 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{MilliQ} angesetzt. Puffer für chromatographische Aufreinigungen wurden entgast und filtriert (0,45 µm, Apparatur von Nalgene).

<p>Ampicillin-Stocklösung (1000×)</p> <p>100 mg/ml Ampicillin in 1 M Tris-HCl pH 8 sterilfiltrieren (Lagerung bei -20°C)</p> <p>AP-Puffer</p> <p>100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl₂</p> <p>Auftragspuffer (5x)</p> <p>50% (v/v) Glycerin 0.1% (w/v) Bromphenolblau</p> <p>BCIP-Lösung</p> <p>50 mg BCIP in 1 ml 100% (v/v) DMF</p>	<p>Elektrophorese-Puffer</p> <p>190 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% (w/v) SDS</p> <p>Lösung I</p> <p>25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 50 mM Glukose</p> <p>Sterilisation im Autoklav (20 min, 121°C).</p> <p>Vor Gebrauch je 100µl Lösung I mit 10 µl RNase-Lösung (3.6) versetzen.</p> <p>Lösung II</p> <p>0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS</p> <p>Vor Verwendung frisch ansetzen.</p>
--	---

<p>Lösung III 3 M Kaliumacetat 10% (v/v) Essigsäure pH mit HCl auf > 4,8 einstellen.</p> <p>Malachitgrün-Lösung 5,25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 170 mg Malachitgrün in 37,5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ Das Ammoniummolybdat wurde in 4 N HCl gelöst und mit der Malachitgrün-Lösung versetzt. Die Lösung wurde auf 500 ml aufgefüllt und mind. 12 h bei 4°C inkubiert. Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert (Faltenfilter, Schleicher&Schuell) und mit 0,1% (v/v) Triton X-100 versetzt.</p> <p>MES-Puffer 50 mM MES pH 6,2 300 mM NaCl 20 mM MgCl_2 0,5 mM DDM</p> <p>Mn-Puffer 10 mM Pipes 250 mM KCl 60 mM MnCl_2 5 mM CaCl_2 pH 6,7 mit KOH, sterilfiltrieren</p> <p>Neuhoff-Lösung 10% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% (w/v) H_3PO_4</p> <p>NTA-Puffer 50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0 300 mM NaCl</p>	<p>10 mM Imidazol pH 8,0 Für die Reinigung von $Ta\text{Lon}_{\text{His}6}$ (3.8.6) wurde der NTA-Puffer zusätzlich mit 5 mM MgCl_2 versetzt.</p> <p>NTB-Lösung 50 mg NTB in 1 ml 70% (v/v) DMF</p> <p>NTAW-Puffer 50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0 Für die Reinigung von $Ta\text{Lon}_{\text{His}6}$ (3.8.6) wurde der NTAW-Puffer zusätzlich mit 5 mM MgCl_2 und 0,5 mM DDM versetzt.</p> <p>PBS 140 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 2,7 mM KCl 1,8 mM KH_2PO_4</p> <p>PBSE PBS + 20 mM EDTA</p> <p>PBST PBS + 0,05% (v/v) Tween 20</p> <p>Ponceau-S-Lösung 3% (w/v) TCA 3% (w/v) Sulfosalicylsäure 0,2% (w/v) Ponceau-S</p> <p>Reaktionspuffer 50 mM MES pH 6,2 20 mM MgCl_2</p>
--	--

0,5 mM DDM	Ta-Puffer
RNase-Lösung	50 mM Tris-HCl pH 7,5
10 mM Tris-HCl pH 7,5	5 mM MgCl ₂
15 mM NaCl	1 mM ATP
5 mg/ml RNase	TE-Puffer
Lösung 15 min bei 95°C inkubieren, bei RT langsam abkühlen lassen und bei -20°C lagern.	10 mM Tris-HCl pH 8,0
Sammelgel-Puffer (4×)	1 mM EDTA
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Trenngel-Puffer (4 ×)
0,4% (w/v) SDS	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
SDS-Probenpuffer (6 ×)	0,4% (w/v) SDS
0,3 M Na ₃ PO ₄ pH 6,8	Transfer-Puffer
10% (w/v) SDS	190 mM Glycin
30% (v/v) Glycerin	25 mM Tris
0,6 M DTT	20% (v/v) Methanol
0,1% (w/v) Bromphenolblau	0,02% (w/v) SDS
Standard-Puffer	Trockner-Lösung
50 mM Tris-HCl pH 8,0	20% (v/v) Ethanol
20 mM MgCl ₂	10% (v/v) Glycerin
10% (v/v) Glycerin (100%)	Tris-Puffer
0,5 mM β-Mercaptoethanol	25 mM Tris pH 7,5
TAE-Puffer	300 mM NaCl
40 mM Tris/Essigsäure pH 8,0	
1 mM EDTA	

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Kultivierung *Thermoplasma acidophilum*

25 ml *Thermoplasma*-Medium (3.5) wurden im Ölbad auf 59°C vorgewärmt und mit 1,5 ml tiefgefrorener Dauerkultur (3.7.2) inokuliert. Die Kultur wurde 3-4 Tage bei 59°C und 150 rpm auf eine OD_{540nm} von 0,4-0,5 angezogen, in 1 l frisches, vorgewärmtes Medium überführt und weiter inkubiert (59°C, 150 rpm). Bei einer OD_{540 nm} = 0,6-0,7 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000×g für 15 min bei 4°C geerntet und direkt weiter verarbeitet. Größere Menge *Thermoplasma*-Zellen wurden als gefrorenes Pellet von Prof. Dr. Karl O. Stetter (Universität Regensburg) bezogen.

3.7.2 *Thermoplasma*-Dauerkultur

100 ml einer 4-Tage-Kultur (3.7.1) mit einer OD_{540nm} von 0,55 wurden auf RT abgekühlt und mit 7% iger NH₄OH-Lösung auf pH 3 titriert (2,2 ml). Nach Zugabe von 15 g Sukrose wurde die Kultur in 1,5 ml Aliquots bei -70°C eingefroren.

3.7.3 CaCl₂-kompetente *E.-coli*-Zellen

Einige Mikroliter einer *E.-coli*-Dauerkultur (3.7.5) wurden auf einer LB-Festagarplatte (3.5) ausgestrichen (Verdünnungsausstrich) und für 12-24 h bei 37°C inkubiert. 10 ml LB-Medium (3.5) wurden mit einer vereinzelt Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. 1 ml der Über-Nacht-Kultur wurde in 100 ml frisches LB-Medium überführt und weitere 2-3 h bei 37°C angezogen. Bei einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 wurden die Zellen geerntet (3000×g, 10 min, 4°C). Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C und mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 100 ml Wasser resuspendiert, sedimentiert (3000×g, 10 min, 4°C) und in 50 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (3000×g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml 100 mM CaCl₂ + 15% (v/v) Glycerin resuspendiert und auf ein Endvolumen von 2 ml verdünnt. Die Zellsuspension wurde in 50-µl-Aliquots schockgefroren (N₂) und bei -70°C gelagert.

3.7.4 MnCl₂-kompetente *E.-coli*-Zellen (nach Hanahan, 1983)

Einige Mikroliter einer *E.-coli*-Dauerkulturen (3.7.5) wurden auf einer LB-Festagarplatte (3.5) ausgestrichen (Verdünnungsausstrich) und für 12-24 h bei 37°C inkubiert. 100 ml SOB-Medium (3.5 SOC ohne Glukose) wurden mit einer vereinzelt Kolonie angeimpft und 24 h

bei 22°C inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 wurden die Zellen geerntet (3000×g, 10 min, 4°C). Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C und mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden in 40 ml Mn-Puffer (3.6) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Sedimentation (3000×g, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 8 ml Mn-Puffer aufgenommen und mit 600 µl DMSO versetzt. Nach 10 min Inkubation der Suspension auf Eis wurde diese in 125-µl-Aliquots schockgefroren (LN₂) und bei -70°C gelagert.

3.7.5 *E.-coli*-Dauerkulturen

5 ml LB-Medium (3.5) wurden mit einer vereinzelt *E.-coli*-Kolonie angeimpft und 12-14 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Bei Kulturen ohne Plasmid-DNA wurden 1440 ml Kultur mit 360 ml autoklaviertem Glycerin versetzt (Endkonzentration 20% (v/v) Glycerin) und bei Kulturen mit Plasmid-DNA wurden 1660 µl Kultur mit 140 µl autoklaviertem Glycerin versetzt (Endkonzentration 8% (v/v) Glycerin). Die Glycerinkulturen wurden bei -70°C eingefroren und aufbewahrt.

3.7.6 Transformation CaCl₂-kompetenter *E.-coli*-Zellen

50 µl kompetenter Zellen (3.7.3) wurden mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA (3.4) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 40 s Hitzeschock bei 42°C wurde die Suspension weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert und mit 200 µl SOC-Medium (3.5) versetzt. Nach 20 min bei 37°C wurden die Zellen sedimentiert und 150 µl des Überstandes verworfen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Selektivplatten (3.5) ausgestrichen.

3.7.7 Transformation MnCl₂-kompetenter *E.-coli*-Zellen

125 µl MnCl₂-kompetenter Zellen (3.7.4) wurden mit 1 µl PCR-Ansatz (3.7.9) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 40 s Hitzeschock bei 42°C wurde die Suspension weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert und mit 200 µl SOC-Medium (3.5) versetzt. Nach 20 min bei 37°C wurden die Zellen sedimentiert und 200 µl des Überstandes verworfen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Selektivplatten (3.5) ausgestrichen.

3.7.8 Überexpression in *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* in größeren Mengen Flüssigmedium wurden Glaskolben mit Schikanen verwendet. Die Kolben wurden für eine optimale Sauerstoffversorgung der Zellen maximal zu 1/3 ihres Volumens mit Medium befüllt. Wenn nicht anders angegeben wurden

die Kulturen bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Zur Überexpression von Proteinen in *E. coli* wurden CaCl₂-kompetente (3.7.3) BL21-Zellen (3.3) mit dem gewünschten Plasmid (3.4) transformiert (3.7.6). Eine vereinzelte *E.-coli*-Kolonie wurde in 5 ml LB_{Amp} (3.5) über Tag angezogen. Abends wurden 100 µl der Kultur in 100 ml frisches Medium überführt und über Nacht inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 5 ml Über-Nacht-Kultur in 1 l vorgewärmtes LB_{Amp}-Medium gegeben und weitere 2-3 h kultiviert. Bei einer OD_{600nm} von 0,6 wurde die Überexpression durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Nach 4 h Überexpression wurden die Zellen geerntet (5000×g, 10 min, 4°C), mit eiskaltem 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen und bei -80°C gelagert.

3.7.9 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese von Aminosäuren wurde mit dem QuickChange[®]-Kit von Stratagene durchgeführt. Bei dieser Methode wurde das gesamte Plasmid mittels PCR amplifiziert und die Mutation über ein Paar komplementärer Primer eingeführt. In der folgenden Tabelle wurden die verwendeten Primer mit den zugehörigen Templates aufgelistet und die mutierten Codons unterstrichen.

Mutation	Template	Primer	
K63A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense	5'-GGAGAGCCGGGTACTGGAG <u>CC</u> TCGATGCT-TGCACAGTCAATGG-3'
		antisense	5'-CCATTGACTGTGCAAGCATCGAG <u>GG</u> CTCCAGTACCGGCTCTCC-3'
D241A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense	5'-GGGTGTCCTATTCATAG <u>CC</u> GAGATAAACCTTCTCAGGCCCG-3'
		antisense	5'-CGGGCCTGAGAAGGTTTATCTC <u>GG</u> CTATGAATAGGACACCC-3'
N293A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense	5'-CTCGTTGCTGCCGGAG <u>CC</u> TATGATGCGATAAGAAATATGC-3'
		antisense	5'-GCATATTTCTTATCGCATCATAG <u>GG</u> CTCCGGCAGCAACGAG-3'
R305A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense	5'-GCACCCTGCGCTC <u>CG</u> GTCAAGGATACGCGG-3'
		antisense	5'-CCGCGTATCCTTGAC <u>CG</u> GAGCGCAGGGTG-C-3'

R375A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense antisense	5'-GCTGACCTTGAGGCTC <u>GCGG</u> GAGCTGGGCG- GACTCG-3' 5'-CGAGTCCGCCCAGCTC <u>GCGG</u> GAGCCTCAAG- GTCAGC-3'
R382A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense antisense	5'-GCTGGGCGGACTCGTC <u>GCGG</u> TAGCCGGA- GATATAGC-3' 5'-GCTATATCTCCGGCTAC <u>GCGG</u> ACGAGTC- CGCCAGC-3'
S525A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense antisense	5'-CGAGGGAGTTGAAGGAGAC <u>GCGG</u> CAGC- GTATCAATAGCC -3' 5'-GGCTATTGATACGCTGG <u>GCGG</u> CTCTCCTT- CAACTCCCTCG-3'
K568A	pET22b(+) <i>talonwt</i>	sense antisense	5'-CCGGTTGGCGGCGTAACCGCAG <u>GCGG</u> TTGA- GGCAGCTATAGAAGC-3' 5'-GCTTCTATAGCTGCCTCAACCGCTGCGGT- TACGCCGCCAACCGG -3'
K722A	pLonwt	sense antisense	5'-GCCGATGGTGGTTTGAAAGAAG <u>GCCCT</u> CCT- GGCAGCGCATCGCG-3' 5'-CGCGATGCGCTGCCAGGAGGG <u>GCTTCTT</u> TC- AAACCACCGATCGGC-3'

Die Mutagenese-PCR wurde entsprechend dem QuickChange[®]-Kit-Manual wie folgt durchgeführt:

PCR-Ansatz	PCR-Protokoll (für pET22b(+) <i>talon</i>)		
10-50 ng Template-DNA 125 ng sense-Primer 125 ng antisense-Primer 5 µl Reaktions-Mix* (10×) 1 µl dNTP-Mix* ad 50 µl mit H ₂ O _{MilliQ} 1 µl <i>Pfu</i> Turbo* DNA-Polymersae (2,5 U/µl)	Zyklen	Temperatur	Dauer
	1	95°C	30 s
* Bestandteil des QuickChange [®] -Kits (Stratagene)	16	95°C	30 s
		55°C	1 min
		68°C	15 min
	PCR-Protokoll (für pLonwt)		
	Zyklen	Temperatur	Dauer
	1	95°C	30 s
	16	95°C	30 s
		55°C	1 min
		68°C	12 min

Nach der PCR wurde die Reaktionsmischung mit 1 µl DpnI (10 U/µl) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl des DpnI-verdauten PCR-Ansatzes in MnCl₂-kompetente XL1-Blue Zellen (3.7.4) transformiert (3.7.7). Die Plasmid-DNA aus einzelnen *E.-coli*-Kolonien wurde isoliert (3.7.10) und mittels Sequenzierung auf die gewünschte Mutation überprüft. Bei positivem Ergebnis wurde das gesamte Gen sequenziert, um unspezifische Mutationen auszuschließen. Die folgende Tabelle enthält die verwendeten Sequenzierprimer. Die DNA-Sequenzierungen wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg (Deutschland) durchgeführt.

Plasmid	Bp in <i>lon</i>	Sequenzierprimer	
pET22b(+) <i>talon</i>	580 - 600	sense	5'-GATTCTACTGGAGCGCATTCG-3'
	763 - 744	antisense	5'-GTATTGCCTGCTGATCCTCG-3'
	1405 - 1425	sense	5'-GAACACAAGGGTGCTGGAAAC-3'
pLon	664 - 645	antisense	5'-CCATCTGCTTTTTAACGCGG-3'
	619 - 636	sense	5'-CTGCAGGTTGAGAAACGc-3'
	1206 - 1214	sense	5'-GCCGGGTAAACTGATCCAG-3'
	1801 - 1818	sense	5'-CTGGCGTGGACGGAAGTG-3'

Alle verwendeten Primer wurden bei *metabion* GmbH, Martinsried (Deutschland) synthetisiert.

3.7.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (nach Birnboim und Doly, 1979)

Eine vereinzelte *E.-coli*-Kolonie wurde 12-14 h in 3-5 ml LB-Selektivmedium (3.5) bei 37°C kultiviert. Der Kultur wurden 1,5-2 ml entnommen und der Rest der Kultur bei 4°C verwahrt. Die Zellen wurden 10 min bei 20.000×g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Lösung I (3.6) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II (3.6) wurde die Suspension vorsichtig geschwenkt und mit 150 µl Lösung III (3.6) neutralisiert. Die Suspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 50 µl Chloroform versetzt. Nach 30 min Zentrifugation bei 20.000×g und 4°C wurde der wässrige Überstand in eine neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Chloroform-haltige Phase sowie die Zwischenphase verworfen. Durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und durch Zentrifugation (1 h, 20.000×g, 4°C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und für 5-10 min bei 65°C getrocknet. Die trockene DNA wurde in 30 µl TE-Puffer (3.6) aufgenommen. Größere DNA-Mengen, etwa für Sequenzierungen (Abschnitt 3.7.9), wurden mit dem Midi-Plasmid-

Purification-Kit (Qiagen) hergestellt. Zur Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle wurde nach Plasmid-Isolation ein Restriktionsverdau (3.7.11) durchgeführt.

3.7.11 Restriktionsverdau

Nach Isolation von Plasmid-DNA (3.7.10) wurde 1 μl der DNA-Präparation mit Restriktionsenzymen für 2 h bei 37°C inkubiert (siehe Tabelle) und anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert (3.7.12). Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen.

pET22b(+)<i>talon</i>		pLonwt	
Plasmid-DNA	1 μl	Plasmid-DNA	1 μl
NdeI (20 U/ μl)	0,5 μl	NcoI (10 U/ μl)	0,5 μl
XhoI (20 U/ μl)	0,5 μl	XbaI (20 U/ μl)	0,5 μl
NEBuffer 4 (10 \times)	1 μl	NEBuffer 2 (10 \times)	1 μl
H ₂ O _{MilliQ}	7 μl	H ₂ O _{MilliQ}	7 μl

3.7.12 Agarose-Gele

Durch Restriktionsverdau (3.7.11) gespaltene DNA wurde nach Zugabe von 2,5 μl Auftragspuffer (3.6) in 1,2%-igen Agarose-Gelen aufgetrennt (x% Agarose in TAE-Puffer(3.6)). Als Standardmarker (1 μl) diente der 1 kb-Marker von New England Biolabs mit folgenden DNA-Fragmenten: 10 kb (42 ng), 8 kb (42 ng), 6 kb (50 ng), 5 kb (42 ng), 4 kb (33 ng), 3 kb (125 ng), 2 kb (48 ng), 1.5 kb (36 ng), 1 kb (42 ng) und 0.5 kb (42 ng). Die Laufspannung betrug 5 V/cm (Distanz zwischen den Elektroden) und als Laufpuffer wurde TAE verwendet (3.6). Die Gele wurden anschließend 30 min in H₂O_{dest} mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid gefärbt und 20 min in H₂O_{dest} entfärbt. Unter UV-Licht ($\lambda = 320 \text{ nm}$) wurden entsprechend des Restriktionsverdau (3.7.11) folgende Fragmente detektiert:

pET22b(+)<i>talon</i>		pLon	
Vektor	5,4 kb	Vektor	3,7 kb
Insert	2,0 kb	Insert	2,4 kb

Aus der Intensität der Banden wurde die DNA-Konzentration der Plasmid-Präparation (3.7.10) anhand des 1-kb-Markers abgeschätzt.

3.7.13 Klonierung von *talon* in pET22b(+)

Die Klonierung von *talon* in einen Expressionsvektor wurde von Tomohiro Tamura am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Molekulare Strukturbiologie durchgeführt.

Das *talon*-Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA (Ruepp et al., 2000) mit folgenden Primern isoliert: 5'-GGAATTCCATATGGA-AGAAAACATT-GAGAGCGTCGAGG-3' (sense; *NdeI*-Schnittstelle unterstrichen) und 5'-CCGCTCGAGAGCTGCATTATTTCTGC TCTTGTGG-3' (antisense, *XhoI*-Schnittstelle unterstrichen). Das PCR-Produkt wurde mit *NdeI* und *XhoI* verdaut und mit pET22b(+) (3.4) ligiert (Ligation Kit, Takara Shuzo). Der resultierende Vektor pET22b(+)*talon* kodierte für *TaLon* mit zwei zusätzlichen Aminosäure (Leucin-Glutamat) vor dem C-terminalem His₆-Tag.

3.8 Biochemische Methoden

3.8.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde unter Verwendung von SDS-Polyacrylamid-Gelen (Dimension: 10×8×0,75 cm) nach (Laemmli, 1970) mit dem „Hoefer-Mighty-Small“-System für vertikale Elektrophorese durchgeführt (Amersham Biosciences). Die SDS-Gele wurden mit 12%-igem Trenngel und 6%-igem Sammelgel wie in der Tabelle beschreiben präpariert. Die angegebenen Mengen reichten für 5 Gele in einem „Hoefer-Mighty-Small-4-Gel-Caster“ (Amersham Biosciences).

Trenngel (12% (w/v) Acrylamid)		Sammelgel (6% (w/v) Acrylamid)	
Trenngel-Puffer (3.6)	7,5 ml	Sammelgel-Puffer (3.6)	3,75 ml
30% (w/v) Acrylamid	12 ml	30% (w/v) Acrylamid	3 ml
H ₂ O _{MilliQ}	10,5 ml	H ₂ O _{MilliQ}	8,25 ml
10% (w/v) APS	120 µl	10% (w/v) APS	120 µl
TEMED	15µl	TEMED	15µl

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1/6-tel Volumen SDS-Probenpuffer (3.6) versetzt und 10 min bei 70°C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 100 V in Elektrophorese-Puffer (3.6). Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden auf jedes Gel 5 µl des SDS-PAGE „Broad-Range“-Markers von Biorad aufgetragen: Myosin 200 kD, β-Galaktosidase 116 kD, Phosphorylase b 97,4 kD, BSA 66 kD, Ovalbumin 45 kD, Carbonat-anhydrase 31 kD, Sojabohnen Trypsininhibitor 21,5 kD, Lysozym 14,5 kD, Aprotinin 6,5 kD

(5 µl entsprachen je 500 ng Markerprotein pro Bande). Zur Detektion der Proteine wurden die SDS-Gele nach Elektrophorese entweder mit Coomassie gefärbt (3.8.2) oder zur Antikörper-Detektion (3.8.4) auf Nitrocellulose transferiert (3.8.3).

3.8.2 Coomassie-Färbung (nach Neuhoff et al., 1988)

Die SDS-Gele wurden nach Elektrophorese (3.8.1) für 2-4 Minuten in 12,5% (w/v) TCA inkubiert. Die überschüssige Säure wurde durch intensives Waschen mit H₂O_{dest} entfernt und die Gele für ½-1 h in Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde aus 40 ml Neuhoff-Lösung (3.6) mit 10 ml Methanol und 0,4 ml 5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) frisch angesetzt (ausreichend für 1-2 Gele). Anschließend wurde unspezifisch gebundenes Coomassie mit H₂O_{dest} ausgewaschen. Zur Aufbewahrung wurden die SDS-Gele für 30 min in Trockner-Lösung (3.6) inkubiert und anschließend zwischen Cellophan (Biorad) im GelAir Dryer (Biorad) getrocknet.

3.8.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose („Western-Blot“)

Zum Transfer SDS-denaturierter Proteine von der SDS-PAGE (3.8.1) auf Nitrocellulose wurde das Gel nach Elektrophorese auf ein Stück Optitran-Membran BA-S85 (Schleicher&Schuell) transferiert und zwischen je zwei Lagen Filterpapier (Whatman 3MM) in einer TransBlot[®]-Semi-Dry-Kammer (Biorad) platziert. Der Deckel der Kammer bildete die Kathode („Gel-Seite“) und der Boden die Anode („Nitrocellulose-Seite“). Alle Komponenten wurden zuvor mit Transfer-Puffer (3.6) benetzt und Luftblasen-frei aufeinander gelegt. Nach 1 h bei 15 V wurde das Gel verworfen und die Nitrocellulose-Membran 3 min in Ponceau-S-Lösung (3.6) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit H₂O_{dest} gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Der Molekulargewichtsmarker (3.8.1) und die Laufrichtung des Gels wurden auf der trockenen Membran mit Kugelschreiber markiert.

3.8.4 Antikörper-Detektion

Die Ponceau-S-gefärbte Nitrocellulose-Membran (3.8.3) wurde 10 min in PBST (3.6) entfärbt und anschließend für 1 h in PBST + 1,5% (w/v) Gelatine (Sigma) inkubiert. Die Gelatine-gesättigte Membran wurde 10 min in PBST gewaschen und dann für 1 h in PBST mit der entsprechenden Antikörper-Verdünnung (siehe Tabelle) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST (je 10 min) wurde die Membran für 1 h mit anti-Kaninchen-IgG inkubiert (Verdünnung in PBST 1:10.000), der mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert war (Sigma).

Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in PBST (dreimal 10 min) entfernt und die Nitrocellulose-Membran zum Entwickeln in 10 ml AP-Puffer (3.6) transferiert. Unter Schwenken wurden dem AP-Puffer zuerst 66 µl NTB-Lösung (3.6) gefolgt von 33 µl BCIP-Lösung (3.6) zugesetzt. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Membran in PBSE (3.6) transferiert und anschließend getrocknet.

Antikörper	Art	Quelle	Verdünnung
anti-TaLon	Peptidantikörper, Serum, polyklonal, aus Kaninchen	siehe unten	1:1000
anti-His ₅	affinitätsgereinigt, polyoklonal, aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:2500
anti-FtsH	Peptidantikörper, Serum, polyklonal, aus Kaninchen	Tomoyasu et al., 1993	1:5000

Der als anti-TaLon bezeichnete Antikörper wurde von der Firma Eurogentec als Peptidantikörper gegen eine 1:1-Mischung aus einem N-terminalen (NH₂-¹MEENIESVEEWVKNLC¹⁶-CONH₂) und einem C-terminalen Peptid (NH₂-⁶⁴¹QRPATPATRAGNNAA⁶⁵⁷-COOH) von TaLon hergestellt. Der anti-FtsH-Antikörper wurde von Teru Ogura, Kumamoto Universität (Japan) zur Verfügung gestellt.

3.8.5 Zellfraktionierung von *Thermoplasma acidophilum*

10 g *Thermoplasma*-Zellen (3.7.1) wurden in 30 ml Ta-Puffer (3.6) resuspendiert. Die von Mediumsrückständen saure Suspension wurde mit 1 M Tris neutralisiert (~ pH 7). Durch den pH-Schock wurden die Zellen lysiert und DNA freigesetzt, wodurch die Suspension eine Gelee-artige Konsistenz annahm. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNase I wurde die Suspension ca. 1 h gerührt, bis diese wieder flüssig war. Danach wurde die Probe zweimal bei 15.000 psi im Cell-Disrupter homogenisiert und 15 min bei 12.000×g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet aus nicht-aufgeschlossenen Zellen wurde verworfen. Der Überstand, auch Gesamtzellextrakt oder Homogenisat genannt, wurde mittels Ultrazentrifugation (200.000×g, 2 h, 4°C) in cytosolische Bestandteile (Überstand) und Membranen (Pellet) getrennt.

