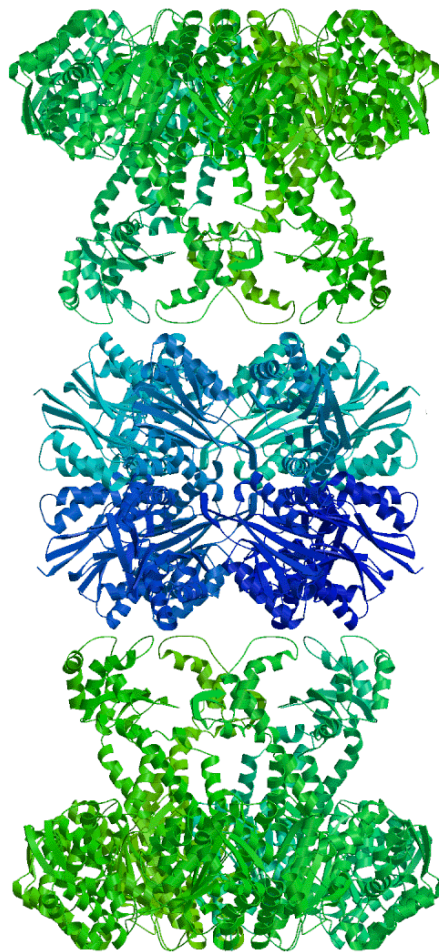


**Kristallographische und biochemische Untersuchungen
des Proteasekomplexes der ATP-abhängigen Protease
Heat Shock Locus VU (HslVU) aus *E. coli***



Claudia Hartmann
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Kristallographische und biochemische Untersuchungen
des Proteasekomplexes der ATP-abhängigen Protease
Heat Shock Locus VU (HslVU) aus *E. coli***

Claudia Hartmann

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. H. Schmidbauer

Prüfer der Dissertation:

1. apl.-Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huber

2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 14.05.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.09.2001 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis April 2001 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber in der Abteilung für Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die Überlassung des interessanten Themas, sein stetes Interesse am Fortschritt des Projektes und seine Hilfe beim Modellbau von HslU und HslV-HslU.

Herrn Dr. Matthias Bochtler, Dr. Hyun Kyu Song und Herrn Dr. Ravishankar Ramachandran möchte ich für die gute und effiziente Zusammenarbeit an HslVU danken.

Herrn Dr. Marius Boicu danke ich für die DNA-Sequenzierung, Herrn Dr. Karl-Heinz Mann und Herrn Dr. Josef Kellermann danke ich für Proteinsequenzierungen.

Herrn Werner Dersch und Herrn Fischer danke ich für ihre Hilfe bei technischen Problemen.

Frau Renate Rüller und Frau Gina Beckmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Sekretariat.

Herrn Tobias Ullrich, Frau Iris Fritze, Herrn Pablo Fuentes-Prior, Herrn Rainer Friedrich, Herrn Dr. Michael Groll und Herrn John Richardson danke ich für das angenehme Arbeitsklima im Labor.

Herr Thomas Steiner, Frau Tatjana Krywcun, Frau Petra Birle, Frau Traudl, Wenger, Frau Irene Bonin, Frau Andrea Papendorf, Frau Sofia Macieira, Herr Carsten-Peter Kaerlein waren nette Gesellschaft im Büro und im Labor.

Herrn Prof. Dr. Hans Bartunik, Herrn Gleb Bourenkov möchte ich für die Unterstützung bei der Datensammlung am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg danken.

Frau Elisabeth Weyer und Herr Dr. Nediljko Budisa möchte ich für die Einführung in den Zirkulardichroismus danken.

Weiterhin sei dem Martinsrieder Mutantenstadel für die nette Begleitung während der Dissertation gedankt.

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMP-PNP	β,γ -Imidoadenosin-5'-triphosphat
ATP γ S	Adenosin 5'-O-(3-Thiotriphosphat)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethylsulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
MES	2-Morpholinoethylsulfonsäure
UV	ultravioletter Spektralbereich
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidene fluorid
SulA-MBP	Fusionskonstrukt aus Maltosebinding-Protein und SulA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
VS	Vinylsulfon
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
Z	Benzyloxycarbonyl
Z-GGL-AMC	Benzyloxycarbonyl-Gly-Gly-Leu-7-Amino-4-methylcumarin

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	5
2.1	Die AAA ⁺ -ATPasen	5
2.2	Proteinabbau in Eukaryonten	7
2.3	Proteinabbau in Prokaryonten	11
2.3.1.	HslVU	13
3.	Materialien und Methoden	15
3.1	Oligonukleotide	15
3.1.1	Oligonukleotide für die Sequenzierung	15
3.1.2	Oligonukleotide für die Einklonierung von HslUHis und HslUHis-Mutanten aus <i>E.coli</i> in Expressionsvektoren	15
3.1.3	Oligonukleotide für die Mutagenese an HslU aus <i>E. coli</i>	16
3.2	Plasmide	16
3.3	Bakterienstämme	17
3.4	Enzyme	17
3.5	Präperationskits	17
3.6	Chemikalien	18
3.7	Geräte und Säulenmaterialien	18
4.	Methoden	20
4.1	Arbeiten mit DNA	20
4.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	20
4.1.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	21
4.1.3	Polymerase-Kettenreaktion	22
4.1.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	23
4.1.5	Mutagenese	23
4.1.5.1	Mutagenese-Strategie-1	23
4.1.5.2	Mutagenese-Strategie-2	24
4.1.6	Enzymatische Reaktionen an DNA	25
4.1.6.1	Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	25
4.1.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten	25
4.1.7	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
4.1.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	26
4.1.9	Sequenzierung gereinigter Plasmid-DNA	26
4.2	Arbeiten mit Bakterien	27
4.2.1	Plattenkulturen	27
4.2.2	Flüssigkulturen	27
4.2.3	Fermentation von <i>E. coli</i>	27
4.2.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	28
4.2.4.1	RbCl-chemisch kompetente Zellen	28
4.2.4.2	Elektrokompetente Zellen	28
4.2.5	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	29
4.2.5.1	Chemisch kompetente Zellen	29
4.2.5.2	Elektrokompetente Zellen	29
4.3	Arbeiten mit Proteinen	30
4.3.1	Gelelektrophorese	30

4.3.1.1	Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	30
4.3.2	Blotting	32
4.3.3	Proteinfärbung	33
4.3.3.1	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	33
4.3.3.2	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	33
4.3.3.3	Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen	34
4.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
4.3.4.1	nach Lowry	34
4.3.4.2	nach Bradford	35
4.3.4.3	durch Absorptionsmessung	35
4.3.5	Massenspektroskopie	36
4.3.6	Aktivitätstests	36
4.3.6.1	Peptidaseassay	36
4.3.6.2	Casein-Degradationsassay	37
4.3.6.3	ATPase-Assay	37
4.4	Zirkulardichroismus	38
4.5	Kristallographische Methoden	40
4.5.1	Kristallisation	40
4.5.2	Kristallaufbau	41
4.5.3	Beugung an Kristallen	42
4.5.3.1	Reziprokes Gitter	42
4.5.3.2	Laue-Gleichungen und die Ewaldkugel	42
4.5.4	Matthews-Koeffizient	44
4.5.5	Strukturfaktoren und Fouriersynthese	44
4.5.6	Pattersonfunktion	45
4.5.7	Phasenproblem	46
4.5.8	Isomorpher Ersatz	46
4.5.9	MAD	49
4.5.10	Molekularer Ersatz	51
4.5.11	Verfeinerungen	52
4.5.12	Mittelungen	53
4.5.13	Modifikation der Elektronendichte (solvent-flattening)	54
5.	Ergebnisse	55
5.1	Überexpression und Aufreinigung	55
5.2	Kristallisation	58
5.2.1	Kristallisation von HslVU	58
5.2.2	Kristallisation von HslU	60
5.3	Strukturauswertung von HslVU	62
5.3.1	Datensammlung und Raumgruppenbestimmung	62
5.3.2	Suche der Schweratomlagen	64
5.3.3	Packung der HslVU-Kristalle	68
5.3.4	Verfeinerung	70
5.4	Strukturaufklärung der HslU-Kristalle	71
5.4.1	Datensammlung und Raumgruppenbestimmung	71
5.4.1.1	HslU mit Nukleotid und Magnesium	71
5.4.1.2	HslU	72
5.4.2	Strukturlösung von HslU	73
5.4.2.1	HslU mit Nukleotid und Magnesium	73
5.4.2.2	HslU	76
5.5	Strukturbeschreibung	78

5.6	Mutagenesestudie an HslU basierend der Struktur	89
5.6.1	Assays zur Charakterisierung der Mutanten	89
5.6.2	Mutagenesestudie an der ATP-Bindestelle von HslU basierend auf der Struktur	92
5.6.3	Mutagenesestudie an HslU an den möglichen Kontaktflächen zu HslV	97
6.	Diskussion	102
6.1	Expression und Aufreinigung	102
6.2	Kristallisation	102
6.3	Strukturlösung von HslU und HslV-HslU	103
6.4	Strukturbeschreibung	105
6.5	Biochemische Charakterisierung	108
6.6	Mutagenesestudie	109
6.7	EM-Aufnahmen und Mutagenesestudie an ATP-abhängigen Proteasen	111
6.8	Kristallstrukturen von HslVU in der alternativen Komplexkonformation	112

1. Zusammenfassung

Die meisten zytosolischen Proteine werden in Eukaryonten durch einen einzigen löslichen Proteasekomplex, das 26S Proteasom, abgebaut. In diesem Komplex ist das 20S Proteasom das proteolytische Core-Partikel und die 19S Kappe das ATP-abhängige Regulatorpartikel. Prokaryonten dagegen enthalten eine Reihe ATP-abhängiger Proteasen, die für den Abbau defekter Proteine verantwortlich sind. Eine dieser ATP-abhängigen Proteasen ist HslVU (Hitzeschock-Locus VU). In diesem Komplex ist HslV die Proteasekomponente und HslU der ATP-abhängige Aktivator. Das 26S Proteasom und HslVU stehen miteinander in Verbindung. Die Kristallstrukturen von HslV und 20S Proteasom sind gelöst. Die Untereinheiten des HslV Dodekamers haben ~20% Sequenzähnlichkeit und eine konservierte Faltung mit den β -Untereinheiten des 20S Proteasoms gemeinsam, das sich aus den α -, β - Untereinheiten in einer ringförmigen $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Architektur zusammensetzt. Von dem heterogenen 19S Proteasomaktivator gibt es keine hochaufgelöste Struktur.

Die Gene HslV und HslU aus *E. coli* wurden jeweils mit einem His₆-Fusionspeptid unter der Kontrolle des T7-Promotors im Zytosol überexprimiert. Die Aufreinigung von HslU wurde so optimiert, daß die Stabilität des sonst instabilen Proteins erheblich verbessert wurde. Es ließen sich in vitro die ATP-abhängige Proteaseaktivität an den Substraten Z-GGL-AMC, FITC-Casein und SulA-MBP nachweisen, obwohl der Komplex zwischen beiden Komponenten biochemisch instabil ist.

Folgende Komponenten wurden miteinander kristallisiert und durch Röntgenkristallbeugung untersucht: (1) HslU, HslV und AMP-PNP; (2) HslU, Magnesiumchlorid und AMP-PNP und (3) HslU. Alle Datensätze wurden am Synchrotron im 90 K Stickstoffstrom gemessen. Die HslV-HslU Struktur wurde durch eine Kombination von MAD und molekularem Ersatz gelöst. Die beiden HslU Strukturen wurden durch die Methode des molekularen Ersatzes mittels eines Teilmodells von HslU aus der HslV-HslU Struktur als Suchmodell gelöst.

HslU ist eine Hsp100 (Clp) ATPase. Die Kristallstruktur von HslU ist die erste eines Proteins aus dieser Familie. Die sechs Untereinheiten bauen eine ringförmige Struktur um

ein zentrales Core aus. Eine HslU Untereinheit kann in drei Domänen eingeteilt werden, die N- und C-Domäne, die den globulären Teil des Hexamers bilden und einer flexiblen I-Domäne, die sich vom Rest absetzt. Das Modell konnte bis auf einige Bereiche der I-Domäne, die fehlgeordnet waren, modelliert werden. Im Bereich der Nukleotidbindestelle weist HslU die konservierte Faltung der AAA-ATPasen auf, die sich aus einer N-terminalen α/β -Subdomäne mit der ATP-Bindestelle und einem C-terminalen 4 Helixbündel zusammensetzt, das auf der ATP-Bindestelle liegt. Damit wird die Klassifizierung der Clp ATPasen als AAA-ATPasen strukturell bestätigt. Beim Vergleich der Nukleotidbindenden und Nukleotid-freien Untereinheiten in HslU ergab sich, daß im Nukleotid-freien Zustand die N- und die C-Domäne, die über ein Gelenk miteinander verknüpft sind, voneinander wegrotiert sind. Die C-Domäne ist entweder an Interaktionen mit der Nachbaruntereinheit beteiligt, oder mit dem Lösungsmittel an der Oberfläche des Proteins in Kontakt, aber nicht mit der Innenseite des Cores. Damit kann das Modell der C-Domäne als Substratbindedomäne (SSD-Domäne) widerlegt werden. Des Weiteren weist sie keine strukturellen Ähnlichkeiten mit den PDZ-Domänen auf, die auf Grund einer schwachen Sequenzhomologie zwischen der PDZ-Domäne und dem C-Terminus der Clp-ATPasen identifiziert wurden.

Vergleiche zwischen HslU und den proteasomalen AAA-ATPasen, die den *base*-Subkomplexes des 19S Regulatorpartikels aufbauen, ergaben, daß diese mit den N- und C-Domäne von HslU auf Sequenzebene überlagert werden konnten. Basierend auf der Kristallstruktur von HslU wird deshalb für den *base*-Subkomplex eine ringförmige, oligomere Struktur erwartet.

Sowohl HslV, als auch HslU haben D6 Symmetrie und schließen somit aus, daß für die Aktivierung von HslV eine gebrochene Symmetrie zwischen Protease und ATPase notwendig ist. An beiden Polen des HslV Dodekamers ist jeweils ein HslU lokalisiert, das über die I-Domäne mit den Resten am Eingang von HslV wechselwirkt. Die Seitenlänge des HslVU Partikels ist in der Röntgenstruktur im Vergleich zur EM-Aufnahme größer und die Hauptstreumasse von HslU ist 5 nm von HslV entfernt. Dies wurde als Hinweis aufgefaßt, daß es eine alternative Möglichkeit der Komplexbildung geben könnte, in der die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist.

Basierend auf den strukturellen Daten wurde in einer Mutagenesestudie an der ATP-Bindetasche von HslU der Einfluß der einzelnen Reste auf ATP-Bindung und Hydrolyse, sowie Proteolyseaktivität von HslVU untersucht. Die drastischsten Effekte auf die Aktivität bewirkten die Mutationen E321Q, R325E und R393A.

Weiterhin wurden die Einwirkung von HslU-Mutationen an den beiden möglichen Kontaktflächen zwischen Protease und Aktivator und am hexameren Eingang von HslU auf die Degradation von SulA-MPB untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl die hydrophobe, flexible Region I175-Q209 der I-Domäne von HslU in die Substraterkennung, als auch die hexamere Öffnung von HslU in die Substraterkennung oder/und Translokation involviert sind. Die Deletion des Segments der I-Domäne, das in der Kristallstruktur den Kontakt zu HslV vermittelt, hat keinen Einfluß auf die Proteolyseaktivität gegen SulA-MPB, während Mutationen, die das Ausbilden der alternativen Komplexform, in der die I-Domäne von HslU auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist, sterisch verhindern sollten, inhibierend wirkten. Der Austausch geladener Reste an der alternativen Kontaktfläche in entgegengesetzt geladene hatten bis auf eine nahe am konservierten C-Terminus keine Einwirkung auf die Aktivität gegen SulA-MPB. Im Gegensatz zu den Resultaten aus dem SulA-Degradationsassay sind die amidolytischen und caseinolytischen Aktivitäten dieser Mutanten wildtypähnlich.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- 1) Hartmann, C., Bochtler, M., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. & Huber, R. (2000). The structure of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature* **403**, 800-805.
- 2) Hartmann, C., Song, H. K., Ravishankar, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. & Huber, R. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *PNAS* **97**, 14103-14108.
- 3) Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Ravishankar, R. & Huber, R. (2000). Docking of components in a bacterial complex. *Nature*, **408**, 667-668.
- 4) Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. & Huber, R. (1999). The proteasome. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **8**, 295-317.
- 5) Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Stock, D., Löwe, J., Hartmann, C., Dorowski, A. & Huber, R. Proteasomes. Landes Publishing Company, eds. Hilt, W. and Wolf, D. H., (in press).

2. Einleitung

2.1 Die AAA⁺-ATPasen

-verwandte ringförmige ATPasen mit diversen Funktionen

Die AAA-Proteinfamilie ist eine Unterfamilie der Walker-A/GTPasen [Walker, 1982; Schulz, 1992], da die charakteristischen Sequenzmotive Walker A (P-Loop) und Walker B enthalten sind. Dabei ist Walker A in die Phosphatbindung von ATP und Walker B in Metallbindung und Katalyse involviert. Die AAA-Proteinfamilie selbst zeichnet sich durch eine hochkonservierte Region von 220-250 Aminosäuren aus, der sogenannten AAA-Kassette [Kunau, 1993]. In dieser AAA-Kassette sind die beiden Walker-Motive und ein weiteres für AAA-Proteine typisches Sequenzmotiv, die sogenannte minimale AAA-Konsensussequenz enthalten [Patel, 1998]. Ein Teil dieser Minimalen AAA-Konsensussequenz wird auch SHR-Region (*Second Region of Homology*) genannt [Karata, 1999; Neuwald, 1999], deren Rolle allerdings noch unklar ist. Ein Vertreter dieser Proteinfamilie ist FtsH. Mutagenese an FtsH in diesem Bereich inaktivieren das Enzym [Karata, 1999]. Innerhalb der Familie werden zwischen Proteinen, die ein oder zwei AAA-Kassetten enthalten, unterschieden (Gruppe I und II) [Koonin, 1993b].

Proteine dieser Familie haben auf Sequenzebene innerhalb der AAA-Kassette eine Identität von ~30 % und eine konservierte Core-Struktur, wie bereits gelöste Kristallstrukturen der inaktiven NSF-D2-Domäne [Lenzen, 1998; Yu, 1998] und der dazu homologen Struktur der aktiven p97-N-D1-Domäne [Zhang, 2000] zeigen. Diese setzt sich aus einer N-terminalen α/β -Subdomäne mit der Nukleotidbindstelle und einem C-terminalen 4-Helixbündel zusammen, das auf der Nukleotidbindstelle liegt. Dabei ist allerdings anzumerken, daß die Adenintasche in der p97-N-D1-Domäne im Vergleich zur NSF-D2-Domäne eine andere Form zeigt [Zhang, 2000]. Das Nukleotid wird in der p97-N-D1-Domäne in *anti*- und nicht wie in NSF in *syn*-Konformation gebunden [Zhang, 2000].

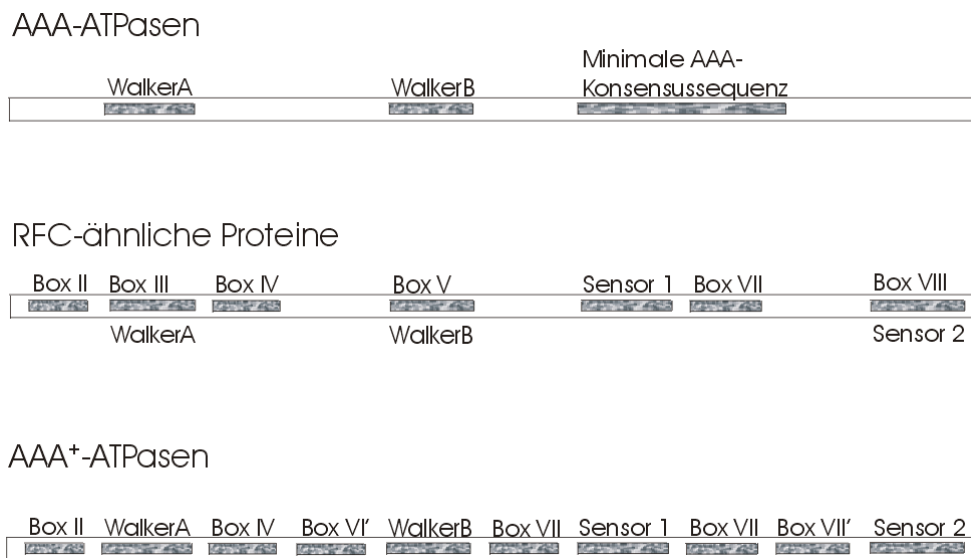
Die Strukturen zeigen weiterhin, daß die Untereinheiten zu Hexameren um ein zentrales Core assemblieren.