3.8.6 Expression und Aufreinigung von TaLon_{His6} (72 kDa) aus *E. coli*

Mit pET22b(+)*talon(-wt, -K63A, -D241A, -N293A, -R305A, -R375A, -R382A, -S525A, K568A)* (3.4) transformierte BL21(DE3)C43-Zellen (3.7.6) wurden wie in (3.7.8) beschrieben kultiviert. Das Zellpellet aus 6 l Kultur (ca. 20 g) wurde auf Eis in 100 ml NTA-Puffer (3.6)

resuspendiert. Die Zellen wurden in vier Durchgängen bei 15.000 psi im Cell-Disrupter aufgeschlossen und 15 min bei 12.000×g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet aus nicht-aufgeschlossenen Zellen wurde verworfen und der Überstand (Homogenisat) durch Ultrazentrifugation (200.000×g, 2 h, 4°C) in cytosolische Bestandteile (Überstand) und Membranen (Pellet) getrennt. Das Membranpellet wurde in 100 ml NTA-Puffer (3.6) + 1,5% (w/v) DDM resuspendiert und zur Solubilisierung der Membranproteine 2 h unter Rühren bei 4°C inkubiert. Unlösliche oder präzipitierte Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation (100.000×g, 1 h, 4°C) von solubilisierten Proteinen getrennt. Der 100.000×g-Überstand wurde über Nacht (mind. 10 h) unter Rückfluss bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (30 ml, 20×1,3 cm) aufgetragen (4°C). Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumina (SV) NTAW-Puffer (3.6) gewaschen (2 ml/min, 4°C) und anschließend mit einem linearen Imidazolgradienten (20-250 mM) in 10 SV NTAW-Puffer (3.6) eluiert (2 ml/min, 4°C). Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE (3.8.1) und Coomassiefärbung (3.8.2) analysiert. Ab 125 mM Imidazol wurden saubere *TaLon*_{His6}-Fraktionen erhalten, vereinigt und auf ein Volumen von 6-8 ml einkonzentriert (Jumbosep 100K, PallFiltron). Das Konzentrat wurde auf eine in MES-Puffer (3.6) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (319 ml), Amersham Biosciences) aufgetragen und bei einer Flussrate von 2 ml/min (4°C) getrennt. *TaLon*_{His6} eluierte bei einem ungefähren Molekulargewicht von 510 kDa. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde die Säule mit Markerproteinen des High-Molecular-Weight-Gel-Filtration-Calibration-Kits (Amersham Biosciences) in Tris-Puffer (3.6) geeicht. Die *TaLon*_{His6}-Fraktion wurden vereinigt, auf 6-8 ml ankonzentriert (Jumbosep 100K, PallFiltron) und nach Konzentrationsbestimmung (3.8.9) in Aliquots zu 100 µl schockgefroren (IN₂) und bei -80°C gelagert.

3.8.7 Überexpression und Aufreinigung von *EcLon* (87 kDa)

Mit pLon(-wt, -362A, -S679A, -K722A) (3.4) transformierte BL21(DE3)-Zellen (3.7.6) wurden wie in (3.7.8) beschrieben kultiviert. Die Aufreinigung von *EcLon* wurde nach (Fischer und Glockshuber, 1993) in Standard-Puffer (3.6) durchgeführt. Die isolierte Protease wurde nach Konzentrationsbestimmung (3.8.9) in Aliquots zu 100 µl schockgefroren (IN₂) und bei -80°C gelagert.

3.8.8 Überexpression und Aufreinigung von His₆-GFP-Calmodulin (45 kDa)

Mit pET22b(+)*GFP-Cal* (3.4) transformierte BL21(DE3)-Zellen (3.7.6) wurden wie in (3.7.8) beschrieben kultiviert. Das Zellpellet aus 6 l Kultur (ca. 18 g) wurde auf Eis in 100 ml NTA-Puffer (3.6) resuspendiert. Die Zellen wurden in drei Durchgängen bei 15.000 psi im Cell-

Disrupter aufgeschlossen und 1 h bei $100.000\times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Pellet aus nicht-aufgeschlossenen Zellen wurde verworfen und der Überstand wurde mit 1 ml/min auf eine Ni^{2+} -NTA-Säule (30 ml, $20\times 1,3$ cm) aufgetragen (4°C). Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumina (SV) NTAW-Puffer (3.6) gewaschen (2 ml/min, 4°C) und anschließend mit einem linearen Imidazolgradienten (20-250 mM) in 10 SV NTAW-Puffer (3.6) eluiert (2 ml/min, 4°C). Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE (3.8.1) und Coomassie-Färbung (3.8.2) analysiert. Die Fraktionen ab 80 mM Imidazol wurden vereinigt und auf ein Volumen von 7 ml einkonzentriert (Macrosep 10K, PallFiltron). Das Konzentrat wurde auf eine in Tris-Puffer (3.6) equilibrierte Gelfiltrationssäule (450 ml Sephacryl-300 (Pharmacia), $86\times 2,3$ cm) aufgetragen und bei einer Flussrate von 0,75 ml/min (4°C) getrennt. Die sauberen GFP-Calmodulin-Fraktionen wurden vereinigt, auf 8 ml ankonzentriert (Macrosep 10K, PallFiltron) und nach Konzentrationsbestimmung (3.8.9) in Aliquots zu 100 μl schockgefroren (N_2) und bei -80°C gelagert.

3.8.9 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde mit dem DCTM Protein Assay von Biorad bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet.

3.8.10 Elektronenmikroskopie (EM)

EM-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Günter Pfeifer und Oana Mihalache am Transmissions-Elektronenmikroskop (CM 12 oder CM 20 FEG von Philips) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde frisch gebrochener Glimmer in einer Bedampfungsanlage (Balzers) bei 5×10^{-6} Torr mit einem 10 nm dicken Kohlefilm beschichtet. Der Kohlefilm wurde abflotiert und auf Kupfergrids übertragen. Um Adsorption und Kontrastierung zu verbessern, wurden die Grids vor Gebrauch in einem Plasmacleaner (PDC-3XG, Harrick) gereinigt. Die Proteinprobe ($\sim 0,1$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde 1 min zur Adsorption auf dem Grid belassen, mit Filterpapier abgesaugt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ gewaschen und 30 s mit 2% (w/v) Uranylacetat negativ kontrastiert.

3.9 Enzymatische Charakterisierung

Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Messungen für *TaLon*_{His6} in Reaktions-Puffer (3.6) und für *EcLon* in Standard-Puffer (3.6) durchgeführt. Für Fluoreszenzmessungen (3.9.2-3.9.4) wurden 96-iger ELISA-Platten verwendet.

3.9.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität wurde über den Nachweis des anorganischen Phosphats nach (Lanzetta et al., 1979) bestimmt. Je nach Angaben wurden 0,75-2 µg Lon in Gegenwart von 0-5 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 50 µl Puffer (3.9) für 10-20 min bei 60°C inkubiert. Durch Vermischen mit 800 µl Malachitgrün-Lösung (3.6) wurde die ATPase-Reaktion gestoppt. Nach Zugabe von 100 µl Citronensäure-Lösung (34% (w/v)) wurde die Reaktionslösung 30 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 640 nm bestimmt. Die Phosphatmenge in der Probe wurde anhand einer Standardkurve aus 0-15 nmol KH₂PO₄ berechnet.

3.9.2 Bestimmung der Peptidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Peptidase-Aktivität wurden 100 µM Peptidsubstrat (Bachem; siehe Tabelle) mit 4 µg Lon in 200 µl Puffer (3.9) bei 60°C inkubiert. In An- und Abwesenheit von Nukleotiden (je 2 mM ATP, ADP, AMPPNP oder ATPγS) wurde die Entwicklung der Fluoreszenz kontinuierlich bei den angegebenen Wellenlängen im Spektrofluorometer verfolgt und die Anfangssteigung berechnet. Bei der Vermessung von *TaLon*_{His6} wurden dem Reaktionsansatz zusätzlich 12,8 µg *TaPIP* (von Tomohiro Tamura, siehe Abschnitt 4.5) zugesetzt.

Peptidsubstrat	Name	Stocklösung	λ _{Excitation}	λ _{Emission}
Suc-LLVY-AMC	Succinyl-LLVY-7-Amino-4-Methylcoumarin	10 mM in DMSO	360 nm	460 nm
Glt-AAF-MNA	Glutaryl-AAF-4-Methoxy-β-Naphthylamid	10 mM in DMSO	320 nm	405 nm
Suc-FLF-MNA	Succinyl-FLF-4-Methoxy-β-Naphthylamid	10 mM in DMSO	320 nm	405 nm

Zur Bestimmung der Abbauprodukte nach Peptidverdau wurden 3 µg *TaLon*_{His6} in 200 µl Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DDM) mit 100 µM Suc-LLVY-AMC für 1 h bei 60°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Essigsäure beendet und Aliquots der Lösung wurden über MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) massenspektrometrisch analysiert (Massen-Service, Abteilung Lottspeich, MPI für Biochemie).

3.9.3 Bestimmung der Protease-Aktivität

Fluorescein-markiertes Casein wurde von Sigma bezogen und vor Verwendung zu Reduktion des unspezifischen Hintergrunds gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert (Dialyseschlauch 3500 K, Biomol). Zur Bestimmung der Protease-Aktivität wurden 25 µg Fluorescein-Casein (5 mg/ml) mit 5 µg Lon in 200 µl Puffer (3.9) bei 60°C inkubiert. In An- und Abwesenheit von Nukleotiden (je 2 mM ATP, ADP, AMPPNP oder ATP γ S) wurde die Entwicklung der Fluoreszenz kontinuierlich bei 485 und 520 nm im Spektrofluorometer verfolgt und die Anfangssteigung berechnet.

3.9.4 Bestimmung der Entfaltungs-Aktivität

Zur Bestimmung der Entfaltungs-Aktivität wurden 3,3 µg GFP-Calmodulin (3.8.8) mit 3 µg *TaLon*_{His6} in 200 µl Puffer (3.9) bei 60°C inkubiert. In An- und Abwesenheit von 2 mM ATP und/oder 5 mM CaCl₂ wurde die Entwicklung der Fluoreszenz kontinuierlich bei 485 und 520 nm im Spektrofluorometer verfolgt.

3.9.5 Abbau von Insulin-B

Die Versuche zum Abbau von Insulin-B wurden von Tomohiro und Noriko Tamura am AIST, in Sapporo, Japan durchgeführt.

Oxidiertes Insulin-B von Sigma (Endkonzentration von 250 µM) wurde mit 2 µg *TaLon*_{His6} in 200 µl Puffer (25 mM MES (pH 6,2), 10 mM MgCl₂, 1 mM DDM) in An- und Abwesenheit von Nukleotiden (je 2 mM ATP, ADP, AMPPNP oder ATP γ S) bei 60°C inkubiert. Alle 30 min wurden dem Ansatz 10 µl entnommen, mit 110 µl 0,3% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und bei -20°C gelagert. Später wurden je 100 µl der Reaktionsmischung über Umkehrphasenchromatographie (LiChroCART 152-2 Superspher RP-select B Column, Merck) getrennt. Die Säule wurde in 0,1% (v/v) TFA in H₂O_{MilliQ} äquilibriert und mit einem linearen Gradienten aus 0-60% (v/v) Acetonitril in 0,08% (v/v) TFA in 20 min eluiert (0,3 ml/min); der Gradient startete 8,9 min nach Auftrag der Probe. Die Abbauprodukte wurden über UV-Absorption bei 215 nm detektiert.

Zur Sequenzierung der Abbauprodukte wurde Insulin-B wie beschrieben für 3 h bei 60°C mit *TaLon*_{His6} inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde 10 fach mit 2% (v/v) Acetonitril in 0,1% (v/v) TFA verdünnt und 5-10 µl der Probe wurden mittels LC-MS/MS analysiert (MAGIC2002 HPLC, Michrom Bioresources und LCQ-DECA ion-trap mass spectrometer, Ther-

mo Finnigan). Anhand der Massendaten wurden die Sequenzen mit TurboSequest (Thermo Finnigan) ermittelt.

3.9.6 Abbau von β -Casein

Die Versuche zum Abbau von β -Casein wurden von Tomohiro und Noriko Tamura am AIST, in Sapporo, Japan durchgeführt.

1,25 mg/ml β -Casein (Sigma) wurden mit 12 μ g *TaLon*_{His6} bzw. 80 μ g *TaProteasom* (Zwickl et al., 1992) in 600 μ l Puffer (25 mM MES (pH 6,2), 10 mM MgCl₂, 1 mM DDM, 2 mM ATP) bzw. 25 mM Tris-HCl pH 8,0 bei 60°C inkubiert. Alle 30 min wurden dem Ansatz 40 μ l entnommen, mit 0,5% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) verdünnt und bei -20°C gelagert. Später wurden je 100 μ l der Reaktionsmischung über Umkehrphasenchromatographie (LiChroCART 152-2 Superspher RP-select B Column, Merck) getrennt. Die Säule wurde in 0,1% (v/v) TFA in H₂O_{MilliQ} äquilibriert und mit einem linearen Gradienten aus 0-80% (v/v) Acetonitril in 0,08% (v/v) TFA in 40 min eluiert (0,3 ml/min); der Gradient startete 8,8 min nach Auftrag der Probe. Die Abbauprodukte wurden über UV-Absorption bei 215 nm detektiert.

Zur Analyse der Abbauprodukte wurden *TaLon*_{His6} und das *TaProteasom* wie beschrieben für 3 h bei 60°C mit β -Casein inkubiert. Nach Umkehrphasenchromatographie wurden die Peptid-haltigen Fraktionen (15-32 min) aus vier Läufen vereinigt, eingetrocknet und in 240 μ l 30% (v/v) Acetonitril in 0,1% (v/v) TCA aufgenommen. 100 μ l dieser Probe wurden über Größenausschlusschromatographie in 30% (v/v) Acetonitril in 0,1% (v/v) TCA analysiert (0,3 ml/min; Superdex Peptide 7.5/300, Amersham Biosciences). Die Fraktionen wurden mit der Methode von Udenfriend et al. (1972) auf ihren Gehalt an α -Aminogruppen getestet. Dazu wurden 60 μ l jeder Fraktion mit 100 μ l 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 und 50 μ l Fluorescamin (0,3 mg/ml gelöst in Aceton) versetzt und gevortext. Nach Verdünnung der Reaktionsmischung mit 1 ml 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 wurde die Fluoreszenz der Lösung ($\lambda_{\text{Excitation}} = 390$ nm, $\lambda_{\text{Emission}} = 475$ nm) bestimmt und die Anzahl der freien Aminogruppen berechnet (Standard: L-Leucin).

4. Ergebnisse

4.1 Sequenzvergleiche

Während der Sequenzierung des Genoms von *Thermoplasma acidophilum* wurde ein offener Leserahmen (ORF 1081) mit auffällender Sequenzhomologie zur Lon-Protease aus Bakterien entdeckt (Ruepp et al., 2000). Die archaeale Lon-Protease besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen AAA⁺-Domäne und einer C-terminalen Protease-Domäne, während bakterielle und eukaryontische Lon-Proteasen eine weitere Domäne besitzen, die N-terminal zur AAA⁺-Domäne liegt (Abbildung 2.4). Allerdings wird die N-terminale AAA⁺-Domäne von einer ca. 120 Aminosäuren umfassenden Domäne unterbrochen, die laut Sekundärstrukturvorhersagen einen Transmembrananker in Form einer helikalen Haarnadelstruktur bildet (Ruepp et al., 2000). Die Insertion von zusätzlichen strukturellen Elementen insbesondere in flexible Loop-Regionen der AAA⁺-Domäne wurde bereits mehrfach beschrieben und scheint oft funktionelle Spezifität zu vermitteln (Ogura und Wilkinson, 2001). Abbildung 4.1 zeigt ein Sequenzalignment archaealer Lon-Proteasen mit den konservierten katalytischen Resten in AAA⁺- und Protease-Domäne und den ungefähren Domänengrenzen.

Neben den in Abschnitt 2.3 beschriebenen AAA⁺-Motiven Walker-A, Walker-B, Arginin-Finger, Sensor-1 und Sensor-2 enthalten archaeale Lon-Proteasen N-terminal zum Sensor-2 einen weiteren konservierten Arginin-Rest, der bei Archaeen streng konserviert ist, aber nicht exakt mit der bei Guenther et al. (1997) beschriebenen Konsensussequenz für Sensor-2 übereinstimmt. Im Folgenden wird dieser Rest als Sensor-2' bezeichnet (Abbildung 4.1). Mutagenese-Studien an verschiedenen AAA- und AAA⁺-Proteinen belegen die wichtige Rolle von konservierten Arginin-Resten bei ATP-Bindung und -Hydrolyse. Überraschenderweise kann die spezifische Funktion eines konservierten Arginin-Restes nicht aufgrund seiner konservierten Position verallgemeinert werden. Vielmehr scheinen konservierte Arginin-Reste Kontextspezifische Funktionen je nach physiologischer Aufgabe des betreffenden AAA⁺-Proteins anzunehmen (Ogura et al., 2004).

Archaeen enthalten neben der membranständigen Lon-Protease nur eine weitere ATP-abhängige Protease, das PAN-20S-Proteasom-System. Ihnen fehlt die in Bakterien lebenswichtige, membranständige AAA-Protease FtsH (Abschnitt 2.6), die u. a. für den Abbau von Membranproteinen zuständig ist. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die archaeale Lon-Protease trotz Sequenzhomologie zur löslichen Lon-Protease aus Bakterien und Eukaryonten (Abschnitt 2.5) ein Funktionshomolog von FtsH sein könnte (Ruepp et al., 2000).

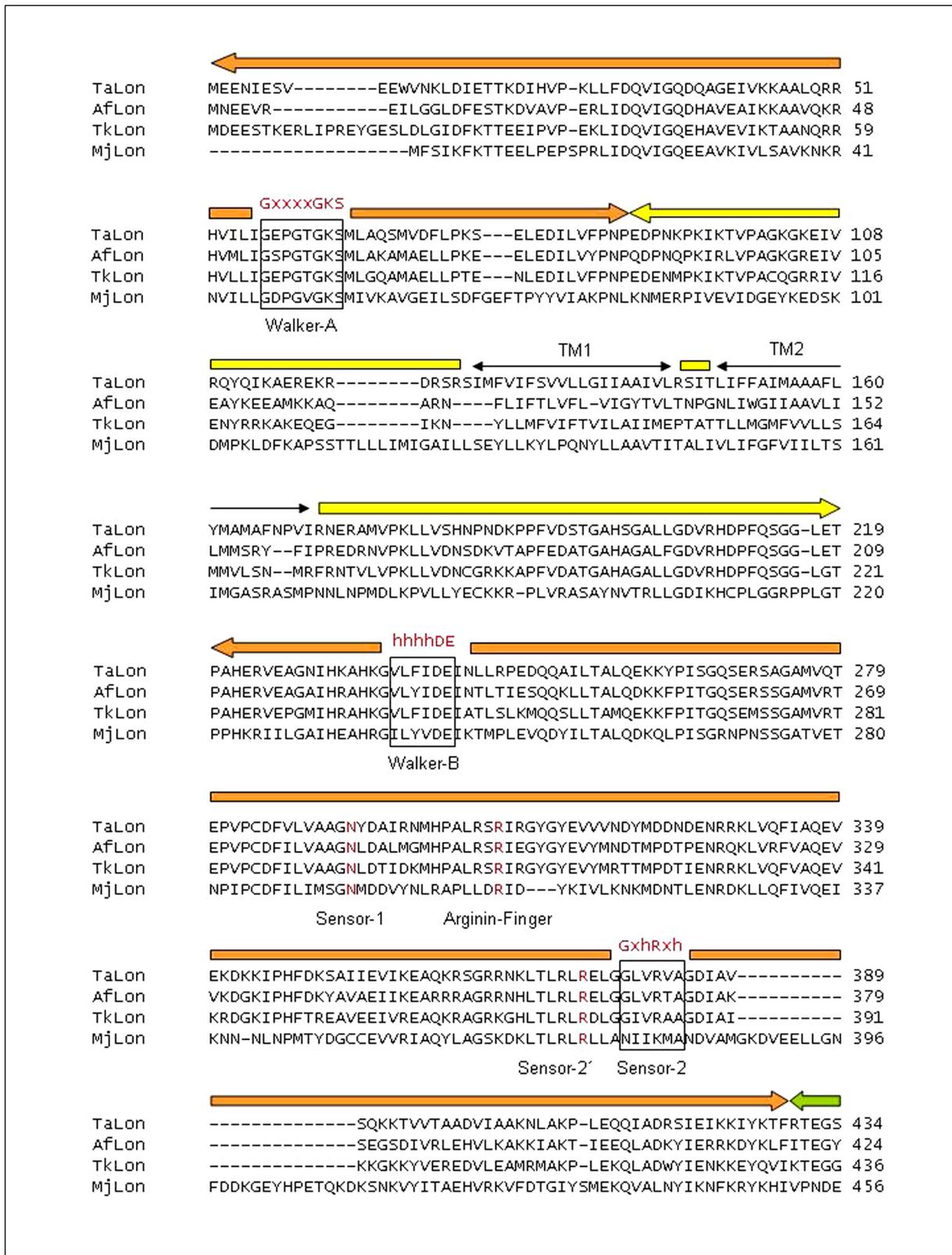


Abbildung 4.1: Vergleich der Proteinsequenzen archaealer Lon-Proteasen. Die Sequenzen von Lon aus *Thermoplasma acidophilum* (Ta); *Archaeoglobus fulgidus* (Af); *Thermococcus kodakarensis* (Tk) und *Methanococcus jannaschii* (Mj) wurden über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) miteinander verglichen. Konsensussequenzen oder streng

		
TaLon	-VGMVNGLAVVGADTGMSEYTGVLPIVAEVTPAEHKGAGNIIATGKLGDIACEAVLNV	493
AfLon	-EVGRVNGLAVIG-----ESAGIVLPPIIAEVTSPMSKSEGRVIATGRLQEIAREAVMNV	477
TkLon	-EIGRVNGLAVIG-----EQSGIVLPPIEAVVAPAASKEEGKIIVTGKLGDIACEAVQNV	489
MjLon	PKVGVIYGLAVLG-----AGGIGDVTKIIIVQILESKNPGTHLLN-ISGDI AKHSITLA	508
		
TaLon	SAVFKKLTGK-----DISNMDIHIQFVGTYESVEGDSASVSIATAVISAIENIPV	543
AfLon	SAIIKKYTGR-----DISNMDVHIQFVGTYESVEGDSASISVIATAVISAIIEGIPV	527
TkLon	SAIIKRYKGE-----DISRYDIHVQFLQTYEGVEGDSASISVATAVISALENIPI	539
MjLon	SALSKLVAEKKLPLPKKIDLNKKEIYIQFSQSYSKI DGD SATAAVCLAIISALLDIPL	568
	S/K-Diade	
		
TaLon	DQSVAMTGSLSVRGDVLVGGVTAKEVAAIEAGLNKVIPELNYSDIILDADHVNKIEII	603
AfLon	DQSVAMTGSLSVKGEVLPVGGVTKIEAAIQAGLKKVVIIPKDNIDDVLLDAEHEGKIEVI	587
TkLon	RQDVAMTGSLSVRGEVLPVGGATPKIEAAIEAGIKKVIIPKANEDVFLSPDKAEKIEIY	599
MjLon	KQDFAITGSLDLSGNVLAIGGVNEKIEAAKRYGFKRVIPEANMIDVIETEG----IEII	624
	S/K-Diade	
		
TaLon	PAKTIEDVLRVALVNSPEKEKLFDRISNLINAAKIIPQRPATPATRAGNNA	657
AfLon	PVSRINEVLEHVLEDGKKKNRLMSKFKLELA	621
TkLon	PVETIDQVLEIALQDGPEKDELLRRIREALPLYGSS	635
MjLon	PVKTLDEIVPLVFDLDRGG--AERFN	649

konservierte Reste sind rot markiert mit x für jede beliebige Aminosäure und h für hydrophobe Aminosäure. Die mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten hydrophoben Bereiche bilden laut Sekundärstrukturvorhersagen (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>) zwei Transmembranhelices (TM). Die ungefähren Domänengrenzen sind farblich hervorgehoben: ATPase-Domäne (orange), Transmembrandomäne (gelb), Lon-Protease-Domäne (grün).

Ebenso wie die AAA⁺-Domäne ist die Lon-Protease-Domäne ein unabhängiges Modul, das während der Evolution an verschiedene andere Domänen gekoppelt wurde (Iyer et al., 2004). Die funktionelle Unabhängigkeit der beiden Domänen belegen Studien an der rekombinanten Protease-Domäne von Lon aus *E. coli*, die *in vitro* Peptidase-Aktivität zeigte, aber keine Proteinsubstrate abbauen konnte (Rasulova et al., 1998). In Hefe gelang sogar die funktionelle Komplementation Lon-defizienter Zellen durch die getrennte Expression von Protease- und ATPase-Domäne (van Dijl et al., 1998).

Anhand phylogenetischer Studien konnten drei Formen der Lon-Protease identifiziert werden (Abbildung 4.2). Die klassische Lon-Protease aus Bakterien (Abschnitt 2.5) besteht aus einer N-terminalen Domäne mit bislang unbekannter Funktion, gefolgt von der AAA⁺-Domäne und der C-terminalen Lon-Protease-Domäne. Einige Gram-positive Bakterien, wie Bacillen und Clostridien, enthalten neben LonA eine zweite Lon-Protease, LonB, welcher die N-terminale Domäne fehlt. Nach Deletion der Transmembrandomäne können archaeale Lon-Proteasen und LonB miteinander verglichen werden und bilden einen eigenen Zweig im phylogenetischen

schen Stammbaum. In Prokaryonten und Viren findet man noch eine dritte Form der Lon-Protease, die nur aus der löslichen Protease-Domäne besteht und als nicht-kanonische Lon-Protease bezeichnet wird. Ein Beispiel hierfür ist die virale Lon-Protease VP4 aus dem Birnavirus IBDVP2 („infectious bursal disease virus strain P2“). Die nicht ATP-abhängige Protease ist verantwortlich für die autoproteolytische Aktivierung eines viralen Polyproteins und essentiell für den Vermehrungszyklus des Virus (Birghan et al., 2000). In *Bacillus subtilis* konnten für LonA und LonB unterschiedliche physiologische Funktionen nachgewiesen werden. Für LonB wurde die spezifische Transkription des Gens während der Sporulation gezeigt, während LonA durch äußeren Stress induziert wird und die Aktivität eines Sporulations-spezifischen Transkriptionsfaktors reguliert (Serrano et al., 2001). Weitere Homologe von LonB oder eine prokaryontische Variante der nicht-kanonischen Lon-Protease wurden bisher nicht charakterisiert. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass *Bacillus subtilis* und *Methanosarcina mazei* Lon-Gene aus allen drei phylogenetischen Gruppen enthalten, was wahrscheinlich auf horizontalen Gentransfer während der Evolution dieser Organismen zurückzuführen ist (Kunst et al., 1997; Deppenmeier et al., 2002).

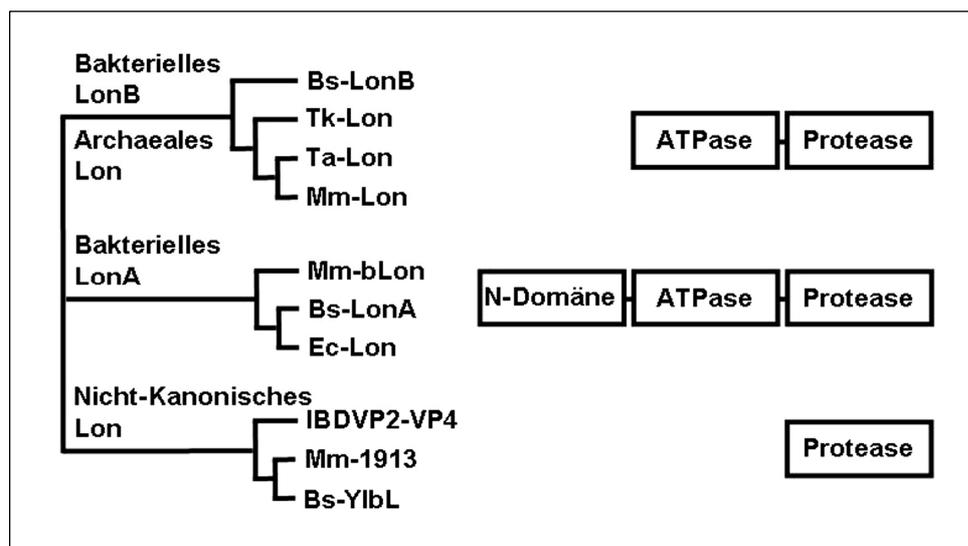


Abbildung 4.2: Phylogenetische Analyse der Lon-Protease. Die Protein-Sequenzen der Lon-Protease-Domäne aus *Bacillus subtilis* (Bs), *Escherichia coli* (Ec),

IBDVP2 (infectious bursal disease virus strain P2), *Methanosarcina mazei* (Mm), *Thermoplasma acidophilum* (Ta) und *Thermococcus kodakarensis* (Tk) wurden mit ClustalX untereinander verglichen und als Kladogramm abgebildet. Auf der rechten Seite des Diagramms ist die Domänen-Organisation der drei verschiedenen Lon-Proteasen dargestellt.