Die starke Konservierung in Sequenz und Struktur spricht für einen gemeinsamen oder ähnlichen Mechanismus der Enzyme in dieser Familie. Doch die biologischen Aktivitäten sind weit gestreut, in die die AAA-Proteine involviert sind, wie z.B. Peroxisome-Biogenese, Assemblierung von mitochondrialen Membranproteinen, Zellzykluskontrolle, Ausbilden der Spindel während der Mitose, Vesikelsekretion, Interaktionen des Cytoskeletts, Signaltransduktion, Aktivierung des Proteasoms und Transkription [Confalonieri, 1995; Beyer, 1997; Waterham, 1997; Subramani, 1998]. Daher rührt auch der Name AAA-ATPase (Tripel-A-Familie), der als Abkürzung für "*ATPase Associated to a variety of cellular Activities*" steht [Kunau, 1993]. Eine weitere Bezeichnung dieser Gruppe von Enzymen ist CAD als Abkürzung für "*Conserved ATPase Domain*" [Choi, 1996; Sun, 1996]. Es ist noch unklar, wie das AAA-Modul mit den verschiedensten Aktivitäten in Verbindung steht.

Durch eine Positionsspezifische Iterative Datenbanksuche (PSI-BLAST) und multiplen Sequenzüberlagerungen konnte gezeigt werden, daß die AAA-Proteine außer Walker A, Walker B und minimale AAA-Konsensussequenz weitere konservierte Bereiche enthalten, wie die RFC-Boxen der Replikationsfaktor-ähnlichen Proteine und drei weitere konservierte Bereiche, über die vorher noch nicht berichtet wurde (Box IV', VII, VII') [Neuwald, 1999]. Daraufhin wurde das Konsensusmotiv für AAA-ATPasen erweitert. Nach der Erweiterung werden die AAA-ATPasen auch AAA⁺-ATPasen genannt. Der Sachverhalt ist in Figur 2.1.1 dargestellt. In der ersten Reihe sind konservierte Bereiche der Prototypen der AAA-ATPasen dargestellt, in der letzten die der AAA-/AAA⁺-ATPasen.

Die Aufnahme der RFC-ähnlichen Proteine in die Familie der AAA-ATPasen wird durch den Vergleich der bereits gelösten Kristallstrukturen von der NSF-D2-Domäne, einem AAA-Protein nach der alten Definition und der RFC-ähnlichen δ -Untereinheit der DNA-Polymerase III im Bereich der Nukleotidbindestelle bestätigt [Lenzen, 1998; Guenther, 1997]. Als Folge der Erweiterung des Konsensusmotivs wurden weitere Proteine in der Datenbank als AAA-Proteine klassifiziert, wie die proteaseassoziierten Chaperone (Clp-Proteine, Lon), Dynein-Motorprotein und NTPasen, die in die DNA-Replikation, Tran-

skription, Rekombination und Restriktion involviert sind [Neuwald, 1999, Traudt, 1994]. Doch dieser Analyse steht gegenüber, daß auf Grund einer schwachen Sequenzhomologie zwischen der carboxyterminalen Region der Clp-Proteine und der bereits strukturell charakterisierten PDZ-Domäne zwei PDZ-Domänen identifiziert wurden. [Levchenko, 1997]. Die Strukturen von NSF-D2 und der δ^1 -Untereinheit der DNA-Polymerase III zeigen jedoch keine Ähnlichkeit zu den PDZ-Domänen.



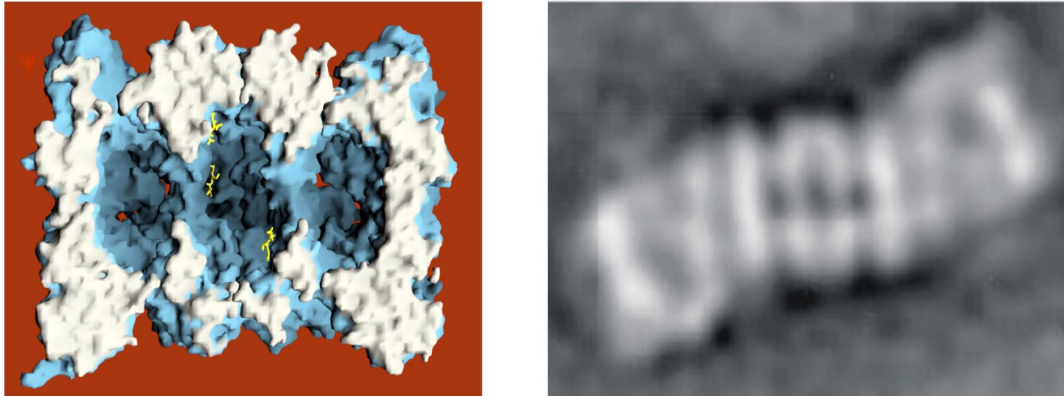
Figur 2.1.1: In der ersten Reihe sind die konservierten Bereiche der Prototypen der AAA-ATPasen dargestellt. In der letzten Reihe sind die konservierten Bereiche der AAA-/AAA⁺-Familie dargestellt. Darin sind die Konsensusmotive der AAA-ATPasen und die der RFC-ähnlichen Proteine vereint. Außerdem wurden die Boxen VI', VII und VII' identifiziert, über die vorher noch nicht berichtet wurde.

2.2 Proteinabbau in Eukaryonten

In eukaryontischen Zellen gibt es zwei verschiedene Wege, um Proteine abzubauen: Extrazelluläre Proteine werden in den Lysozymen hydrolysiert [Heinemeyer, 1991; Knop, 1993]. Die meisten zytosolischen Proteine werden über den Ubiquitin-Proteasom-Weg im Zytosol abgebaut [Chiechanover, 1984; Hershko, 1992; 1996; Hochstraßer, 1996; Varshavski, 1997]. Dabei werden Proteine mit einem Ubiquitinmolekül über eine Isopeptidbindung kovalent verbunden. Dieser Prozeß kann für bereits ubiquitinierte Pro-

teine wiederholt werden, wodurch ganze Ubiquitinbäume entstehen [Chiechanover, 1981a, 1981b; Hershko, 1982; Scheffner, 1995, Hershko, 1985; Chau, 1989]. Das 26S Proteasom erkennt derartig markierte Proteine und baut diese unter ATP-Verbrauch ab. Das 26S Proteasom ist in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert, wie Zellkern, Zytosol [Peters, 1994] und auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulum [Rivett, 1998]. Der Abbau von Proteinen durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg spielt eine wichtige Rolle in der Streßantwort [Finley, 1987] und in der Kontrolle einer Vielzahl von Prozessen, wie Zellzyklus, Signaltransduktion, Transkription, Endozytose und Regulierung von Rezeptoren [Hershko, 1998].

Allerdings werden einige Regulatorproteine ubiquitinunabhängig abgebaut. Dies sind z.B. in Säugetieren c-Jun [Jariel-Encontre, 1995], $I\kappa\beta$ [Krappmann, 1996], Ornithine Decarboxylase [Coffino, 1998], p21^{CIP} [Sheaff, 2000]. In Säugern werden die entstehenden Peptide an der Zelloberfläche von dem MHC-I-Komplex für die spezifische Immunantwort präsentiert [York, 1996; Koopmann, 1997].



Figur 2.2.1: (a) Schnitt senkrecht zur zweizähligen Achse durch das Oberflächenmodell des 20S Hefe-Proteasoms. Der Inhibitor Lactacystein ist gelb markiert. [Groll, 1997]; (b) EM-Aufnahme des 26S Hefe-proteasoms [Glickman, 1998]

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des 26S Hefe-Proteasoms (Figur 2.2.1) zeigen, daß sich dieses aus dem proteolytischen Core-Partikel, dem 20S Proteasom, im Zentrum und einem 19S Regulatorpartikel an einem oder beiden Polen des 20S Proteasoms zusammensetzt. Das 19S Proteasom besteht aus zwei Subkomplexen, dem “*lid*” und dem

“*base*” [Glickman, 1998; Peters, 1991, 1993, Walz, 1998]. Dabei ist der *base*-Subkomplex der dem Core-Partikel zugewandte und der *lid*-Subkomplex der vom Core-Partikel abgewandte Teil des 19S Proteasomregulators [Glickman, 1998].

Die Kristallstruktur des 20S Hefe-Proteasoms zeigt, daß sich dieses aus vier heptameren Ringen zu einem zylinderförmigen Core-Partikel zusammensetzt. Der Innenraum ist in drei Kammern eingeteilt (Figur 2.2.1). Die größere zentrale Kammer wird von zwei Ringen gebildet, die sich jeweils aus sieben verschiedenen β -Untereinheiten zusammensetzen [Groll, 1997]. Dabei zeigen β 1 peptidyl-glutamyl-Protein-hydrolysierende, β 2 trypsin-ähnliche und β 7 chymotrypsin-ähnliche Aktivitäten [Orlowski, 1981]. Das 20S Proteasom gehört zu der Klasse der Threonin-Proteasen [Groll, 1997; Löwe, 1995; Seemüller, 1995]. Die Aktivitätszentren sind an den Innenwänden der Kammer lokalisiert. Die beiden äußeren Antikammern werden aus jeweils einem α -Ring gebildet, der sich aus sieben verschiedenen, inaktiven α -Untereinheiten zusammensetzt. Die α -/ β -Untereinheiten sind sich in der Tertiärstruktur ähnlich, obwohl sie auf Sequenzebene eine geringe Homologie zueinander haben. Die α -Untereinheiten verschließen durch ihre N-Termini die Eingänge des Core-Partikels und machen es für gefaltete Proteine unzugänglich [Groll, 1997, Löwe, 1995].

Die Komplexbildung zwischen 20S-Hefeproteasom und seiner 19S Kappe führen zu einer Erhöhung der Aktivität [Hoffman, 1992]. Eine Deletion des N-Terminus der α 3-Untereinheit führt zu einer Erhöhung der Peptidaseaktivität und zur Öffnung des Eingangs zum Core-Partikel. Die Aktivität der α 3 Δ N CP-Mutante kann durch das Regulatorpartikel kaum gesteigert werden. Dies spricht dafür, daß die 19S Kappe durch eine Konformationsänderung der N-Termini der α -Untereinheiten das Core-Partikel öffnet und die Aktivitätszentren für Substrate besser zugänglich macht (“*gating*”-Mechanismus) [Groll, 2000].

Der Regulator besteht aus mindestens 18 verschiedenen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 119 kDa [Peters, 1994]. Davon enthalten sechs das konservierte AAA-Modul [Beyer, 1997] und sind für die ATPase-Aktivität der 19S Kappe verantwortlich. Sie werden mit Rpt (Regulator particel triphosphatase) bezeichnet. Die restlichen Untereinheiten sind ATP-unabhängig und werden mit Rpn (Regulator particel

non-ATPase) bezeichnet. Die sechs ATPasen und drei ATP-unabhängige Untereinheiten, Rpn1, Rpn2 und Rpn10, bauen den *base*-Subkomplex auf. *Base* und *lid* können durch Hochsalz oder einer Deletionsmutante Δ rpn10 voneinander getrennt werden [Glickman, 1998]. Der *base*-Subkomplex zusammen mit dem 20S Proteasom hydrolysiert chromogene Substrate und Casein, kann aber keine ubiquitinierte Substrate abbauen.

Einerseits wurde eine Chaperonaktivität gegen chemisch denaturierte Citrat-Synthase für den *base*-20S Proteasom-Komplex nachgewiesen, die genauso stark wie die des 26S Proteasoms ist [Braun, 1999]. Andererseits werden, wie oben erwähnt, einige gefaltete Proteine vom 26S-Komplex ubiquitinunabhängig abgebaut.

Eine einfachere Homolog der 26S ATPasen aus *M. janaschii*, PAN (Proteasom Activating Nuclease), steigert die Aktivität der 20S Proteasome aus verschiedenen Archaeobakterien und Säugetieren, chromogene Substrate und denaturierte Proteine abzubauen [Zwickl, 1999]. Dies weist auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hin.

Interessanterweise zeigen die Untereinheiten des *lid*-Subkomplexes signifikante Struktur motive, die im COP9/Signalosom und in eIF3 present sind [Aravind, 1998; Hofmann, 1998]. Einige Signalosomsubstrate, wie c-Jun und I κ B α [Pickart, 1997], können vom *lid*-Subkomplex ubiquitinunabhängig erkannt werden. Signalosom könnte daher ein Vorläufer des *lid*-Subkomplexes sein [Glickman, 1998].

Die Kombination aus beiden Elementen war ein kritischer Schritt in der Evolution der eukaryontischen Zellen, in dem Proteasomfunktion und Ubiquitinkonjugation gekoppelt worden sind zum Ubiquitin-Proteasom-Weg.

Eine ATP- und ubiquitinunabhängige Regulierung des 20S Proteasoms erfolgt durch PA26 oder PA28. Kristallographische Studien zeigten, daß die Wechselwirkung der C-Termini der PA26/28- α -Untereinheiten mit dem α -Ring des Core-Partikels eine Konformationsänderung bewirken, wodurch das 20S Proteasom geöffnet wird [Knowlton, 1997; Song, 1997; Whitby, 2000]. Dies wird auch durch biochemische Daten bestätigt [Wilk, 1997].

2.3 Proteinabbau in Prokaryonten

In Bakterien dient die Proteolyse zum Abbau von falsch gefalteten Proteinen und einigen intakten Regulatorproteinen, die in *E.coli* z.B. in Transkription, Hitzeschock (Stress)-Antwort, SOS-Antwort, der Kontrolle von Lyse und lytischem Zyklus des Bakteriophagen λ und der Polysaccharid-Synthese bei der Kapselbildung im Hungerzustand involviert sind [Torres-Cabassa, 1987; Gottesman, 1992; Goldberg, 1992]. Im Gegensatz zu der Ubiquitinierungskaskade in Eukaryonten wurde in Prokaryonten kein System gefunden, durch das Proteine für den Abbau markiert werden können. Die zytosolischen Proteine werden durch ATP-abhängige Proteasen abgebaut, von denen die in *E.coli* am besten charakterisiert sind.

In einigen Systemen sind die Protease- und die ATPase-Komponente auf einem Polypeptidstrang lokalisiert, wie bei Lon [Chung, 1981] und FtsH [Voellmy, 1981]. Im Gegensatz dazu sind in der Clp-Proteinfamilie (*Caseinolytic proteolysis*) beide Komponenten auf getrennten Polypeptidsträngen lokalisiert [Gottesman, 1996; Katayama, 1988]. Zu dieser Familie gehören die Serinprotease ClpP mit ihren Aktivatoren ClpX und ClpA, die Threoninprotease HslV mit ihrem Aktivator HslU. HslU wird auch als ClpY bezeichnet, um die Sequenzhomologie zu ClpX zu betonen. In Analogie zu der von ClpX aktivierten Protease ClpP wird HslV auch ClpQ genannt, obwohl ClpP und ClpQ in Sequenz und Struktur verschieden sind [Bochtler, 1997; Wang, 1997; Chuang, 1993]. ClpB ist nur wegen der Sequenzhomologie zu ClpA und ClpX aufgelistet. Es wurde allerdings noch keine Protease gefunden, die von ClpB aktiviert wird [Squires, 1991].

Die Nukleotidbindestellen enthalten die Walker A und B Konsensusmotive. Weiterhin sind die C-Termini unter den Clp-Proteinen konserviert [Schirmer, 1996]. Die Clp-Aktivatoren werden in zwei Klassen eingeteilt. Zu Klasse 1 gehören Aktivatoren mit zwei Nukleotidbindestellen, wie ClpA, ClpB. Davon zeigt nur die zweite ATPase-Aktivität zeigt. In Klasse 2 werden die Aktivatoren, die nur die zweite Nukleotidbindestelle enthalten, zusammengefaßt. Dazu gehören ClpX und ClpY.

In *E.coli* unterliegt die Transkription der Gene HslV, HslU, ClpP, ClpX, ClpB und FtsH der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors [Chuang, 1993; Herman, 1995; Katayama,

1988; Kitagawa, 1991; Kroh, 1990, Maurizi, 1990; Squires, 1991], während die Transkription des *lon*-Gens durch die Anwesenheit von abnormal gefalteten Proteinen induziert wird [Goff, 1985]. Alle Einzelheiten über den komplexen Ablauf der Streßantwort sind nicht bekannt. Werden jedoch Zellen einer höheren Temperatur ausgesetzt, so wird die Translation des Transkriptionsfaktors σ^{32} verstärkt, der die bevorzugte Transkription der Hitzeschockproteine (HSP) bewirkt, indem er mit der Polymerase einen Komplex bildet, der die Bindung an Hitzeschockpromotoren bevorzugt. Der Hauptanteil der beschädigten Proteine wird von Lon und ClpAP abgebaut [Gottesman, 1992]. Die Hitzeschockantwort wird durch eine “*Feedback-Regulation*” kontrolliert. σ^{32} selbst ist Substrat der oben aufgezählten ATP-abhängigen Proteasen, einschließlich Lon und ClpAP. Sind die beschädigten Proteine degradiert, wird der Transkriptionsfaktor abgebaut und so die Streßantwort gedrosselt [Kanemori, 1997]. An der Streßantwort sind in vivo weitere Proteine beteiligt, wie DnaJ, DnaK, GrpE, GroEL, GroES und die sHSPs (*small heat shock proteins*) [Georopoulos, 1984; Gross, 1996; Hayer-Hartl, 1996]. Diese unterliegen auch der Kontrolle des Hitzeschockpromotors und schützen die beschädigten Proteine vor der Aggregation. Bei der Zurückregulierung der Streßantwort verhindert das DnaJ/K-GrpE-System die Bindung von σ^{32} an die Polymerase. Die Substrate werden an die ATP-abhängigen Proteasen weitergegeben und so deren Aktivität gefördert [Gamer, 1992; Liberek, 1993].

Weiterhin werden, wie oben schon erwähnt, auch einige Regulatorproteine abgebaut. Diese Substrate werden von den Aktivatoren durch eine Erkennungssequenz erkannt, gebunden, entfaltet, eventuell translokiert und von der Protease abgebaut [Gottesman, 1998; Hoskins, 1998, 2000; van Melderen, 1996; Sonezaki, 1995; Kanemori, 1999; Smith, 1999, Wickner, 1999]. Dabei ist zu bemerken, daß die Aktivatoren unterschiedliche Substratspezifitäten haben [Gottesman, 1996; Singh, 2000].

Obwohl die Clp-ATPasen keine Sequenzähnlichkeit mit den Chaperonen, wie GroEL/GroES haben, konnte Chaperonaktivität nachgewiesen werden [Zolkiewski, 1999; Hoskins, 2000; Laachouch, 1996; Singh, 2000; Keiler, 1996].

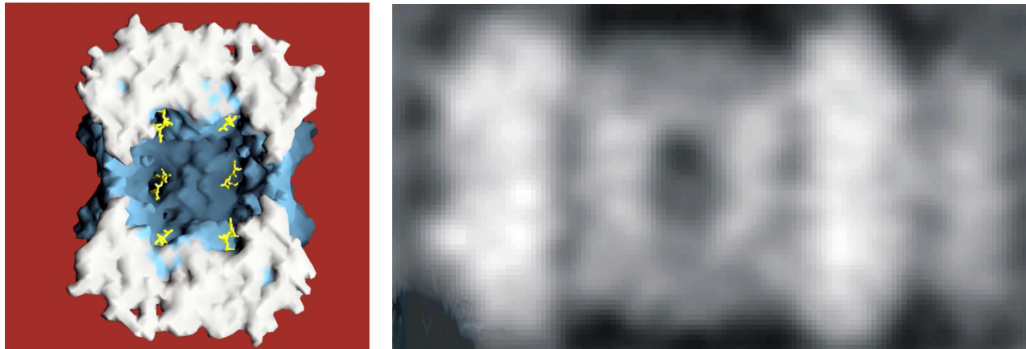
Im Gegensatz zu den übrigen ATP-abhängigen Proteasen erkennt ClpAP die metabolische Stabilität eines Proteins an dem N-terminalen Rest. Diese Regel wird N-end Regel

genannt [Tobias, 1991] und besagt, daß die hydrophoben Reste Phenylalanin, Tyrosin, Leucin (nicht aber Isoleucin) und die basischen Reste Arginin und Lysin (nicht aber Histidin) stark destabilisierend auf ein Protein wirken [Tobias, 1991].