4.2 Lon in *Thermoplasma acidophilum*

Zu Beginn dieser Arbeit war über archaeale Lon-Proteasen nicht mehr als ihre Gensequenz bekannt. Um die Expression und Lokalisation der Lon-Protease in *Thermoplasma acidophilum* nachzuweisen, wurde ein Antikörper gegen N- und C-terminale Peptide der Lon-Protease

hergestellt (Abschnitt 3.8.4). Anschließend wurden *Thermoplasma*-Zellen angezogen, aufgeschlossen (Homogenisat) und durch Ultrazentrifugation in cytosolischen Überstand und Membranen getrennt (Abschnitt 3.8.5). Die entsprechenden Fraktionen wurden auf Reaktion mit dem anti-Lon-Antikörper getestet (Abschnitt 3.8.4). Der Antikörper reagierte mit einer Bande, deren Höhe dem erwarteten Molekulargewicht von *TaLon* mit 71 kDa entsprach. Im Vergleich zum Zellhomogenat war die Bande in der Membran angereichert und im Cytosol kaum zu detektieren (Abbildung 4.3). Antikörperreaktion, Molekulargewicht und Lokalisation entsprachen den auf Sequenzdaten beruhenden Vorhersagen und bestätigten die Expression von Lon als Membranprotein in *Thermoplasma acidophilum*.

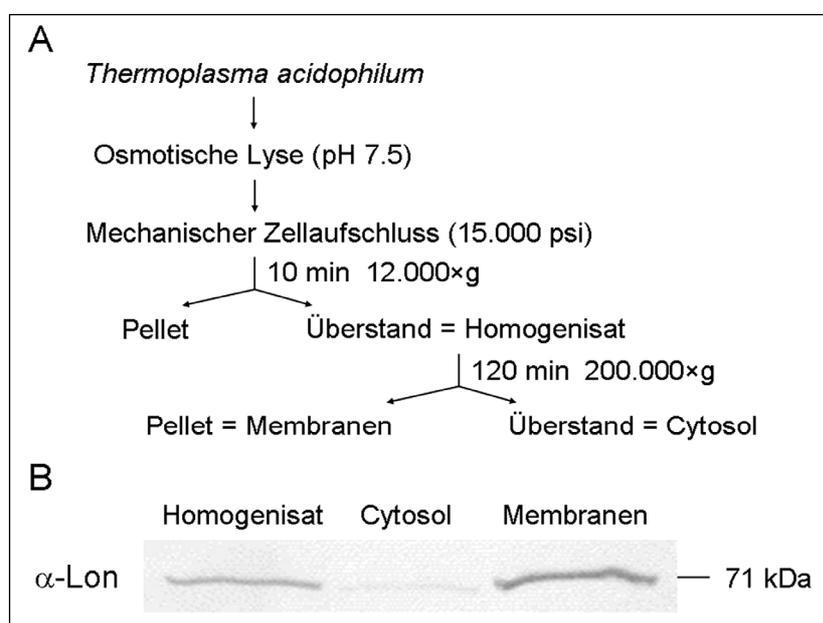


Abbildung 4.3: Expression und Lokalisation von Lon in *Thermoplasma acidophilum*.

(A) *Thermoplasma*-Zellen wurden nach osmotischer Lyse mechanisch homogenisiert und mittels Ultrazentrifugation in Cytosol und Membranen getrennt (Abschnitt 3.8.5). (B) 50 μ g Protein aus jeder Fraktion wurden mittels

SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 3.8.1) und nach Western-Blot (Abschnitt 3.8.3) auf Reaktion mit dem anti-Lon-Antikörper (α -Lon) getestet (Abschnitt 3.8.4).

Unabhängig von dieser Arbeit wurde die Membranlokalisierung von Lon aus dem extrem thermophilen Archaeobakterium *Thermococcus kodakarensis* (*TkLon*) nachgewiesen (Fukui et al., 2002). Zusammengenommen bestätigen diese Daten den Membranprotein-Charakter der archaealen Lon-Protease und unterstützen die Annahme, dass Lon in Archaeen die Funktion von FtsH beim Abbau von Membranproteinen und der Membran-Qualitätskontrolle übernehmen könnte (Ruepp et al., 2000).

4.3 Rekombinante Expression und Aufreinigung von *TaLon* in *E. coli*

Zur Expression von *TaLon* in *E. coli* wurde das Gen mittels genomischer PCR amplifiziert und in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert (Abschnitt 3.7.13). Der resultierende

Vektor pET22b(+)*talon* kodierte für *TaLon* mit C-terminalem His6-Tag (*TaLon*_{His6}) unter Kontrolle des T7-Promotors. Trotz Verwendung eines gängigen Expressionssystems (pET-System, Novagen) konnte *TaLon*_{His6} in BL21(DE3) nicht zur Expression gebracht werden. Aufgrund ähnlicher Probleme bei der Überexpression von Membranproteinen in *E. coli* haben Miroux und Walker (1996) Mutanten von BL21(DE3) nach ihrer Fähigkeit isoliert, Membranproteine und toxische Proteine besonders gut zu exprimieren. Die bei dieser Studie entstandenen BL21-Derivate C41(DE3) und C43(DE3) sind mittlerweile kommerziell erhältlich (Avidis). BL21(DE3)C43 wurde mit pET22b(+)*talon* transformiert (Abschnitt 3.7.6), in Flüssigmedium angezogen (Abschnitt 3.7.8) und bei einer OD_{600nm} von 0,6 mit IPTG (1-Thio-β-D-Galaktopyranosid) induziert. Proben vor und nach Induktion wurden über SDS-PAGE (Abschnitt 3.8.1) aufgetrennt und nach Western-Blot (Abschnitt 3.8.3) mit anti-Lon- und anti-His₅-Antikörper getestet (Abschnitt 3.8.4). Auf diese Weise wurden verschiedene Bedingungen von Wachstumstemperatur (18°C, 30°C, 37°C) über IPTG-Konzentration (0,1-1 mM) bis Induktionsdauer (1-24 h) getestet. Unter allen getesteten Bedingungen konnte nach IPTG-Zugabe ein Protein von ca. 70 kDa nachgewiesen werden, das sowohl mit dem anti-Lon- als auch dem anti-His₅-Antikörper reagierte. Als optimale Bedingungen in Bezug auf Induktionsdauer und Proteingehalt stellte sich die Expression bei 1 mM IPTG und 37°C für 4 h heraus (Abschnitt 3.7.8).

Nach Überexpression, Ernte und Aufschluss der Zellen wurden cytosolische Proteine und Membranen durch Ultrazentrifugation (2 h, 200.000xg) voneinander getrennt (Abschnitt 3.8.6). Die Analyse dieser Fraktionen mit SDS-PAGE (Abschnitt 3.8.1) und Immuno-Blot (Abschnitt 3.8.3-4) ergab, dass *TaLon*_{His6} auch in *E. coli* an der Membran lokalisiert war (Abbildung 4.4). Durch Waschen der Membranen mit 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11,5) konnte *TaLon*_{His6} nicht von der Membran gelöst werden (Abbildung 4.4), ein Verhalten, das integrale Membranproteine von peripheren Membranproteinen unterscheidet.

Zur Isolierung von Membranproteinen verwendet man Detergenzien. Detergenzien sind wasserlösliche Amphiphile, die anders als polare Lipide keine Membranen sondern Micellen ausbilden. Der hydrophobe Teil von Detergenzmolekülen besteht häufig aus aliphatischen Ketten oder einem Steroidgerüst, während die hydrophile Komponente aus einer ionischen Gruppe, einem Zucker oder Hydroxylgruppen gebildet werden kann. Entsprechend den Eigenschaften des hydrophilen Teils unterscheidet man ionische, nicht-ionische und zwitterionische Detergenzien. Bei der Solubilisierung von Membranen interkalieren die Detergenzmoleküle in die Lipide der Membran und bilden Mischmicellen, die die integralen Membranproteine enthalten. Zur Solubilisierung von *TaLon*_{His6} aus der Membran von *E. coli* wurde das nicht-ionische Detergenz Dodecyl-β-D-Maltopyranosid (DDM) verwendet. Die isolierten Membranen wurden in 1,5%-iger DDM-Lösung resuspendiert und 2 h langsam gerührt. Anschließend wurden die solubilisierten Proteine von den nicht in DDM-löslichen Bestandteilen durch Ultrazentri-

fugation getrennt (1 h, 100.000xg) und $TaLon_{His6}$ aus dem Überstand über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie isoliert (Abschnitt 3.8.6).

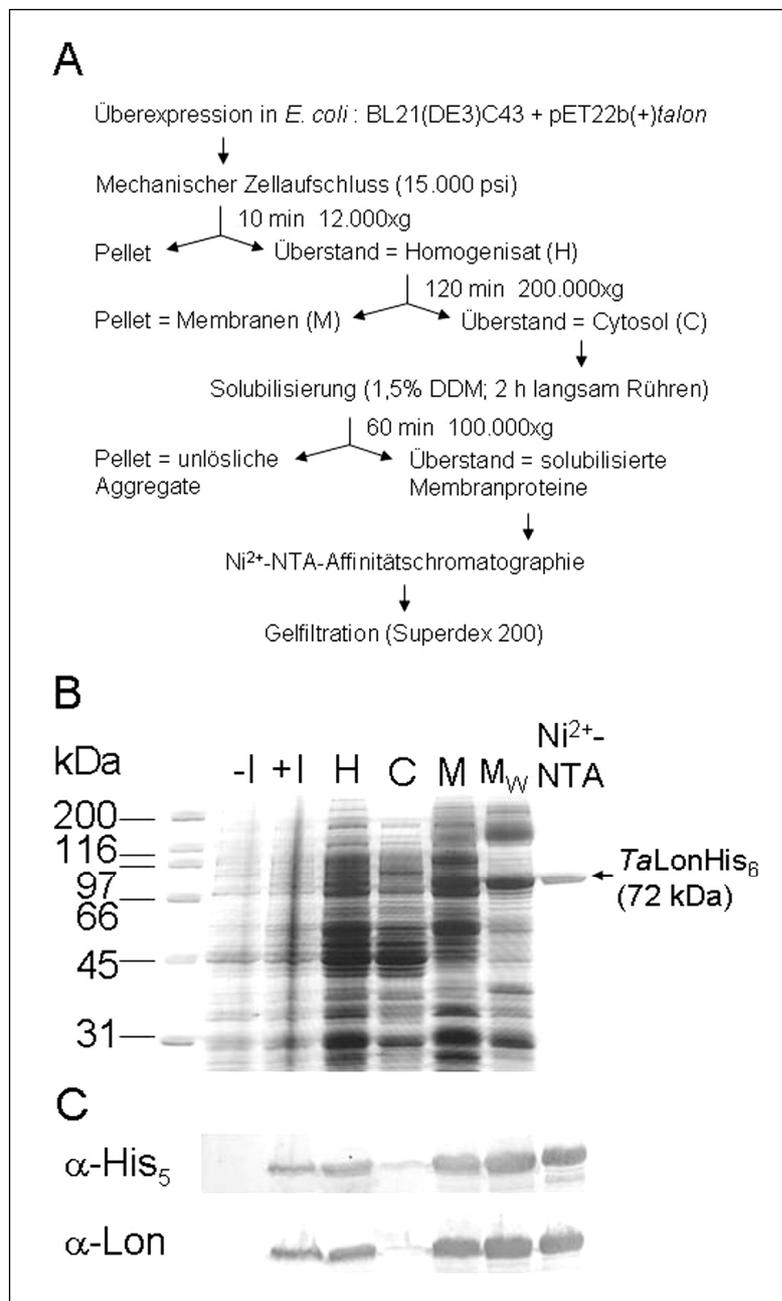


Abbildung 4.4: Expression und Lokalisation von $TaLon_{His6}$ in *E. coli*. (A) Der Zellkultur (BL21(DE3)C43 + pET22b(+)*talon*) wurden vor (-I) und nach Induktion (+I) der Proteinexpression (1 mM IPTG, 37°C, 4 h) Proben entnommen. Die in (B) und (C) aufgetragenen Mengen entsprechen dem 10.000-stel aus einem Liter Expressionskultur. Nach Zellernte wurden die Zellen mechanisch lysiert. Das zellfreie Homogenisat H wurde mittels Ultrazentrifugation in Cytosol C und Membranen M getrennt. Eine Probe der Membranen wurde mit 0,1 M Na_2CO_3 pH 11,5 gewaschen M_w, der Rest wurde in Detergenz gelöst (1,5% DDM) und die solubilisierte Lon-Protease über Affinitätschromatographie isoliert (Ni^{2+} -NTA). Die aufgetragenen

Mengen entsprachen je 50 μ g Gesamtprotein bzw. 1 μ g gereinigtem $TaLon_{His6}$. (B) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (Abschnitt 3.8.1-2). (C) Western-Blot-Analyse mit anti-Lon-Antikörper (α -Lon) und anti-His₅-Antikörper (α -His₅) (Abschnitt 3.8.3-4).

Nach dem Solubilisieren von Membranproteinen wird die Detergenzkonzentration üblicherweise auf die so genannte kritische Micellenkonzentration (KMK) abgesenkt. Die KMK bezeichnet die minimale Konzentration, bei der das Detergenz in Micellen vorliegt, darunter dissoziieren die Micellen in ihre Einzelmoleküle. Da das Prinzip der Solubilisierung auf der

Rekonstitution des Transmembranbereichs eines Proteins in Micellen beruht, darf die KMK in der Proteinlösung nicht unterschritten werden. Gleichzeitig sollten zu hohe Detergenzkonzentrationen vermieden werden, damit Aktivität und Struktur des entsprechenden Proteins nicht negativ beeinflusst werden. Die KMK von DDM liegt zwischen 0,15-0,3 mM und die Konzentration aller verwendeten Pufferlösungen wurde nach Solubilisierung auf 0,5 mM DDM abgesenkt (entspricht 0,025% (w/v)). DDM bildet Micellen mit einem ungefähren Molekulargewicht von 70 kDa, bestehend aus 80-90 Detergenzmolekülen.

Zur weiteren Reinigung und Überprüfung des Molekulargewichts von *TaLon*_{His6} wurde im Anschluss an die Affinitätschromatographie eine Gelfiltration durchgeführt (Abschnitt 3.8.6). *TaLon*_{His6} (72 kDa) eluierte als hochmolekularer Komplex von ca. 510 kDa. Nach Subtraktion der Detergenz-Micelle, die den Membrananker des Proteins umgibt, verblieben ~ 440 kDa. Dieses Molekulargewicht entsprach einem hexameren Komplex, ein für AAA⁺-Proteine typischer Oligomerisierungszustand (Iyer et al., 2004).

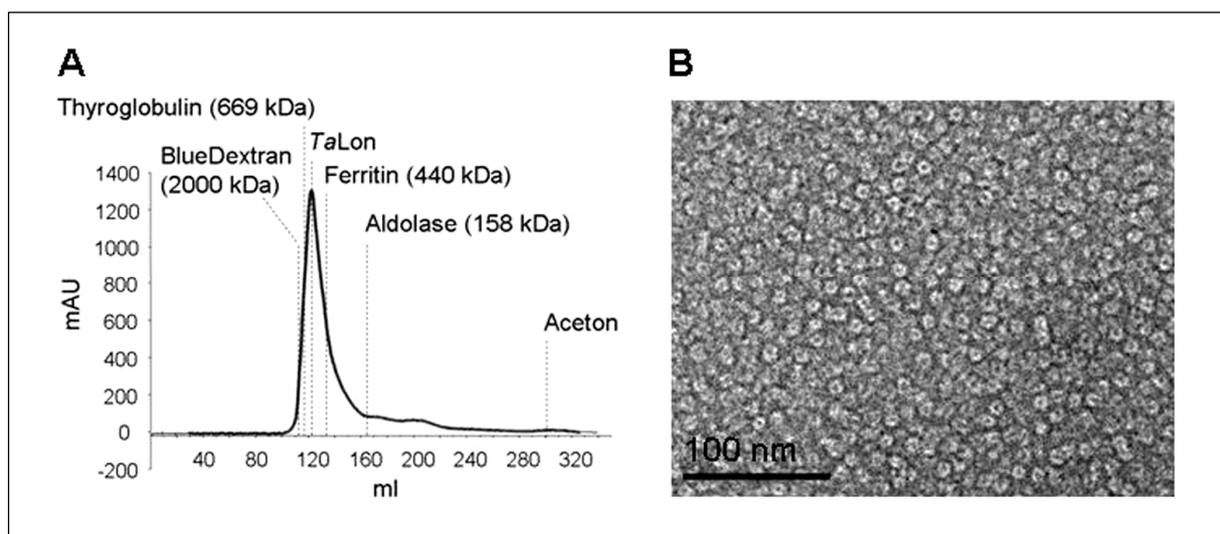


Abbildung 4.5: *TaLon*_{His6} bildet hochmolekulare ringförmige Komplexe. (A) Elutionsprofil von *TaLon*_{His6} nach Größenausschlusschromatographie (Abschnitt 3.8.6). Ca. 30 mg *TaLon*_{His6} wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in 25 mM MES (pH 6,2), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM über eine Superdex 200 HiLoad 26/60 mit einem Bettvolumen von 320 ml (Amersham Biosciences) getrennt. Die Position entsprechender Molekulargewichtsmarker (je 5 mg) wurde bei gleicher Flussrate in 50 mM Tris (pH 7,5), 300 mM NaCl ermittelt und eingezeichnet. Aceton markiert die Lauffront von Salzen und Puffermolekülen. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *TaLon*_{His6}. Die Probe wurde der Peakfraktion nach Gelfiltration entnommen und mit 2%-iger Uranylacetat-Lösung negativ kontrastiert (Abschnitt 3.8.10).

Abbildung 4.5 A zeigt das Elutionsprofil von *TaLon*_{His6} nach Gelfiltration zusammen mit dem Elutionsvolumen entsprechender Molekulargewichtsmarker. Elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ kontrastierter Präparate nach der Gelfiltration zeigten ringförmige Komplexe mit einem Durchmesser von 10-12 nm (Abschnitt 3.8.10 und Abbildung 4.5 B). Der genaue Oligomerisierungszustand von *TaLon*_{His6} konnte aufgrund der Partikeldichte nicht ermittelt werden. In Konzentrationen, die eine Einzelpartikelanalyse erlauben, wurden keine Partikel mehr gefunden. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich die Lon-Komplexe in hohen Konzentrationen gegenseitig stabilisieren und in Schichten übereinander auf dem Grid ablagern, während die direkte Interaktion des Moleküls mit dem Kohlefilm den Komplex destabilisiert. Auch Versuche zur Darstellung des Proteins mit Cryo-Elektronenmikroskopie und negativ kontrastierter Cryo-Elektronenmikroskopie scheiterten. Die Annahme eines Hexamers wird aber durch Beobachtungen an homologen Proteinen unterstützt. Erst kürzlich wurde die lösliche Protease-Domäne von Lon aus *E. coli* (Abschnitt 2.5) als Hexamer kristallisiert (Botos et al., 2004) und auch die ATPase-Domäne von FtsH aus *Thermus thermophilus* (Abschnitt 2.6) kristallisierte als Spirale aus sechs Untereinheiten (Niwa et al., 2002). *TaLon*_{His6} benötigte kein Nukleotid zur Oligomerisierung. Dies deckt sich mit Beobachtungen an FtsH, bei dem die zweite Transmembranhelix für die Bildung von Oligomeren entscheidend ist, Nukleotide aber nicht benötigt werden (Makino et al., 1999).

Die Überexpression von Membranproteinen in *E. coli* ist oft mit geringen Ausbeuten, Aggregation des Zielproteins in „inclusion bodies“ und Toxizität verbunden (Miroux und Walker, 1996). Für *TaLon*_{His6} wurde eine durchschnittliche Ausbeute von 4,5 mg gereinigtem Protein pro Liter Expressionskultur erzielt. Weder Toxizität noch die Bildung von „inclusion bodies“ wurde beobachtet, und *TaLon*_{His6} konnte als hochmolekularer Komplex aus der Membran von *E. coli* isoliert werden. Die molekularen Mechanismen, die der Faltung von Membranproteinen zu Grunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Bei Bakterien geht man davon aus, dass die Proteine der inneren Membran cotranslational mit Hilfe der SecYEG Translokase in die Membran inseriert werden (Dalbey et al., 2000). Ob die erfolgreiche Expression von *TaLon*_{His6} als Membranprotein in *E. coli* auf entsprechender Homologie dieser Mechanismen zwischen Bakterien und Archaeen beruht oder auf die spontane Insertion des haarnadelförmigen Transmembranbereichs von *TaLon* zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht werden.

4.4 ATPase-Aktivität

Um die optimalen Bedingungen für nachfolgende enzymatische Messungen an *TaLon* zu ermitteln, wurde die ATPase-Aktivität von *TaLon* bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Die

ATPase-Aktivität wurde indirekt über den Nachweis von anorganischem Phosphat (Pi) bestimmt. Bei der verwendeten Methode wird die ATPase-Reaktion durch Zugabe eines Farbreagenzes bestehend aus Ammoniummolybdat und Malachitgrün gestoppt. Das Phosphat bildet mit dem Molybdat einen negativ-geladenen Phosphomolybdat-Komplex, der aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen einen Farbumschlag des Malchitgrüns von gelb-grün zu blaugrün verursacht. Die entsprechende Phosphatkonzentration kann dann anhand einer Eichgerade über die Absorption bei 640 nm ermittelt werden. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1 nmol Phosphat (Lanzetta et al., 1979).

Für die Messung des pH-Optimums wurden Puffer mit verschiedenen pH-Werten hergestellt, die unter Einbeziehung der entsprechenden ΔpK_a -Konstante eine pH-Reihe von 5 bis 9 ergaben. Die Einbeziehung der ΔpK_a -Konstante war in diesem Fall von Bedeutung, da die Messungen in Anlehnung an die optimale Wachstumstemperatur von *Thermoplasma acidophilum* bei 60°C erfolgten (Darland et al., 1970; Segerer et al., 1988). Anschließend wurde die spezifische ATPase-Aktivität von *TaLon* bestimmt (Abschnitt 3.9.1) und gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen (Abbildung 4.6 A). Der für die ATPase-Aktivität optimale pH lag mit 5,75 in unmittelbarer Übereinstimmung mit dem für *Thermoplasma* ermittelten intrazellulären pH von $5,4 \pm 0,2$ (Searcy, 1976). Entsprechend wurde bei optimalem pH die spezifische ATPase-Aktivität von *TaLon* bei verschiedenen Temperaturen ermittelt (Abbildung 4.6 B). *TaLon* erreichte bei 75°C eine maximale spezifische ATPase-Aktivität von 1,1 nmol Pi/min μg . Da die obere Wachstumsgrenze für *Thermoplasma*-Zellen bei 63°C liegt (Segerer et al., 1988), wurden alle nachfolgenden enzymatischen Messungen angelehnt an die physiologischen Bedingungen bei 60°C und pH 5,75 (entspricht MES-Puffer mit pH 6,2 bei Raumtemperatur) durchgeführt.

Entsprechende Versuche mit verschiedenen Salzbedingungen ergaben, dass die ATPase-Aktivität von 5-20 mM MgCl_2 und 0-100 mM NaCl bzw. KCl nicht beeinflusst wird. Höhere Salzkonzentrationen inhibieren die ATPase-Aktivität schrittweise.

Um genauere Angaben zur katalytischen Wirksamkeit von *TaLon* als ATPase zu erhalten, wurde die ATPase-Aktivität unter „steady-state“-Bedingungen bestimmt. „Steady-state“ oder auch Fließgleichgewicht bezieht sich auf die Annahme, dass unter Reaktionsbedingungen das Substrat im Überschuss vorliegt und somit die Bildung des Substrat-Enzym-Komplexes [ES] nicht den Reaktions-limitierenden Schritt darstellt. Eine solche Reaktion erreicht ihre Maximalgeschwindigkeit, v_{max} , wenn das Enzym bei hohen Substratkonzentrationen vollständig mit Substrat gesättigt ist. Die Michaelis-Menten-Annäherung beschreibt die Geschwindigkeit v_0 einer enzymatischen Reaktion unter „steady-state“-Bedingungen in Abhängigkeit von der vorliegenden Substratkonzentration [S]: $v_0 = (v_{\text{max}} * [S]) / (K_M + [S])$. K_M bezeichnet in dieser Gleichung die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht. Ein kleiner K_M bedeutet damit eine hohe Affinität des Enzyms für

das Substrat und umgekehrt ein hoher K_M eine niedrige Substrataffinität. Die katalytische Konstante k_{kat} ist definiert als Quotient aus Maximalgeschwindigkeit und totaler Enzymkonzentration: $k_{\text{kat}} = v_{\text{max}}/[E]_T$. Diese Größe ist auch als Wechselzahl bekannt und gibt die Anzahl der Reaktionszyklen an, die das Enzym pro Zeiteinheit durchläuft.

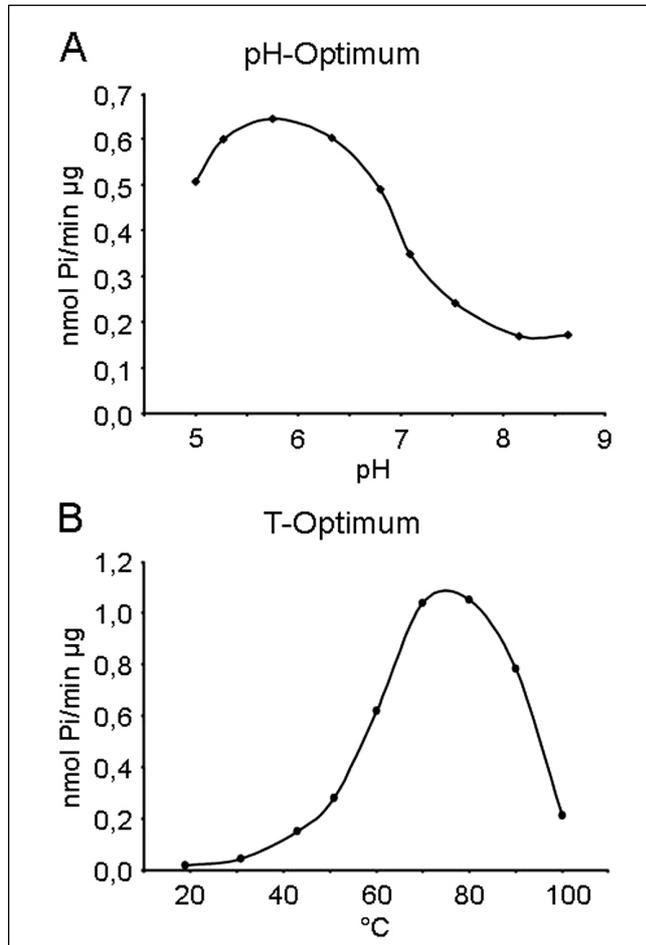


Abbildung 4.6: Optimierung der ATPase-Aktivität von *TaLon*.

(A) pH-Optimum. Für den pH-Bereich von 5-7 wurde MES ($\Delta pK_a = -0,011$), von pH 7-8 HEPES ($\Delta pK_a = -0,014$) und von pH 8-9 Tricine ($\Delta pK_a = -0,021$) als Puffersubstanz verwendet. Je 2 μg *TaLon* (93 nM Hexamer) wurden in 50 μl Reaktions-Puffer (50 mM MES/HEPES/Tricine, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 0,5 mM DDM) für 10 min bei 60°C inkubiert. Die Menge des entstandenen Phosphats wurde bestimmt (Abschnitt 3.9.1) und als spezifische ATPase-Aktivität (nmol Pi/min μg) gegen den pH-Wert aufgetragen. (B) Temperatur-Optimum bei optimalem pH. Die Messungen wurden in MES-Puffer mit an die Temperaturbereiche angepassten pH-Werten wie in (A) durchgeführt: pH 5,7 (20-30°C), pH 5,9 (40-50°C), pH 6,2 (60-70°C), pH 6,4 (80-90°C), pH 6,8 (100°C).