2.3.1 HslVU

Die prokaryontische ATP-abhängige Protease HslVU steht interessanterweise in Verbindung zu dem eukaryontischen 26S Proteasom. HslV ist ein Dodekamer aus identischen Untereinheiten, die ~20 % Sequenzhomologie zu den β -Untereinheiten des 20S Hefeproteasoms zeigen [Chuang, 1993]. Diese Verwandtschaft wird durch den Vergleich der Strukturen der Proteasome aus Hefe und Thermoplasma mit HslV [Bochtler, 1997; Groll, 1997; Löwe, 1995] verstärkt. Die Untereinheiten der prokaryontischen Proteasekomponente enthalten die gleiche konservierte $\alpha\beta\beta\alpha$ -sandwich-Faltung der Ntn-Hydrolasen wie die β -Untereinheiten des Hefeproteasoms und des Thermoplasma-Proteasoms. Alle drei Partikel sind Threoninproteasen, was durch die kovalente Bindung des Inhibitors N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal an das N-terminale Threonin in den Kristallstrukturen bewiesen wurde (Figur 2.2.1; Figur 2.3.1.1) [Bochtler, 1997; Groll 1997; Löwe, 1995; Seemüller, 1995]. Die Reste Thr1, Asp17, Lys33, Ser 129 und Ser169 im Aktivitätszentrum von HslV sind auf Sequenzebene und strukturell zwischen den drei Proteasen stark konserviert. Für den Katalysemechanismus von HslV und Hefeproteasom könnte deshalb der für das 20S Proteasom aus *T. acidophilum* vorgeschlagene zutreffen [Bochtler, 1997; Groll 1997; Löwe, 1995]. Dabei wird angenommen, daß ein Proton von Thr1O^γ auf die α -Aminogruppe von Thr1 übertragen wird. Dabei könnten Ser129 und Ser169 als Protonenshuttle funktionieren. Lys33 dagegen ist positiv geladen und kann deshalb kein Proton aufnehmen. Im Hefeproteasom ist zusätzlich ein Wassermolekül im aktiven Zentrum am Protonentransfer beteiligt [Groll, 1997].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HslVU (Figur 2.3.1.1) [Rohrwild, 1997], wie auch von ClpXP [Grimaud, 1998] und ClpAP [Kessel, 1995], zeigen Ähnlichkeiten in der Architektur zum 26S Proteasom [Glickman, 1998]. An den Öffnungen des zylinderförmigen Corepartikels sind die Aktivatoren HslU lokalisiert [Rohrwild, 1997].



Figur 2.3.1.1: (a) Schnitt entlang der sechszähligen Achse durch das Oberflächenmodell des HslV. Der Inhibitor Lactacystein ist gelb markiert [Bochtler, 1997]; (b) EM-Aufnahme von HslVU [Rohrwild, 1997]

HslV allein ist inaktiv. In vitro degradiert HslVU in Anwesenheit von ATP oder ATP-Analoga und Mg^{2+} das chromogene Substrat Z-Gly-Gly-Leu-AMC [Rohrwild, 1997] oder das Modellssubstrat Casein [Seol, 1997]. Die ATPase-Aktivität von HslU wird durch HslV und Substrate stimuliert [Yoo, 1996; Seol, 1997]. In vivo und in vitro ist die ATP-abhängige Protease in der Lage, Sula bzw. Sula-MBP abzubauen, wobei hier unbedingt die ATP-Hydrolyse erforderlich ist [Khattar, 1997; Seong, 1999]. In vivo wird Sula hauptsächlich von Lon abgebaut [Mizusawa, 1983; Wu, 1999]. Sula ist ein Zellteilungs-inhibitor, der bei UV-Einstrahlung oder DNA-zerstörenden Chemikalien überexprimiert wird, an FtsZ bindet und dadurch die Ausbildung eines Septums verhindert [Huang, 1996; Huisman, 1984]. Weitere Substrate von HslVU sind der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor σ^{32} und σ^E [Missiakis, 1996], der den Abbau extrazellulärer beschädigter Proteine induziert [Erickson, 1989]. In vitro ist das DnaJK-System für die Degradation von σ^{32} nicht notwendig [Kanemori, 1999]. Genau wie für die anderen ATP-abhängigen Proteasen wurde für HslVU auch Chaperonaktivität nachgewiesen. In vitro wird beobachtet, daß HslU die Aggregation von Sula verhindern. Für die Bindung des Substrates ist die Bindung von ATP, nicht aber die Hydrolyse notwendig [Seong, 2000].

3. Materialien und Geräte

3.1 Oligonukleotide

3.1.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung

E. coli HslU (1332 bp):

hslU_Seq1	5'-GAATGCGCCGTTTCATCAAAG-3' (222-241)
hslU_Seq2	5'-GCGTGAAGGCCAGCTTG-3' (489-505)
hslU_Seq3	5'-GTTTATCGACGAAATCGAC-3' (759-767)
hslU_Seq4	5'-GACCGAGCCGAATGCCTC-3' (1032-1049)
hslU_Seq5	5'-GCGGCATCGGTCAGATCGC-3' (320-302)
hslU_Seq6	5'-GGTCATCTCTTCCATGCCCG-3' (588-569)
hslU_Seq7	5'-CCTTCTACCAGCGGCAGCAG-3' (860-841)
hslU_Seq8	5'-CGATGCGTTTAATACCGGAG-3' (1124-1110)

E. coli HslV (531 bp):

hslV_Seq1	5'-GCCGCCGTTGAGCTGGC-3' (223-239)
hslV_Seq2	5'-GATAAGCGATGCAGTTTC-3' (318-301)

Die Sequenzierprimer für HslUHis und HslVHis wurden von Dr. M. Bochtler übernommen.

pet-Vektor-System:

T7-Promotor Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
Terminator Primer	5'-ATAGTTATTGCTCAGCGGTG-3'

pMal-p2-Vektor:

malh1	5'-GATGAAGCCCTGAAAGACGCGC-3'
malr1	5'-CACGACGTTGTAAAACGACGGC-3'

3.1.2 Oligonukleotide für die Einklonierung von HslUHis und HslUHis-Mutanten aus *E. coli* in Expressionsvektoren

E. coli HslU:

5'-hslUH	5'-CA TGC ATG GGC <u>CAT ATG</u> CAC CAT CAC CAT CAT CAT TCT GAA ATG ACC CCA CGC GAA ATC GTC AGC GAA CTG G-3'
3'-hslU	5'-GC <u>GGA TCC TTA</u> TAG GAT AAA ACG GCT CAG-3'
3'-hslU*	5'-C CCA <u>AGC TTA</u> TAG GAT AAA ACG GCT C-3'

Der 5'-hslUH und der 3'-hslU wurden auch von Dr. M. Bochtler übernommen.

3.1.3 Oligonukleotide für die Mutagenese an HslU aus *E. coli*

5'-K80T	5'- <u>C ATC ACT GTT GAA GCG ACC AAA TTC</u> -3'
3'-K80T	5'- <u>C TTC AAC AGT GAT GAA CGG CGC ATT C</u> -3'
5'-E286Q	5'- <u>G GTA CAA GGT TGC ACC GTT TCC</u> -3'
3'-E286Q	5'- <u>CA ACC TTG TAC CAG CGG CAG CAG G</u> -3'
5'-E321Q	5'- <u>GT CGA CTG CCA ATC CGC GTT G</u> -3'
3'-E321Q	5'- <u>G TCG ACC TTG CAG TTG CGG GAT C</u> -3'
5'-R325E	5'-C GAG <u>CTC CCA ATC CGC GTT GAA CTG</u> -3'
3'-R325E	5'-G <u>GAG CTC ACC TTG CAG TTC CGG G</u> -3'
5'-R325K	5'- <u>CCC AAG CTT CCA ATC CGC GTT GAA CTG</u> -3'
3'-R325K	5'- <u>GGG AAG CTT ACC TTG CAG TTC CGG G</u> -3'
5'-R393A	5'- <u>GCT GCT CGT TTA CAC ACT GTT CTG</u> -3'
3'-R393A	5'-G <u>TAA ACG AGC AGC ACC GAT GTT TTC G</u> -3'
5'-R393K	5'- <u>GCT AAA CGT TTA CAC ACT GTT CTG</u> -3'
3'-R393K	5'-G <u>TAA ACG TTT AGC ACC GAT GTT TTC G</u> -3'

3.2 Plasmide

Für die cytosolische Expression von HslUHis-Mutanten in *E. coli* unter der Kontrolle des T7-Promotors wurden die Plasmide pET22b(+) der Firma Novagen (Boehinger Ingelheim Bioproducts, Czernyring, 22/11, D69115 Heidelberg, bzw. Calbiochem-Novabiochem GmbH, Postfach 1167, D-65796 Bad Solen) und pT7-7(San Tabor, Dept. of Biol. Chem., Harvard Medical School, Boston, Mass 02115) verwendet. Die Klone HslVHis in pET12b und HslUHis in pET 22b(+) wurden von Dr. M.Bochter übernommen und ebenfalls im Cytosol expremiert.

Für die periplasmatische Expression des Fusionskonstrukts aus Maltose-Binding-Protein und Sula in *E. coli* unter der Kontrolle des Tac-Promotors wurde der Klon pMal-p2-Sula von A. Higashitani (Division of Microbial Genetics, National Institute of Genetics 111 Yata, Shizuoka-ken, Mishima 411, Japan) zur Verfügung gestellt [Higashitani, 1997].

3.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α :	deoR, endA1, gyr96, hsdR17 (r _k -m _k +), recA1,relA1,supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argF), Φ 80lacZ Δ M15,F λ
<i>E. coli</i> BL21 (DE3):	F', ompT, hsdS _B , (r _B -m _B -), gal, dcm, (DE3)
<i>E. coli</i> CSH26:	F', ara Δ (lacpro) thi

Die Bakterienstämme DH5 α und BL21 (DE3) wurden von der Firma Calbiochem-Novabiochem GmbH, (Postfach 1167, D-65796 Bad Solen) verwendet und die CHS26 wurde freundlichst von A. Higashitani, Division of Microbial Genetics, National Institute of Genetics 111 Yata, Shizuoka-ken, Mishima 411, Japan) zur Verfügung gestellt [Higashitani, 1997].

3.4 Enzyme

MBI Fermentas GmbH Franz-Antoni-Str. 22 D-68789 St. Leon-Rot Tel: 06227 51308	Restriktionsenzyme
New England Biolabs GmbH Postfach 2750 D- 65820 Schwalbach, Taunus Tel: 06196 83639	Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase
Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 11 D-68305 Mannheim Tel: 0621 7598540	Restriktionsenzyme, DNase, Lysozym, Pwo-Polymerase, RNase, Apyrase, alkalischePhosphatase, dNTPs

3.5 Präparationskits

Applied Biosystems Brunnenweg 13 D-64331 Weiterstadt Tel: 06150 1010	Big Dye Terminator Mix
Helmut Schröder Handelsvertretungen Gaußstr. 30/2 D-70193 Stuttgart	National Diagnostics Acrylamid-Bisacrylamidmischung 30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid
Qiagen GmbH Max-Volmer-Str. 4 D-40724 Hilden Tel: 02103 892230	Qiagen Mini, Midi, Maxi, Mega-Kits QIAprep Spin Miniprep Kit QIAquick PCR Purification Kit QIAquick Gel Extraction Kit

3.6 Chemikalien

Bachem Biochemica GmbH
Haberstr. 6
D-69126 Heidelberg
Tel: 06221 33050

Ac-Leu-Leu-Norleucinal
(Calpain-Inhibitor I),
Z-Gly-Gly-Leu-AMC

BIOMOL Feinchemikalien GmbH
Waidmannstr. 35
D-22769 Hamburg
Tel: 040 8532600

IPTG

Molecular Probes Europe BV
PoortGebouw
Rijnsburgerweg 10
2333AA Leiden (NL)
Tel: 31 71 5233378

Ethidiumbromide, SybrGreen

Difco Laboratories
P. O. Box 331058
Detroit, MI 48232 7058
Tel: 001 313 462 8500

Bacto-Trypton, Hefeextrakt

Merk
Frankfurter Str.250
D-64293 Darmstadt
Tel: 0130 852280

verschiedene Chemikalien,
Reinheit für die Analyse
Ammoniumheptamolybdat

Sigma
Grünwalder Weg 30
D-82041 Deisenhofen
Tel: 0130 5155

verschiedene Chemikalien, Adenin,
AMP, ADP, ATP, cAMP,
Reinheit für die Analyse, Mineralöl
FITC-Casein, Malachitegrün

3.7 Geräte und Säulenmaterialien

Abimed
Postfach 1111
D-40754 Langenfeld
Tel: 02173 890 50

Pipetten, Schlauchpumpen

Amicon GmbH
Neuer Weg 2
D-58453 Witten
Tel: 02302 960600

Ultrafiltrationszellen, Membranen,
Ultrazentrifugationsröhrchen

Beckmann Instruments
Frankfurter Ring 115
D-80939 München
Tel: 098 3887 1

Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotoren JA10,
JA20, Ultrazentrifuge L7-55,
mit Rotor Ti-45 und Ti 55,
Diodenarray DU 7500

Bio-Rad Laboratories GmbH
Heidemannstr.164
D-80939 München

Spannungsquelle 1420A,
Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell
Elektroporationsküvetten

Tel: 089 318840

CHARLES SUPPER Company. INC.
15 Tech Circle Nattrick
MA 01760 USA

MVD/24Crystal Growth CHAMBER

Fa. H. Fäger, Dentaldepot
Pettenkofersrt. 4
D- 80336 München
Tel: 089 5518000

Havard-Dentalwachs

Fa. G. Heinemann
Ultraschall und Labortechnik
Erwin-Rommel-Str. 4
D-73525 Schwäbisch Gmünd
Tel. 07171 61142

Branson Sonifier Modell 250

Hampton Research
27632 EL Lazo Road, Suite 100
Niguel, CA 92677-3913 USA

Crystal Screen, Crysyal Screen II, Additive seen 1-3,
Detergentien Screen 1-3, Cryo Screen, Laguna
CrystalCap System, Cryo Tong, CrystalWand,
Vial clamps

Hellma GmbH & Co. KG
Klosterunsstr. 5
79371 Müllheim
Tel. 07631 182-0

Präzisions-Küvetten

Jasco Deutschland GmbH
Robert-Bosch-Str. 11
64823 Groß-Umstadt
Tel. 06078 74917

JASCO J715 Spectropolarimeter

Kontron Instruments GmbH
Werner von Siemensstr. 1
Postfach 1380
D-85375 Neufahrn
Tel: 081 659220

Floureszenzspektrometer SFM 25

MANCO® INC.
32150 Just Image Drive
Avon, Ohio 44011 USA

CrysalClear-Folie

Millipore GmbH
Postfach 5647
D-65731 Eschborn
Tel: 06196 4940

Serilfilter, VS-Membranen, Ultrafree-CL
Filtereinheiten, Ultrafree-0,5-
Zentrifugalfiltereinheiten,
Micron® Zentrifugalfiltereinheiten

Fa. W. Müller
Reiherallee 12
D-13503 Berlin
Tel. 030 4316172

Markröhrchen für Kristallographie

Neolab
Rischerstr. 7
D-69123 Heidelberg
Tel 06221 844219

Schlauchverbinder

New England Biolabs GmbH
Postfach 2750
D- 65820 Schwalbach, Taunus
Tel: 06196 83639

Amylose-Resin

Sartorius AG
Weender Landstr. 94-108
37070 Göttingen
Tel. 0551 308 0

Ultrafilter

Pall GmbH Filtrationstechnik
Philipp-Reis-Str. 6
D-63303 Dreieich
Tel: 06103 3070

Fluorotrans Transfermembran

Pharmacia Biotech
Munzinger Str. 9
D-79111 Freiburg
Tel: 0761 4903226

FPLC-Systeme, Smart-System,
Q-Sepharose, Sephacryl S300,
Superose6, Chelating Sepharose

Stratagene
Postfach 105466
D-69044 Heidelberg
Tel: 06221 400 634

Robocycler Gradient 96
Electroporator 1000, 0,2 µl PCR-Reaktions-
gefäße

Whatman
St. Leonards Road
Maidstone
Kent (UK)
Tel: 622 676670

Whatman-Papier

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit DNA

4.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Geladene Teilchen unterschiedlicher Größe können durch Elektrophorese aufgrund ihrer unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge ("Marker") kann die Größe des Teilchens bestimmt werden. Um DNA-Fragmente aufzutrennen, werden abhängig von der Größe der zu untersuchenden Fragmente 0,5%(w/v) bis 2%(w/v) Agarose-Gele verwen-

det. Dazu wird feste Agarose in Laufpuffer solange aufgeköcht, bis eine klare Lösung entsteht. Damit nach Lauf des Geles die Banden unter UV-Licht sichtbar werden, wird Ethidiumbromid (Molecular Probes Europe BV, Leiden) zu einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml zugegeben. Durch anschließendes Abkühlen läßt man die Agarose in einer Gelform auspolymerisieren. Das Gel wird dann mit Laufpuffer überschichtet, und die Proben werden zusammen mit Auftragspuffer in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer werden TAE oder TBE benutzt. Verwendet man anstatt Ethidiumbromid Sybr-Green (Molecular Probes Europe BV, Leiden) in DMSO, so genügt es, diesen der Probe im Verhältnis 1:10000 zuzusetzen. Je nach Gelgröße und Agarose-Konzentration werden 40-100 V angelegt.

<u>50xTAE:</u>	2M Tris 1M Essigsäure 50mM EDTA (gelöst bei pH 8,0)	242,0g / 1000 ml 57,1ml / 1000ml
<u>5xTBE:</u>	450mM Tris 450mM Borsäure 10mM EDTA (gelöst bei pH 8,0)	54,0g / 1000 ml 27,5g / 1000ml
<u>6xAuftragspuffer:</u>	30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Xylenecyanol FF 0,25% (w/v) Bromphenolblau	

4.1.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Zurückgewinnung von DNA aus Agarosegelen erfolgt mit dem kommerziell erhältlichen QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers. Dabei wird die Gelmatrix in einem Puffer, der ihr Auflösen und das Binden der DNA an ein Trägermaterial in einem zentrifugierbaren Säulchen unterstützt, geschmolzen. Nach dem Auftrag der Probe auf ein Säulchen und einem Waschschrift in Hochsalz wird die DNA mit Niedersalz eluiert.

4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Mutagenese an HslUHis in pET22b(+) wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Dabei wurde folgende Reaktion in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß (Stratagene, Heidelberg) angesetzt und mit Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet.

1 µl Template (100ng / µl)
1 µl Pwo-Polymerase
2,5 µl 10 X Pwo-Polymerase-Reaktionspuffer
40 pmol Primer 5'-Richtung
40 pmol Primer 3'-Richtung
1,25 µl Nukleotide (10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
ddH₂O ad 25 µl

(Pwo-Polymerase, Puffer, Nukleotide wurden von der Firma Roche, Mannheim verwendet).

Dieser Reaktionsansatz wurde in einem "Robocycler Gradient 96" (Stratagene, Heidelberg) folgenden Temperaturschritten unterworfen:

1 min	95 °C	} 30 Zyklen	Strangtrennung
1 min	94 °C		Strangtrennung
1 min	44 °C-66 °C		Annealing
1min-2:30 min	72 °C		Elongation
∞	4 °C		Ende

Die Temperatur des Annealingschrittes wurde für jeden Primer errechnet, indem für jedes G-C-Paar 4 °C und jedes A-T-Paar 2 °C zwischen Primer und HslUHis-Gen gerechnet wurde. Die Primer wurden so konstruiert, daß ihre Annealingtemperatur für beide Richtungen ähnlich ist. Da in diesem Gerät die gleiche Reaktion mit verschiedenen Annealingtemperaturen gleichzeitig ablaufen kann, wurde für jede PCR-Reaktion mehrere Ansätze pipettiert.

Der Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab.

4.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Anwesenheit von Polymerase, Nukleotiden und Primern aus der PCR-Reaktion stört viele der nachfolgenden Reaktionen. Deshalb ist es notwendig, diese Komponenten entweder durch Gelelektrophorese and anschließende Rückgewinnung der DNA aus dem Gel oder schneller mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) abzutrennen. DNA im Bereich von 100 bp bis 10 kbp wird an eine Silikatmatrix unter Hochsalzbedingungen adsorbiert und unter Niedersalzbedingung eluiert.

4.1.5 Mutagenese

4.1.5.1 Mutagenese-Strategie-1

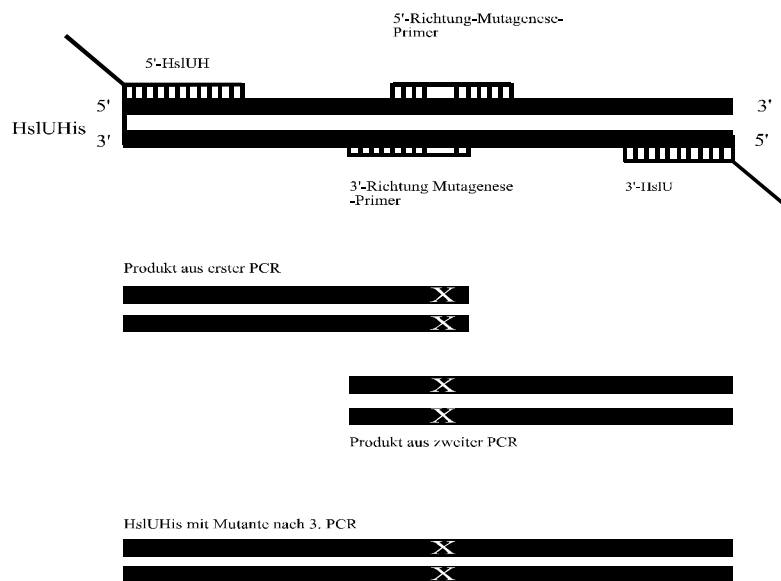
Für die Mutanten K80T, E286Q, R393A, R393K wurden jeweils zwei gegenläufige, sich ungefähr 12 Basen überlappende Primer konstruiert, die beide die gewünschte Mutation enthalten. Die Länge der Primer beträgt zwischen 20 und 25 Basen. Desweiteren wurden die Primer 5'-hslUH und 3'-hslU benötigt. Es wurde der oben beschriebene PCR-Reaktionsansatz benutzt.

In einem ersten PCR-Ansatz wurde für den Primer in 5'-Richtung 5'-hslUH und in 3'-Richtung ein 3'-Mutagenese-Primer eingesetzt. In einem zweiten Ansatz wurde für den Primer in 5'-Richtung ein 5' Mutagenese-Primer und in 3'-Richtung 3'-hslU verwendet. Als Template diente hier HslUHis in pET22b(+). Die daraus erhaltenen zwei sich um 12 Basen überlappende DNA-Fragmente enthielten jeweils die Mutante. Das ursprüngliche Template wurde durch Gelelektrophorese abgetrennt. Zusammen mit den Primern 5'-hslUH und 3'-hslU und einem 1:1 Gemisch der Produkte aus PCR-Reaktion 1 und 2 als Template wurde eine weitere PCR angesetzt, in der dann das Volllängekonstrukt mit Mutante entstand.

4.1.5.2 Mutagenese-Strategie-2

Durch den Austausch von R325 in K oder E wurden zusätzliche Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SacI und HindIII in HslUHis erzeugt. Wie in Strategie-1 beschrieben, wurden durch zwei PCR-Reaktionen zwei DNA-Fragmente erzeugt. Doch im Gegensatz dazu überlappten sich die Fragmente hier nicht. Da hier die Schnittstelle am Ende vom vorderen Fragment gleich der vorderen Schnittstelle vom hinteren Fragment war, konnten diese nacheinander durch Einklonieren in einen Vektor verbunden werden.

Für die E321Q konnte in der Nähe der Mutagenesestelle zusätzlich zur Mutante durch eine stille Punktmutante eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease SalI erzeugt werden und dann, wie oben beschrieben, zwei Fragmente nacheinander einkloniert werden.



Figur 4.1.5.1.1: Mutagenese-Strategie 1

Das Protein der HslU-Mutante R393K war unlöslich und das der HslU-Mutante R325K band unspezifisch an die Säule beim Aufreinigen. Beide Konstrukte wurden nicht mehr weiterverfolgt.

4.1.6 Enzymatische Reaktionen an DNA

4.1.6.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA und zum Einklonieren von PCR-Produkten in Plasmide ist ein Restriktionsverdau notwendig. Dabei wurde ein Reaktionsansatz mit ungefähr 1 bis 2 µg DNA, 10 units Restriktionsendonukleasen, 1/10 Endvolumen des vom Hersteller der Enzyme empfohlenen 10 x Puffer gemischt und Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktionen wurden bei 37 °C in 2 – 4 h inkubiert. Für eine nachfolgende Ligationsreaktion müssen die Restriktionsendonukleasen durch Gelelektrophorese oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) abgetrennt werden.

4.1.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die geschnittenen Gene werden durch eine Ligationsreaktion in ein Plasmid einkloniert. Diese Reaktion wird durch das Enzym Ligase aus dem Bakteriophagen T4 unter ATP-Verbrauch katalysiert. Der Ligationsansatz enthielt ungefähr 100 ng geschnittener Vektor, viermal mehr Insert als Vektor, 1/10 Endvolumen des vom Hersteller der Enzyme empfohlenen 10 x Puffer und 1 µl Ligase. Das Volumen wurde auf 25 µl aufgefüllt und bei 16 °C über Nacht inkubiert.

4.1.7 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Mini- oder Midipräparation wurden die Plasmid-Kits von Qiagen (Hilden) verwendet. Diese basieren auf der alkalischen Lyse der Bakterien durch eine NaOH/SDS-Behandlung und einer Ausfällung von genomischer DNA und Proteinen durch KOAc. Die DNA wird durch Adsorption an eine Silikatmatrix ähnlich wie bei den Kits zur Reinigung von PCR-Produkten von Verunreinigungen abgetrennt.

4.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Das Absorptionsmaximum für DNA liegt bei 260 nm: Die Konzentration berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{c}{\mu\text{g} / \mu\text{l}} = OD_{260\text{nm}} * \frac{V}{20}$$

In der Formel stehen c für die gesuchte DNA-Konzentration und V für die Verdünnung der Probe, die in einer UV-durchlässigen Quarzküvette (Hellma, Müllheim) der Dicke 1cm gemessen wird.

4.1.9 Sequenzierung gereinigter Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen der Mutanten wurden mit der Kettenabbruch-Methode [Sanger, 1977] durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide. Dabei wird der zum Template komplementäre Strang, ausgehend vom Sequenzierprimer, solange durch Deoxynukleotide verlängert, bis zufällig ein beigemischtes fluoreszenzmarkiertes Dideoxynukleotid eingebaut und so die Kette abgebrochen wird. Durch Gelelektrophorese und anschließendes Auslesen der Fluoreszenz des Abbruchnukleotides in einem DNA-Sequenator (Model 373, Applied Biosystems, Foster City, USA) kann die Sequenz bestimmt werden. Der Mix aus thermostabiler Polymerase und den Deoxy- und Dideoxynukleotiden ist als Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystem, Foster City, USA) kommerziell erhältlich. Für den Reaktionsansatz werden 4 µl Big Dye Terminatormix, 3,5 pmol Primer und 0,6 µg Template gemischt, mit Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und folgendem PCR-Programm mit 30 Zyklen unterworfen:

95°C für 30s
50°C für 20s
62°C für 4min

4.2 Arbeiten mit Bakterien

4.2.1 Plattenkulturen

Zur Anzucht von Bakterien wird ein festes Trägermaterial verwendet. Dazu wurde LB-Medium mit 15 g/l Agar autoklaviert. Durch das Erhitzen löst sich der feste Agar. Nach dem Abkühlen auf etwa 55°C werden zur Propagierung von Plasmiden 50 µg/ml Ampicilin zugegeben. Das Medium wird dann auf sterile Petrischalen verteilt und getrocknet. Die Platten werden bei 4 °C gelagert.

LB-Medium: 10g BactoTrypton
 5g Hefeextrakt
 10g NaCl
 mit H₂O ad 1l

4.2.2 Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB-Medium wurde nach dem Abkühlen und Zugabe von 50 µg/ml Ampicilin mit einer Bakterienkolonie von einer Plattenkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden für HslV und HslUHis/HslUHis-Mutanten bei 37 °C, für Sula-MBP bei 30 °C inkubiert.

4.2.3 Fermentation von *E.coli*

Für die Expression von HslV und HslUHis/HslUHis-Mutanten wurden die *E.coli* BL21(DE3)-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden frisch transformiert (4.3.2) und auf eine Agar-Platte mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen. Mit einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur (100 ml) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 1,0 angezogen. Danach wurden mehrere 2 l Schikanekolben mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 1,5 kultiviert. Danach wurde mit 1mM IPTG Endkonzentration induziert und 4 h expremiert.

Die Expression von SulA-MBP wurde nach dem Protokoll von Higashitani [Higashitani, 1997] durchgeführt.

4.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli*

4.2.4.1 RbCl-chemisch kompetente Zellen

Chemisch kompetente Bakterien, die mit großer Effizienz Plasmide aufnehmen können, wurden hergestellt, indem eine Kultur in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen wurde. 50ml der Kultur wurden dann 5min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4000 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde anschließend in 20 ml TFB I resuspendiert und nach 5 min auf Eis erneut abzentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde dann vorsichtig in 2 ml TFB II resuspendiert, in Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt:

<u>Transforming buffer I (TFB I):</u>	30mM KAc	0,29g / 100ml
	100mM RbCl	1,21g / 100ml
	10mM CaCl ₂	0,14g / 100ml
	50mM MnCl ₂ x 2H ₂ O	0,81g / 100ml
	15%(v/v) Glycerin	

Der pH 5,8 wurde mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

<u>Transforming buffer II (TFB II):</u>	10mM Pipes	0,30g / 100ml
	75mM CaCl ₂	1,1g / 100ml
	10mM RbCl ₂	0,12g / 100ml
	15%(v/v) Glycerin	

Der pH 6,5 wurde mit 1M KOH eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

4.2.4.2 Elektrokompente Zellen

Höhere Transformationsraten können mit elektrokompenten Zellen erzielt werden. Zu ihrer Herstellung wurde das Protokoll von Calvin und Hanawalt [Calvin, 1988] modifiziert. Zunächst werden nach Protokoll in 11 SOB-Medium Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 gezogen. Die Zellen werden anschließend zweimal in eiskaltem 1%(v/v) Glycerin statt

10 % (v/v) Glycerin gewaschen, dann in 2ml eiskaltem 1%(v/v) Glycerin resuspendiert, in 100µl-Aliquots schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

SOB:

20g BactoTrypton
5g Hefeextrakt
0,584g NaCl
0,186g KCl
H ₂ O ad 1l

4.2.5 Transformation kompetenter *E. coli*

4.2.5.1 Chemisch kompetente Zellen

Für die Transformation chemisch kompetener Zellen mischt man ungefähr 1 µg DNA mit 4µl β-Mercaptoethanol und 100µl Zellen und inkubiert den Ansatz 45min lang auf Eis. Dabei adsorbiert die DNA an die Zellwand. Die eigentliche Transformation erfolgt im Anschluß daran durch Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 45s. Danach werden die Zellen auf Eis wieder gekühlt. Nach einer Erholungsphase von 90 min nach Zugabe von 900 µl LB-Medium ohne Antibiotika bei 37 °C werden die Zellen abzentrifugiert und ein Teil des Mediums abgenommen und im restlichen Medium resuspendiert und auf einer Agar-Platte mit der üblichen Ampicilinmenge ausplattiert.

4.2.5.2 Elektrokompente Zellen

Für die Elektroporation wurden DNA-Proben (ungefähr 1 µg) durch Dialyse auf VS-Membranen (Millipore, Eshborn) gegen bidestilliertes Wasser vorbereitet, da die Transformationsrate umso höher ausfällt, je geringer die Leitfähigkeit der zu transformierenden DNA ist und dann mit 100 µl elektrokompenter Zellen gemischt, in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1mm (Bio-Rad, München) gefüllt und in einem Elektroporator der Firma Stratagene (Modell 1000) transformiert. Bei einer angelegten Spannung von 1600V lag die Zeitkonstante für die Entladung zwischen den „Kondensatorplatten“ typischerweise zwischen 4 und 5s.

4.3 Arbeiten mit Proteinen

4.3.1 Gelelektrophorese

4.3.1.1 Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Für die Gelelektrophorese werden Proteinproben 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und kurz auf 95 °C erhitzt. Wenn jedoch die Proteinkonzentration zu niedrig oder Kaliumionen anwesend sind, die mit SDS unlösliche Komplexe bilden, kann durch TCA-Fällung aufkonzentriert bzw. umgepuffert werden. Dabei wird durch Zugabe von 72%(w/v) Trichloressigsäure im Verhältnis 5:1 zur Probe das Protein ausgefällt, abzentrifugiert und solange mit Neutralisationpuffer gewaschen, bis kein Farbumschlag von blau nach gelb mehr erfolgt. Die Probe wird dann erneut abzentrifugiert, das Pellet Auftragspuffer aufgenommen und kurz auf 95 °C erhitzt.

Neutralisationspuffer:

50mM Tris/HCl pH 6,9
70%(v/v) Ethanol
Spur Bromphenolblau

Diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow

Die verwendete Methode ist eine Modifikation der Originalvorschrift von Schägger und Jagow [Schägger, 1987]. Es wurden jeweils acht 9 cm breite und 8,5 cm hohe Minigele mit einer Dicke von 1mm auf einmal in einer Gelgießkammer (Eigenbau, Max-Planck-Institut Martinsried) gegossen. Das Trenngel wurde für die Zeit des Auspolymerisierens mit Butanol überschichtet, das zuvor mit Wasser gesättigt wurde, damit die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel geglättet wurde.

<u>Trenngel für 8 Minigele (12%):</u>	<u>Trenngel für 8 Minigele (15%):</u>	<u>Sammelgel für 8 Minigele (6%):</u>
36ml Protogellösung	45ml Protogellösung	9,6ml Protogel
30ml Lösung B	30ml Lösung B	16ml Lösung B
15ml Glycerin	15ml Glycerin	
9ml H ₂ O bid	=	22,4ml H ₂ O bid
Entgasen	Entgasen	Entgasen
60µl TEMED	60µl TEMED	40µl TEMED
200µl 10%(w/v) APS	200µl 10%(w/v) APS	400µl APS

Protogellösung:

30%(w/v) Acrylamid
0,8%(w/v) Bisacrylamid

Lösung B:

3M Tris 363g/l
0,3%(w/v) SDS 3g/l
pH 8,9 mit HCl

Anodenpuffer (10x):

2M Tris 240g / l
pH 8,9 mit HCl

Kathodenpuffer (10x):

1M Tris 120g / l
1M Tricine 180g / l
1%(w/v) SDS 1g
pH nicht einstellen

Probenpuffer (2x):

100mM Tris 0,12g / 10ml
100mM DTT 0,154g / 10ml
5 mM EDTA 0,019g / 10ml
20%(v/v) Glycerin 2,0 ml / 10ml
pH 6,8 mit Essigsäure
0,04%(w/v) Bromphenolblau

Diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Lämmli

Die Gelelektrophoresevorschrift nach Lämmli [Lämmli, 1970] bietet gegenüber der Gelelektrophorese nach Schägger den Vorteil, daß sie besonders große Proteine besser auf-trennt und daß ein einheitlicher Puffer für Anode und Kathode verwendet werden kann. Es wurden auch hier acht Gele im Format 9,0cm x 8,5cm x 0,1cm auf einmal gegossen und derselbe Probenpuffer wie für Schäggergele verwendet.

<u>Trenngel für 8 Minigele (12%):</u>	<u>Trenngel für 8 Minigele (15%):</u>	<u>Sammelgel für 8 Minigele (6%):</u>	<u>Laufpuffer (1x): (1l)</u>
36,0ml Protogel	45,0ml Protogel	9,6ml Protogel	3,0g Tris (25mM)
33,75ml 1M Tris pH 8,8	33,75ml 1M Tris pH 8,8	6,0ml 1M Tris pH 6,8	18,8g Glycin (250mM)
20,25ml H ₂ O bid	11,25ml H ₂ O bid	32,4ml H ₂ O bid.	1,0g SDS (0,1%)
0,1%(w/v) SDS	0,1%(w/v) SDS	0,1%(w/v) SDS	mit H ₂ O bid ad 1l
Entgasen	Entgasen	Entgasen	
200 µl 10%(w/v)APS	200µl 10%(w/v) APS	500µl 10%(w/v) APS	
60µl 10%(w/v) TEMED	60µl 10%(w/v) TEMED	50µl 10%(w/v)TEMED	

4.3.2 Blotting

Zur weitem Charakterisierung von Proteinen wurde eine Sequenzierung durch Edman-Abbau durchgeführt. Nach der Auftrennung durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese wurden getrennte Proteine zunächst in einer "Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell-Apparatur" (Bio-Rad, München) auf PVDF-Membranen (Porendurchmesser 0,45 µm, Millipore, Eschborn) geblottet. In dieser Apparatur wurden luftblasenfrei überschichtet (von unten nach oben, von der Anode zur Kathode):

- 8 Lagen Whatman-Papier (3MM, Whatman), in Transferpuffer getränkt
- die PVDF Membran, 1min in Methanol, dann in Transferpuffer getränkt
- das unfixierte SDS-Gel, 1min in Transferpuffer getränkt
- 8 Lagen Whatman-Papier (3MM, Whatman), in Transferpuffer getränkt

Anschließend wurde 2h lang ein Strom von 0,65mA / cm² Gel angelegt.

Transferpuffer	39mM Glycin	2,9g
	0,037%(w/v) SDS	3,7ml 10%SDS
	20% Methanol	200ml Methanol
	48mM Tris, pH 8,3	48 ml 1M Tris, pH 8,3 mit H ₂ O bid. ad 1l

4.3.3 Proteinfärbung

4.3.3.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die höchste Färbeempfindlichkeit von Proteinen in Polyacrylamidgelen wird durch Silberfärbung erzielt. Es können Proteinmengen im ng Bereich nachgewiesen werden. Nachteil dieser Methode ist, daß die Reaktionsprodukte von DTT und 2-Mercaptoethanol Banden vortäuschen können.

Fixierung (1h)	300ml Ethanol 150ml Eisessig mit H ₂ O bid. ad 1000 ml
Inkubation (1h-12h)	34,02 g NaAc*3 H ₂ O, oder 20,51 NaAc 1 g Na ₂ S ₂ O ₃ 250ml Ethanol 2,5 ml Glutaraldehyd mit H ₂ O bid. ad 500 ml
Waschen (30min)	3 x 10 min in H ₂ O bid.
Färben (30min)	0,5 g Silbernitrat 150 µl Formaldehyd mit H ₂ O bid. ad 500 ml
Entwickeln	12,5 g Natriumcarbon mit H ₂ O bid. ad 1000 ml 150 µl Formaldehyd pH 11,5 mit Carbonat/Hydrogencarbonat
Stoppen	18,6 g EDTA mit H ₂ O bid. ad 1000 ml

4.3.3.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Färbung ist weniger aufwendig und schneller als die Silberfärbung. Der Nachteil der Methode ist die gegenüber der Silberfärbung geringere Empfindlichkeit. Die Mindestmenge Protein für die Sichtbarmachung einer Bande liegt bei 1 µg Protein.

Färber 250 ml Ethanol (technisch)	80 ml Eisessig 2,5g Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva) mit H ₂ O bid. ad 1000 ml
-----------------------------------	--

Entfärber: 250 ml Ethanol
 80 ml Eisessig
 670 ml H₂O bid.

4.3.3.3 Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen

Der Färber für die zur Sequenzierung auf die hydrophoben PVDF-Membranen geplotteten Proteine setzt sich genauso zusammen wie der Coomassie-Färber für Polyacrylamidgele, aber anstelle von Ethanol, das den Edmann-Abbau stört, wird Methanol verwendet, außerdem wird statt des wasserlöslichen Coomassie Blue R250 das Coomassie Blue G250 verwendet.

Färber: 50% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure
 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva)

Entfärber: 30% (v/v) Methanol
 7% ml Eisessig
 670 ml H₂O bid.