Bei Enzymen, die mehrere Reaktionszentren enthalten, kann die Bindung des Substrates an einer Stelle die Substrataffinität eines anderen Reaktionszentrums positiv oder negativ beeinflussen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Kooperativität. Das erste beschriebene kooperative Enzym ist Hämoglobin, bei dem die Bindung eines Sauerstoffmoleküls die Affinität für weitere Sauerstoffmoleküle erhöht. Durch entsprechende Umformungen wurde die Michaelis-Menten-Gleichung um den so genannten Hill-Koeffizienten n erweitert: $v_0 = (v_{\text{max}} \cdot [S]^n) / (K_M + [S]^n)$. Der Wert für den Hill-Koeffizienten n steigt mit der Kooperativität einer Reaktion an. Bei $n > 1$ liegt eine positive Kooperativität vor und bei $n < 1$ vermindert die Bindung eines Liganden die Affinität für weitere Liganden (negative Kooperativität). Ist $n = 1$ handelt es sich um eine nicht kooperative Reaktion und die Hill-Gleichung entspricht der

Michaelis-Menten-Gleichung. AAA⁺-Proteine gelten als kooperative Enzyme, obwohl genauere Details des Reaktionszyklus wie die Anzahl der parallel gebundenen ATP-Moleküle oder die Reihenfolge ihrer Hydrolyse nicht bekannt sind (Ogura und Wilkinson, 2001). Die strukturelle Grundlage für einen möglichen kooperativen Mechanismus bildet eine Achse aus zwei konservierten polaren Resten, die benachbarte Reaktionszentren miteinander verbindet. Ein Asparagin- oder Threonin-Rest (Sensor-1) koordiniert das γ -Phosphat in der Nukleotidbindestasche und ist über eine kurze α -Helix mit dem Arginin-Finger verbunden, der in die aktive Tasche der Nachbaruntereinheit zeigt. Zusammengenommen könnten diese beiden Reste als eine Art Schalter dienen, der den Nukleotidzustand eines aktiven Zentrums mit einer Konformationsänderung im benachbarten Reaktionszentrum verbindet (Lupas und Martin, 2002 und Abschnitt 2.3). Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M , v_{max} und k_{kat} wurde die spezifische ATPase-Aktivität von *TaLon* bei verschiedenen ATP-Konzentrationen bestimmt (Abschnitt 3.9.1) und gegen die entsprechenden ATP-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 4.7). Die in mehreren unabhängigen Messungen erhaltenen Datenpunkte ließen sich nach Hill anpassen und die kinetischen Konstanten berechnen. Aus der ermittelten Maximalgeschwindigkeit von $v_{max} = 0,631 \pm 0,003$ nmol Pi/min μ g lässt sich eine Wechselzahl von 4,5 ATP/s berechnen.

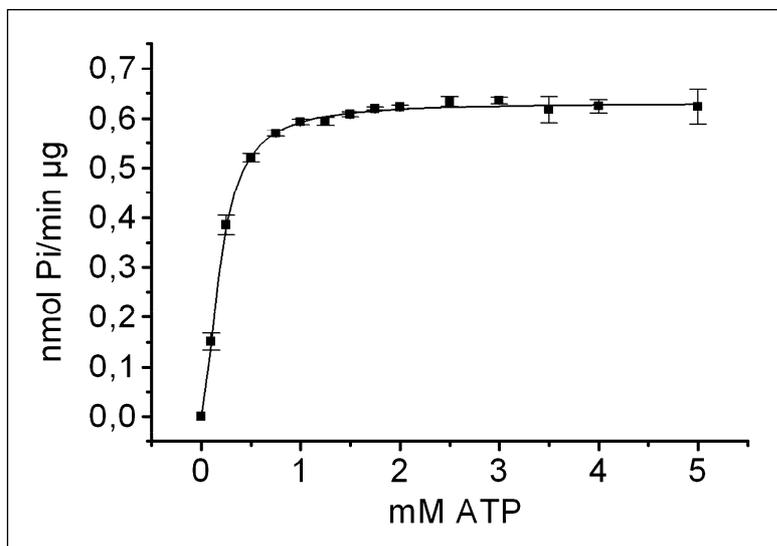


Abbildung 4.7: Kinetische Analyse der ATP-Hydrolyse durch *TaLon* unter „steady-state“-Bedingungen.

2 μ g *TaLon* (93 nM Hexamer) wurden in 50 μ l Reaktionspuffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) in Gegenwart von 0-5 mM ATP für 10 min bei 60°C inkubiert. Die entstandene

Phosphatmenge wurde bestimmt und die spezifische Aktivität aus vier unabhängigen Messungen als Mittelwerte gegen die entsprechende ATP-Konzentration aufgetragen (Abschnitt 3.9.1). Die Hill-Kurve wurde in Microcal Origin 5.0 berechnet und folgende kinetischen Konstanten ermittelt: $v_{max} = 0,631 \pm 0,003$ nmol Pi/min μ g; $K_M = 0,196 \pm 0,004$ mM; $n = 1,68 \pm 0,05$.

Der ermittelte Hill-Koeffizient von $1,68 \pm 0,05$ bedeutet positive Kooperativität, d. h. die Bindung von ATP an eine Bindestelle erhöht die Affinität von *TaLon* für weitere ATP-Moleküle. In vergleichbaren Studien an ClpB und Hsp104 wurden ebenfalls positive Hill-Koeffizienten

in der Größenordnung von 2-3 ermittelt (Schlee et al., 2001; Hattendorf und Lindquist, 2002). Es bleibt anzumerken, dass der für den Hill-Verlauf entscheidende Teil der Kurve von 0-0,1 mM ATP außerhalb der Nachweisgrenze der Malachitgrün-Methode lag. Auf eine genauere Analyse dieses Bereiches mittels radioaktiv markiertem ATP wurde verzichtet, da diese Information zur Interpretation der im Folgenden bearbeiteten Fragestellungen vernachlässigbar war.

Unter „steady-state“-Bedingungen ist der Quotient aus k_{kat} und K_M ein Maß für die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms. Mit $K_M = 0,196 \pm 0,004$ mM ergibt sich für *TaLon* ein Umsatz von $2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Der direkte Vergleich von *TaLon* mit Lon und FtsH aus *E.coli* zeigt, dass alle drei AAA^+ -Proteasen eine ähnliche ATPase-Aktivität aufweisen (Tabelle 4.1). Die katalytischen Kapazitäten von *TaLon*, *EcLon* und *EcFtsH* bewegen sich im oberen Bereich bisheriger für AAA^+ -Proteine ermittelter Werte, die mit 10^3 - $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ angegeben werden (Schlee et al., 2001; Hattendorf und Lindquist, 2002; Song et al., 2003). Für diffusionskontrollierte Reaktionen beträgt die katalytische Wirksamkeit 10^8 bis $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, AAA^+ -Proteine liegen somit im mittleren Bereich enzymatisch möglicher Reaktionsraten.

ATPase	<i>TaLon</i>	<i>EcFtsH</i> Karata et al., 1999	<i>EcLon</i> Abschnitt 4.10
K_M (mM)	0,196	0,083	0,201
v_{max} (nmol Pi/min μg)	0,631	0,459	0,554
k_{kat} (s^{-1})	4,5	3,3	4,8
k_{kat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$2,3 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$

Tabelle 4.1: Vergleich der ATPase-Aktivität von *TaLon* mit Lon und FtsH aus *E. coli*

4.5 Peptidase-Aktivität

Die Peptidase-Aktivität von Proteasen wird üblicherweise mit kurzen Peptiden getestet, die C-terminal mit einem Fluoreszenzmarker wie zum Beispiel AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) oder MNA (4-Methoxy- β -Naphthylamid) verknüpft sind. Nach Abspaltung des Markers kann dessen Fluoreszenz im Spektrofluorometer nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Peptidase-Aktivität von *TaLon* wurden 18 verschiedene Peptidsubstrate getestet. Eine Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von *TaLon* konnte nicht nachgewiesen werden. Erst nach Zugabe der Prolin-Imino-peptidase aus *Thermoplasma acidophilum* (*TaPIP*) wurde in Gegenwart von Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC, $M_w = 765$ Da) ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. *TaPIP* ist eine Aminopeptidase mit breiter Substratspezifität

und einer Vorliebe für kleine, hydrophobe Aminosäuren (Tamura et al., 1996). In *Thermoplasma* ist *TaPIP* auch als Faktor F1 bekannt und Teil einer Peptidasekaskade, die vom 20S Proteasom freigesetzte Peptide in Aminosäuren zerlegt (Tamura et al., 1996). Über Massenspektrometrie wurde nachgewiesen, dass bei Inkubation von Suc-LLVY-AMC mit *TaLon* die beiden Peptide VY-AMC und LVY-AMC entstanden (Abschnitt 3.9.2). VY-AMC und LVY-AMC sind im Spektrofluorometer nicht nachweisbar, erst wenn *TaPIP* diese Peptide schrittweise hydrolysiert, wird der Fluorophor AMC freigesetzt. Aufgrund der N-terminalen Schutzgruppe kann *TaPIP* Suc-LLVY-AMC nicht hydrolysieren und zusammen mit *TaLon* ergibt sich eine gekoppelte Methode, die den qualitativen Nachweis der Peptidase-Aktivität von *TaLon* erlaubt (Abbildung 4.8).

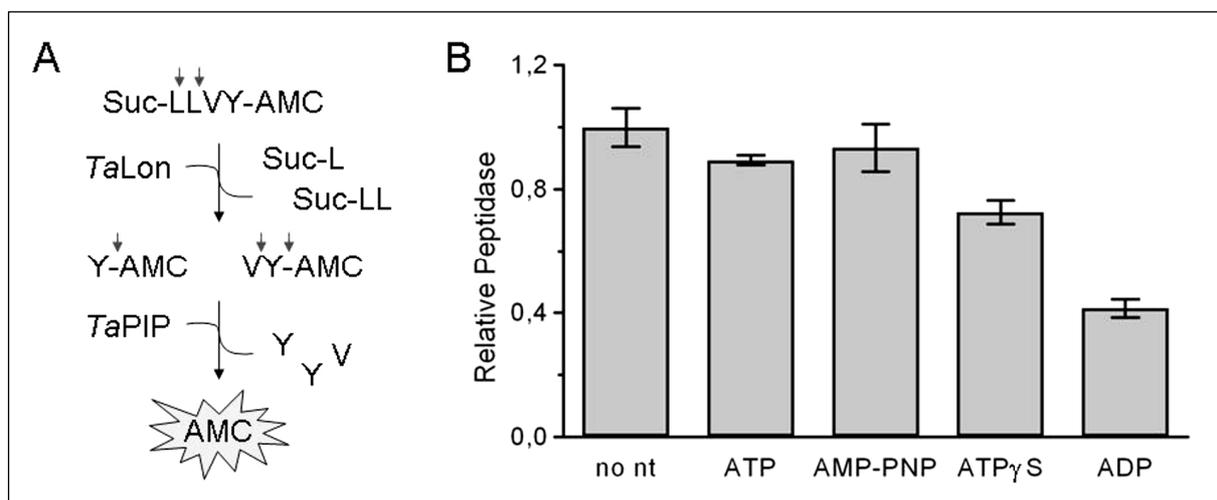


Abbildung 4.8: Die Peptidase-Aktivität von *TaLon*. (A) Schematische Darstellung der Peptidase-Messung. *TaLon* schneidet das Peptidsubstrat Suc-LLVY-AMC zwischen L-L oder L-V. Die Endopeptidase *TaPIP* erkennt Peptide mit ungeschütztem N-Terminus und hydrolysiert diese zu Aminosäuren, wodurch freies AMC entsteht. Dieses kann im Spektrofluorometer bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm nachgewiesen werden (Abschnitt 3.9.2). (B) Abhängigkeit der Peptidase-Aktivität vom Nucleotidzustand in *TaLon*. 4 μ g *TaLon* (46 nM Hexamer) und 12,8 μ g *TaPIP* (1,83 μ M) wurden in 200 μ l Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM, 100 μ M Suc-LLVY-AMC) mit oder ohne 2 mM Nucleotid bei 60°C inkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt und die Anfangssteigung der Kurven berechnet. Die Steigung in Abwesenheit von Nucleotid wurde auf eins normiert.

Die Bestimmung der Peptidase-Aktivität von *TaLon* (Abschnitt 3.9.2) in An- und Abwesenheit von ATP, ADP, AMPPNP oder ATP γ S ergab, dass *TaLon* über eine Nucleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität verfügte. Während ATP, AMPPNP und ATP γ S die Peptidase-

Aktivität nur unwesentlich beeinflussten, inhibierte ADP die Peptidase-Aktivität um 60% (Abbildung 4.8). Damit unterscheidet sich *TaLon* von der bakteriellen Lon-Protease und FtsH, die in Abwesenheit von ATP oder einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen kaum Peptidase-Aktivität aufweisen und damit Nukleotid-abhängige Peptidasen sind (Tabelle 4.2).

Peptidase (%)		ATP	AMP-PNP	ATP γ S	ADP
<i>TaLon</i>	100	89	93	73	41
<i>EcLon</i>	12	100	81	96	5
<i>EcFtsH</i>	3	100	keine Anga- be	32	3

Tabelle 4.2: Vergleich der relativen Peptidase-Aktivität von *TaLon* mit Lon (Goldberg et al., 1994) und FtsH (Yamada-Inagawa et al., 2003) aus *E. coli*.

Bezüglich der Selektivität gegenüber Peptidsubstraten wurden für FtsH aus *E. coli* die gleichen Beobachtungen gemacht wie im Fall von *TaLon*: aus einer Reihe von Peptidsubstraten konnte nur bei Suc-LLVY-AMC und in Gegenwart einer Aminopeptidase die Freisetzung von Fluoreszenz detektiert werden (Karata et al., 2001). Aus diesem Grund wurde die gereinigte Lon-Protease mittels Immuno-Blot (Abschnitt 3.8.3-4) auf Kontamination mit *E. coli* FtsH überprüft, aber FtsH konnte in der Präparation nicht nachgewiesen werden. Zusammengekommen sprechen die interne Schnittstelle in Suc-LLVY-AMC und die Unfähigkeit zur Hydrolyse anderer Peptidsubstrate für eine hohe Substratspezifität von *TaLon* und *EcFtsH*. Für die archaeale Lon-Protease aus *Thermococcus kodakarensis* wurde Peptidase-Aktivität gegenüber den beiden Standardsubstraten für *EcLon*, Glt-AAF-MNA und Suc-FLF-MNA, in Abwesenheit einer Aminopeptidase gemessen. Die beobachtete spezifische Peptidase-Aktivität war extrem gering (0,0007 nmol/min μ g) und wurde in Gegenwart von physiologischen ATP-Konzentrationen von 2-4 mM (Goldberg et al., 1994; Driessen et al., 1998) vollständig inhibiert (Fukui et al., 2002). Da *TkLon* im Gegensatz zu *TaLon* nach Überexpression in *E. coli* aus dem cytosolischen Überstand ohne Detergenz und als Aggregat-ähnlicher Komplex mit unbestimmtem Molekulargewicht gereinigt wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der „Lon-ähnlichen“ Peptidase-Aktivität von *TkLon* um einen Präparationsartefakt handelt.

Die membranständigen AAA⁺-Proteasen *TaLon* und FtsH unterscheiden sich in der Peptidase-Aktivität von der löslichen Lon-Protease. Während *TaLon* und FtsH eher kleine, hydrophobe Aminosäuren bevorzugen und die großen, hydrophoben Fluoreszenzmarker aus der ak-

tiven Tasche ausschließen, zeigt die lösliche Lon-Protease eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität mit einer Vorliebe für große hydrophobe Aminosäuren (Goldberg et al., 1994).

4.6 Abbau von Insulin-B

Reifes Insulin besteht aus einer A-Kette (21 Aminosäuren) und einer B-Kette (30 Aminosäuren), die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Nach Oxidation wird die isolierte B-Kette als Proteasesubstrat verwendet (Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO₃H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO₃H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala, $M_W = 3495$ Da).

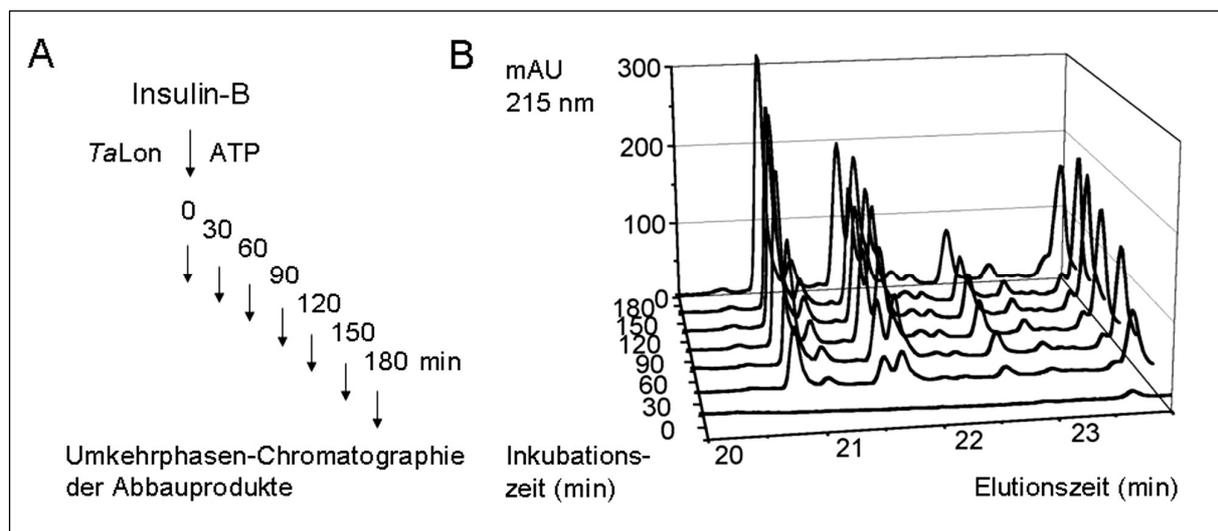


Abbildung 4.9: Proteolytischer Abbau von Insulin-B. (A) Schematischer Versuchsaufbau. (B) 2 μg *TaLon* (23 nM Hexamer) wurden in 200 μl Reaktions-Puffer (25 mM MES (pH 6,2), 10 mM MgCl_2 , 1 mM DDM, 2 mM ATP) mit 175 μg oxidiertem Insulin-B (250 μM) bei 60°C inkubiert. Alle 30 Minuten wurde der Reaktion ein Aliquot von 10 μl entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Die Peptidfragmente eluierten im Bereich von 20-23 Minuten nach Beginn der Elution. Die Absorptionsspitze von Insulin-B bei 25 Minuten wurde aufgrund der hohen Absorption bei 215 nm zur besseren Auflösung des Peptidprofils weggelassen (Abschnitt 3.9.5).

Der Abbau von Insulin-B durch *TaLon* wurde unter Standardbedingungen über drei Stunden bei 60°C durchgeführt. Alle 30 Minuten wurde der Reaktionsmischung eine Probe entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC („high pressure liquid chromatography“) analysiert. Bei dieser Methode wurden die Peptide an eine hydrophobe Säulenmatrix gebunden und anschließend mit einem linearen Gradienten aus 0-60% Acetonitril eluiert. Die Elution der Pep-

tide konnte über UV-Absorption bei 215 nm verfolgt werden (Abbildung 4.9 A und Abschnitt 3.9.5). 20-23 Minuten nach Beginn der Elution wurden mehrere Absorptionsspitzen beobachtet, deren Höhe in Anwesenheit von *TaLon* mit der Zeit zunahm und darum den Abbauprodukten von Insulin-B zugeordnet wurden (Abbildung 4.9 B).

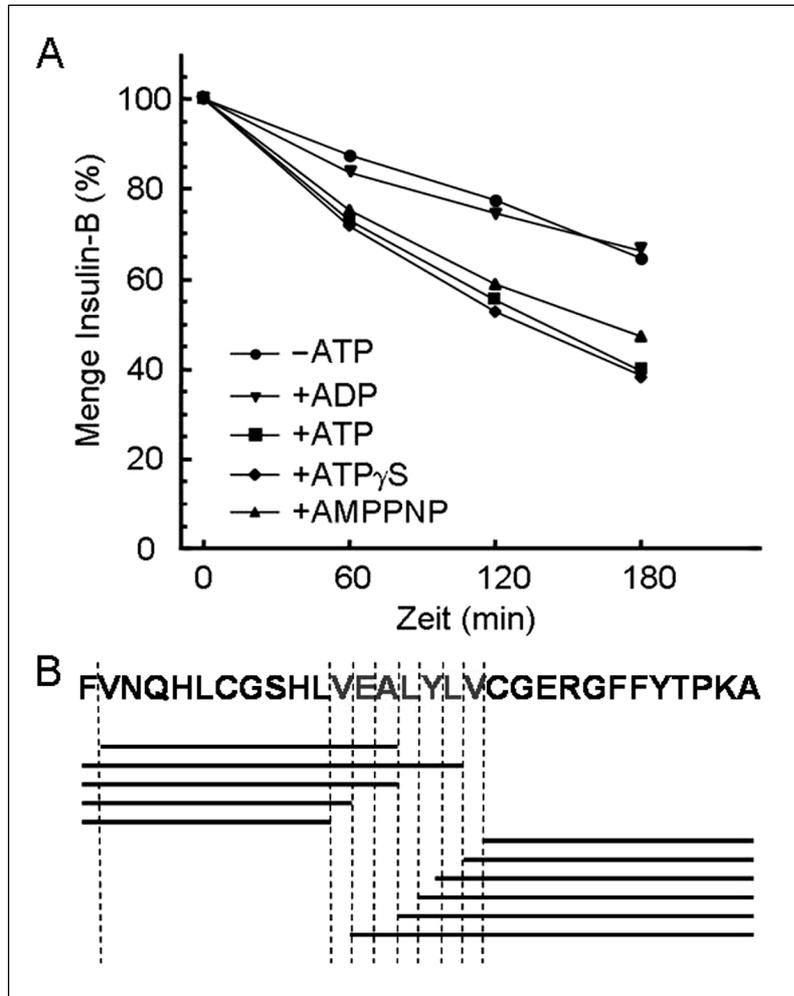


Abbildung 4.10: Abbau von Insulin-B durch *TaLon*. (A) Zur Untersuchung des Einflusses von Nukleotiden auf den Abbau von Insulin-B wurden 2 μ g *TaLon* (23 nM Hexamer) in 200 μ l Reaktions-Puffer (25 mM MES (pH 6,2), 10 mM MgCl₂, 1 mM DDM) in An- oder Abwesenheit von 2 mM Nukleotid mit 175 μ g oxidiertem Insulin-B (250 μ M) bei 60°C inkubiert. Nach 1, 2 und 3 h wurde je ein Aliquot von 10 μ l entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert (Abschnitt 3.9.5). Die Abnahme der Insulin-B-Menge wurde aus dem Ab-

sorptionsprofil bei 215 nm berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. (B) Analyse der Spaltprodukte von Insulin-B. *TaLon* und Insulin-B wurden mit ATP wie unter (A) beschrieben für 3 h bei 60°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnfache Verdünnung mit 0,1% Trifluoressigsäure in 2% Acetonitril gestoppt. 5-10 μ l dieser Lösung wurden mittels LC-MS/MS analysiert (Abschnitt 3.9.5). Die am häufigsten detektierten Peptide wurden als Balken unter der Insulin-B-Sequenz dargestellt. Der rot markierte Bereich entspricht der von *TaLon* bevorzugten Spaltregion in Insulin-B.

Insulin-B eluierte 25 Minuten nach Start der Elution. In 3 h fiel die zugehörige Absorptionsspitze von 1200 mAU auf 340 mAU ab. Rechnerisch ergab sich daraus ein Umsatz von ca. 125 μ g Insulin-B in 3 h (~ 70% der eingesetzten Gesamtmenge). In mehreren unabhängigen Messungen wurde auf diese Weise der Abbau von Insulin-B durch *TaLon* in An- und Abwe-

senheit von Nukleotiden bestimmt. Abbildung 4.10 A zeigt den Einfluss von ATP, ADP, AMPPNP und ATP γ S auf den Abbau von Insulin-B. *TaLon* benötigt kein Nukleotid zum Abbau von Insulin-B, aber ATP und die nicht hydrolysierbaren Analoga ATP γ S und AMPPNP stimulierten den Abbau zweifach. ADP hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Reaktion.

In einem weiteren Versuch wurden die beim Abbau von Insulin-B isolierten Peptide mit LC-MS/MS identifiziert (Abschnitt 3.9.5). Die meisten Peptide entstanden durch Hydrolyse von Insulin-B innerhalb der Sequenz Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val (Abbildung 4.10 B). FtsH hydrolysiert ebenfalls bevorzugt Peptidbindungen C-terminal von kleinen hydrophoben Resten, wie für *EcFtsH* an λ CII und β -Casein (Shotland et al., 2000) und für *TtFtsH* an Pepsin und α -Casein (Asahara et al., 2000) nachgewiesen wurde. Die Vorliebe von *TaLon* und FtsH für aliphatische Aminosäuren stimmte mit der bei Suc-LLVY-AMC beobachteten Substratspezifität überein (Abschnitt 4.5).

Zusammengenommen unterstützen diese Daten die bereits in Zusammenhang mit der Peptidase-Aktivität (Abschnitt 4.5) geäußerte Vermutung, dass *TaLon* und FtsH eine für den Abbau von Membranproteinen optimierte Peptidbindetasche besitzen. Sequenzanalysen von Membranproteinen haben gezeigt, dass die Hälfte aller Aminosäuren in Transmembranhelices aus den unpolaren, aliphatischen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Alanin besteht (Senes et al., 2000).

4.7 Protease-Aktivität

α - und β -Caseine bilden den Hauptproteinbestandteil der Milch und haben ein ungefähres Molekulargewicht von 24 kDa. Da α - und β -Casein keine definierte Tertiärstruktur besitzen (Holt und Sawyer, 1988), werden sie von ATP-abhängigen Proteasen als „ungefaltet“ erkannt und abgebaut. ClpAP wurde anhand dieser Aktivität entdeckt, isoliert und benannt (*clp* = „caseinolytic protease“) (Katayama-Fujimura et al., 1987). Über Fluorescein-markiertes Casein kann der Proteinabbau kontinuierlich am Spektrofluorometer verfolgt werden (Craiu et al., 1997; Lo et al., 2001). Diese Methode beruht auf internem Quenching, dem die an Casein gebundenen Fluorescein-Moleküle durch ihre räumliche Nähe unterliegen. Durch Proteolyse wird Casein in Peptide zerlegt und die dadurch voneinander isolierten Fluorescein-Moleküle können zur Fluoreszenz angeregt werden (Abbildung 4.11 A).

Der Abbau von Fluorescein-markiertem Casein durch *TaLon* wurde in An- und Abwesenheit von Nukleotiden gemessen (Abschnitt 3.9.3). Ohne ATP war der Abbau an Fluorescein-markiertem Casein gering. Die Zugabe von AMPPNP und ATP γ S führte zur Verdopplung des

Casein-Abbaus, während ATP den Umsatz verzehnfachte. ADP dagegen inhibierte die Reaktion vollständig (Abbildung 4.11 B).