4.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.3.4.1 nach Lowry

Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry [Lowry, 1951] bestimmt und basiert auf der Molybdänblau-Reaktion. Dabei wird ein sechswertiges Molybdän bzw. Wolfram durch Tyrosin-, Tryptophan-, Cystein- und Histidinreste zum kolloidal gelösten Mischoxid aus MoO₂ und MoO₃ reduziert. Dabei kann durch Cu²⁺ die Empfindlichkeit der Reaktion erhöht werden. Mit dieser Methode können 5-50 µg Protein in einem Volumen von 300 µl nachgewiesen werden.

Lösung A: 2% Natriumkarbonat, 0,1M NaOH , 0,16% Natriumtartrat
Lösung B: 0,5% Kupfersulfat
Lösung C: 400µl Lösung B + 20ml Lösung A (kurz vor Gebrauch mischen)
Lösung D: 50% Folin-Cioc
Lösung E: 2% Natriumkarbonat, 0,1M NaOH , 0,16% Natriumtartrat
Lösung F: 0,1mg/ml BSA
Lösung G: 1mg/ml BSA

BSA (µg)	0	5	7,5	10	15	20	30	35	40	45	50
Lösung (µl)	-	F: 50	F: 75	F: 100	G: 15	G: 20	G: 30	G: 35	G: 40	G: 45	G: 50
H ₂ O bid. (µl)	300	250	225	200	285	280	270	265	260	255	250

300 µl Probe bzw. Eichlösung wurde mit 1 ml Lösung C gemischt und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Lösung D und 100µl Lösung E zugegeben und 3 min inkubiert. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte durch Absorptionsmessung bei 740 nm.

4.3.4.2 nach Bradford

Eine weitere Methode zur Konzentrationsbestimmung ist die nach Bradford [Bradford, 1976]. Im Gegensatz zu der von Lowry benutzten Reaktion stört hier die Anwesenheit von ATP nicht. Es wurde wie folgt vorgegangen: Die Proteinprobe (0,1µg bis 15µg) wurde mit 200 µl Bradfordreagenz (Biorad, München) vermischt und mit H₂O bid. auf 1ml aufgefüllt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm vermessen und mit der Absorption einer Serie von Eichlösungen verglichen.

4.3.4.3 durch Absorptionsmessung

Eine weitere Methode der Konzentrationsbestimmung von Proteinen ist die Messung des Absorptionsmaximums bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge hängt der Extinktionskoeffizient im wesentlichen nur von der Proteinkonzentration und der Anzahl der Tryptophane und Tyrosine im Protein ab. Näherungsweise gilt [Mach, 1992]:

$$\epsilon_{280nm} = (5540W + 1480Y) \cdot \frac{1}{Mcm}$$

Für eine 1 cm dicke Küvette ergibt sich daraus die folgende Formel für die OD₂₈₀:

$$OD_{280nm} = \frac{c}{mg/ml} \frac{5,54W + 1,48Y}{m/kDa} \quad \text{bzw.} \quad \frac{c}{mg/ml} = OD_{280nm} \frac{m/kDa}{5,54W + 1,48Y}$$

Dabei ist W die Anzahl der Tryptophanreste, Y die Anzahl der Tyrosinreste, c die Proteinkonzentration und m das Molekulargewicht.

4.3.5 Massenspektroskopie

Eine weitere Technik zur Charakterisierung von Proteinen ist die Massenspektroskopie. Sie wurde neben der DNA-Sequenzierung benutzt, um die Modifikation der Aminosäuren der einzelnen Mutanten zu überprüfen. Dafür standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Electrospray-Ionisation (ESI), die sehr genau ist, aber durch Salze und Detergenzien gestört wird, und Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI), die unempfindlicher, aber dafür nicht durch Salze und Detergenzien gestört wird. Die Proben wurden mit ES-Massenspektroskopie in der Abteilung für Proteinanalytik des Max-Planck-Instituts für Biochemie untersucht.

Bei dieser Methode wird die sich in wässriger Lösung befindende Probe in einem starken elektrostatischen Feld zwischen der Kapillarspitze, aus der die Probe austritt, und einer Gegenelektrode, in der sich eine Öffnung befindet, versprüht. Durch das hohe positive oder negative Potential wird eine feine Zerstäubung und eine effektive Ionisierung bewirkt. Die so entstandenen Ionen gelangen durch die Öffnung in ein Quadrupol-Massenspektrometer, in dem sie je nach Masse unterschiedlich abgelenkt werden.

4.3.6 Aktivitätstests

4.3.6.1 Peptidaseassay

Zur Bestimmung der Peptidase-Aktivität von HslVHis und HslUHis/HslUHis-Mutanten gegen das chromogene Substrat Z-Gly-Gly-Leu-AMC wurde in einem zu Rohrwild [Rohrwild, 1996] modifizierten Reaktionsansatz von 100 µl 0.4 µg HslVHis, 1 µg HslUHis, 4 nmol Z-Gly-Gly-Leu-AMC und 1 mM ATP γ S eingesetzt. Der Reaktionspuffer enthielt 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 2,5 µl DMSO (Z-Gly-Gly-Leu-AMC ist in DMSO löslich). Die Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, dann mit 900 µl 1%(w/v) SDS gestoppt. Im Fluoreszenzspektrometer (Modell SFM 25, Kontron Instruments, Neufahrn) wurde die Emissionsintensität bei 460 nm bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm quantifiziert. Als 100 % Probe wurden 4 nmol freies AMC eingesetzt.

4.3.6.2 Casein-Degradationsassay

Die Bestimmung der Protease-Aktivität von HslVHis und HslUHis/HslUHis-Mutanten gegen Casein wurde in einem zu Huang [Huang, 1997] modifizierten Protokoll durchgeführt. Das radioaktive α -Casein wurde durch FITC-Casein oder Resorufin gelabeltes Casein (Sigma, Deisenhofen) [Twining, 1984; Matsuka, 1999] ersetzt und die Protein-Menge variiert. Der Reaktionsansatz von 100 μ l enthielt 10 μ g HslVHis, 25 μ g HslUHis, 10 μ g FITC-gelabeltes Casein und 1 mM ATP γ S. Der Reaktionspuffer setzte sich aus 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂ zusammen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 1mM Calpain-Inhibitor I Endkonzentration beendet. Die Reaktionsprodukte wurden auf einer HPLC-Säule (X-TERRA-TM-C8, 5 μ m, 3,9 X 150 mm) aufgetrennt und bei 440 nm Absorptionswellenlänge analysiert.

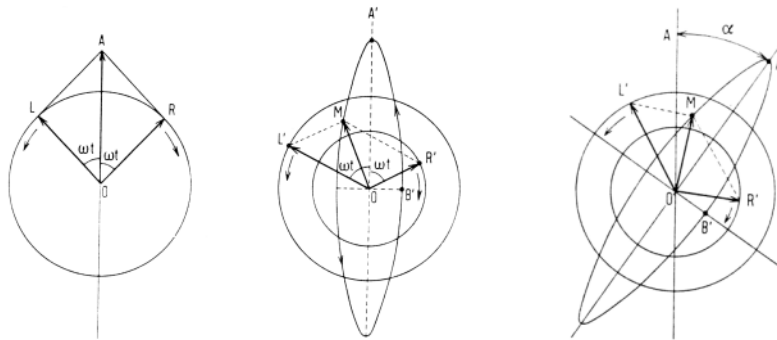
4.3.6.3 ATPase-Assay

Die ATPase-Aktivität von HslUHis und HslUHis-Mutanten wurde nach einem Protokoll von Lanzetta [Lanzetta, 1979] bestimmt. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, daß anorganisches Phosphat in einem Komplex mit Malachitegrün (Sigma, Deisenhofen) und Ammoniumheptamolybdat (Merk, Darmstadt) gebunden wird, der bei 660 nm absorbiert. Die gemessenen Werte werden mit denen einer Serie von Eichlösungen verglichen. Dazu müssen 68 mg Malachitegrün in 15 ml H₂O und 2,1 g Ammoniumheptamolybdat in 50 ml 4 N HCl gelöst werden. Beide Lösungen werden gemischt und mit bidest. H₂O auf 200 ml aufgefüllt und auf Eis 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 250 μ l 20 %iges Triton-X-100 auf 50 ml erhält man das Farbreagenz.

Im Reaktionsansatz von 100 μ l waren 10 μ g HslVHis, 25 μ g HslUHis, 10 μ g Gelatin, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 7,5, enthalten. Dies wurde bei 37 °C 10, 20, 30 min inkubiert und dann mit 800 μ l Farbreagenz und 100 μ l 34 % (v/v) Natriumcitrat gemischt.

4.4 Zirkulardichroismus

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie basiert auf der ungleichen Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht (Cotton-Effekt) durch optisch aktive Moleküle. Substanzen, die diese Eigenschaft haben, besitzen kein Symmetriezentrum und keine Spiegelebene. Sie weisen dadurch die Besonderheit auf, daß sie in zwei enantiomorphen Formen vorkommen.



Figur 4.4.1: (a) zirkular polarisiertes Licht (b) elliptisch polarisiertes Licht (c) elliptisch polarisiertes Licht mit gekippter Achse [Velluz, 1965]

Zirkular polarisiertes Licht kann als eine elektromagnetische Welle beschrieben werden, deren elektrischer Feldvektor, in eine Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung projiziert einen Kreis beschreibt. Jede geradlinige Schwingung kann aus zwei entgegengesetzt umlaufenden Kreisschwingungen mit halber Amplitude und gleicher Schwingungszahl zusammengesetzt werden. Mit dieser Zerlegung einer linear polarisierten elektromagnetischen Welle kann man das Drehverhalten optisch aktiver Substanzen erklären. Denn beim Durchgang durch ein aktives Medium breiten sich links- und rechts polarisiertes Licht unterschiedlich schnell aus, da dieses in verschiedenen Richtungen verschieden große Brechungsindizes hat. Es entsteht elliptisch polarisiertes Licht mit einer Phasendifferenz von $\delta = \pi(n_L - n_R)d/\lambda = \alpha$. Für einige Wellenlängen sind die Brechzahlen gleich, doch generell sind diese verschieden, d. h. die Hauptachsen der Ellipse sind um $\delta/2$ gekippt.

Mittels eines $\lambda/4$ -Plättchens kann nach Verlassen des Mediums durch einen Phasensprung von $\pi/2$ das elliptisch polarisierte Licht in linear polarisiertes umgewandelt werden, dessen Schwingungsebene um $\delta/2$ gedreht ist. Die Drehung ist positiv (negativ),

wenn die rechts (links) zirkulare Welle die größere (kleinere) Geschwindigkeit oder die kleinere (größere) Brechzahl besitzt.

Die Drehung α der Schwingungsebene ist demnach eine Folge der zirkularen Doppelbrechung. Diese ist wellenlängenabhängig, zeigt also Dispersion. Diese Dispersion ist durch Absorptionsstellen (Dipoleigenfrequenzen) bedingt. In der Nähe der Absorptionsstelle ändert sich die Brechzahl erheblich. Die Dispersionskurve durchläuft nach einem raschen Anstieg ein Maximum, wechselt nach einem Nullpunktdurchgang ihr Vorzeichen und durchläuft ein Minimum. Die Absorptionskurve in diesem Bereich des Nullpunktes zeigt ein Maximum. Wegen seiner unterschiedlichen Absorption von rechts- und linkspolarisiertem Licht ist das austretende Licht elliptisch polarisiert (Cotton-Effekt). Absorptionskoeffizient ϵ und Brechzahl n können über die Kramer-Kronig-Relation ineinander umgerechnet werden.

Gemessen wird die Differenz in der Absorption zwischen links- und rechtspolarisiertem Licht mit

$$\Delta A = \log(I_0/I_L) - \log(I_0/I_R),$$

wobei $I_L = I_0 e^{-\epsilon_L d}$ und $I_R = I_0 e^{-\epsilon_R d}$ die Intensitäten für rechts- und linkspolarisiertes Licht, $\epsilon_{R/L}$ die entsprechenden Absorptionskoeffizienten sind und d die Dicke der Küvette ist. Durch Einsetzen der Intensitäten und Auflösen nach $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ergibt sich $\Delta\epsilon = \Delta A / (c \cdot l)$. Daraus kann die mittlere Elliptizität pro Rest

$$\Theta_R = (\Delta A \cdot F) / c,$$

mit $F = (\text{Sensitivität} \times M_{AS} \times f) / d$ bestimmt werden (c ist die Proteinkonzentration in mg/ml, M_{AS} ist das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren, d ist die Dicke der Küvette, f ist ein gerätespezifischer Korrekturfaktor, der durch Eichung mit Epian-drosteron ermittelt wurde).

CD-Spektren in der Fern-UV-Region (170-250 nm) werden von Peptidbindungen dominiert und enthalten Informationen über die Sekundärstruktur. CD-Spektren in der Nah-UV-Region (250-350 nm) werden von der Absorption der aromatischen Aminosäuren dominiert und enthalten Informationen über Tertiärkontakte in der gefalte-

ten Struktur. Die asymmetrische Umgebung geht verloren, wenn sich die Aromaten in der wässrigen Umgebung außerhalb des Proteins befinden oder die Tertiärstruktur fehlt. Zur Bestimmung der Bindung von ATP- und die seiner Derivate an HslU/Mutanten wurde im nahen UV gemessen, da die benutzten Nukleotide bei 259 nm absorbieren [Prodromou, 2000].

Für die Wechselwirkung mit elektromagnetischen Wellen sind in den Aromaten die π -Elektronen verantwortlich, die durch einen magnetischen Dipolübergang in ein antibindendes π^* -Orbital angeregt werden können. Durch Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren in der Umgebung wird eine Asymmetrie in dem Orbital erzeugt und es entsteht ein zusätzliches elektrisches Dipolmoment. Durch das Zusammenwirken beider Dipolmomente wird ein elektrisches Quadropolmoment erzeugt, das die Polarisationsenebene des Lichtes dreht. Dabei sind für Phenylalanin bei 260 nm, Tyrosin bei 295nm und Tryptophan bei 280nm Übergänge zu beobachten.

4.5 Kristallographische Methoden

4.5.1 Kristallisation

Zur Kristallisation von HslUHis, HslUHis/HslVHis und HslUHis-Mutanten/HslVHis wurde die *sitting drop* Methode angewandt. Bei dieser Technik wird in einer MVD/24 Kristallisationsplatte (Charles Supper Co., Natick, MA, USA) 0,5 ml Fällungspuffer als Reservoir in die Vertiefung gegeben. Das zu kristallisierende Protein wird mit dem Fällungspuffer gemischt und in die etwas erhöhte kleine Vertiefung gegeben. Die gesamte Platte wird mit CrystalClear-Folie (Manco Inc., Avon, Ohio, USA) abgedichtet. Durch Dampfdiffusion entzieht nun der höher konzentrierte Fällungspuffer im Reservoir dem Proteintropfen langsam das Wasser. Dadurch wird das Protein langsam bis zur Löslichkeitsgrenze aufkonzentriert, wodurch Kristallkeimbildung möglich ist. Oberhalb der Grenze entstehen Aggregate, unterhalb ist das Protein in Lösung.

Die Bedingungen, unter denen Proteine auskristallisieren, werden durch Screenen von Bedingungen gefunden, die in der Vergangenheit bereits besonders erfolgreich waren oder kommerziell von Hampton (Laguna Niguel, USA) erhältlich sind. Sind einmal Start-

bedingungen gefunden, so können diese systematisch durch Feinscreenen verbessert werden.

4.5.2 Kristallaufbau

Kristalle sind dreidimensionale periodische Wiederholungen von einzelnen Atomen oder Atomgruppen. Die Atome einer Atomgruppe können verschieden sein, aber die Zusammensetzung und die räumliche Anordnung innerhalb einer Gruppe müssen identisch sein. Ordnet man jeder Atomgruppe einen Gitterpunkt zu, so entsteht ein Raumgitter. In diesem Raumgitter lassen sich drei Vektoren \vec{a}_1 , \vec{a}_2 , \vec{a}_3 angeben, durch die von jedem Punkt des Raumgitters die anderen Gitterpunkte durch eine Translation $\vec{R} = n_1 \vec{a}_1 + n_2 \vec{a}_2 + n_3 \vec{a}_3$, erreicht werden können. Dabei sind n_1 , n_2 , n_3 ganzzahlige Werte. \vec{a}_1 , \vec{a}_2 , \vec{a}_3 werden als primitive Translationen bezeichnet. Durch die primitiven Translationen wird ein Parallelepiped, die sogenannte Elementarzelle, aufgespannt. Neben der Translationssymmetrie kann das Raumgitter auch Dreh- und Spiegelsymmetrien besitzen. Durch eine Symmetriebetrachtung läßt sich zeigen, daß nicht mehr als 14 Gitter gebildet werden können, die 7 verschiedenen Kristallsystemen zugeordnet werden können und allgemein als Bavaris-Gitter bezeichnet werden (Kristallsysteme: triklin, monoklin, orthorhombisch, hexagonal, rhomboedrisch/trigonal, tetragonal, kubisch).

Die Kanten des Bavarisgitters spannen ein Koordinatensystem auf. In einer Symmetrieuntersuchung werden nun alle kristallographischen Symmetrien, die als einziges Symmetrieelement eine Achse ohne Translationskomponente haben, aufgestellt. In einem weiteren Schritt werden die Symmetrieelemente miteinander kombiniert, wobei nur solche Kombinationen erlaubt sind, durch deren Anwendung der Ausgangspunkt wieder erreicht wird. Die Gesamtheit dieser axialen Symmetrien ergeben die 32 kristallographischen Punktgruppen. Zu den Raumgruppen gelangt man dann, indem man Drehungen, Schraubungen, Spiegelungen, Inversionen, Gleitspiegelungen und Gittertranslationen miteinander kombiniert, so daß keine Widersprüche entstehen. Durch Anwendung von Symmetrieoperatoren auf die kleinste sich wiederholende Einheit, asymmetrische Einheit genannt, kann ein Raumgitter aufgebaut werden. Wenn zwei Drehungen die gleich

Drehkomponente haben, so heißen sie isogonal. Deshalb gibt es zu jeder Punktgruppe einen Satz isogonaler Raumgruppen, der mindestens eine Raumgruppe enthält. Insgesamt erhält man 230 Raumgruppen, von denen 65 enantiomer sind und für chirale Moleküle in Frage kommen.

4.5.3 Beugung an Kristallen

4.5.3.1 Reziprokes Gitter

Für die Untersuchung der Beugung an Kristallen ist es zweckmäßig, an der Stelle des eigentlichen Kristallgitters (direkter Raum) das dazugehörige reziproke Gitter (reziproker Raum) zu benutzen. Dabei gilt zwischen den primitiven Translationen $\vec{a}_1, \vec{a}_2, \vec{a}_3$ im Kristallgitter und den primitiven Translationen im reziproken Gitter $\vec{b}_1, \vec{b}_2, \vec{b}_3$ folgende Beziehung:

$$\vec{b}_1 = 2\pi \frac{\vec{a}_2 \times \vec{a}_3}{\vec{a}_1 \cdot \vec{a}_2 \times \vec{a}_3}, \quad \vec{b}_2 = 2\pi \frac{\vec{a}_3 \times \vec{a}_1}{\vec{a}_1 \cdot \vec{a}_2 \times \vec{a}_3}, \quad \vec{b}_3 = 2\pi \frac{\vec{a}_1 \times \vec{a}_2}{\vec{a}_1 \cdot \vec{a}_2 \times \vec{a}_3}.$$

Der Vektor \vec{b}_1 z. B. steht senkrecht auf der von \vec{a}_2, \vec{a}_3 aufgespannten Fläche. Es gilt $\vec{a}_i \cdot \vec{b}_k = 2\pi\delta_{ik}$. Die Längen der Gitterabstände im Kristallgitter sind umgekehrt proportional zu den Längen im reziproken Raum. Durch die Translation $\vec{G} = h\vec{b}_1 + k\vec{b}_2 + l\vec{b}_3$ kann jeder Punkt im reziproken Raum erreicht werden. h, k, l werden auch Millersche Indizes genannt.

4.5.3.2 Laue-Gleichungen und die Ewaldkugel

Die Beugung an Kristallen kann durch die Laue-Gleichungen beschrieben werden. Bei der Herleitung geht man von zwei Gitterpunkten aus, die durch die primitive Translation \vec{a}_i voneinander entfernt sind, und überlagert ihre Streustrahlung. Werden die Wellen-

vektoren $\vec{k}_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \vec{s}_0$, $\vec{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \vec{s}$ eingesetzt, so erhält man die entsprechenden Gleichungen im reziproken Raum. Für ganzzahlige n_1, n_2, n_3, h, k, l tritt konstruktive Interferenz auf, für halbzahlige destruktive:

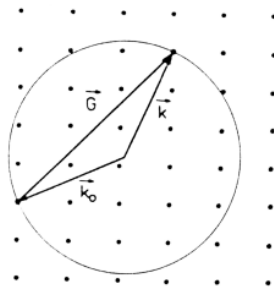
direkter Raum:

$$\begin{aligned} \vec{a}_1(\vec{s}_0 - \vec{s}) &= n_1 \lambda \\ \vec{a}_2(\vec{s}_0 - \vec{s}) &= n_2 \lambda \\ \vec{a}_3(\vec{s}_0 - \vec{s}) &= n_3 \lambda. \end{aligned}$$

reziproker Raum:

$$\begin{aligned} \vec{b}_1(\vec{k}_0 - \vec{k}) &= h \\ \vec{b}_2(\vec{k}_0 - \vec{k}) &= k \\ \vec{b}_3(\vec{k}_0 - \vec{k}) &= l \end{aligned}$$

Die Beugung der Röntgenstrahlen kann im Teilchenbild als elastische Streuung der Photonen am Kristallgitter betrachtet werden, da sich der Betrag des Photonenimpulses nicht ändert. Im reziproken Raum gilt als Auswahlregel $\vec{G} = \vec{k} - \vec{k}_0$, mit \vec{k}_0 als Wellenvektor des einfallenden Röntgenstrahles und \vec{k} als Wellenvektor des gebeugten Strahls. Graphisch läßt sich der Sachverhalt folgendermaßen darstellen: Im reziproken Raum wird ein beliebiger Gitterpunkt als Koordinatenursprung gewählt und der Vektor $-\vec{k}_0$ abgetragen. Seinen Endpunkt wählt man als Kugelmittelpunkt, deren Radius $k=2\pi/\lambda$ beträgt. Dies ist die Ewald-Kugel [Ewald, 1921]. Immer dann, wenn ein Gitterpunkt auf der Kugelhülle liegt, entsteht ein Beugungsreflex. Der gebeugte Röntgenstrahl weist dann in Richtung von $\vec{G} + \vec{k}_0 = \vec{k}$.



Figur 4.5.3.2.1: Ewald-Kugel [Kopitzki, 1989]

4.5.4 Matthews-Koeffizient [Matthews, 1968]

Hierbei wird das Volumen der Elementarzelle durch die Summe der molekularen Masse der Proteinmoleküle in Da dividiert. Der daraus erhaltene Wert wird Matthews-Koeffizient genannt. Dieser wird dann mit empirisch bestimmten Werten verglichen und einer bestimmten Anzahl von Molekülen in der asymmetrischen Einheit zugewiesen, bei der der Solventgehalt zwischen 30 % und 70 % liegt.

4.5.5 Strukturfaktoren und Fouriersynthese

Jedes Atom i am Ort x_i, y_i, z_i in einer Elementarzelle streut das einfallende Röntgenlicht während eines Beugungsexperiments und wird so Ausgangspunkt einer neuen Welle. Eine solche Streuwelle hat die Amplitude f_i (atomarer Streufaktor) und die Phase α_i . Für N Atome in einer Elementarzelle ergibt sich als resultierende Streuwelle:

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{i=1}^N f_i \exp[2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)] = A_{hkl} + iB_{hkl}$$

Der atomare Streufaktor hat die Form $f_i = \frac{2 \sin \Theta}{\lambda}$, da die Atome keine punktförmigen Gebilde sind, sondern wegen ihrer Elektronenwolke eine räumliche Ausdehnung besitzen. Wird außerdem die thermische Bewegung der Atome berücksichtigt, so muß der Temperaturfaktor B_i eingeführt werden. Dadurch entsteht folgende Beziehung, aus der ersichtlich wird, daß mit steigendem Temperaturfaktor die Amplitude sinkt:

$$f_{idyn} = f_{istat} \exp\left[-B_i \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right]$$

$|\vec{F}_{hkl}|$ wird Strukturfaktoramplitude des Reflexes hkl genannt und ihr Betrag berechnet sich wie folgt:

$$|\vec{F}_{hkl}| = \sqrt{A_{hkl}^2 + B_{hkl}^2}$$

Das Quadrat des Betrages $|\vec{F}_{hkl}|^2$, oder manchmal auch \vec{F}_{hkl} , wird Strukturfaktor genannt. Der Phasenwinkel α_{hkl} des Reflexes hkl berechnet sich nach folgender Formel:

$$\alpha_{hkl} = \arctan \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}}$$

Die Elektronendichteverteilung am Ort (x, y, z) läßt sich durch die Fouriersumation über die h, k, l errechnen.

$$\rho = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k |\vec{F}_{hkl}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) - \alpha_{hkl}]$$

Die Elektronendichte ist also eine inverse Fouriertransformierte der Strukturfaktoren, und die Strukturfaktoren sind die Fouriertransformierte der Elektronendichte.

4.5.6 Pattersonfunktion

Zur vollständigen Kristallstrukturbestimmung müssen sowohl Betrag als auch Phase aller \vec{F}_{hkl} bekannt sein. Ein Wendepunkt in der Kristallstrukturanalyse war die Frage, welche Eigenschaften einer Struktur allein durch die Beträge $|\vec{F}_{hkl}|$ bestimmt sind. Dazu wird \vec{F}_{hkl} mit ihrer konjugiert komplexen Größe \vec{F}_{hkl}^* multipliziert, und es entsteht eine Fourierreihe mit den Koeffizienten $|\vec{F}_{hkl}|^2$ [Patterson, 1934]. Im allgemeinen Fall gilt für zwei verschiedene Atome m, q:

$$\vec{F}_{hkl} \vec{F}_{hkl}^* = \sum_m \sum_q f_m f_q \exp\{i2\pi(h[x_m - x_q] + k[y_m + y_q] + l[z_m + z_q])\}$$

Die Vektoren, die zu den Atomlagen führen, erscheinen im Pattersonbild nicht direkt, es erscheinen nur Differenzvektoren, an deren Enden die Pattersonfunktion maximale Werte annimmt, wobei es zu jedem Vektor einen zweiten gibt, der inversionssymmetrisch zum ersten ist.

$$\overline{F_{hkl}} \overline{F_{hkl}}^* = \sum_m \sum_q f_m f_q \exp\{i2\pi(hu_{mq} + kv_{mq} + lw_{mq})\}$$

Eine Ableitung der Pattersonfunktion sind Elektronendichteprodukte. Dabei werden Elektronendichtewerte an der Position \vec{r} und an einer um \vec{u} verschobenen Position $\vec{r} + \vec{u}$ miteinander multipliziert und über alle \vec{r} aufintegriert. Die Pattersonfunktion ist also eine Selbstfaltung der Elektronendichteverteilung.

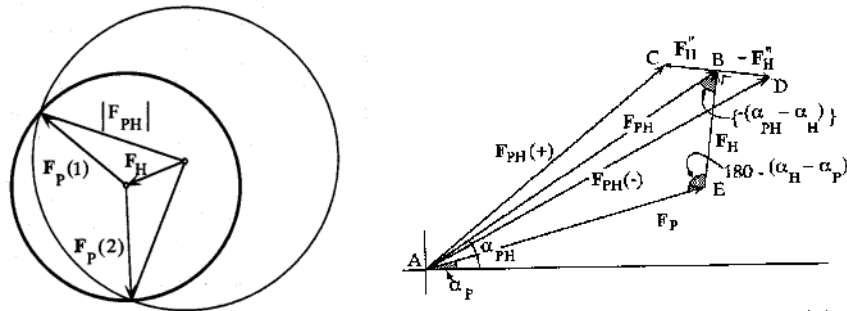
$$P(\vec{u}) = \int_r \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r} + \vec{u}) d\vec{r}$$

4.5.7 Phasenproblem

Aus obiger Formel für die Elektronendichteverteilung wird erichtlich, daß diese nur bestimmt werden kann, wenn die Amplitude und die Phase des Reflexes hkl bekannt sind. Die Intensität des Reflexes hkl kann direkt aus dem Diffraktionsbild bestimmt werden und die Amplitude daraus errechnet werden. Doch für die Phasenbestimmung sind weitere Schritte nötig, wie der Isomorphe Ersatz [Perutz, 1960], die Multiple Anomale Dispersion [Karle, 1986], der molekulare Ersatz oder direkte Methoden.

4.5.8 Isomorpher Ersatz

Beim isomorphen Ersatz wird eine lokale Änderung in der Elektronendichte herbeigeführt, indem ein Schwermetall im Kristall gebunden wird, oder die Methioninreste des Proteins durch Selenmethionin ersetzt werden, wobei die Zellkonstanten möglichst unverändert bleiben sollen (Isomorphismus).



Figur 4.5.8.1: (a) Hakerschnitt eines Derivatkristalls, (b) Argand-Diagramm eines Derivatkristalls

Für die Strukturfaktoren des nativen Proteinkristalls \vec{F}_P , des Derivates \vec{F}_{PH} und des Schwermetalls allein \vec{F}_H gilt folgender Zusammenhang:

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_P + \vec{F}_H$$

Dies kann graphisch durch einen Hakerschnitt dargestellt werden, siehe Figur 4.5.8.1b. Für den Strukturfaktor des Proteins \vec{F}_P und somit für den Phasenwinkel α_P gibt es zwei mögliche Lösungen. Rechnerisch kann α_P über den Kosinussatz bestimmt werden:

$$\alpha_P = \alpha_H + \cos^{-1} \left(\frac{|\vec{F}_{PH}|^2 - |\vec{F}_P|^2 - |\vec{F}_H|^2}{2|\vec{F}_P||\vec{F}_H|} \right)$$

Eine weitere Möglichkeit ist, die Phasen α_H der Schwermetallstrukturfaktoren \vec{F}_H aus den Positionen der Schweratome zu bestimmen, durch die Berechnung einer Differenz-Pattersonmap

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\Delta F_{iso}|^2 \cos[2\pi i(hu + kv + lw)], \text{ mit } |\Delta F_{iso}| = \left| \vec{F}_{PH} \right| - \left| \vec{F}_P \right|$$

Wie aus dem Argand-Diagramm in obiger Figur zu erkennen ist, kann \vec{F}_H und \vec{F}_{PH} auf \vec{F}_P projiziert werden. Die Differenz zwischen $|\vec{F}_{PH}|$ und $|\vec{F}_H|$ heißt $|\Delta F_{iso}|$.

Im Falle der anomalen Streuung (siehe Kapitel 4.6.10) kann eine anomale Pattersonmap berechnet werden. Für die Reflexe (h, k, l) und (-h, -k, -l) entstehen folgende Struktur-faktoren:

$$\vec{F}_{PH}(+) = \vec{F}_P + \vec{F}_H \quad \text{und} \quad \vec{F}_{PH}(-) = \vec{F}_P - \vec{F}_H .$$

In diesem Fall lautet die anomale Pattersonmap:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\Delta F_{ano}|^2 \cos[2\pi i(hu + kv + lw)],$$

mit $\Delta |F_{ano}| = \left\{ |\vec{F}_{PH}(+)| - |\vec{F}_{PH}(-)| \right\} \frac{f'}{2f''}$

Durch die Matthews Pattersonsummation kann gezeigt werden, daß normale und anomale Streuung miteinander wie folgt kombiniert werden können:

$$\Delta |\vec{F}_{iso}|^2 + \Delta |\vec{F}_{ano}|^2 = |\vec{F}_H|^2$$

Da die Pattersonfunktion zentrosymmetrisch ist, besteht auch hier eine Zweideutigkeit. Diese kann aufgelöst werden durch z. B. zusätzliche Derivate, deren Lagen durch Differenzfourier-Elektronendichtekarten lokalisiert werden können.

In der Praxis sind die beobachteten $|\vec{F}_{PH}|$ zu kurz oder zu lang, um den Endpunkt von \vec{F}_H zu erreichen. Diese Differenz wird "lack of closure error" [Blow, 1959] genannt. Es wird versucht, diesen Fehler zu minimieren, indem der Phasenwinkel optimiert wird. Dieser wird mit einer Wahrscheinlichkeitsverteilung (Gauß) gewichtet.

$$F_{hkl} = \int_0^{2\pi} \frac{e^{i\alpha} P(\alpha) d\alpha}{P(\alpha) d\alpha}$$

Für die Kombination verschiedener Phaseninformationen können die Phasen-Wahrscheinlichkeitsverteilungen miteinander multipliziert werden, wobei A, B, C, D die Hendrickson-Lattmann-Koeffizienten [Hendrickson & Lattmann, 1970] darstellen und N eine Normierung.

$$P(\alpha) = Ne^{A\cos(\alpha)+B\sin(\alpha)+C\cos(2\alpha)+D\sin(2\alpha)}$$

4.5.9 MAD

Die Multiple Anomale Dispersion (MAD) beruht auf dem anomalen Effekt, daß in der Nähe der Absorptionskante eine Differenz zwischen den Friedelpartnern \vec{F}_{hkl} und \vec{F}_{-h-k-l} auftritt, die zur Phasierung benutzt werden kann. Wie schon beschrieben, muß dabei ein anomal streuendes Atom im Kristall gebunden sein. Für den atomaren Formfaktor gilt:

$$f_{\text{ano}} = f_0 + f(\lambda) + if''(\lambda)$$

Der wellenlängenabhängige Realteil ($f(\lambda) < 0$) verringert die Streukraft durch Absorption, und der Imaginärteil $if''(\lambda)$ führt zur Phasenverschiebung, wodurch die Friedel-Symmetrie aufgehoben wird. Im Argand-Diagramm in Figur 4.5.9.1 stehen $f_0 + f(\lambda)$ und $if''(\lambda)$ senkrecht aufeinander. In der Praxis wird außer den Datensätzen für jeden der Friedelpartner bei einer Wellenlänge mit maximalem f'' und einer mit minimalem f'' an der Absorptionskante ein Datensatz einer Wellenlänge, die weit von der Absorptionskante entfernt ist, aufgenommen, um die Differenzen zu maximieren.

Wie im Argand-Diagramm dargestellt, summieren sich der Strukturfaktor der normal streuenden Atome \vec{F}_B und der nichtanomale Betrag des Strukturfaktors der anomal streuenden Atome \vec{F}_A zu einem resultierenden Vektor:

$$\vec{F}_{BA} = \vec{F}_B + \vec{F}_A$$

Der anomale Beitrag zur Streuung läßt sich wie folgt, darstellen:

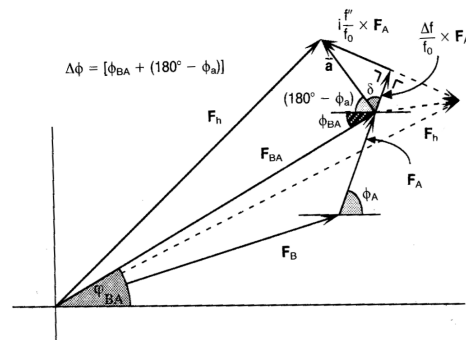
$$\frac{f(\lambda)}{f_0} \vec{F}_A + i \frac{f(\lambda)'}{f_0} \vec{F}_A = \vec{a}$$

Werden die Strukturfaktoren der beiden Friedelpartner $|\vec{F}_{\pm h}|^2$ durch den Kosinussatzes ausgedrückt, und wird $|\vec{a}|^2$ ersetzt, erhält man folgende Beziehung:

$$|\vec{F}_{\pm h}|^2 = |\vec{F}_{BA}|^2 + p \|\vec{F}_A\|^2 + |\vec{F}_{BA}| \|\vec{F}_A\| [q \cos(\Phi_{BA} - \Phi_A) + r \sin(\Phi_{BA} - \Phi_A)]$$

$$\text{mit } p = \frac{(f(\lambda))^2 + (f(\lambda)')^2}{f_0^2}, \quad q = 2 \frac{f(\lambda)}{f_0}, \quad r = 2 \frac{f(\lambda)'}{f_0}.$$

In diesem System sind außer den gemessenen Werten für die Strukturfaktoren der beiden Friedelpartner alle Werte unbekannt. Sie sind unabhängig von λ und für beide Friedelpartner gleich, bis auf das Vorzeichen von $(\Phi_{BA} - \Phi_A)$. Um die Elektronendichte zu berechnen, ist Φ_{BA} und $|\vec{F}_{BA}|$ notwendig. Dazu muß Φ_A entweder durch die Lage der Schweratome in der Pattersonmap für $|\vec{F}_A|^2$ berechnet werden oder durch direkte Methoden. Man bekommt zwei mögliche Phasen für Φ_A und somit zwei Lösungen für Φ_{BA} und somit zwei Elektronendichtemaps. Die beste Lösung wird ausgewählt.



Figur 4.5.9.1: Argand-Diagramm MAD

4.5.10 Molekularer Ersatz

Die Methode des molekularen Ersatzes basiert auf der Beobachtung, daß Proteine mit homologer Aminosäuresequenz oder Protein-Inhibitor-Komplexe im Vergleich zum freien Protein ähnlich gefaltet sind. Die Phasen zu den aus den Meßdaten bestimmten Amplituden werden dadurch gewonnen, daß die Position des ähnlichen bekannten Proteinmodells in der Einheitszelle der unbekanntes Struktur bestimmt wird. Dazu sind zwei Schritte notwendig, die Rotation und die Translation mit jeweils 3 Freiheitsgraden. Diese können für Rotation und Translation getrennt mittels der Pattersonfunktion berechnet werden [Hoppe, 1957; Rossmann& Blow, 1962; Huber, 1965].

$$P(\vec{u}) = \int_r \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r} + \vec{u}) d\vec{r}$$

Der Vektor \vec{r} beschreibt die relative Lage der Moleküle innerhalb der Zelle und \vec{u} die intramolekularen Vektoren, die nur von den Rotationsfreiheitsgraden abhängen. Die Pattersonpeaks der intramolekularen Vektoren liegen um den Ursprung in einem Radius der der Ausdehnung des Proteins entspricht.

Bei der Bestimmung der Rotationsfunktion wird die bekannte Proteinstruktur durch Anwendung der Rotationsmatrix [C] auf \vec{u} gedreht, die dazugehörigen \vec{F}_{calc} und die Pattersonfunktion berechnet, die dann auch gedreht ist, $P_r(\vec{u}_r)$. Diese wird mit der ungedrehten Pattersonfunktion, die aus den \vec{F}_{obs} der unbekannt Struktur berechnet wird, $P(\vec{u})$, verglichen. Bei maximalem Überlapp wird die Rotationsfunktion (Korrelationsfunktion) maximal:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P_{calc}(\vec{u}) P_{obs,r}(\vec{u}_r) d\vec{u}$$

In der Formel ist U das Volumen der Pattersonmappe. Die Qualität der Lösung wird durch den R-Faktor und die Korrelationsfunktion bestimmt.

Um die Translation zu bestimmen, wird das Modell durch die Einheitszelle translatiert und für die verschiedenen Positionen wieder ein \vec{F}_{calc} und die dazugehörige Pattersonfunktion berechnet, die mit der aus den \vec{F}_{obs} der unbekannt Struktur berechneten Pattersonfunktion überlagert wird.

$$T(\vec{m}) = \int_U P_{obs}(\vec{u}) P_{calc}(\vec{m}, \vec{u}) d\vec{u}$$

\vec{m} ist der Positionsvektor des Modellmoleküls und \vec{u} ist der Vektor, der die gesamte Pattersonmappe durchläuft. Die Qualität der Lösung wird wieder durch den R-faktor und die Korrelationsfunktion T bestimmt.

4.5.11 Verfeinerungen

Die Qualität eines Proteinstrukturmodells wird durch den kristallographischen R-Faktor bestimmt. Nach jedem Zyklus der Modellverbesserung werden für dieses Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ berechnet, die mit den $|F_{obs}|$ verglichen werden und einander angenähert werden. Dazu werden verschiedene Parameter unter Berücksichtigung der Huber

& Engh Parameter [Engh & Huber, 1991] verfeinert, wie Positionen der einzelnen Atome, B-Faktoren und die Position des gesamten Modells oder Teile des Modells. Der R-Faktor ist definiert als:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left\| \vec{F}_{obs} - k \vec{F}_{calc} \right\|}{\sum_{hkl} \left| \vec{F}_{obs} \right|}$$

k ist ein Skalierungsfaktor, um die gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine Skala zu bringen. Eine weitere wichtige Größe für die Beurteilung des Modells ist der freie R-Faktor, für dessen Berechnung 5-10 % der Reflexe nicht in die Verfeinerungsrechnung eingehen und deren $|F_{obs}|$ mit den $|F_{calc}|$ verglichen werden. Wird die Differenz zwischen R_{cryst} und R_{free} zu groß, dann weicht das Modell zu weit von dem tatsächlichen ab oder die Parameter sind überverfeinert.