Im Gegensatz zur Peptidhydrolyse (Abschnitt 4.5) oder dem Abbau von Insulin-B (Abschnitt 4.6) wurde für den effizienten Abbau von Fluorescein-Casein durch *TaLon* die Hydrolyse von ATP benötigt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der allgemeinen Annahme, dass ATP-abhängige Proteasen Proteinsubstrate aktiv in die proteolytische Kammer transportieren. Erst kürzlich wurde für ClpXP aus *E. coli* gezeigt, dass für ungefaltete Proteinsubstrate die Translokation in die Proteasekammer zum reaktionslimitierenden Schritt wurde und für jede translozierte Aminosäure durchschnittlich ein ATP-Molekül hydrolysiert werden musste (Kenniston et al., 2003).

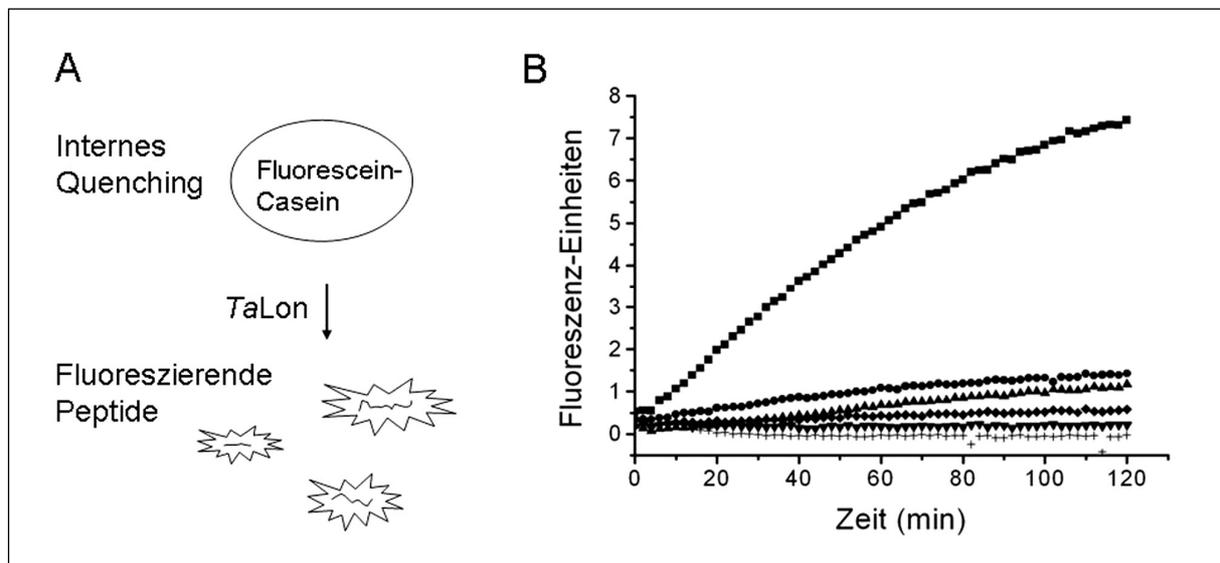


Abbildung 4.11: Abbau von Fluorescein-markiertem Casein. (A) Schematische Darstellung. In Fluorescein-markierten Casein-Molekülen führt die hohe Dichte der Farbstoffmoleküle zum internen Quenching der Fluoreszenz. Nach Proteolyse können Fluorescein-markierte Peptide im Spektrofluorometer bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm nachgewiesen werden. (B) Nukleotid-Abhängigkeit des Fluorescein-Casein Abbaus durch *TaLon*. 5 μg *TaLon* (58 nM Hexamer) wurden mit 25 μg Fluorescein-Casein (5 μM) in 200 μl Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl_2 , 0,5 mM DDM) mit oder ohne 2 mM Nukleotid bei 60°C inkubiert. Der Abbau von Fluorescein-Casein wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt (Abschnitt 3.9.3).

■ ATP; ● ATP γ S; ▲ AMPPNP; ◆ ohne Nukleotid; ▼ ADP; + ohne *TaLon*.

Der Vergleich der caseinolytischen Aktivität von *TaLon* mit den beiden AAA^+ -Proteasen aus *E. coli* bestätigt die erhaltenen Ergebnisse (Tabelle 4.3)

Aktivität (%)		ATP	AMP- PNP	ATP γ S	ADP
<i>TaLon</i>	9	100	15	19	2
<i>EcLon</i>	5	100	20	18	0
<i>EcFtsH</i>	0	100	keine Anga- be	9	4

Tabelle 4.3: Vergleich der caseinolytischen Aktivität von *TaLon* mit Lon (Goldberg et al., 1994) und FtsH (Yamada-Inagawa et al., 2003) aus *E. coli*.

Ebenso wie im Fall von Insulin-B (Abbildung 4.9) wurden die Abbauprodukte von Casein einer zeitaufgelösten Analyse mittels Umkehrphasen-Chromatographie unterworfen (Abschnitt 3.9.6). Abbildung 4.12 zeigt einen Vergleich der Abbauprofile von β -Casein durch *TaLon* mit dem Abbau von β -Casein durch das 20S Proteasom aus *T. acidophilum*. Die beiden Profile unterschieden sich in der Verteilung der Absorptionsspitzen, was die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Proteasen widerspiegelte. Das 20S Proteasom aus *Thermoplasma* hydrolysiert Peptidbindungen nach hydrophoben oder aromatischen, basischen und Glutamat-Resten und hat damit eine sehr breite Substratspezifität (Voges et al., 1999). Für *TaLon* hingegen wurde in Abschnitt 4.6 eine hohe Selektivität für aliphatische Aminosäuren N-terminal zur Schnittstelle gezeigt.

Bei beiden Proteasen änderte sich nur die Fläche unterhalb der Absorptionsspitzen mit der Zeit nicht aber das Absorptionsprofil. Dieses Verhalten ist ein Merkmal prozessiver Proteasen. Nicht-prozessive Proteasen wie zum Beispiel Trypsin hydrolysieren immer nur eine Peptidbindung und entlassen dann die Reaktionsprodukte aus der aktiven Tasche, dadurch variieren Länge und Zusammensetzung der Reaktionsprodukte mit der Zeit. Prozessive Proteasen hingegen zerlegen ein gebundenes Polypeptid in einer konzertierten Reaktion vollständig in Peptide und setzen keine Intermediate frei, damit lassen sich zu jedem Zeitpunkt der proteolytischen Reaktion dieselben Abbauprodukte nachweisen. *TaLon* ist wie FtsH aus *E. coli* und *T. thermophilus* (Shotland et al., 1997; Asahara et al., 2000) und *EcLon* (Maurizi, 1987; Nishii et al., 2002) eine prozessive Protease.

Die durch Umkehrphasen-Chromatographie isolierten Abbauprodukte von β -Casein wurden im Anschluss vereinigt und mittels Größenausschluss-Chromatographie untersucht. In den erhaltenen Fraktionen wurde die Anzahl freier N-Termini durch Reaktion mit Fluorescamin bestimmt (Abschnitt 3.9.6 und Abbildung 4.13 A). Das Absorptionsprofil nach Gelfiltration bei 215 nm und das Profil freier Aminogruppen korrelierte hinreichend, um die quantifizierte

Menge der ermittelten Aminogruppen der Menge freier N-Termini (α -Aminogruppen) und damit der Anzahl der in jeder Fraktion enthaltenen Peptide gleichzusetzen. Alle detektierten Reaktionsprodukte waren kleiner als 3,5 kDa, unabhängig ob durch proteasomalen Abbau oder durch *TaLon* generiert (Abbildung 4.13 B).

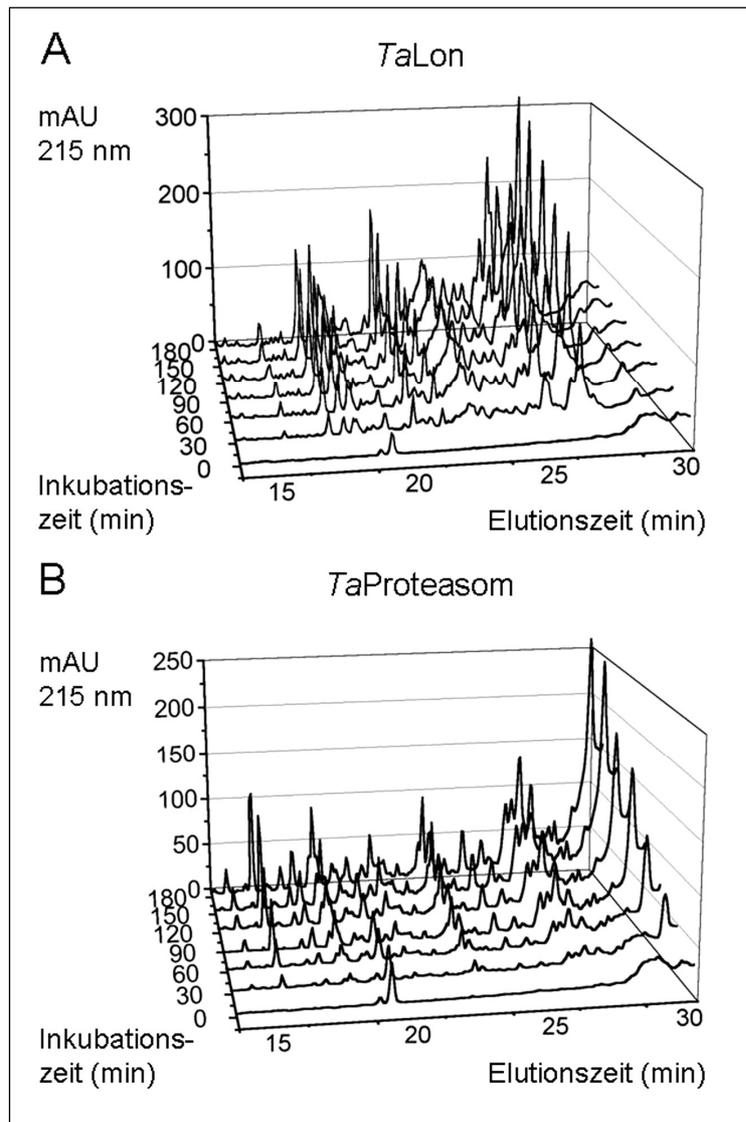


Abbildung 4.12: Prozessiver Abbau von β -Casein.

(A) 12 μ g *TaLon* (47 nM Hexamer) wurden mit 750 μ g β -Casein (52 μ M) in 600 μ l Reaktionspuffer (25 mM MES (pH 6,2), 10 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 1 mM DDM) bei 60°C inkubiert. Alle 30 Minuten wurde der Reaktion ein Aliquot von 40 μ l entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Die Peptidfragmente eluierten im Bereich von 15-30 Minuten nach Beginn der Elution. Die Absorptionsspitze von β -Casein bei 33,6 Minuten wurde aufgrund der hohen UV-Absorption zur besseren Auflösung des Peptidprofils weggelassen (Abschnitt 3.9.6). (B) 80 μ g *TaProteasom* (200 nM) wurden mit 750 μ g β -Casein (52 μ M)

in 600 μ l 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) bei 60°C inkubiert und wie unter (A) beschrieben behandelt.

Die Größenverteilung der proteasomalen Abbauprodukte ähnelte stark bereits publizierten Daten und zeigte die Form einer logarithmischen Normalverteilung mit einer mittleren Peptidgröße von 7 Aminosäuren (Kisselev et al., 1998). In Gegenwart von *TaLon* und ATP akkumulierten dagegen Peptide mit einem Molekulargewicht von ca. 1300 Da (11-12 Aminosäuren) und weniger ausgeprägt von 600 Da (5-6 Aminosäuren) (Abbildung 4.13 B). Diese Daten stimmten mit für FtsH aus *E. coli* und *T. thermophilus* ermittelten Größen von Abbauprodukten überein.

produkten überein, deren Maximum ebenfalls im Bereich von 1- 2 kDa lag (Shotland et al., 1997; Asahara et al., 2000). Die beobachtete Länge der Abbauprodukte spiegelte die Selektivität von *TaLon* und *FtsH* für hydrophobe Aminosäuren wider (Abschnitt 4.6).

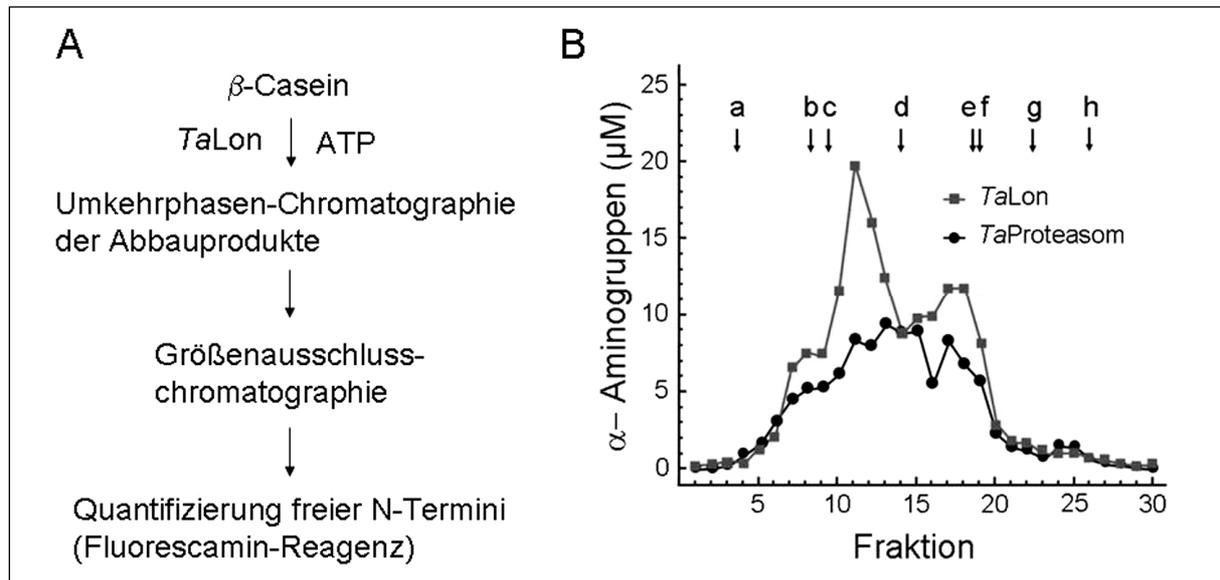


Abbildung 4.13: Größenverteilung der Abbauprodukte von β -Casein. (A) Schematischer Versuchsaufbau. (B) *TaLon* und *TaProteasom* wurden wie in Abbildung 4.12 beschrieben mit β -Casein für 3 h bei 60°C inkubiert. Mittels Umkehrphasen-Chromatographie wurden die Reaktionsprodukte von den Edukten getrennt und die Peptidfraktionen von 15-30 Minuten (siehe Abbildung 4.13) aus vier Reaktionsläufen vereinigt. Die Größenverteilung der von *TaLon* und dem Proteasom generierten Peptide wurde über Gelfiltration analysiert und mit einem Molekulargewichtsmarker verglichen: a = Ausschlussvolumen der Säule, b = 3496 Da, c = 1654 Da, d = 773 Da, e = 565 Da, f = 331 Da, g = 246 Da, h = 75 Da. Die Anzahl der Aminogruppen in den gewonnenen Fraktionen nach Gelfiltration wurde durch Reaktion mit Fluorescamin ermittelt (Abschnitt 3.9.6).

Es bleibt zu bemerken, dass sich diese Daten auf lösliche Modellsubstrate beziehen. In Abschnitt 4.6 wurde bereits diskutiert, dass die bei *FtsH* und *TaLon* beobachtete Substratspezifität für aliphatische Reste mit deren Häufigkeit in Transmembranbereichen korreliert. Die Abbauprodukte integraler Membranproteine müssten demnach durch die erhöhte Schnittstellenfrequenz kürzer ausfallen als die für β -Casein ermittelte Produktlänge.

4.8 Abbau und Entfaltung von GFP-Calmodulin

Das „Grün-Fluoreszierende-Protein“ (GFP) aus der Qualle *Aequorea aequorea* wird in verschiedensten Bereichen der Biochemie und Zellbiologie als Reportermolekül eingesetzt. GFP (28 kDa) bildet eine zylinderförmige Struktur aus 11 β -Strängen, in deren Mitte Ser⁶⁵-Tyr-Gly⁶⁷ in der Gegenwart von Sauerstoff autokatalytisch zu einem Chromophor zyklisieren. Die β -Struktur ist essentiell für die Biolumineszenz des Chromophors. Chemische Denaturierung der Proteinstruktur durch Säuren, Basen oder Guanidiniumchlorid führt zu völligem Verlust messbarer Fluoreszenz, die aber nach Rückfaltung von GFP wiederhergestellt werden kann (Zimmer, 2002). Im Bereich ATP-abhängiger Proteasen hat sich mit einem SsrA-Tag versehenes GFP (GFP-SsrA) als Substrat etabliert, dessen Entfaltung direkt am Spektrofluorometer verfolgt werden kann (Weber-Ban et al., 1999; Singh et al., 2000; Benaroudj und Goldberg, 2000). Der aus 11-Aminosäuren bestehende SsrA-Tag reicht aus, um das thermisch stabile GFP für den Abbau durch prokaryontische ATP-abhängige Proteasen zu markieren (Abschnitt 2.2).

Um die Entfaltungs-Aktivität zu untersuchen, wurde *TaLon* unter Standardbedingungen mit verschiedenen rekombinanten „Varianten“ von GFP inkubiert und die Fluoreszenz in Gegenwart von ATP bei 60°C am Spektrofluorometer verfolgt (Abschnitt 3.9.4). Auf diese Weise wurden GFP, GFP-SsrA, Casein-GFP, Calmodulin-GFP und GFP-Calmodulin getestet, aber nur im Fall von GFP-Calmodulin wurde eine Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit beobachtet (Abbildung 4.14 B). Calmodulin ist in Abwesenheit von Ca²⁺ flexibel (Zhang et al., 1995) und wird von *TaLon* als ungefaltetes Substrat erkannt. Die Bindung von Ca²⁺ führt zur Ausbildung einer stabilen Struktur in Calmodulin (Babu et al., 1988), und die Zugabe von CaCl₂ zur Reaktion inhibierte den Abbau von GFP-Calmodulin durch *TaLon* vollständig. Ohne ATP wurde keine Aktivität gegenüber GFP-Calmodulin beobachtet (Abbildung 4.14).

Warum GFP-Calmodulin als einziges unter den getesteten GFP-Substraten von *TaLon* als Substrat erkannt wurde, ist schwierig zu beantworten. Möglicherweise erkennt *TaLon* anders als ClpA, ClpX oder PAN den SsrA-Tag nicht, da in Archaeen die SsrA-RNA nicht identifiziert wurde und über ähnliche Abbausignale auch nichts bekannt ist (siehe Abschnitt 2.2). Eine mögliche Erklärung für die Selektivität von *TaLon* gegenüber Casein-GFP, Calmodulin-GFP und GFP-Calmodulin bietet eine Studie mit ClpAP, ClpXP und dem 26S Proteasom. Der Vergleich von verschiedenen Substraten ergab, dass diese ATP-abhängigen Proteasen ihre Substrate prozessiv vom Erkennungssignal her entfalten und abbauen. Entscheidend für die Substraterkennung war dabei weniger die Thermostabilität des Gesamtmoleküls als die direkte dreidimensionale Umgebung in der Nähe des Abbausignals (Lee et al., 2001). Möglicher-

weise bietet von allen angebotenen Varianten nur das C-terminal verknüpfte Calmodulin einen Übergang zum stabilen GFP, der von *TaLon* erkannt wird.

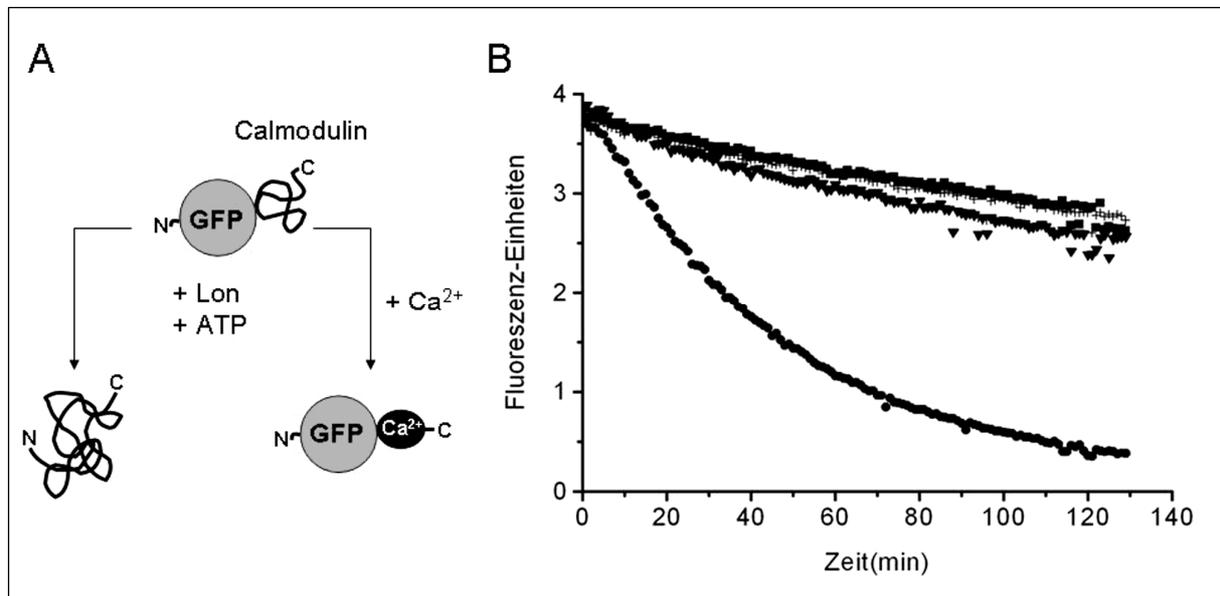


Abbildung 4.14: Entfaltung und Abbau von GFP-Calmodulin durch *TaLon*. (A) In Gegenwart von ATP wird GFP-Calmodulin durch *TaLon* entfaltet, was im Spektrofluorometer anhand des Abfalls der Fluoreszenz verfolgt werden kann (Anregung bei 480 nm, Emission bei 520 nm). In Gegenwart von Ca²⁺ bildet Calmodulin einen stabilen Komplex mit Ca²⁺, der die Substraterkennung durch *TaLon* verhindert. (B) Entfaltung von GFP-Calmodulin durch *TaLon*. 3 µg *TaLon* (35 nM Hexamer) wurden mit 3,3 µg GFP-Calmodulin (370 nM) in 200 µl Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) bei 60°C inkubiert. Die Fluoreszenz von GFP-Calmodulin wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt (Abschnitt 3.9.4). ● 2 mM ATP; ▼ 2 mM ATP und 5 mM CaCl₂; + kein Nukleotid; ■ ohne *TaLon*.

Zum Nachweis, dass GFP-Calmodulin von *TaLon* nicht nur entfaltet, sondern auch abgebaut wurde, wurden *TaLon* und GFP-Calmodulin unter Standardbedingungen bei 60°C inkubiert (Abschnitt 3.9.4). In mehreren Zeitabständen wurden der Reaktion Proben entnommen und nach SDS-PAGE (Abschnitt 3.8.1) und Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.8.2) miteinander verglichen (Abbildung 4.15). In Gegenwart von ATP wurde GFP-Calmodulin von *TaLon* vollständig und prozessiv abgebaut, d. h. es wurden keine Abbauprodukte detektiert. Der Vergleich von nativem GFP-Calmodulin mit einem Ansatz, in dem GFP-Calmodulin vorher durch Säure denaturiert wurde (Yoshida et al., 2002), zeigte keine Veränderung in der Geschwindigkeit des Abbaus von GFP-Calmodulin (Abbildung 4.15).

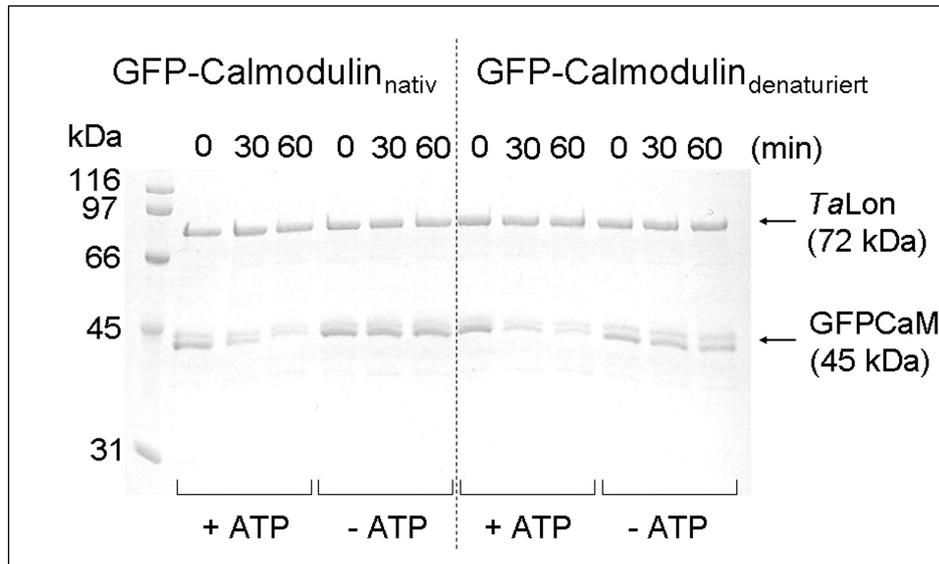


Abbildung 4.15: Abbau von GFP-Calmodulin durch *TaLon*. 6,5 μg *TaLon* (150 nM Hexamer) wurden mit 8,3 μg GFP-Calmodulin (1,8 μM) in 100 μl Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM Mg

Cl_2 , 0,5 mM DDM, ± 2 mM ATP) bei 60°C inkubiert. Nach 0, 30 und 60 Minuten wurden je 25 μl des Reaktionsansatzes mit 5 μl SDS-Probenpuffer versetzt. 12,5 μl jeder Probe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 3.8.1) und mit Coomassie gefärbt (Abschnitt 3.8.2). Zur Denaturierung von GFP-Calmodulin wurden 8,3 μg GFP-Calmodulin in 10 μl Denaturierungs-Puffer (50 mM HCl, 1 mM DTT) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Yoshida et al., 2002).

Kenniston et al. (2004) konnten für ClpXP aus *E. coli* zeigen, dass für gefaltete Proteinsubstrate die Entfaltung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion wird. Im Fall von GFP-Calmodulin und *TaLon* konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Säure-denaturiertes und natives GFP-Calmodulin wurden mit gleicher Geschwindigkeit abgebaut (Abbildung 4.15), was die Vermutung nahe legt, dass im Fall von *TaLon* die Translokation des Substrats die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion bestimmt.

4.9 AAA⁺-Mutanten

Zur genaueren Untersuchung des molekularen Mechanismus von *TaLon* wurden einige der am stärksten konservierten Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht und die jeweiligen enzymatischen Eigenschaften der Mutanten mit dem Wildtyp-Enzym (*TaLon*_{wt}) verglichen. Über ortsspezifische Mutagenese (Abschnitt 3.7.9) wurden das Walker-A-Lysin (K63A), das Walker-B-Aspartat (D241A), das Sensor-1-Asparagin (N293A), der Arginin-Finger (R305A), das Sensor-2-Arginin (R382A) und ein weiterer Arginin-Rest (R375A), hier Sensor-2' genannt, gegen Alanin ausgetauscht (Abbildung 4.16). Alle Mutanten konnten, wie für *TaLon* beschrieben (Abschnitt 3.8.6), in *E. coli* exprimiert und als hochmolekulare Komplexe mit

definierter Stöchiometrie gereinigt werden. Keine der Mutationen schien die Assemblierung von *TaLon* zu beeinträchtigen und alle waren ohne Zugabe von Nukleotid stabil.