Außerdem gibt es durch das “simulated annealing” die Möglichkeit den Konvergenzradius der Verfeinerung zu erhöhen. Dabei werden unter die einzelnen Atome in Bewegung versetzt, so daß ihre Energie ungefähr einer Temperatur von 3000-4000 K entspricht und langsam wieder abgekühlt. Dadurch kann die Verfeinerung aus einem lokalen Minimum gehoben werden. Die Positionen der Atome werden mittels der Newton’schen Dynamik berechnet.

4.5.12 Mittelung

Das Prinzip der Mittelung beruht auf dem Prinzip, daß die Dichte von Molekülen, die durch nichtkristallographische Symmetrien miteinander verwandt sind, überlagert und gemittelt werden. Dafür wird zuvor für die beiden Moleküle eine Einhüllende berechnet, innerhalb der Dichte vorhanden ist und außerhalb null gesetzt wird. Nach dem Mitteln werden durch die Rücktransformation die Phasen bestimmt, deren Qualität durch den Rücktransformations-R-Faktor ausgedrückt werden. Für einen weiteren Zyklus wird wieder eine Elektronendichte berechnet. Dies kann mehrmals wiederholt werden. Die Dichte wird zunehmend modellfreier.

Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, die Moleküle zu überlagern. Einmal kann dafür die Rotations- und die Translationsmatrix, die benötigt wird, um ein Molekül auf dem anderen abzubilden, berechnet werden, impropere Mittelung. Andermal kann die Rotations- und die Translationsmatrix, die theoretisch das eine Molekül auf das andere abbilden, benutzt werden, propere Mittelung.

4.5.13 Modifikationen der Elektronendichte (solvent flattening)

Eine Verbesserung der Phasen kann durch die Dichtemodifikation (dm) erreicht werden. Eine Methode ist das solvent flattening. Nach einem Algorithmus von Wang [1985] werden die Bereiche mit Protein und Lösungsmittel im Kristall bestimmt. Der Bereich mit Lösungsmittel wird null gesetzt.

5. Ergebnisse

5.1 Überexpression und Aufreinigung

Sowohl HslV als auch HslU konnten in BL21(DE3) löslich im Zytosol überexprimiert werden (siehe Kapitel 4.2.3). Dabei war jeweils ein His₆-Peptid an den N-Terminus von HslU und an den C-Terminus von HslV fusioniert. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten zwischen 70 und 120 mg reines, homogenes Protein gewonnen werden. HslV wurde nach einem bereits vorhandenen Protokoll aufgereinigt [Bochtler, 1997].

Die Aufreinigung von HslU wurde im Rahmen dieser Arbeit so optimiert, daß aufgrund der höheren Homogenität und Stabilität des Proteins die Qualität der HslVU-Kristalle erheblich verbessert und für HslU eine neue Kristallbedingung gefunden werden konnte. Die Kristalle lieferten auswertbare Daten. Die Struktur konnte damit gelöst werden.

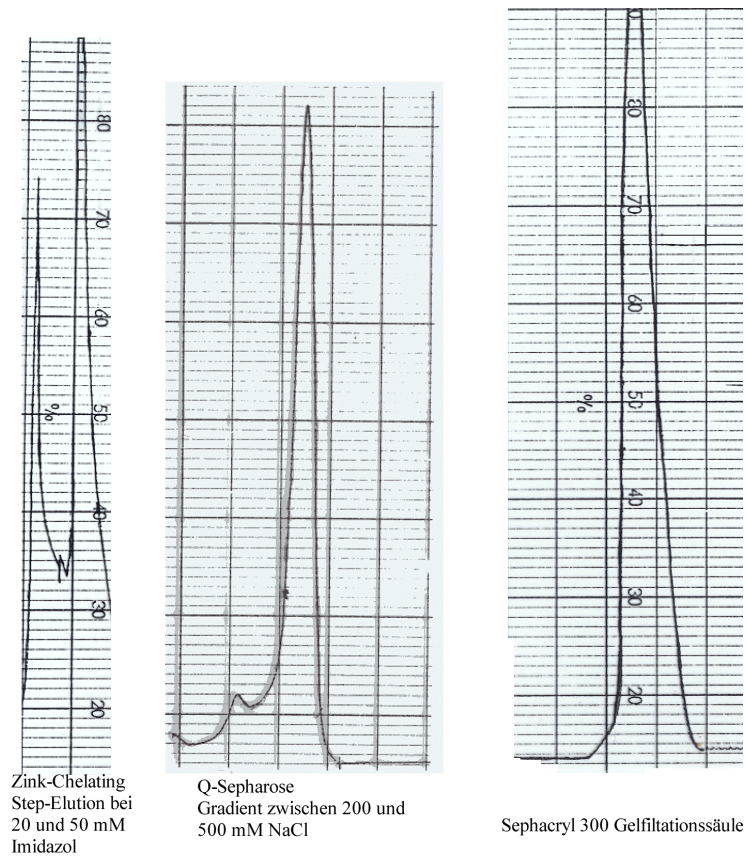
Die bei -20 °C in 10 mM Tris, pH 7,5 eingefrorenen Zellen mit überexprimiertem HslU wurden aufgetaut. Danach wurde sofort der Proteaseinhibitor PMSF (Phenyl-methylsulfonyl-flourid) ad 1mM zugegeben. Dies mußte nach jedem Reinigungsschritt wiederholt werden, da PMSF nach ungefähr einer Stunde hydrolysiert ist. Dadurch konnte der Abbau von HslU erheblich unterdrückt werden. Anschließend wurden die Zellen durch eine halbstündige Inkubationszeit mit 20 mg Lysozym und 1 mg DNase bei 4 °C und einer Ultraschallbehandlung von einer halben Stunde lysiert. Die Membranbestandteile wurden danach bei 36000 Umdrehungen innerhalb 1 Stunde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zn²⁺-Chelating-Sepharose (Ø=2,5 cm, h=5 cm) aufgetragen, die zuvor mit 2 mg/ml Zn²⁺ beladen und mit Puffer A (20 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,002 % NaN₃) eingespült worden war. Nach zwei Waschsritten mit Puffer A ohne bzw. mit 5 mM Imidazol wurde das Protein mit Puffer A und 20 mM bzw. 50 mM Imidazol eluiert (Figur 5.1.1.a). Der Hauptteil HslU war in der 50 mM Imidazol-Fraktion und danach ~80 % rein. Eine Analyse dessen auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte einige Fremdproteinbanden und zwei Abbaubanden von HslU (Figur 5.1.2). Die 20 mM-

Fraktion war zu stark verschmutzt und wurde daher nicht weiterverarbeitet (Analyse auf den SDS-Polyacrylamid-Gel nicht gezeigt).

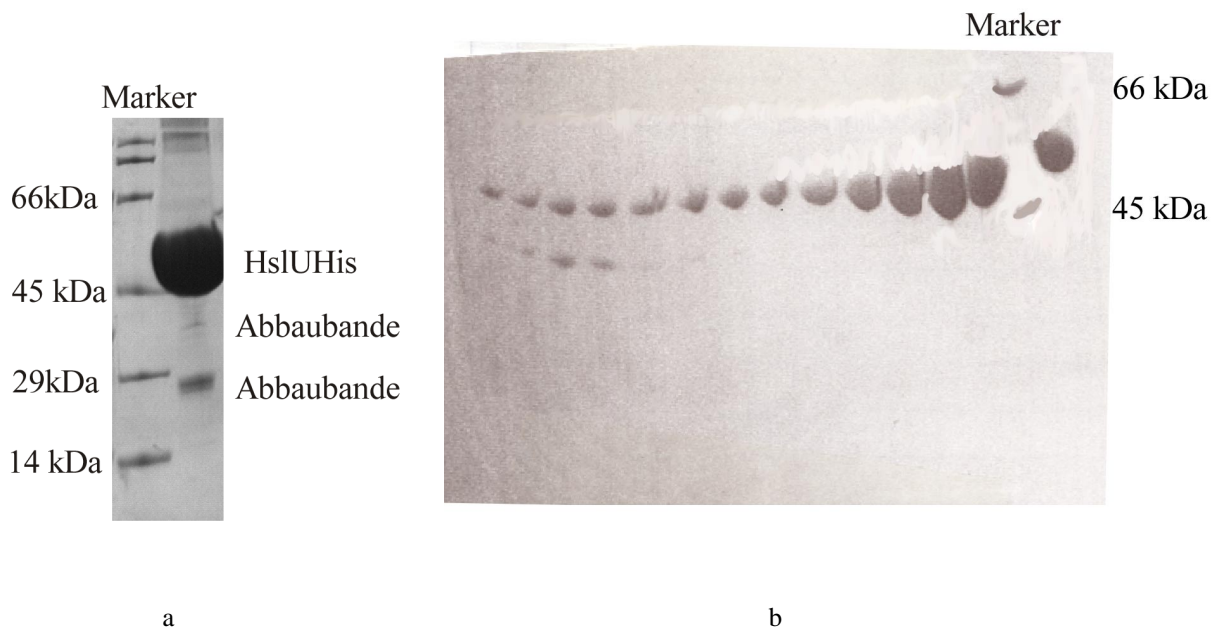
Beim Eluieren des Proteins werden auch einige Zn^{2+} -Ionen von der Säule gewaschen. Diese können über Koordinationsbindungen die His₆-Fusionspeptide verschiedener HslU-Partikel miteinander verknüpfen und so Aggregate bilden. Der Effekt ist bei HslV viel stärker, da dieses auf Grund der exponierten His₆-Fusionspeptids stark an die Zn^{2+} -Chelating Sepharose bindet. Dies kann durch die Zugabe von EDTA ad 5 mM unterdrückt werden. Außerdem werden alle anderen zweiwertigen Ionen auch chelatiert und so die Metallionen-abhängigen Proteasen inhibiert.

Danach wurde das Material auf eine Q-Sepharose-Säule ($\varnothing=3,5$ cm, h=7 cm) aufgetragen, die mit Puffer B (20 mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 0,002 % NaN_3) und 200 mM NaCl eingespült worden war. Nach einem Waschschrift mit dem Equilibrierpuffer wurde ein Gradient von zweimal 350 ml zwischen 200 mM NaCl und 500 mM NaCl und jeweils Puffer B angelegt. Die kleine Abbaubande und die Fremdproteine wurden im Waschschrift beseitigt. Die große Abbaubande konnte zusammen mit etwas unabgebautem HslU zu Beginn des Gradienten von der Säule gewaschen werden. Bei ~300 mM NaCl eluierte im Hauptpeak HslU ohne Abbaufragmente. Dies ist im Elutionsprofil in Figur 5.1.1.b und auf dem dazugehörigen SDS-Polyacrylamid-Gel in Figur 5.1.2b dargestellt. Das Protein war danach ~98 % rein. Lichtstreuexperimente mit dem Eluat ergaben für HslU eine Partikelgröße, die dem eines HslU-Trimers entsprach. Durch Zugabe von 1 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$ entstand ein Partikel mit der Größe eines Hexamers. Das Oligomer wurde durch die Trenneigenschaften des Säulenmaterials und der Salzkonzentration disassembliert. Da die HslU-Trimere mit teilweisem Abbau andere Bindeeigenschaften als die intakten Trimere haben, konnten beide voneinander getrennt werden. Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden eingesammelt, mit 5mM EDTA versetzt und in einer Rührzelle auf eine Konzentration zwischen 5-6 mg/ml in einem Volumen von 15-20 ml aufkonzentriert. Das Protein wurde dann auf eine Sephacryl 300 Gelfiltrationssäule ($\varnothing=2.5$ cm, h=120 cm) aufgetragen, die mit Puffer B equilibriert worden war. HslU eluierte in einem symmetrischen Peak als Hexamer (5.1.1c), da die Proteinkonzentration höher, Salzkonzentration niedriger war und das Säulenmaterial andere Trenneigenschaften

besitzt. Nach der Gelfiltration wurde kein PMSF mehr zugegeben, da dieser Inhibitor mit Threoninproteasen kreuzreagiert und so HslV irreversibel inhibieren könnte.



Figur 5.1.1: Elutionsprofile der einzelnen Chromatographiestritte bei der Aufreinigung von HslU (a) Zn-Chelating-Säule, (b) Q-Sepharose, (c) S300-Gelfiltrationssäule



Figur 5.1.2: (a) SDS-Poly-Acrylamid-Gel mit einer Probe des Eluats von der Zn-Chelating-Säule bei 50 mM Imidazol (b) SDS-Poly-Acrylamid-Gel mit Fraktionen des Gradienten des Q-Sepharose-Chromatographieschittes. Die Reihenfolge in (b) entspricht dem oben gezeigten Verlauf im Chromatogramm in 5.1.1(b). Beide Gele wurde absichtlich überladen, um die Reinheit des Proteins zu zeigen. Angegeben ist die relative Masse in kDa.

HslU wurde auf ~20 mg/ml aufkonzentriert, mit 1 mM AMP-PNP stabilisiert, bei 4 °C aufbewahrt und konnte nach 4 Wochen noch zum Kristallisieren verwendet werden.

HslV in Puffer B mit 300 mM NaCl wurde auf ~16 mg/ml aufkonzentriert.

5.2 Kristallisation

5.2.1 Kristallisation von HslVU

HslU und HslV in dem oben angegebenen Puffern wurden im molaren Verhältnis 2:1 gemischt. Es wurde kein MgCl₂ zugegeben, da HslV wegen seines stark exponierten His₆-Fusionspeptids in Anwesenheit von zweiwertigen Ionen stark zur Aggregation neigt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Ansatz hart abzentrifugiert, um mögliche Aggregate zu beseitigen. Mit der verbesserten Proteinqualität von HslU wurde

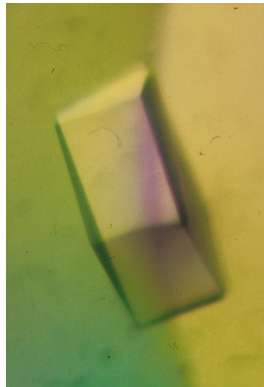
HsIVU in der schon vorhandene Kristallbedingung zum Kristallisieren angesetzt. Diese lautet:

100 mM Mes pH 5,6-6,7

1,6-2,2 M NaAc

Zum Kristallisieren wurde die *sitting-drop*-Methode verwendet. Dazu wurde in einer MVD/24 Kristallisationsplatte mit 6×4 Ansätzen der pH der Reservoir-Lösung in 0,2-Einheiten und das Präzipitant in 0,2 M-Schritten variiert. In jedem Ansatz wurden 2 µl Proteinlösung und 2µl Reservoir-Lösung miteinander vermischt, die Platte verschlossen und bei ~16 °C gelagert. Nach ungefähr 2 Tagen waren die ersten Kristalle zu sehen, die nach ungefähr 4-5 Tagen eine Größe von 0,3×0,3×0,3 mm³ mit glatten Seitenflächen erreicht hatten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem ein Puffer gefunden, in dem die Kristalle bei 90 K im Stickstoffstrom schockgefroren werden konnten. Dazu wurden die Kristalle in einer Lösung aus Reservoir-Puffer und d(-)-2,3--Butandiol im Verhältnis 17:3 ungefähr 2 min inkubiert und dann schnell in den Stickstoffstrom transferiert. Diese wurden dann in flüssigem Stickstoff gelagert und konnten später am Synchrotron (DESY) Hamburg gemessen werden. Die Reflexe zeigten eine leichte Verschmierung in c-Richtung. Dennoch konnten die Beugungsbilder relativ leicht ausgewertet werden (Beugungsbild siehe 5.3).

Des weiteren wurden die Kristalle in Thiomersal oder Tantalbromid eingelegt. Dazu wurden zu Kristallen maximaler Größe im Tropfen 1 µl einer Schwermetallverbindung mit der Konzentration von 5 mg/ml zugegeben, die zuvor durch hartes Abzentrifugieren von Schwebeteilchen befreit worden war. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr 12 Stunden wurden die Kristalle im Reservoir-Puffer 10 min gewaschen, um so die nicht gebundenen Schweratome zu beseitigen. Die Kristalle konnten auch im oben beschriebenen Kryopuffer auch gefroren werden.



Figur 5.2.1: HslVU-Kristall

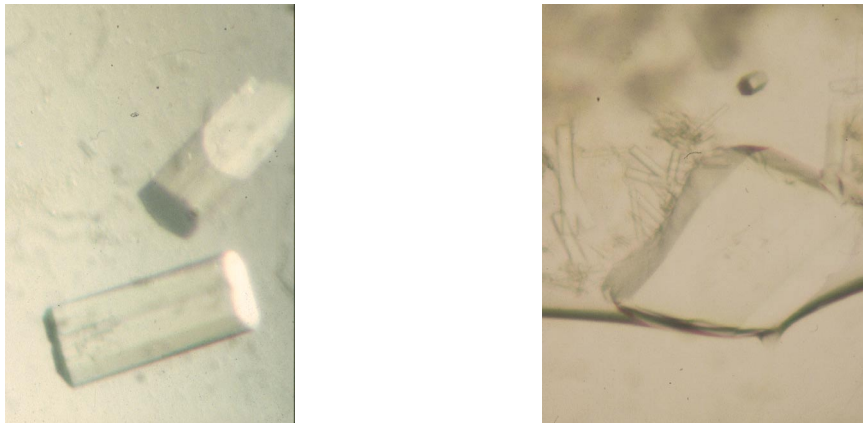
5.2.2 Kristallisation von HslU

Zur der HslU Proteinlösung in Puffer B und 1 mM AMP-PNP wurde MgCl_2 ad 5 mM zugegeben. Nach systematischem Suchen einer Kristallisationsbedingung in den Hampton-Screens und den Hausfactorials mit der *sitting-drop*-Methode in den MVD/24 Kristallisationsplatten kristallisierte HslU in Bedingung 15 des Hampton-Kryo-Screens. Dazu wurden jeweils 2 μl Proteinlösung und 2 μl Reservoirlösung zu einem Tropfen gemischt. Die Bedingung wurde weiter verfeinert. Die Kristalle waren schwer reproduzierbar und hatten rauhe Seitenflächen. Sie konnten im Reservoir-Puffer gefroren und am Synchrotron getestet werden. Die Reflexe im Beugungsbild waren gespalten, was auf einen mikroskopischen Zwilling hindeutete. Durch die Zugabe von 1 μl C_{12}E_6 aus dem Hampton-Detergentien-Screen und 0,5 μl Guanidiniumhydrochlorid (1M) aus dem Hampton-Additiv-Screen zum Tropfen wurden die Kristalle reproduzierbarer und die Oberflächen glatter. Die neuen Kristalle waren allerdings sehr klein und wurden durch Variation der ursprünglichen Bedingung auf eine Größe von $0.15\text{mm} \times 0.3\text{mm} \times 0.15\text{mm}$ gebracht. Die besten Kristalle entstanden unter folgender Bedingung:

105 mM Natriumcacodylat pH 5,8-7,0
300mM-600mM Ammoniumsulfat
10,5 % PEG 8K
15 % Glycerin

Die Bedingung eignete sich nicht mehr als Kryopuffer und es mußte ein neuer gefunden werden. Schließlich wurden die Kristalle in 70 % Reservoir-Puffer und 30 % Glycerin nach der selben Methode wie die HslVU-Kristalle gefroren, gelagert und am Synchrotron gemessen. Die Reflexe waren klar und regelmäßig (Beugungsbild siehe Kapitel 5.4).