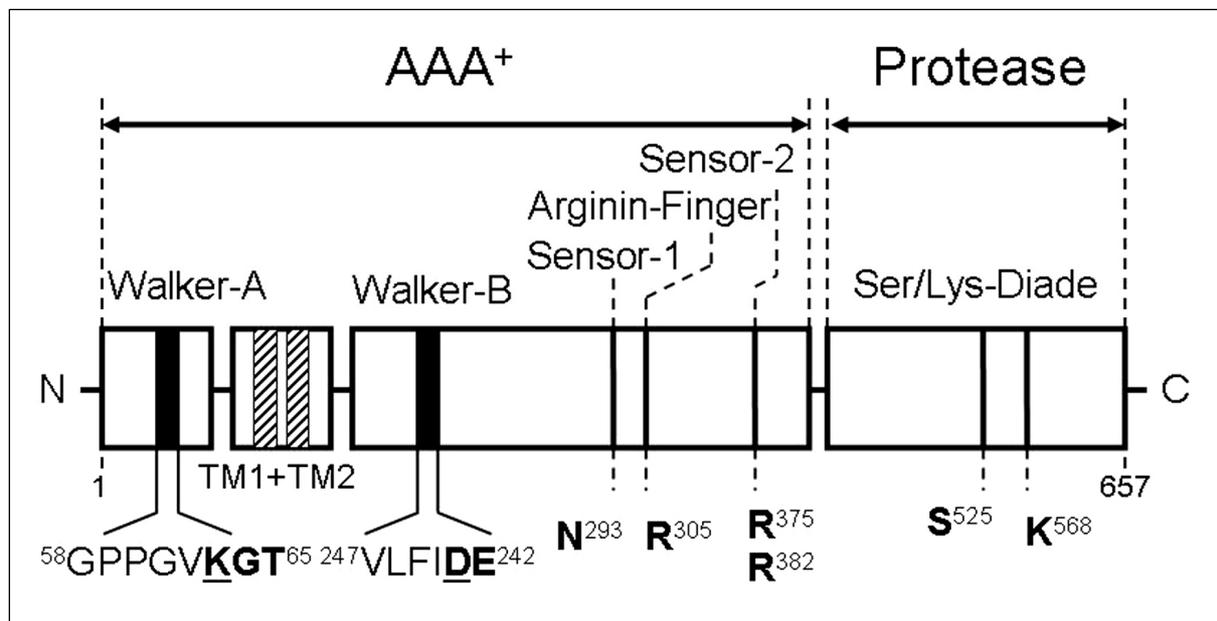


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung von *TaLon*. Die N-terminale AAA⁺-Domäne wird von zwei Transmembranhelices (TM) unterbrochen, die zwischen Walker-A und -B inseriert sind. Die in dieser Studie zu Alanin mutierten konservierten Reste wurden schwarz gekennzeichnet bzw. unterstrichen.

Die relative ATPase- (Abschnitt 3.9.1), Peptidase- (Abschnitt 3.9.2) und Protease-Aktivität (Abschnitt 3.9.3) der Mutanten wurde bestimmt und mit dem Wildtyp-Enzym (*TaLon*_w) verglichen (Tabelle 4.4 und 4.5).

Die Walker-A-Mutante *TaLon*K63A zeigte keinerlei ATPase-Aktivität (Tabelle 4.4). Die Peptidase-Aktivität dagegen wurde von der Mutation nicht beeinträchtigt. In Abwesenheit von Nukleotid oder in Gegenwart von ATP und seinen nicht-hydrolysierbaren Analoga verhielt sich *TaLon*K63A wie *TaLon*_w. Nur ADP hatte im Gegensatz zum Wildtyp keinen inhibitorischen Einfluss auf die Peptidase-Aktivität der Walker-A-Mutante (Tabelle 4.4). Die Protease-Aktivität korrespondierte zur Peptidase-Aktivität, *TaLon*K63A besaß wie *TaLon*_w eine ATP-Hydrolyse unabhängige Aktivität gegenüber Fluorescein-Casein, die in der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht von ADP inhibiert wurde (Tabelle 4.5). Strukturell ist der mutierte Walker-A Lysin-Rest verantwortlich für die Koordination der β- und γ-Phosphatgruppen des gebundenen ATPs (Abschnitt 2.3). Für die entsprechende Walker-A-Mutante in *EcFtsH* wurde vermutet, dass diese kein ATP binden konnte (Karata et al., 1999). Die vom Nukleotidzustand entkoppelte Peptidase- und Protease-Aktivität in *TaLon*K63A ließe sich mit der Unfähigkeit der Mutante Nukleotide zu binden erklären.

Die Walker-B-Mutante *TaLon* D241A behielt 5% ATPase-Aktivität (Tabelle 4.4). Der mutierte Aspartat-Rest ist verantwortlich für die Koordination des für die Katalyse essentiellen Mg^{2+} -Ions, das wiederum an der Koordination des β - und γ -Phosphats sowie des katalytisch aktiven Wassermoleküls beteiligt ist (Abschnitt 2.3). Die stark reduzierte ATPase-Aktivität von *TaLon*D241A ist damit wahrscheinlich die Folge einer veränderten Koordination des γ -Phosphats und/oder des katalytisch aktiven Wassermoleküls, die die Hydrolyse von ATP ca. 20-fach verlangsamt. Die reduzierte Protease-Aktivität von *TaLon*D241A, die durch ATP nicht weitergehend stimuliert wurde, korrelierte mit der geringen ATPase-Aktivität (Tabelle 4.5). In Abwesenheit von Nukleotid war die Peptidase-Aktivität von *TaLon*D241A nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, während ADP, ATP, ATP γ S und AMPNPNP gleichermaßen zu einer Reduktion der Peptidase-Aktivität auf ca. 60% der Wildtyp-Aktivität führten (Tabelle 4.4). Dies erinnert an die Reduktion der Peptidase-Aktivität von *TaLon*wt in Gegenwart von ADP auf 40% des Wildtyp-Niveaus (Tabelle 4.5). Zusammengenommen scheint *TaLon*-D241A nicht mehr zwischen ADP und Nukleotiden, die γ -Phosphate enthalten, unterscheiden zu können und befindet sich damit in Gegenwart von Nukleotiden in einem permanenten „ADP-Zustand“.

Sensor-1 ist ein bei AAA^+ -Proteinen konservierter polarer Rest, der in die Nukleotidbindetasche zeigt und an der Koordination des γ -Phosphats beteiligt ist (Abschnitt 2.3). Ursprünglich wurde vermutet, dass Sensor-1 als Fühler des jeweiligen Nukleotidzustandes der ATP-Bindetasche im Rahmen eines kooperativen Hydrolysemechanismus dient (Guenther et al., 1997; Neuwald et al., 1999). Mittlerweile lassen Mutagenesestudien und mit Strukturdaten unterstützte Sequenzanalysen eher eine katalytische Funktion des Sensor-1-Restes vermuten (Karata et al., 1999; Hattendorf und Lindquist, 2002; Iyer et al., 2004). In Übereinstimmung mit einer Rolle bei der Hydrolyse von ATP zeigte die Sensor-1-Mutante *TaLon*N293A kaum ATPase-Aktivität, während die Regulation der Peptidase durch Nukleotide nicht beeinträchtigt wurde (Tabelle 4.4). Die proteolytische Aktivität gegenüber Fluorescein-Casein war der reduzierten ATPase-Aktivität entsprechend gering (Tabelle 4.5).

Auch die Sensor-2'-Mutante *TaLon* R375A zeigte kaum ATPase-Aktivität, wobei die Peptidase-Aktivität ebenso wie bei *TaLon*N293A unbeeinträchtigt blieb (Tabelle 4.4). Sensor-2', ein unter archaealen Lon-Proteasen streng konservierter Arginin-Rest in der Nähe des Sensor-2, wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. In der bakteriellen Lon-Protease befindet sich ebenfalls ein zweiter konservierter Arginin-Rest (R537 in *EcLon*) in der Nähe des Sensor-2-Arginins (R542). Die Struktur der isolierten α - AAA^+ -Subdomäne der *EcLon*-Protease lässt vermuten, dass beide Reste in die Richtung der Nukleotidbindetasche zeigen (Botos et al., 2004) und an der Koordination und/oder Hydrolyse des γ -Phosphats beteiligt sein könnten (Ogura et al., 2004).

		ATPase (%)	Peptidase (%)				
			kein Nukleotid	ADP	AMP- PNP	ATP γ S	ATP
Wildtyp		100 \pm 4	100 \pm 6	41 \pm 3	93 \pm 8	73 \pm 4	89 \pm 2
Mutante	Motiv						
K63A	Walker-A	0	113 \pm 6	130 \pm 5	138 \pm 13	95 \pm 13	103 \pm 15
D241A	Walker-B	5 \pm 1	99 \pm 5	58 \pm 6	66 \pm 5	58 \pm 5	57 \pm 7
N293A	Sensor-1	9 \pm 1	122 \pm 5	77 \pm 6	103 \pm 10	66 \pm 12	78 \pm 13
R305A	R-Finger	38 \pm 2	2 \pm 1	3 \pm 1	32 \pm 11	81 \pm 9	81 \pm 7
R375A	Sensor-2'	2 \pm 1	112 \pm 5	56 \pm 4	96 \pm 5	74 \pm 7	86 \pm 8
R382A	Sensor-2	24 \pm 3	6 \pm 1	3 \pm 1	28 \pm 7	88 \pm 6	86 \pm 7

Tabelle 4.4: Relative ATPase- und Peptidase-Aktivität von Wildtyp-*TaLon* und AAA⁺-Mutanten. Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden 0,75 μ g *TaLon* (35 nM Hexamer) in 50 μ l Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) mit 2 mM ATP für 20 min bei 60°C inkubiert. Die entstandene Menge Phosphat wurde bestimmt (Abschnitt 3.9.1) und die spezifische ATPase-Aktivität berechnet. Zur Bestimmung der Peptidase-Aktivität wurden 4 μ g *TaLon* (46 nM Hexamer) und 12,8 μ g *TaPIP* (1,83 μ M) in 200 μ l Reaktions-Puffer mit 100 μ M Suc-LLVY-AMC in An- bzw. Abwesenheit von Nukleotid (2 mM) bei 60 °C inkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt und die Anfangssteigung der Kurven berechnet (Abschnitt 3.9.2). Die ATPase- und Peptidase-Aktivität von *TaLon*wt wurde auf 100% normiert.

Sowohl Sensor-1 als auch Sensor-2' verhalten sich in *TaLon* wie katalytische ATPase-Reste, die nicht an der Regulation der Peptidase-Aktivität beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu führte die Mutation von Arginin-Finger (R305A) und Sensor-2 (R382A) in *TaLon* zum völligen Verlust der Peptidase-Aktivität in Abwesenheit von Nukleotid oder in Gegenwart von ADP. Durch ATP und ATP γ S wurde die Peptidase-Aktivität wieder auf Wildtyp-Niveau stimuliert, während AMPPNP nur einen moderaten Anstieg der Aktivität vermittelte (Tabelle 4.4). Beide Mutanten behielten signifikante ATPase-Aktivität und damit einhergehend auch eine durch ATP-stimulierbare proteolytische Aktivität gegenüber Casein (Tabelle 4.5). AAA⁺-Strukturen belegen, dass der Arginin-Finger in Richtung des γ -Phosphats der benachbarten Nukleotidbindetasche zeigt und an der Nukleotidhydrolyse beteiligt sein könnte (Abschnitt 2.3). Die katalytische Funktion des Arginin-Fingers wurde bei mehreren AAA⁺-Proteinen durch zielgerichtete Mutagenese bestätigt (Ogura et al., 2004).

		ATPase (%)	Protease (%)				
			kein Nukleotid	ADP	AMP- PNP	ATP γ S	ATP
Wildtyp		100 \pm 2	9 \pm 1	2 \pm 1	15 \pm 2	19 \pm 1	100 \pm 3
Mutante	Motiv						
K63A	Walker-A	0	12 \pm 1	10 \pm 1	12 \pm 1	12 \pm 1	19 \pm 1
D241A	Walker-B	8 \pm 1	17 \pm 1	9 \pm 1	7 \pm 1	13 \pm 2	17 \pm 3
N293A	Sensor-1	8 \pm 1	10 \pm 1	2 \pm 1	11 \pm 0	20 \pm 2	25 \pm 2
R305A	R-Finger	43 \pm 1	0	0	0	6 \pm 2	65 \pm 6
R375A	Sensor-2'	2 \pm 1	12 \pm 1	1 \pm 1	8 \pm 2	6 \pm 1	9 \pm 2
R382A	Sensor-2	53 \pm 3	1 \pm 1	0	1 \pm 1	6 \pm 1	69 \pm 4

Tabelle 4.5: Relative ATPase- und Protease-Aktivität von Wildtyp-*TaLon* und AAA⁺-Mutanten. Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden 0,75 μ g *TaLon* (35 nM Hexamer) in Gegenwart von 6,25 μ g Fluorescein-Casein (5 μ M) in 50 μ l Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) mit 2 mM ATP für 20 min bei 60°C inkubiert. Die entstandene Menge Phosphat wurde bestimmt (Abschnitt 3.9.1) und die spezifische ATPase-Aktivität berechnet. Zur Bestimmung der Protease-Aktivität wurden 5 μ g *TaLon* (58 nM Hexamer) mit 25 μ g Fluorescein-Casein (5 μ M) in 200 μ l Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) mit oder ohne 2 mM Nukleotid bei 60°C inkubiert. Der Abbau von Fluorescein-Casein wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt und die Anfangssteigung der Kurven berechnet (Abschnitt 3.9.3). Die ATPase- und Protease-Aktivität von *TaLon* wurde auf 100% normiert.

Der Sensor-2-Arginin-Rest ragt aus der α -helikalen C-terminalen Subdomäne in die Nukleotidbindetasche der eigenen Untereinheit, ebenfalls in einer Orientierung, die die Koordination des γ -Phosphats erlaubt (Abschnitt 2.3). Es wird vermutet, dass Sensor-2 in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand die Orientierung der α -Subdomäne im AAA⁺-Ring reguliert (Ogura und Wilkinson, 2001). Im Fall von *TaLon* tragen Sensor-2 und der Arginin-Finger teilweise zur ATPase-Aktivität bei, haben aber mit 24% bzw. 38% der Wildtyp-Aktivität die höchste Restaktivität unter den AAA⁺-Mutanten (Tabelle 4.4). Im Gegensatz zu den anderen Mutanten, die eine mehr oder weniger unbeeinträchtigte Peptidase-Aktivität aufweisen, sind Sensor-2 und der Arginin-Finger essentiell für die Nukleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität und scheinen an der Kopplung der Nukleotidhydrolyse an die Peptidase-Aktivität beteiligt zu sein. Für den Sensor-2 in Hsp104 wurde ebenfalls eine Funktion bei der Kommunikationsvermittlung zwischen AAA⁺-Domänen beschrieben (Hattendorf und Lindquist, 2002), während

der Arginin-Finger bisher nur in Zusammenhang mit reduzierter ATP-Hydrolyse beobachtet wurde (Ogura et al., 2004).

In Tabelle 4.5 wurde gezeigt, dass die Protease-Aktivität in Gegenwart von ATP mit der ATPase-Aktivität korrelierte. In gleicher Weise wurde die Entfaltungs-Aktivität der AAA⁺-Mutanten gegenüber GFP-Calmodulin bestimmt (Abschnitt 3.9.4) und mit der ATPase-Aktivität verglichen. Abbildung 4.17 zeigt, dass die Entfaltungs-Aktivität von *TaLon* und den ATPase-defizienten Mutanten linear von ihrer ATPase-Aktivität abhing und *TaLon* keine minimale ATPase-Aktivität zur Entfaltung von GFP-Calmodulin benötigte. Für ClpXP wurde in einem umgekehrten Versuchsansatz der ATP-Umsatz beim Abbau eines Substrats und thermisch destabilisierter Mutanten bestimmt. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass der ATP-Umsatz linear zur thermischen Stabilität des Substrates korrelierte (Kenniston et al., 2003). Diese Daten entsprechen den Vorstellungen eines molekularen Entfaltungsmechanismus bei dem Substrate durch iterative Serien ATPase-regulierter Konformationsänderungen entfaltet werden (Kenniston et al., 2003).

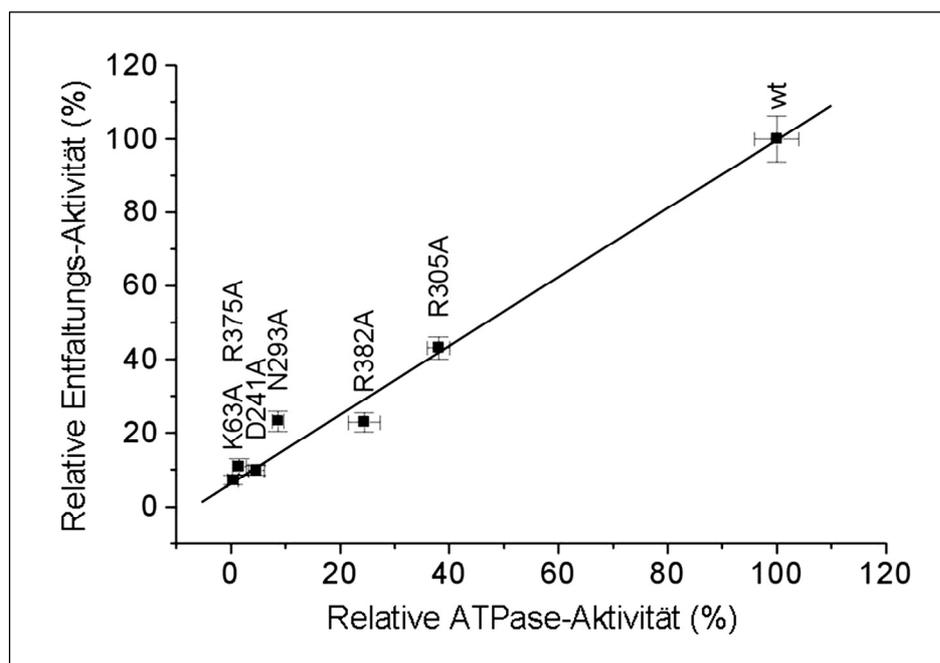


Abbildung 4.17:

Korrelation von ATPase- und Entfaltungs-Aktivität bei *TaLon*.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden 0,75 µg *TaLon* (35 nM Hexamer) in Gegenwart von 0,83 µg GFP-Calmodulin (370 nM) in 50 µl Reaktions-Puffer

(50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) mit 2 mM ATP für 20 min bei 60°C inkubiert. Die entstandene Menge Phosphat wurde bestimmt (Abschnitt 3.9.1) und die spezifische ATPase-Aktivität berechnet. Zur Bestimmung der Entfaltungs-Aktivität wurden 3 µg *TaLon* (35 nM Hexamer) mit 3,3 µg GFP-Calmodulin (370 nM) in 200 µl Reaktions-Puffer mit 2 mM ATP bei 60°C inkubiert. Nach 2 h wurde die entfaltete Menge GFP-Calmodulin anhand des Fluoreszenzabfalls bestimmt (Abschnitt 3.9.4). Die ATPase- und Entfaltungs-Aktivität von *TaLon*_{wt} wurde auf 100% normiert.

4.10 S/K-Diade

Die Lon-Protease gehört zur Familie der Serin-Proteasen, was schon in frühen Mutagenese-Studien an Lon aus *E. coli* bestätigt wurde (Amerik et al., 1991; Fischer und Glockshuber, 1993). Weiterführende Versuche *EcLon* als klassische Serin-Protease mit einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat zu etablieren scheiterten (Rotanova, 1999), bis eine Studie an einer viralen nicht-kanonischen Lon-Protease den Nachweis erbrachte, dass die Lon-Protease-Domäne eine katalytische Serin-Lysin-Diade enthält (Birghan et al., 2000). Serin-Lysin-Diaden wurden bereits für andere Proteine in *E. coli* beschrieben, darunter die Typ I Signal-Peptidase (Paetzel et al., 1998), die Tsp-Protease (Keiler und Sauer, 1995), die SOS-Antwort Proteine LexA (Luo et al., 2001) und UmuD' (Peat et al., 1996) und die β -Lactamase (Strynadka et al., 1992). Sequenzvergleiche ergaben, dass der entsprechende Lysin-Rest unter archaealen Lon-Proteasen streng konserviert ist (Abbildung 4.1).

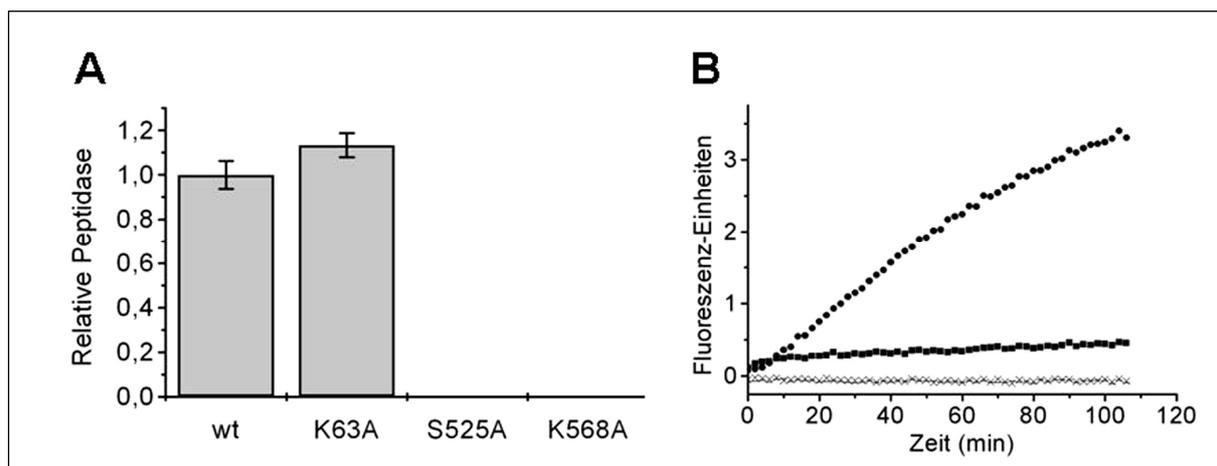


Abbildung 4.18: Konservierte S/K-Diade in *TaLon*. (A) Peptidase-Aktivität: 4 μ g *TaLon* (46 nM Hexamer) und 12,8 μ g *TaPIP* (1,83 μ M) wurden in 200 μ l Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH6,2), 20 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DDM, 100 μ M Suc-LLVY-AMC) bei 60°C inkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt und die Anfangssteigung der Kurven berechnet (Abschnitt 3.9.2). Die Steigung in Abwesenheit von Nukleotid wurde auf eins normiert. (B) Protease-Aktivität: 10 μ g *TaLon* (116 nM Hexamer) wurden mit 25 μ g Fluorescein-Casein (5 μ M) in 200 μ l Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DDM) mit oder ohne 2 mM Nukleotid bei 60°C inkubiert. Der Abbau von Fluorescein-Casein wurde kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt (Abschnitt 3.9.3). ● *TaLon*wt + 2 mM ATP; ■ *TaLon*wt ohne ATP; × *TaLon*S525A \pm 2 mM ATP; - *TaLon*K568A \pm 2 mM

Um zu zeigen, dass die Lon-Protease aus *T. acidophilum* ebenfalls eine S/K-Diade enthält, wurden Serin 525 und Lysin 568 zu Alanin mutiert (Abschnitt 3.7.9). *TaLonS525A* und *TaLonK568A* wurden gereinigt (Abschnitt 3.8.6) und auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht. Als Kontrolle diente die ATPase-defiziente Mutante *TaLonK63A* (siehe Abschnitt 4.9). Beide Enzyme verhielten sich bei der Proteinaufreinigung wie das Wildtyp-Enzym und konnten als hochmolekulare Komplexe gereinigt werden, was bedeutet, dass die Mutationen keinen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand zu haben schienen. Wie erwartet, zeigten beide Mutanten keinerlei Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat Suc-LLVY-AMC (Abbildung 4.18 A) und ließen sich auch nicht durch Zugabe von Nukleotiden stimulieren. Die gleiche Beobachtung galt für den Abbau von Fluorescein-Casein (Abbildung 4.18 B). *TaLonS525A* und *TaLonK568A* zeigten keinerlei proteolytische Aktivität weder in An- noch in Abwesenheit von ATP.

Um zu zeigen, dass die S/K-Diade in allen drei phylogenetischen Ästen der Lon-Protease konserviert ist (Abbildung 2.2), wurden parallel zu *TaLon* auch die S/K-Mutanten von *EcLon* untersucht. *EcLon*_{wt} und die entsprechende Serin-Mutante wurden bereits bei Fischer und Glockshuber (1993) beschrieben, und das Expressionsplasmid wurde verwendet, um die bisher nicht charakterisierte Lysin-Mutante zu generieren (Abschnitt 3.7.9). Alle drei Enzyme, *EcLon*_{wt}, *EcLonS679A* und *EcLonK722A*, wurden exprimiert, gereinigt und ihre katalytische Aktivität bestimmt (Abschnitt 3.8.7). *EcLonS679A* und *EcLonK722A* wiesen keinerlei Peptidase- oder Protease-Aktivität auf, was im Laufe dieser Studie von einer unabhängigen Arbeit an *EcLon* bestätigt wurde (Rotanova et al., 2003).

Um abzusichern, dass es sich bei den beobachteten Effekten nicht um Artefakte aufgrund allgemeiner struktureller Veränderungen in den Proteolyse-Mutanten handelte, wurde die ATPase-Aktivität von *EcLon*, *TaLon* und ihren Proteolyse-defizienten Mutanten bestimmt. In Tabelle 4.6 sind die unter „steady-state“-Bedingungen bestimmten kinetischen Konstanten für die ATP-Hydrolyse zusammengefasst (vergleiche Abschnitt 4.4). Im Fall von *TaLon* war v_{\max} der Serin-Mutante *TaLonS525A* gegenüber dem Wildtyp um 11% reduziert und v_{\max} von *TaLonK568A* um 24%. *TaLon*_{wt} und *TaLonS525A* wiesen ähnliche K_M -Werte auf, aber der Hill-Koeffizient von *TaLonS525A* war niedriger als beim Wildtyp. Der Hill-Koeffizient von *K568A* dagegen blieb unverändert, aber der K_M war um 43% reduziert (Tabelle 4.6). Der Verlust an Gesamtaktivität schien damit bei der Serin-Mutante auf verringerter Kooperativität zu beruhen, während die Lysin-Mutante eine höhere Affinität, aber eine niedrigere Hydrolyserate für ATP aufwies. Analog zu *TaLon* zeigte auch die Serin-Mutante von *EcLon* eine um 51% verringerte ATPase-Aktivität, die mit einem reduzierten Hill-Koeffizienten einherging. Die Lysin-Mutante hingegen schien von der Mutation nicht in ihrer ATPase-Aktivität beeinträchtigt, sondern eher stimuliert (Tabelle 4.6).

Aus den ermittelten katalytischen Konstanten für *EcLon* ergab sich unter Annahme eines hexameren Oligomerisierungszustandes (Abschnitt 2.5) eine Wechselzahl von $4,8 \text{ s}^{-1}$ und eine katalytische Wirksamkeit von $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die in ihrer Größenordnung exakt mit den für *TaLon* und *EcFtsH* ermittelten Werten übereinstimmten (Tabelle 4.1).

ATPase	K_M (mM)	v_{\max} (nmol Pi/min µg)	Hill-Koeffizient
<i>TaLonwt</i>	0,196±0,004	0,631±0,003	1,68±0,05
<i>TaLonS525A</i>	0,176±0,014	0,561±0,012	1,22±0,12
<i>TaLonK568A</i>	0,111±0,003	0,477±0,003	1,59±0,08
<i>EcLonwt</i>	0,201±0,004	0,554±0,012	1,45±0,15
<i>EcLonS679A</i>	0,140±0,014	0,273±0,009	1,26±0,22
<i>EcLonK722A</i>	0,189±0,011	0,782±0,015	1,81±0,20

Tabelle 4.6: Vergleich der ATPase-Aktivität proteolytisch inaktiver Mutanten von *TaLon* und *EcLon*. 2 µg *TaLon* (93 nM Hexamer) wurden in 50 µl Reaktions-Puffer (50 mM MES (pH 6,2), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM DDM) in Gegenwart von 0-5 mM ATP für 10 min bei 60°C inkubiert. Für *EcLon* wurden 2 µg (77 nM Hexamer) in 50 µl Standard-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH8,0), 0,5 mM β-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 20 mM MgCl₂) in Gegenwart von 0-5 mM ATP für 10 min bei 37°C inkubiert. Die entstandene Phosphatmenge wurde bestimmt und die spezifische Aktivität aus vier unabhängigen Messungen als Mittelwerte gegen die entsprechende ATP-Konzentration aufgetragen (Abschnitt 3.9.1). In Microcal Origin 5.0 wurden aus der Hill-Kurve die kinetischen Konstanten berechnet.

Insgesamt wiesen die Protease-defizienten Mutanten von *TaLon* und *EcLon* signifikante ATPase-Aktivität auf und etablierten die S/K-Diade für archaeale und bakterielle Lon-Proteasen. Interessanterweise bestätigen zwei unabhängige Studien an *EcFtsH* ebenfalls eine Reduktion der ATPase-Aktivität nach Mutagenese von essentiellen proteolytischen Resten (Karata et al., 1999; Jayasekera et al., 2000). Leider enthalten weder die Arbeiten an *EcFtsH* noch die bereits erwähnten Arbeiten zu *EcLonS679A* (Fischer und Glockshuber, 1993) und *EcLonK722Q* (Rotanova et al., 2003) entsprechend detaillierte kinetische Daten, die mit den hier ermittelten Werten verglichen werden könnten.

5. Diskussion

Die Familie der AAA⁺-Proteasen lässt sich in drei Gruppen unterteilen, die lösliche Serin-Protease Lon aus Bakterien und eukaryontischen Zellorganellen, die membranständige Metalloprotease FtsH aus Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten und die archaeale Lon-Protease. Letztere bildet mit ihrer Lon-ähnlichen Protease-Domäne und dem in die AAA⁺-Domäne insertierten Transmembranbereich eine Art Hybrid aus löslichem Lon und FtsH. In den letzten beiden Jahrzehnten waren die lösliche Lon-Protease und FtsH Ziel zahlreicher biochemischer Studien, die die physiologische Funktion von Lon und FtsH in Pro- und Eukaryonten beschreiben (Abschnitt 2.5-6). Demgegenüber steht ein Mangel an strukturellen Informationen, denn bis heute sind nur Strukturen von Fragmenten dieser beiden Proteasen gelöst, darunter die Lon-Protease-Domäne (Botos et al., 2004), die Lon-(AAA⁺)- α -Domäne (Botos et al., 2004) und die AAA-Domäne von FtsH ohne Transmembranbereich (Niwa et al., 2002; Krzywda et al., 2002). An der Schnittstelle zwischen physiologischer Funktion und atomarer Struktur liegt der molekulare Mechanismus von AAA⁺-Proteasen, d. h. wie funktionieren AAA⁺-Proteasen als Nanomaschinen, die andere Proteine als Substrate erkennen, entfalten und abbauen. Das Verständnis von AAA⁺-Proteasen auf molekularer Ebene ist nicht zuletzt deswegen von Bedeutung, als dass mitochondriale AAA⁺-Proteasen in Zusammenhang mit Alterungsprozessen und neuronalen Erkrankungen stehen (Abschnitt 2.5-6).

Die Gruppe der archaealen Lon-Proteasen ist bislang nicht auf Protein-Ebene untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war es, die archaeale Lon-Protease als funktionale AAA⁺-Protease zu etablieren und langfristig mechanistische als auch strukturelle Studien zu ermöglichen. Als Modellenzym wurde die Lon-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* ausgewählt. Proteine aus thermophilen Organismen gelten als stabiler und werden insbesondere im Bereich der Röntgenkristallographie bevorzugt. Zudem wurden bereits einige hochmolekulare Proteine aus *Thermoplasma acidophilum* biochemisch und strukturell untersucht, darunter das 20S Proteasom (Dahlmann et al., 1992; Zwickl et al., 1992; Löwe et al., 1995), das archaeale p97-Homolog VAT (Pamnani et al., 1997; Rockel et al., 1999; Rockel et al., 2002), das Thermosom (Waldmann et al., 1995; Ditzel et al., 1998; Nitsch et al., 1998; Gutsche et al., 2000) und die Tricorn-Protease (Tamura et al., 1996; Walz et al., 1997; Brandstetter et al., 2001).

5.1 Rekombinante Expression eines archaealen Membranproteins in *E. coli*

Wie bereits Lon aus *Thermococcus kodakarensis*, wurde Lon in *Thermoplasma*-Membranen mit dem aus Sequenzdaten berechneten Molekulargewicht identifiziert (Abbildung 4.3 B).

Versuche zur direkten Isolation von Lon aus *Thermoplasma*-Zellen waren nicht erfolgreich, so dass stattdessen das *talon*-Gen kloniert und die rekombinante Expression und Isolation von $TaLon_{His6}$ in *E. coli* etabliert wurde (Abbildung 4.4).

Als entscheidend für die erfolgreiche Überexpression von *TaLon* in *E. coli* stellte sich die Verwendung eines von Miroux und Walker (1996) für die Expression von Membranproteinen optimierten *E.-coli*-Stammes heraus. Dieser Stamm - auch C43 genannt - wurde aus BL21(DE3)-Zellen gewonnen, die mit einem Expressionsplasmid für die b-Untereinheit der *E. coli* F-ATPase transformiert worden waren. Durch ständige Selektion der Zellen auf Festmedium, dem IPTG zur Induktion der b-Untereinheit zugefügt worden war, wurden diejenigen Zellen, die das Protein exprimieren konnten, von denjenigen, für die dieses toxisch war, isoliert. Die genauen Mutationen in C43 sind nicht bekannt, aber für die b-Untereinheit wurde eine verzögerte Transkription des Gens nach Induktion beobachtet und ebenso wie *TaLon* konnte die b-Untereinheit in die Membran von *E. coli* inkorporieren (Miroux und Walker, 1996). Im Laufe der Expressionsstudien wurde auch für *TaLon* versucht, nach dieser Methode einen individuellen Expressionsstamm zu generieren. Tatsächlich konnte nach mehreren Selektionsschritten Expression von *TaLon* in BL21(DE3) nachgewiesen werden, die entsprechende Mutante wurde aber aufgrund höherer Expressionsraten in C43 nicht weiter analysiert.

TaLon und die b-Untereinheit der F_0 -ATPase haben die gleiche Membrantopologie, sie sind über zwei bzw. eine α -Helix in der Membran verankert und verfügen über einen großen cytosolischen Bereich. Über die Faltungsmechanismen von Membranproteinen ist wenig bekannt (Dalbey et al., 2000), aber Miroux und Walker (1996) vermuteten, dass die verzögerte Transkription der Gene in C43 Membranproteinen mehr Zeit für Faltung und Insertion in die Membran geben könnte und dadurch die toxische Akkumulation ungefalteter Proteine im Cytosol verhindert. Interessanterweise wurde bei der rekombinanten Expression eines periplasmatisch lokalisierten Membranproteins aus *Thermoplasma*, das in dieser Arbeit nicht näher beschrieben wird, ausschließlich Expression in BL21(DE3) beobachtet, während in C43 keinerlei Protein nachgewiesen werden konnte.

Möglicherweise sind gerade die Topologie und damit die besonderen Voraussetzungen an Proteinfaltung, Membraninsertion oder -translokation entscheidende Prozesse, die bei der Überexpression von Membranproteinen in *E. coli* zwischen hoher Ausbeute oder Toxizität entscheiden. Für *TaLon* konnte in C43 eine für Membranproteine überdurchschnittliche Ausbeute von 4,5 mg/L Expressionskultur erzielt werden (Abschnitt 4.3). Nach Miroux und Walker (1996) und den im Rahmen dieser Doktorarbeit gemachten Beobachtungen, scheint die Wahl des Expressionsstammes bei der Überexpression von Membranproteinen in *E. coli* besonders kritisch zu sein. Für schwierige Fälle bietet die Methode von Miroux und Walker (1996) eine Möglichkeit, ohne hohen Kostenaufwand einen auf die individuellen Bedürfnisse optimierten Expressionsstamm zu generieren.

5.2 Enzymatische Charakterisierung von *TaLon*wt

Nach erfolgreicher Überexpression und Membraninsertion in C43 konnte *TaLon*_{His6} in DDM solubilisiert und über Affinitätschromatographie gefolgt von Größenausschlusschromatographie gereinigt werden (Abschnitt 4.3). *TaLon*wt wurde als hochmolekularer Komplex mit wahrscheinlich hexamerer Stöchiometrie isoliert und war in Anwesenheit von 0,5 mM DDM ohne Nukleotid stabil (Abbildung 4.5). Bei pH 5,75 und 60°C, entsprechend den physiologischen Bedingungen im Cytosol von *Thermoplasma* (Seegerer et al., 1988), zeigte *TaLon* eine spezifische ATPase-Aktivität von 0,631 nmol Pi/min µg. Der Vergleich der ATPase-Aktivität von *TaLon* mit Lon und FtsH aus *E. coli* ergab, dass alle drei AAA⁺-Proteasen über eine ähnliche katalytische Wirksamkeit der ATP-Hydrolyse verfügen und belegt, dass *TaLon* als funktionales Enzym isoliert werden konnte (Tabelle 4.1). Ein Charakteristikum der archaealen Lon-Protease aus *Thermoplasma* ist eine Nukleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität, die sie von Lon und FtsH aus *E. coli* unterscheidet (Tabelle 4.2).

Die Protease-Aktivität von *TaLon* wurde anhand von drei verschiedenen Substraten getestet, die in ihrer Größe von Peptid (Suc-LLVY-AMC, 0,6 kDa) über verlängertes Peptid (Insulin-B, 3,5 kDa) bis zum Polypeptid (Casein, 25 kDa) variierten. Beim Vergleich der Abbaueffizienz in Abwesenheit von Nukleotid mit der entsprechenden Substratlänge ergab sich eine 100%ige Effektivität von *TaLon* gegenüber Suc-LLVY-AMC (Abbildung 4.8 B), die sich mit zunehmender Substratlänge bei Insulin-B auf 50% reduzierte (Abbildung 4.10 A) und bei Casein nur noch 10% betrug (Abbildung 4.11 B). Unter der Annahme, dass im Nukleotid-freien Zustand der Zugang zur proteolytischen Tasche durch Diffusion reguliert wird, scheinen kleine Substrate die aktive Tasche frei betreten zu können, während größere selektiert werden. Die nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga ATPγS und AMPPNP stimulierten sowohl den Abbau von Insulin-B (Abbildung 4.10 A), als auch den Abbau von Casein (Abbildung 4.11 B) zweifach. Im Sinne des obigen Interpretationsansatzes scheint die Bindung von γ-Phosphat-haltigen Nukleotiden eine Konformationsänderung in *TaLon* zu induzieren, die den Zugang zur proteolytischen Tasche öffnet.

Diese Art der Regulation erinnert an das eukaryontische Proteasom, dessen Eingang zur proteolytischen Kammer durch N-terminale Reste in der α-Untereinheit sterisch blockiert wird (Groll et al., 2000). Der Zugang zum Proteasom wird durch die 19S AAA-ATPase Rpt2 reguliert (Köhler et al., 2001), im Fall von *TaLon* scheint das γ-Phosphat den stimulierenden Faktor bei der Öffnung der Protease zu bilden.

5.3 Prozessivität

Ein Merkmal ATP-abhängiger Proteasen ist, dass sie ihre Substrate prozessiv abbauen, d. h. ohne Intermediate freizusetzen. Versuche zum Abbau von β -Casein bestätigten, dass *TaLon* in Gegenwart von ATP eine prozessive Protease ist (Abbildung 4.12 A). In ähnlicher Weise haben Nishii et al. (2002) den Abbau von Sula durch die Lon-Protease in *E. coli* untersucht. Sula ist ein 18-kDa-Protein, bestehend aus 167 Aminosäuren, das unter Stressbedingungen exprimiert wird und die Zellteilung inhibiert (Bi und Lutkenhaus, 1993). In Gegenwart von ATP wurde Sula schnell und prozessiv durch *EcLon* abgebaut. In Abwesenheit von ATP wurden etwa 10% der eingesetzten Menge Sula hydrolysiert, allerdings nicht prozessiv und mit veränderter Substratspezifität. Während in Gegenwart von ATP die katalytisch wichtige mittlere Region von Sula durch *EcLon* hydrolysiert wurde, wurden ohne ATP nur einige Peptidbindungen am ungefalteten N- oder C-Terminus gespalten (Nishii et al., 2002). Der prozessive Abbau von Sula durch *EcLon* war an die Hydrolyse von ATP gekoppelt.

Im Gegensatz dazu können das 20S Proteasom oder ClpP ungefaltete Proteine auch ohne ATPase in prozessiver Weise abbauen (Thompson et al., 1994; Akopian et al., 1997). Beim Proteasom und den Proteasom-ähnlichen ATP-abhängigen Proteasen geht man davon aus, dass die Prozessivität auf der tonnenförmigen Struktur der Proteasekammer beruht (Abschnitt 2.1). In der Kristallstruktur der isolierten Lon-Protease-Domäne aus *E. coli* konnte dagegen keine Proteasekammer identifiziert werden. Die isolierte Lon-Domäne wurde als Hexamer kristallisiert, aber die katalytischen Reste lagen nicht an der Innenseite einer gemeinsamen proteolytischen Kammer sondern voneinander getrennt am Ende eines schmalen Kanals in jeder Untereinheit (Botos et al., 2004 und Abbildung 2.6). In Übereinstimmung damit zeigte die isolierte Lon-Protease-Domäne Peptidase-Aktivität, aber keine Protease-Aktivität (Rasulova et al., 1998).

Zusammengenommen scheinen diese Daten auf einen grundsätzlichen Unterschied zwischen AAA^+ -Proteasen und Proteasom-ähnlichen ATP-abhängigen Proteasen hinzuweisen. Während bei letzteren Prozessivität eine den tonnenförmigen Proteasekompartimenten inhärente Eigenschaft ist, benötigen AAA^+ -Proteasen die ATP-abhängige Translokation der Substrate in die proteolytisch aktiven Taschen. Das Fehlen einer Protease-Kammer in der Struktur der isolierten Lon-Domäne deutet an, dass die Translokations-Abhängigkeit der Prozessivität auf der Notwendigkeit eines kontinuierlichen und direkten Transports der Polypeptidkette zu den isolierten Peptidbindetaschen beruhen könnte. Da besagte Struktur die ATPase-Domäne nicht enthält, ist alternativ denkbar, dass Protease- und ATPase-Domäne gemeinsam eine Kammer bilden, die nicht durch Diffusion zugänglich ist, aber nach aktiver Translokation der Substrate in diese Kammer prozessive Proteolyse nach dem Mechanismus Proteasom-ähnlicher ATP-abhängiger Proteasen erlaubt. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wären Strukturen von voll-

ständigen AAA⁺-Proteasen notwendig, die Auskunft über die Struktur der für den Mechanismus von AAA⁺-Proteasen entscheidenden Grenzfläche von Protease- und ATPase-Domäne geben. Aufgrund solcher Daten ließen sich dann gezielte Mutagenese Experimente zur Untersuchung der Kopplung von Translokation und Proteolyse gestalten.

5.4 AAA⁺-Mutanten

In den letzten Jahren ist das AAA⁺-Modul als Mediator von mechanischer Entfaltung und Disassemblierung von Proteinkomplexen in den Mittelpunkt vieler zellulärer Prozesse gerückt (Neuwald et al., 1999; Ogura und Wilkinson, 2001). Die AAA⁺-Domäne enthält mehrere streng konservierte Motive, die an der Nukleotid-Bindung und Hydrolyse beteiligt sind (Abschnitt 2.3). Bisher wurden die Strukturen von 15 AAA⁺-Domänen unterschiedlichen Typs gelöst, so dass die allgemeine Position konservierter Reste geklärt ist, aber relative Verschiebungen in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand bleiben weitestgehend unbekannt (Iyer et al., 2004). Bezüglich des Mechanismus der ATP-Hydrolyse in AAA⁺-Proteinen gibt es nur wenige Anhaltspunkte, aber biochemische Analysen deuten an, dass konservierte Aminosäuren je nach Protein unterschiedliche Funktionen zu haben scheinen (Ogura et al., 2004).

Um die Rolle der konservierten AAA⁺-Motive in *TaLon* zu untersuchen, wurden das Walker-A-Lysin, das Walker-B-Aspartat, das Sensor-1-Asparagin, der Arginin-Finger, das Sensor-2-Arginin und ein weiterer Arginin-Rest, hier Sensor-2' genannt, gegen Alanin ausgetauscht und enzymatisch charakterisiert (Abschnitt 4.9). Die beiden zentralen Nukleotidbindemotive Walker-A und -B spielten wie zu erwarten eine wichtige Rolle bei ATP-Bindung und Hydrolyse, die Nukleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität (Tabelle 4.4) blieb aber unbeeinträchtigt. Auch die Mutation von Sensor-1 und Sensor-2' führte ausschließlich zum Verlust der ATPase-Aktivität (Tabelle 4.4). Die Rolle des Sensor-1 als katalytischer Rest scheint sich wie schon in Abschnitt 4.9 diskutiert allgemein bei AAA⁺-Proteinen durchzusetzen.

Während Sensor-1 und die Walker-Motive zu den klassischen AAA⁺-Signaturen zählen, ist Sensor-2' nur unter archaealen Lon-Proteasen konserviert und wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Die katalytische Rolle von Sensor-2' in *TaLon* spiegelt vielleicht eine spezifische Funktion wider, die archaeale Lon-Proteasen von andere AAA⁺-Proteinen unterscheidet.

Da in den Sensor-1, -2' und Walker-Mutanten die Peptidase-Aktivität trotz stark beeinträchtigter ATPase nur geringfügig beeinflusst wurde, war es umso überraschender, dass die Mutation von Sensor-2 und dem Arginin-Finger die Nukleotid-unabhängige Peptidase-Aktivität vollständig inhibierte. In Abwesenheit von Nukleotid zeigten beide Mutanten keinerlei Peptidase- oder Protease-Aktivität, während die ATPase signifikante „Rest“-Aktivität aufwies (Tabelle 4.4 und 4.5). Durch Zugabe von ATP oder nicht-hydrolysierbaren Analoga konnte die

Peptidase-Aktivität in *TaLon* wieder stimuliert werden. Damit bilden Sensor-2 und der Arginin-Finger Schlüsselpositionen bei der Kopplung von Protease- und ATPase-Aktivität in *TaLon*.

Der Mechanismus, über den diese Regulation vollzogen wird, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Interessanterweise konnte die Anwesenheit von γ -Phosphat die Peptidase-Aktivität der beiden Mutanten reaktivieren, was mit der in Abschnitt 5.2 diskutierten sterischen Öffnung der proteolytischen Tasche durch γ -Phosphat vereinbar wäre. Sensor-2 und dem Arginin-Finger käme in diesem Modell die Rolle von „Türöffnern“ zu, die den Zugang zur Protease-Domäne koordinieren. In Abwesenheit von Nukleotid stabilisieren Sensor-2 und der Arginin-Finger die Protease in einer Konformation, die den Zugang von kleinen Substraten ungehindert erlaubt und größere Substrate selektiert. In Abwesenheit einer der beiden Reste liegt die Protease in einer geschlossenen Form vor und kann nur durch Zugabe eines γ -Phosphathaltigen Nukleotids geöffnet werden. Strukturdaten belegen, dass sich beide Reste in einer Position befinden, die die Koordination des γ -Phosphats erlaubt (Abschnitt 2.3).

Eine andere Möglichkeit ist auch, dass Sensor-2 und der Arginin-Finger die katalytisch aktiven Reste der Protease-Domäne allosterisch regulieren. Ein Beispiel für allosterische Regulation unter ATP-abhängigen Proteasen ist HslUV. Im Gegensatz zu ClpP oder dem 20S Proteasom ist HslV alleine inaktiv, erst die Assoziation von HslU mit HslV führt zu einer Konformationsänderung in HslV, die die proteolytische Tasche aktiviert (Sousa et al., 2002). Beide Mechanismen müssen sich nicht ausschließen, sondern könnten nebeneinander ablaufen. Eine Unterscheidung der Modelle ist anhand der vorhandenen Daten nicht möglich.

Ortspezifische Mutagenese an konservierten AAA⁺-Resten aus unterschiedlichen Mitgliedern dieser Proteinfamilie haben gezeigt, dass die katalytische Rolle konservierter AAA⁺-Reste nicht allgemein vorhergesagt werden kann, sondern Protein-spezifisch zu sein scheint (Ogura et al., 2004). Diese hohe katalytische Flexibilität korreliert mit den vielfältigen Funktionen von AAA⁺-Proteinen in der Zelle. Nur eine sorgfältige Analyse von mehreren AAA⁺-Proteinen aus einer Familie kann die jeweiligen mechanistischen Details dieser molekularen Maschinen aufdecken.

5.5 Entfaltungs-Aktivität

Im Gegensatz zu *EcFtsH* (Herman et al., 2003) ist *TaLon* in der Lage GFP, wenn es als Fusionsprotein in GFP-Calmodulin vorliegt, zu entfalten und abzubauen (Abbildung 4.14). *EcFtsH* zeigt nur gegenüber weniger stabilen Substraten Entfaltungs-Aktivität (Herman et al., 2003; Okuno et al., 2004). Bei der Analyse der Entfaltungs-Aktivität von *TaLon*_{wt} und den AAA⁺-Mutanten zeigte sich, dass die Entfaltungs-Aktivität von *TaLon* linear von der ATP-

ase-Aktivität abhing (Abschnitt 4.17). Herman et al. (2003) wiederum konnten zeigen, dass die Abbaugeschwindigkeit von *EcFtsH* bezüglich eines spezifischen Substrats mit dessen thermischer Stabilität korrelierte. Diese Beobachtungen unterstützen ein Modell, bei dem Substrate in einer iterativen Folge ATPase-gesteuerter Arbeitshübe entfaltet werden. Ein solches Modell wurde auch für die Entfaltungs-Aktivität von ClpX entworfen und anhand mehrerer Substrate getestet (Kenniston et al., 2003).

Im Gegensatz zu ClpXP, wo für gefaltete Substrate die Entfaltung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt identifiziert wurde (Kenniston et al., 2003), wurde für *TaLon* kein Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit von nativem oder Säure-denaturiertem GFP-Calmodulin gemessen (Abbildung 4.15). Die Peptidhydrolyse ist ein exothermer Prozess und wird im Allgemeinen als zu schnell angesehen, um den Gesamtprozess ATP-abhängiger Proteolyse zu limitieren. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass für *TaLon* die Translokation eines Substrats den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bildet. In Abschnitt 5.3 wurde bereits besprochen, dass die Translokation in AAA⁺-Proteasen Prozessivität vermitteln könnte. In einem solchen Modell läge der Prozess der Translokation als Schnittstelle zwischen Proteolyse und Entfaltung. Schnellere Entfaltung als Translokation wäre Energieverschwendung und schnellere Translokation als Proteolyse würde zu unvollständig verdauten Peptiden oder zur Verstopfung der Protease führen. Es scheint also im Rahmen mechanistischer Überlegungen durchaus denkbar, dass die Translokation bei AAA⁺-Proteasen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ATP-abhängiger Proteolyse bildet.

Kenniston et al. (2003) haben aus ihren Untersuchungen an ClpXP geschlossen, dass man für den Mechanismus ATP-abhängiger Proteasen verschiedene Substrate testen muss. Der Vergleich von *EcFtsH* und *TaLon* zeigt, dass es sinnvoll sein kann, verschiedene Substrate an homologen AAA⁺-Proteasen zu testen.

5.6 S/K-Diade

Neben den AAA⁺-Mutanten wurden auch Protease-defiziente Mutanten von *TaLon* generiert und charakterisiert (Abschnitt 4.10). Angeregt durch eine Studie an einer viralen nicht-kanonischen Lon-Protease, die die S/K-Diade als proteolytischen Mechanismus der Lon-Protease-Domäne beschreibt (Birghan et al., 2000), wurden die entsprechend S/K-Reste in *TaLon* zu Alanin mutiert. Wie erwartet zeigten beide Mutanten keinerlei Peptidase- oder Protease-Aktivität (Abbildung 4.18), während die ATPase-Aktivität und der Oligomerisierungszustand erhalten blieben. Für *EcLon* hatten Fischer und Glockshuber (1993) beobachtet, dass die Mutation des proteolytischen Serin-Restes die ATPase-Aktivität von *EcLon* nicht beeinträchtigte, während die Mutation des Walker-A-Lysins die Peptidase-Aktivität vollständig inhibierte (Fischer und Glockshuber, 1994). Aus dieser Beobachtung schlossen Fischer und

Glockshuber (1994), dass die Protease-Domäne unidirektional von der ATPase-Domäne reguliert wurde, und die Protease- die ATPase-Domäne nicht beeinflusste. Bei der genaueren Analyse der ATPase-Aktivitäten der *TaLon*-S/K-Mutanten zeigte sich jedoch, dass die ATPase-Aktivität in beiden Mutanten reduziert war (Tabelle 4.6). Während die von Fischer und Glockshuber (1993) erhobenen Daten sich nur auf die relative ATPase-Aktivität bezogen, die geringe Aktivitäts-Unterschied nicht widerspiegeln, schienen die kinetischen Daten von *TaLon* eine Regulation der ATPase- durch die Protease-Domäne anzudeuten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die *EcLon*-K-Mutante generiert und zusammen mit der Serin-Mutante enzymatisch charakterisiert (Abschnitt 4.10). Auch hier zeigte die Lysin-Mutante weder Protease- noch Peptidase-Aktivität, was im Laufe dieser Arbeit von einer unabhängigen Studie bestätigt wurde (Rotanova et al., 2003).

Auch für *EcLon* wurden die kinetischen ATPase-Konstanten ermittelt (Tabelle 4.6). Beide Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte spezifische ATPase-Aktivität. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen an *TaLon* war die Aktivität der Serin-Mutante geringer als beim Wildtyp. Die Lysin-Mutante war dagegen, im Gegensatz zu der *TaLon*-K-Mutante, in ihrer Aktivität stimuliert, wobei Rotanova et al. (2003) eine auf 80% reduzierte relative ATPase-Aktivität beschreiben. Aus den erhaltenen Daten lässt sich damit kein stimmiges Modell für beide Lon-Proteasen entwerfen, und es stellt sich die Frage, ob die beobachteten Abweichungen weniger mechanistische Effekte als durch die Mutation eingeführte strukturelle Artefakte spiegeln. Interessanterweise wurde in zwei unabhängigen Studien ein inhibitorischer Effekt von Protease-Mutanten auf die ATPase-Aktivität von *EcFtsH* beschrieben. Karata et al. (1999) berichteten, dass die Mutation des Zink-koordinierenden Restes H421 in *EcFtsH* die Protease-Aktivität vollständig eliminierte und die ATPase-Aktivität auf 23% reduzierte. Da diese Mutation den Verlust des Zink-Ions in der Protease-Domäne zur Folge haben kann, wurde diese Mutante nicht weiter analysiert. Aus diesem Grund generierten Jayasekera et al. (2000) eine Mutante, der stattdessen das katalytische Aspartat fehlte, welches das Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung aktiviert. Obwohl in diesem Fall kaum strukturelle Beeinträchtigungen der Protease-Domäne zu erwarten waren, wurde die ATPase-Aktivität der Mutante auf 80% reduziert. Darüber hinaus finden sich in einer Studie zur Kinetik der Peptidhydrolyse von *EcFtsH* Hinweise auf eine Veränderung der ATPase-Konstanten abhängig von der zugegebenen Peptidkonzentration (Bruckner et al., 2003).

Diese Studie präsentiert die bisher exakteste Analyse Protease-defizienter AAA^+ -Proteasen, in der sich eine bidirektionale Kopplung von Protease- und ATPase-Aktivität andeutet. Physiologisch betrachtet erscheint eine solche Kopplung sinnvoll. In AAA^+ -Proteasen sind die ATPase- und Protease-Domäne über eine Polypeptidkette miteinander gekoppelt. In Abschnitt 5.3, und 5.5 wurde bereits diskutiert, dass in AAA^+ -Proteasen anders als bei Proteasom-ähnlichen

ATP-abhängigen Proteasen die ATP-abhängige Translokation von Substraten Voraussetzung für prozessive Proteolyse zu sein scheint. Um eine eventuelle Verstopfung der Protease zu verhindern bzw. in einem solchen Fall den Energieverbrauch zu minimieren, erscheint es sinnvoll, die ATPase-Aktivität an die proteolytische Aktivität zu koppeln. Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte sind relativ gering, aber zusammen mit den beschriebenen Hinweisen in der Literatur liefern sie eine Ausgangsbasis, sich mit dem Aspekt einer möglichen bidirektionalen Regulation von AAA⁺-Proteasen näher zu beschäftigen.

5.7 Ausblick

Die Lon-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* konnte als funktionale AAA⁺-Protease mit allen erwarteten katalytischen Eigenschaften etabliert werden. Darüber hinaus wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese Einblicke in den intramolekularen Mechanismus gewonnen. Bei der Diskussion dieser Daten und dem Vergleich von *TaLon* mit homologen AAA⁺-Proteasen wurde deutlich, dass ein tieferes mechanistisches Verständnis dieser molekularen Maschinen mehr strukturelle Informationen erfordert.

TaLon bietet gute Voraussetzungen für weiterführende strukturbiochemische Studien. Versuche zur Analyse der Protease mittels Elektronenmikroskopie wurden bereits unternommen und in Abschnitt 4.3 vorgestellt. Die dabei beobachteten Schwierigkeiten *TaLon* zu stabilisieren, lassen sich womöglich auf die Natur des verwendeten Detergenz zurückführen. Das zur Solubilisierung von *TaLon* verwendete Detergenz DDM wurde unter biochemischen Aspekten ausgewählt (Abschnitt 4.3) und in ersten Versuchen zur 3D-Kristallisation von *TaLon* wurden nach Detergenzaustausch stabilere Kristalle erhalten (persönliche Kommunikation, Petra Wollmann). Alternativ dazu bieten sich Methoden an, bei denen ganz auf die Gegenwart von Detergenz verzichtet werden kann wie 2D-Kristallisation und die Rekonstitution in Liposomen. Für *EcFtsH* wurde bereits ein Protokoll zur Herstellung von Proteoliposomen mit spezifischer Orientierung etabliert (Akiyama und Ito, 2003).

TaLon-haltige Liposomen ließen sich auf vielfältige Art und Weise untersuchen. Nach Spreiten der Lipide auf Mica könnte die Topologie von *TaLon* mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht und vielleicht sogar mit mechanistischen Studien zur Substratentfaltung verknüpft werden. Ein weiterer interessanter Ansatz ergibt sich aus der Beobachtung, dass bei der Solubilisierung von *E.-coli*-Membranen FtsH ausschließlich als 1-MDa-Komplex in Assoziation mit Membranproteinen der Prohibitinfamilie identifiziert wurde (Saikawa et al., 2004). Prohibitine sind integrale Membranproteine bestehend aus einer Transmembranhelix und einer periplasmatischen Domäne, die den Abbau von Membranproteinen durch membranständige AAA⁺-Proteasen regulieren (Kihara et al., 1998; Steglich et al., 1999). Das homologe Protein aus *Thermoplasma acidophilum* wurde bereits identifiziert (*Ta1301*), kloniert und nach Über-

expression in der Membran von *E. coli* lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Nach Isolation von *Ta1301* und Rekonstitution in *TaLon*-Proteoliposomen böte ein solches System neue Möglichkeiten, die archaeale Lon-Protease und ihre Mutanten in einer „nativeren“ Umgebung zu studieren und möglicherweise sogar mittels Cryo-Elektronentomographie zu visualisieren.

6. Literatur

Adam, Z., I. Adamska, et al. (2001). "Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature." *Plant Physiol* **125**(4): 1912-8.

Adam, Z. and A. K. Clarke (2002). "Cutting edge of chloroplast proteolysis." *Trends in Plant Science* **7**(10): 451-456.

Ahmadian, M. R., P. Stege, et al. (1997). "Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras." *Nat Struct Biol* **4**(9): 686-9.

Akiyama, Y., M. Ehrmann, et al. (1998). "Polypeptide binding of Escherichia coli FtsH (HflB)." *Mol Microbiol* **28**(4): 803-12.

Akiyama, Y. and K. Ito (2003). "Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH." *J Biol Chem* **278**(20): 18146-53.

Akiyama, Y., A. Kihara, et al. (1996). "Subunit a of proton ATPase F₀ sector is a substrate of the FtsH protease in Escherichia coli." *FEBS Lett* **399**(1-2): 26-8.

Akiyama, Y., A. Kihara, et al. (1996). "FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins." *J Biol Chem* **271**(49): 31196-201.

Akopian, T. N., A. F. Kisselev, et al. (1997). "Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*." *J Biol Chem* **272**(3): 1791-8.

Amerik, A., V. K. Antonov, et al. (1991). "Site-directed mutagenesis of La protease. A catalytically active serine residue." *FEBS Lett* **287**(1-2): 211-4.

Arnold, I. and T. Langer (2002). "Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 89-96.

Asahara, Y., K. Atsuta, et al. (2000). "FtsH recognizes proteins with unfolded structure and hydrolyzes the carboxyl side of hydrophobic residues." *J Biochem (Tokyo)* **127**(5): 931-7.

Atorino, L., L. Silvestri, et al. (2003). "Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia." *J Cell Biol* **163**(4): 777-87.

Babu, Y. S., C. E. Bugg, et al. (1988). "Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution." *J Mol Biol* **204**(1): 191-204.

Bakala, H., E. Delaval, et al. (2003). "Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix." *Eur J Biochem* **270**(10): 2295-302.

Baumeister, W., J. Walz, et al. (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." *Cell* **92**(3): 367-80.

- Benaroudj, N. and A. L. Goldberg (2000). "PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone." *Nat Cell Biol* **2**(11): 833-9.
- Beyer, A. (1997). "Sequence analysis of the AAA protein family." *Protein Sci* **6**(10): 2043-58.
- Bi, E. and J. Lutkenhaus (1993). "Cell-Division Inhibitors Sula and Mincd Prevent Formation of the Ftsz Ring." *Journal of Bacteriology* **175**(4): 1118-1125.
- Birghan, C., E. Mundt, et al. (2000). "A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus." *Embo J* **19**(1): 114-23.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bochtler, M., C. Hartmann, et al. (2000). "The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV." *Nature* **403**(6771): 800-5.
- Bota, D. A. and K. J. Davies (2002). "Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism." *Nat Cell Biol* **4**(9): 674-80.
- Bota, D. A., H. Van Remmen, et al. (2002). "Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress." *FEBS Lett* **532**(1-2): 103-6.
- Botos, I., E. E. Melnikov, et al. (2004). "Crystal structure of the AAA(+) alpha domain of E. coli Lon protease at 1.9A resolution." *J Struct Biol* **146**(1-2): 113-22.
- Botos, I., E. E. Melnikov, et al. (2004). "The catalytic domain of Escherichia coli Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site." *J Biol Chem* **279**(9): 8140-8.
- Boyer, P. D. (2002). "A research journey with ATP synthase." *J Biol Chem* **277**(42): 39045-61.
- Brandstetter, H., J. S. Kim, et al. (2001). "Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line." *Nature* **414**(6862): 466-70.
- Bruckner, R. C., P. L. Gunyuzlu, et al. (2003). "Coupled kinetics of ATP and peptide hydrolysis by Escherichia coli FtsH protease." *Biochemistry* **42**(36): 10843-52.
- Caruthers, J. M. and D. B. McKay (2002). "Helicase structure and mechanism." *Curr Opin Struct Biol* **12**(1): 123-33.
- Casari, G., M. De Fusco, et al. (1998). "Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease." *Cell* **93**(6): 973-83.
- Charette, M. F., G. W. Henderson, et al. (1981). "ATP hydrolysis-dependent protease activity of the lon (capR) protein of Escherichia coli K-12." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 4728-32.

- Chung, C. H. and A. L. Goldberg (1981). "The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 4931-5.
- Chung, C. H. and A. L. Goldberg (1982). "DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(3): 795-9.
- Cox, M. M. (2003). "The bacterial RecA protein as a motor protein." *Annu Rev Microbiol* **57**: 551-77.
- Craiu, A., M. Gaczynska, et al. (1997). "Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation." *J Biol Chem* **272**(20): 13437-45.
- Dahlmann, B., L. Kuehn, et al. (1992). "Biochemical properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*." *Eur J Biochem* **208**(3): 789-97.
- Dalbey, R. E., M. Chen, et al. (2000). "Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 435-42.
- Darland, G., T. D. Brock, et al. (1970). "A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile." *Science* **170**(965): 1416-8.
- De Mot, R., I. Nagy, et al. (1999). "Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes." *Trends Microbiol* **7**(2): 88-92.
- 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.
- Ditzel, L., J. Löwe, et al. (1998). "Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT." *Cell* **93**(1): 125-38.
- Dougan, D. A., A. Mogk, et al. (2002). "Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question." *Cell Mol Life Sci* **59**(10): 1607-16.
- Fischer, H. and R. Glockshuber (1993). "ATP hydrolysis is not stoichiometrically linked with proteolysis in the ATP-dependent protease La from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **268**(30): 22502-7.
- Fischer, H. and R. Glockshuber (1994). "A point mutation within the ATP-binding site inactivates both catalytic functions of the ATP-dependent protease La (Lon) from *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **356**(1): 101-3.
- Fu, G. K. and D. M. Markovitz (1998). "The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner." *Biochemistry* **37**(7): 1905-9.
- Fukui, T., T. Eguchi, et al. (2002). "A membrane-bound archaeal Lon protease displays ATP-independent proteolytic activity towards unfolded proteins and ATP-dependent activity for folded proteins." *J Bacteriol* **184**(13): 3689-98.

- Gerstein, M., G. Schulz, et al. (1993). "Domain closure in adenylate kinase. Joints on either side of two helices close like neighboring fingers." *J Mol Biol* **229**(2): 494-501.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.
- Goldberg, A. L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." *Nature* **426**(6968): 895-9.
- Goldberg, A. L., R. P. Moerschell, et al. (1994). "ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* **244**: 350-75.
- Groll, M., M. Bajorek, et al. (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." *Nat Struct Biol* **7**(11): 1062-7.
- Groll, M., H. Brandstetter, et al. (2003). "Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes." *J Mol Biol* **327**(1): 75-83.
- Groll, M., L. Ditzel, et al. (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." *Nature* **386**(6624): 463-71.
- Guenther, B., R. Onrust, et al. (1997). "Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III." *Cell* **91**(3): 335-45.
- Gutsche, I., O. Mihalache, et al. (2000). "ATPase cycle of an archaeal chaperonin." *J Mol Biol* **300**(1): 187-96.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." *Science* **295**(5561): 1852-8.
- Hattendorf, D. A. and S. L. Lindquist (2002). "Analysis of the AAA sensor-2 motif in the C-terminal ATPase domain of Hsp104 with a site-specific fluorescent probe of nucleotide binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2732-7.
- Hattendorf, D. A. and S. L. Lindquist (2002). "Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants." *Embo J* **21**(1-2): 12-21.
- Hedstrom, L. (2002). "Serine protease mechanism and specificity." *Chem Rev* **102**(12): 4501-24.
- Herman, C., S. Prakash, et al. (2003). "Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH." *Mol Cell* **11**(3): 659-69.
- Herman, C., D. Thevenet, et al. (1997). "The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII." *J Bacteriol* **179**(2): 358-63.

- Holt, C. and L. Sawyer (1988). "Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions." *Protein Eng* **2**(4): 251-9.
- Iyer, L. M., D. D. Leipe, et al. (2004). "Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases." *J Struct Biol* **146**(1-2): 11-31.
- Jayasekera, M. M., S. K. Foltin, et al. (2000). "Escherichia coli requires the protease activity of FtsH for growth." *Arch Biochem Biophys* **380**(1): 103-7.
- Karata, K., T. Inagawa, et al. (1999). "Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH." *J Biol Chem* **274**(37): 26225-32.
- Karata, K., C. S. Verma, et al. (2001). "Probing the mechanism of ATP hydrolysis and substrate translocation in the AAA protease FtsH by modelling and mutagenesis." *Mol Microbiol* **39**(4): 890-903.
- Karzai, A. W., E. D. Roche, et al. (2000). "The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue." *Nat Struct Biol* **7**(6): 449-55.
- Käser, M. and T. Langer (2000). "Protein degradation in mitochondria." *Semin Cell Dev Biol* **11**(3): 181-90.
- Katayama-Fujimura, Y., S. Gottesman, et al. (1987). "A multiple-component, ATP-dependent protease from Escherichia coli." *J Biol Chem* **262**(10): 4477-85.
- Keiler, K. C. and R. T. Sauer (1995). "Identification of active site residues of the Tsp protease." *J Biol Chem* **270**(48): 28864-8.
- Kenniston, J. A., T. A. Baker, et al. (2003). "Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine." *Cell* **114**(4): 511-20.
- Kenniston, J. A., R. E. Burton, et al. (2004). "Effects of local protein stability and the geometric position of the substrate degradation tag on the efficiency of ClpXP denaturation and degradation." *J Struct Biol* **146**(1-2): 130-40.
- Kihara, A., Y. Akiyama, et al. (1995). "FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4532-6.
- Kihara, A., Y. Akiyama, et al. (1996). "A protease complex in the Escherichia coli plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY." *Embo J* **15**(22): 6122-31.
- Kihara, A., Y. Akiyama, et al. (1998). "Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA." *J Mol Biol* **279**(1): 175-88.
- Kihara, A., Y. Akiyama, et al. (1999). "Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis." *Embo J* **18**(11): 2970-81.

- Kikuchi, M., N. Hatano, et al. (2004). "Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease." *J Biol Chem* **279**(1): 421-8.
- Kisselev, A. F., T. N. Akopian, et al. (1998). "Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes." *J Biol Chem* **273**(4): 1982-9.
- Köhler, A., P. Cascio, et al. (2001). "The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release." *Mol Cell* **7**(6): 1143-52.
- Koonin, E. V., Y. I. Wolf, et al. (2000). "Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics." *Adv Protein Chem* **54**: 245-75.
- Krzywda, S., A. M. Brzozowski, et al. (2002). "The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å resolution." *Structure (Camb)* **10**(8): 1073-83.
- Kunst, F., N. Ogasawara, et al. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* **390**(6657): 249-56.
- Kuroda, A., K. Nomura, et al. (2001). "Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*." *Science* **293**(5530): 705-8.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Langer, T. (2000). "AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins." *Trends Biochem Sci* **25**(5): 247-51.
- Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, et al. (1979). "An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate." *Anal Biochem* **100**(1): 95-7.
- Lee, C., M. P. Schwartz, et al. (2001). "ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal." *Mol Cell* **7**(3): 627-37.
- Leipe, D. D., E. V. Koonin, et al. (2003). "Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins." *J Mol Biol* **333**(4): 781-815.
- Leipe, D. D., Y. I. Wolf, et al. (2002). "Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases." *J Mol Biol* **317**(1): 41-72.
- Lenzen, C. U., D. Steinmann, et al. (1998). "Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein." *Cell* **94**(4): 525-36.
- Leonhard, K., J. M. Herrmann, et al. (1996). "AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria." *Embo J* **15**(16): 4218-29.
- Leonhard, K., A. Stiegler, et al. (1999). "Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease." *Nature* **398**(6725): 348-51.

- Lo, J. H., T. A. Baker, et al. (2001). "Characterization of the N-terminal repeat domain of *Escherichia coli* ClpA-A class I Clp/HSP100 ATPase." *Protein Sci* **10**(3): 551-9.
- Löwe, J., D. Stock, et al. (1995). "Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution." *Science* **268**(5210): 533-9.
- Luo, Y., R. A. Pfuetzner, et al. (2001). "Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage." *Cell* **106**(5): 585-94.
- Lupas, A. N. and J. Martin (2002). "AAA proteins." *Current Opinion in Structural Biology* **12**(6): 746-753.
- Maas, R. (2001). "Change of plasmid DNA structure, hypermethylation, and Lon-proteolysis as steps in a replicative cascade." *Cell* **105**(7): 945-55.
- Makino, S., T. Makino, et al. (1999). "Second transmembrane segment of FtsH plays a role in its proteolytic activity and homo-oligomerization." *FEBS Lett* **460**(3): 554-8.
- Maurizi, M. R. (1987). "Degradation in vitro of bacteriophage lambda N protein by Lon protease from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **262**(6): 2696-703.
- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* **260**(3): 289-98.
- Mizusawa, S. and S. Gottesman (1983). "Protein degradation in *Escherichia coli*: the lon gene controls the stability of sulA protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(2): 358-62.
- Müller, C. W. and G. E. Schulz (1992). "Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap5A refined at 1.9 Å resolution. A model for a catalytic transition state." *J Mol Biol* **224**(1): 159-77.
- Navon, A. and A. L. Goldberg (2001). "Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome." *Mol Cell* **8**(6): 1339-49.
- Neuhoff, V., N. Arold, et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* **9**(6): 255-62.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, et al. (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." *Genome Res* **9**(1): 27-43.
- Nishii, W., T. Maruyama, et al. (2002). "The unique sites in Sula protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* **269**(2): 451-7.
- Nitsch, M., J. Walz, et al. (1998). "Group II chaperonin in an open conformation examined by electron tomography." *Nat Struct Biol* **5**(10): 855-7.

- Niwa, H., D. Tsuchiya, et al. (2002). "Hexameric ring structure of the ATPase domain of the membrane-integrated metalloprotease FtsH from *Thermus thermophilus* HB8." *Structure (Camb)* **10**(10): 1415-23.
- Noble, J. A., M. A. Innis, et al. (1993). "The *Escherichia coli* hflA locus encodes a putative GTP-binding protein and two membrane proteins, one of which contains a protease-like domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10866-70.
- Ogura, T., S. W. Whiteheart, et al. (2004). "Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases." *J Struct Biol* **146**(1-2): 106-12.
- Ogura, T. and A. J. Wilkinson (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function." *Genes Cells* **6**(7): 575-97.
- Okuno, T., T. Yamada-Inagawa, et al. (2004). "Spectrometric analysis of degradation of a physiological substrate sigma(32) by *Escherichia coli* AAA protease FtsH." *J Struct Biol* **146**(1-2): 148-54.
- Paetzel, M., R. E. Dalbey, et al. (1998). "Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor." *Nature* **396**(6707): 186-90.
- Paetzel, M., A. Karla, et al. (2002). "Signal peptidases." *Chem Rev* **102**(12): 4549-80.
- Pamnani, V., T. Tamura, et al. (1997). "Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*." *FEBS Lett* **404**(2-3): 263-8.
- Peat, T. S., E. G. Frank, et al. (1996). "Structure of the UmuD' protein and its regulation in response to DNA damage." *Nature* **380**(6576): 727-30.
- Rasulova, F. S., N. I. Dergousova, et al. (1998). "The isolated proteolytic domain of *Escherichia coli* ATP-dependent protease Lon exhibits the peptidase activity." *FEBS Lett* **432**(3): 179-81.
- Rockel, B., J. Jakana, et al. (2002). "Electron cryo-microscopy of VAT, the archaeal p97/CDC48 homologue from *Thermoplasma acidophilum*." *J Mol Biol* **317**(5): 673-81.
- Rockel, B., J. Walz, et al. (1999). "Structure of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* as studied by electron tomography." *FEBS Lett* **451**(1): 27-32.
- Rotanova, T. V. (1999). "Structural and functional characteristics of ATP-dependent Lon-proteinase from *Escherichia coli*." *Bioorg Khim* **25**(12): 883-91.
- Rotanova, T. V., E. E. Mel'nikov, et al. (2003). "Catalytic dyad Ser-Lys at the active site of *Escherichia coli* ATP-dependent Lon-proteinase." *Bioorg Khim* **29**(1): 97-9.
- Ruepp, A., W. Graml, et al. (2000). "The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*." *Nature* **407**(6803): 508-13.

- Saikawa, N., Y. Akiyama, et al. (2004). "FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*." *J Struct Biol* **146**(1-2): 123-9.
- Schlee, S., Y. Groemping, et al. (2001). "The chaperone function of ClpB from *Thermus thermophilus* depends on allosteric interactions of its two ATP-binding sites." *J Mol Biol* **306**(4): 889-99.
- Schumann, W. (1999). "FtsH--a single-chain chaperonin?" *FEMS Microbiol Rev* **23**(1): 1-11.
- Searcy, D. G. (1976). "Thermoplasma acidophilum: intracellular pH and potassium concentration." *Biochim Biophys Acta* **451**(1): 278-86.
- Seegerer, A., T. A. Langworthy, et al. (1988). "Thermoplasma-Acidophilum and Thermoplasma-Volcanium Sp-Nov from Solfatara Fields." *Systematic and Applied Microbiology* **10**(2): 161-171.
- Senes, A., M. Gerstein, et al. (2000). "Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions." *J Mol Biol* **296**(3): 921-36.
- Serrano, M., S. Hovel, et al. (2001). "Forespore-specific transcription of the lonB gene during sporulation in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **183**(10): 2995-3003.
- Shotland, Y., S. Koby, et al. (1997). "Proteolysis of the phage lambda CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **24**(6): 1303-10.
- Shotland, Y., A. Shifrin, et al. (2000). "Proteolysis of bacteriophage lambda CII by *Escherichia coli* FtsH (HflB)." *J Bacteriol* **182**(11): 3111-6.
- Singh, S. K., R. Grimaud, et al. (2000). "Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8898-903.
- Singleton, M. R., M. R. Sawaya, et al. (2000). "Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides." *Cell* **101**(6): 589-600.
- Smith, C. K., T. A. Baker, et al. (1999). "Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6678-82.
- Song, C., Q. Wang, et al. (2003). "ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity." *J Biol Chem* **278**(6): 3648-55.
- Sousa, M. C., B. M. Kessler, et al. (2002). "Crystal structure of HslUV complexed with a vinyl sulfone inhibitor: corroboration of a proposed mechanism of allosteric activation of HslV by HslU." *J Mol Biol* **318**(3): 779-85.
- Sousa, M. C., C. B. Trame, et al. (2000). "Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex." *Cell* **103**(4): 633-43.

- Stahlberg, H., E. Kutejova, et al. (1999). "Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6787-90.
- Steglich, G., W. Neupert, et al. (1999). "Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3435-42.
- Story, R. M. and T. A. Steitz (1992). "Structure of the recA protein-ADP complex." *Nature* **355**(6358): 374-6.
- Story, R. M., I. T. Weber, et al. (1992). "The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer." *Nature* **355**(6358): 318-25.
- Strynadka, N. C., H. Adachi, et al. (1992). "Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution." *Nature* **359**(6397): 700-5.
- Subramanya, H. S., L. E. Bird, et al. (1996). "Crystal structure of a DExx box DNA helicase." *Nature* **384**(6607): 379-83.
- Suzuki, C. K., K. Suda, et al. (1994). "Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration." *Science* **264**(5161): 891.
- Swamy, K. H. and A. L. Goldberg (1981). "*E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent." *Nature* **292**(5824): 652-4.
- Tamura, T., N. Tamura, et al. (1996). "Tricorn protease--the core of a modular proteolytic system." *Science* **274**(5291): 1385-9.
- Tamura, T., N. Tamura, et al. (1996). "Tricorn protease (TRI) interacting factor 1 from *Thermoplasma acidophilum* is a proline iminopeptidase." *FEBS Lett* **398**(1): 101-5.
- Thompson, M. W., S. K. Singh, et al. (1994). "Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis." *J Biol Chem* **269**(27): 18209-15.
- Tomoyasu, T., J. Gamer, et al. (1995). "*Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32." *Embo J* **14**(11): 2551-60.
- Tomoyasu, T., K. Yamanaka, et al. (1993). "Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **175**(5): 1352-7.
- Tomoyasu, T., T. Yuki, et al. (1993). "The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression." *J Bacteriol* **175**(5): 1344-51.
- Udenfriend, S., S. Stein, et al. (1972). "Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range." *Science* **178**(63): 871-2.

- van de Vossen, A. J. Driessen, et al. (1998). "Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae*." *Extremophiles* **2**(2): 67-74.
- van Dijk, J. M., E. Kutejova, et al. (1998). "The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: roles in proteolysis and respiration-dependent growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10584-9.
- Van Dyck, L., D. A. Pearce, et al. (1994). "PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **269**(1): 238-42.
- Varshavsky, A. (1992). "The N-end rule." *Cell* **69**(5): 725-35.
- Varshavsky, A. (1995). "The N-end rule." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 461-78.
- Voges, D., P. Zwickl, et al. (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-68.
- Waldmann, T., E. Nimmesgern, et al. (1995). "The thermosome of *Thermoplasma acidophilum* and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC." *Eur J Biochem* **227**(3): 848-56.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly Related Sequences in the Alpha-Subunits and Beta-Subunits of Atp Synthase, Myosin, Kinases and Other Atp-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold." *Embo Journal* **1**(8): 945-951.
- Walz, J., T. Tamura, et al. (1997). "Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo." *Mol Cell* **1**(1): 59-65.
- Wang, J., J. J. Song, et al. (2001). "Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism." *Structure (Camb)* **9**(2): 177-84.
- Weber-Ban, E. U., B. G. Reid, et al. (1999). "Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA." *Nature* **401**(6748): 90-3.
- Wickner, S., M. R. Maurizi, et al. (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." *Science* **286**(5446): 1888-93.
- Wu, W. F., Y. Zhou, et al. (1999). "Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) protease." *J Bacteriol* **181**(12): 3681-7.
- Yamada-Inagawa, T., T. Okuno, et al. (2003). "Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis." *J Biol Chem* **278**(50): 50182-7.
- Yoshida, T., A. Ideno, et al. (2002). "Two kinds of archaeal group II chaperonin subunits with different thermostability in *Thermococcus* strain KS-1." *Mol Microbiol* **44**(3): 761-9.
- Yu, R. C., P. I. Hanson, et al. (1998). "Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP." *Nat Struct Biol* **5**(9): 803-11.

Zehnbauer, B. A., E. C. Foley, et al. (1981). "Identification and purification of the Lon+ (capR+) gene product, a DNA-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(4): 2043-7.

Zhang, M., T. Tanaka, et al. (1995). "Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin." *Nat Struct Biol* **2**(9): 758-67.

Zhang, X., A. Shaw, et al. (2000). "Structure of the AAA ATPase p97." *Mol Cell* **6**(6): 1473-84.

Zimmer, M. (2002). "Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior." *Chem Rev* **102**(3): 759-81.

Zwickl, P., F. Lottspeich, et al. (1992). "Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **312**(2-3): 157-60.

Zwickl, P., D. Ng, et al. (1999). "An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes." *J Biol Chem* **274**(37): 26008-14.

DANKE

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister für die Möglichkeit diese Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Ich danke Herrn Dr. Peter Zwickl für die Themenstellung dieser Arbeit und die kontinuierliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tomohiro Tamura und Frau Dr. Noriko Tamura, die diese Arbeit durch die Messungen zum Abbau von Insulin-B und β -Casein maßgeblich bereichert haben.

Bei Oana Mihalache und Günter Pfeifer möchte ich mich für die Hilfe bei den Versuchen zur Elektronenmikroskopie bedanken.

Ich danke Alexandra Gerega für viele kritische Diskussionen und die sorgfältige Überarbeitung des Manuskripts.

Ich danke Jens Schiener für seine Geduld in allen „Computerlagen“.

Besonderen Spaß machte die Arbeit mit der Unterstützung von Ulf Klein, Anna Margareta Gail, Friederike Gieseke und Christian Denk.

Für viele Ratschläge und praktische Tipps möchte ich mich bei Herrn Dr. Harald Engelhardt, Herrn Dr. Jürgen Peters und Frau Dr. Susanne Witt bedanken.

Bei der ganzen Abteilung bedanke ich mich für die gute Atmosphäre.