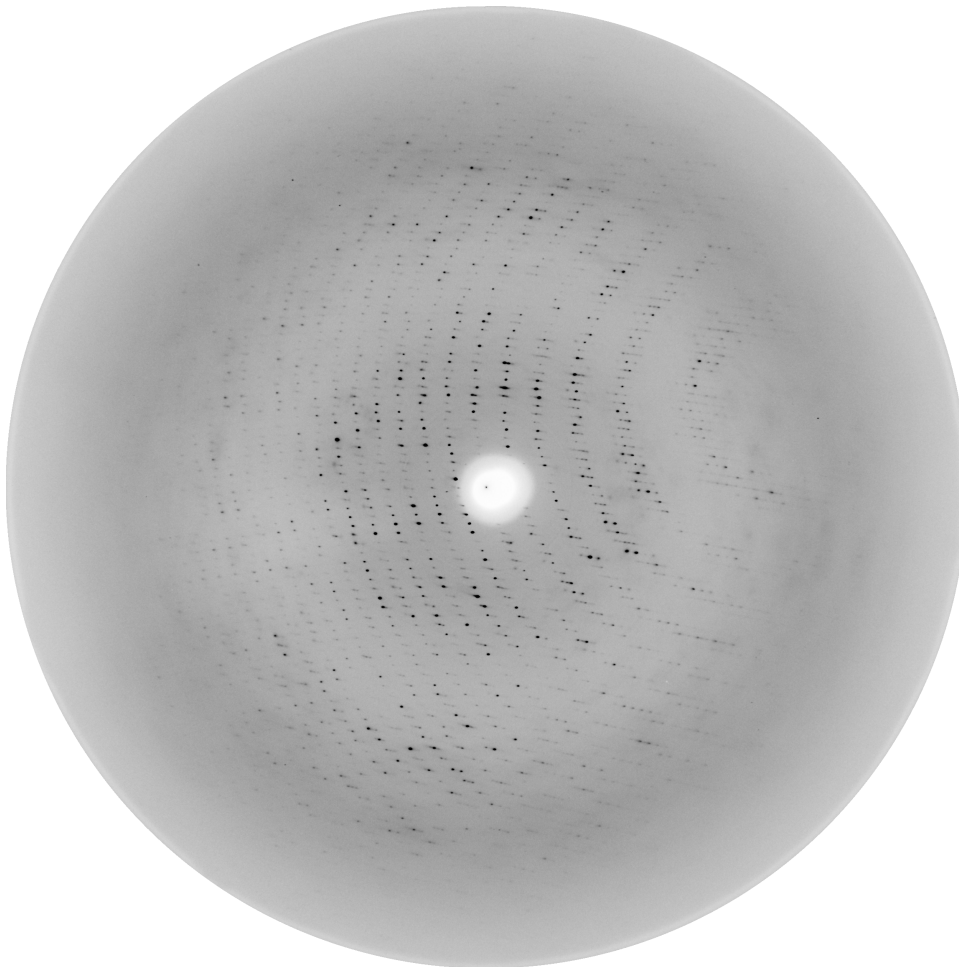
Außerdem war es möglich unter derselben Bedingung HslU ohne Magnesium und Nukleotid zu kristallisieren. Doch der Versuch, HslU mit 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM ADP zu kristallisieren, führte nicht zum Erfolg. Die Kristalle sahen optisch gut aus, ergaben jedoch ein unauswertbares Beugungsbild beim Testen am Synchrotron.



Figur 5.2.2: (a) Kristalle von HslU mit 1 mM AMP-PNP und 5 mM $MgCl_2$ (b) Kristalle von HslU ohne Nukleotid und $MgCl_2$.

5.3 Strukturauswertung von HslVU

5.3.1 Datensammlung und Raumgruppenbestimmung



Figur 5.3.1.1: Beugungsbild eines HslVU-Kristalls mit gebundenem Thiomersal. Die Aufnahme wurde mit einem mar345-Imageplate-Detektor im Abstand von 430 mm und einem Drehwinkel von $0,5^\circ$ -Winkel gemacht. Es wurde belichtet, bis 3000 counts erreicht worden waren.

Die HslVU Kristalle (nativ, Thiomersal-Derivat und $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Derivat) wurden an der BW6 der MPG-Außenstelle am DESY (Deutsches Elektronensynchrotron) in Hamburg im Stickstoffstrom bei 90 K gemessen und die Beugungsbilder mit DENZO/SCALEPACK [Okoinowski, 1993] integriert und skaliert. Für alle Datensätze ergab sich ein hexagonales Gitter. Eine Auswertung in P622 und die Suche nach Auslöschungen im reziproken Raum entlang der Achsen führten zur Raumgruppe $P6_322$.

Für die in Thiomersal und Tantalbromid eingelegten Kristalle wurde MAD (Multiple Anomalous Dispersion) gemessen. Dazu wurde mittels eines Wellenlängenscans für den in Thiomersal eingelegten HsIVU-Kristall folgende Wellenlängen bestimmt:

$$\lambda_{\text{remote}} = 1,05 \text{ \AA}$$

$$\lambda_{f''} = 1,0049 \text{ \AA} \text{ (Maximum des Imaginärteils)}$$

$$\lambda_{f'} = 1,0093 \text{ \AA} \text{ (Maximum des Realeils)}$$

Der Abstand zwischen mar345-Imageplate-Detektor ($\varnothing=345$ mm) und Kristall betrug 430 mm. Gemessen wurde mit einem Drehwinkel $\Delta\alpha=0,5^\circ$. Belichtet wurde doseabhängig. Für jedes Bild wurden 3000 counts gesammelt.

Durch einen Wellenlängenscan wurden für den in $\text{Ta}_6\text{Br}^{2+}_{12}$ eingelegten Kristall folgende Wellenlängen ermittelt:

$$\lambda_{\text{remote}} = 1,078 \text{ \AA}$$

$$\lambda_{f''} = 1,253485 \text{ \AA} \text{ (Maximum des Imaginärteils)}$$

Da die Lagen der Schweratome für den Datensatz bei der Wellenlänge $\lambda_{f''}$ nicht eindeutig zu erkennen waren, wurde auf die Messung bei der Wellenlänge $\lambda_{f'}$ bei maximalem Realteil verzichtet. Für diese Messung wurde mit einer Dose von 9200 counts belichtet. Der Detektor vom Typ marccd befand sich in einem Abstand von 145 mm vom Kristall. Gemessen wurde mit einem Drehwinkel $\Delta\alpha=0,3^\circ$.

Zuletzt wurde noch ein nativer Datensatz für die HsIVU-Kristalle mit dem marccd-Detektor im Abstand von 150 mm mit einem Drehwinkel von $\Delta\alpha=0,3^\circ$ gemessen. Die Wellenlänge betrug $\lambda=1,07 \text{ \AA}$. Für jedes Bild wurden 1000 counts gesammelt.

Zusammenfassend ergibt sich für die Datenqualität:

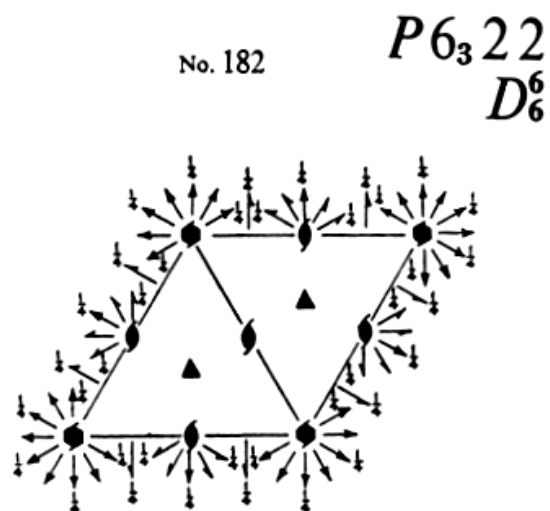
Kristall	Thiomersal λ_{remote}	Thiomersal λ_{f}''	Thiomersal λ_{f}'	$\text{Ta}_6\text{Br}^{2+}_{12}$ λ_{remote}	$\text{Ta}_6\text{Br}^{2+}_{12}$ λ_{f}''	Nativ λ
Wellenlänge (Å)	1,0500	1,0049	1,0093	1,0780	1,2535	1,0712
Auflösung (Å)	25,0-3,2	25,0-3,2	25,0-3,2	20,0-3,0	20,0-3,0	20,0-2,8
Beobachtete Reflexe	400748	409567	349122	331896	649973	220892
Unabhängige Reflexe	74892	75222	74714	89272	88876	57796
Vollständigkeit (%)	99,7	99,7	99,4	98,3	98,8	98,4
R_{merge} (%)	8,9	8,6	8,1	8,2	9,7	14,1
Zellkonstanten (Å)	171,18 171,18 278,09			171,12 171,12 274,50		170,61 170,61 275,86

5.3.2 Suche der Schweratomelagen

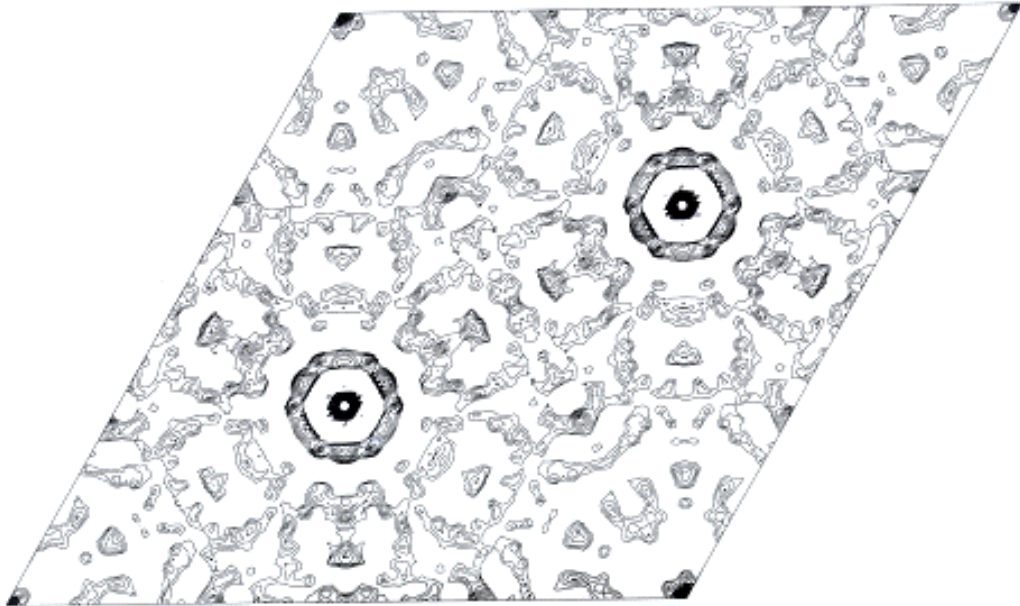
Zu Beginn der Auswertung war der native Datensatz noch nicht vorhanden. Es standen nur die beiden MAD-Datensätze der in Tantalbromid oder Thiomersal eingelegten Kristalle zur Verfügung. Die Derivate waren so schwach, daß die Lagen der Schweratome mit konventionellen Pattersonsuchmethoden nicht bestimmt werden konnten. Der Versuch durch die Methode des molekularen Ersatzes die Position für HsIV in der Zelle zu finden, schlug auch fehl.

Schließlich wurde eine Pattersonmap für die Thiomersalderivatdaten bei λ_{f}' berechnet. Auf der Höhe $z = 1/2$ sind bei den Positionen $(1/3, 2/3)$ und $(2/3, 1/3)$ zwei Pseudourprungspeaks zu erkennen (Figur 5.3.2.2). Weiterhin ergab die Berechnung der Selbstrotation eine lokale sechszählige Symmetrie (Figur 5.3.2.3). Mit diesen Informationen war es möglich, das Modell für HsIV in dem Displayprogramm MAIN [Turk, 1992] von Hand auf einer der beiden 32 Punktlagen zu positionieren. Ein Problem war allerdings die freie Wahl des Ursprungs, der bei $z = \pm 1/4$ liegen kann, und welche sechszählige Achse des Moleküls auf welcher dreizähligen Achse der Zelle liegt. Das Dodekamer wurde auf

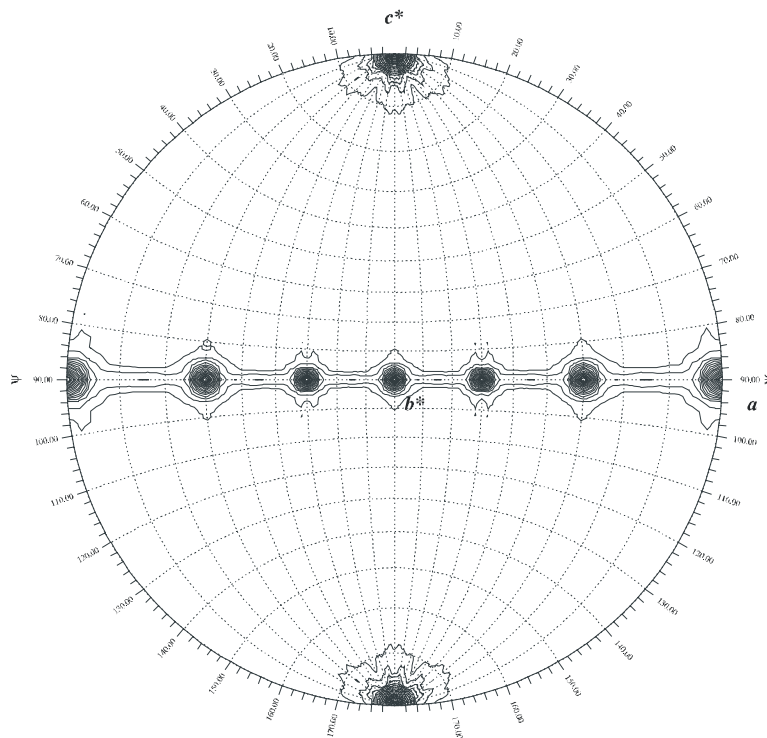
der Position $(1/3, 2/3, 1/4)$ positioniert. Durch Anwenden der Symmetrieoperatoren konnte ein symmetrieverwandtes HslV auf der Position $(2/3, 1/3, 3/4)$ abgebildet werden. Mit dem HslV-Dodekamers als Suchmodell auf der Position $(1/3, 2/3, 1/4)$ wurde durch die Pattersonsuchmethoden eine Rotations- und eine Translationslösungen bestimmt und gefittet. Für die Rechnung wurde das Programm AMORE aus CCP4 verwendet [Otwinski, 1993]. Die Position der Untereinheiten wurden weiterhin durch eine Rigid-Body-Verfeinerung und die Positionen der einzelnen Atome durch ein POSITIONAL aus XPLOR [Brünger, 1992a, b] optimiert.



Figur 5.3.2.1: Darstellung der Einheitszelle in der Raumgruppe $P6_322$ [International Tables for Crystallography]



Figur 5.3.2.2: Hakerschnitt bei $z=1/2$ durch die Pattersonfunktion der HsIVU-Kristalle bei der Auswertung in $P6_322$. Die Pseudoursprungspeaks bei $(2/3, 1/3, 1/2)$ und $(1/3, 2/3, 1/2)$ sind deutlich zu erkennen.



Figur 5.3.2.3: Selbstrotation für $\kappa=180^\circ$ für die Auswertung in $P6_322$.

Aus diesem Modell zweier unabhängiger Untereinheiten von HsIV wurden dann mit SFALL Startphasen berechnet, mittels denen in den anomalen und dispersiven Differenzfouriermaps zwei Tantallagen und zwei Quecksilberlagen gefunden wurden, die durch die Kreuzvektorverifizierung mit RSPS bestätigt werden konnten. Die Tantalbromidcluster konnten allerdings nicht aufgelöst werden. Für diese Rechnungen wurden die Programme CAD, FFT, PEAKMAX, NPO, RSPS aus dem CCP4-Programmpaket benutzt [Otwinowski, 1993].

Da die Lagen schwach waren, wurde versucht, für die nächste Schweratomsuche mehr Phaseninformation zu benutzen, um eventuell weitere Schweratompositionen zu finden. Dazu wurden die MAD-Phasen aus den beiden Quecksilberlagen, den beiden Tantallagen mit MLPHARE bestimmt, wobei die Quecksilberlagen zusätzlich als Löcher in den Tantalbromidderivatdaten definiert wurden. Diese Phaseninformationen wurde wieder mit der von HsIV kombiniert und in der anomalen und dispersiven Differenzfouriermap der Tantalbromidderivatdaten und Thiomersalderivatdaten nach weiteren Lagen gesucht. Die neuen Schweratompositionen wurden durch eine Kreuzvektorverifizierung bestätigt. Daraus erhält man folgend aufgelistete Lagen, die auf die asymmetrische Einheit reduziert wurden. Die Angaben sind in fraktionalen Koordinaten gemacht:

Quecksilberlagen:

Position1	0,2949	0,5059	0,2414
Position2	0,1689	0,5397	0,2437
Position3	0,5672	0,2006	0,0937
Position4	0,0393	0,1665	0,2429
Position5	0,1574	0,1213	0,2432
Position6	0,5449	0,3765	0,2423

Tantallagen

Position1	0,0218	0,3871	0,1433
Position2	0,3146	0,2843	0,1430
Position3	0,2997	0,3545	0,1432
Position4	0,3538	0,0489	0,1434

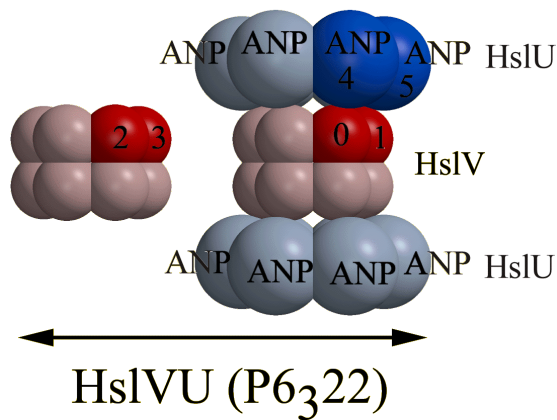
Die oben bestimmten Schweratomlagen konnten für eine MAD-Phasierung in MLPARE benutzt werden. Der Figure of Merit bei der Verfeinerung der Schweratompositionen be-

trug bei einer Auflösung von $2,8 \text{ \AA}$ $0,53$ und konnte durch Hinzunahme der Modellphasen von HslV auf $0,55$ verbessert werden.

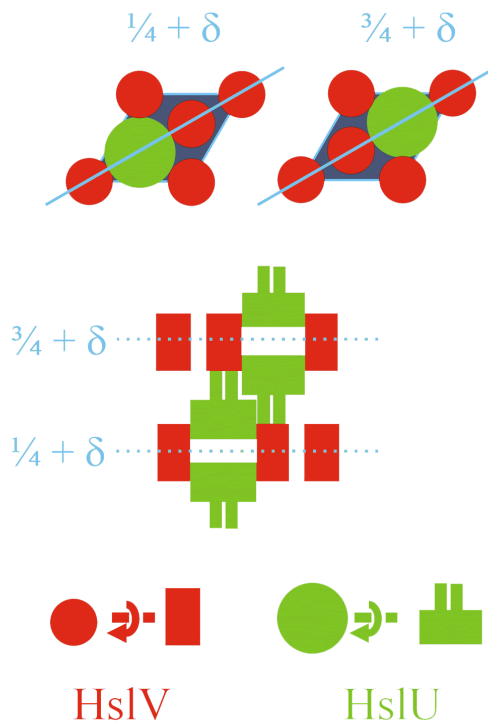
Mittlerweile wurde ein nativer Datensatz gemessen. Mit diesem und den oben bestimmten Phasen konnte eine Dichte berechnet und mit dem Modellbau mit dem Displayprogramm FRODO [Jones, 1978] begonnen werden. Eine genauere Beschreibung der Struktur ist im nächsten Kapitel zu finden. Diese Grobbeschreibung an dieser Stelle dient nur zu Verständnis der nachfolgenden Schritte. HslV ist ein Dodekamer. HslU ist ein Hexamer. Eine HslU-Untereinheit setzt sich aus einer N-, C- und I-Domäne zusammen. Die N- und C-Domäne bilden den globulären Teil des Proteins und sind über ein Gelenk miteinander verknüpft. Die I-Domäne ist sehr flexibel und hebt sich vom Rest ab. Alle sechs Untereinheiten des HslU Hexamers enthalten jeweils ein AMP-PNP-Molekül, allerdings ist das γ -Phosphat in der Dichte nicht definiert.

5.3.3 Packung der HslVU-Kristalle

Der endgültige Gehalt der asymmetrischen Einheit war erst nach dem Modellbau bekannt. Die asymmetrische Einheit der HslVU-Kristalle enthält zwei HslU-Untereinheiten und vier HslV-Untereinheiten. Aus zwei der HslV- und den zwei HslU-Untereinheiten kann unter Anwendung der Symmetrieoperatoren ein HslV-HslU Partikel aufgebaut werden (Figur 5.3.3.1). Dieses besteht aus zwei HslU-Hexameren an den Polen eines HslV-Dodekamers. Dabei ist die intermediäre Domäne dem HslV zugewandt. Die restlichen beiden HslV-Untereinheiten sind Bestandteil eines freien Dodekameres (Figur 5.3.3.1). Die freien HslV und die HslV-HslU Partikel nehmen die 32 Punktlagen in der Zelle ein. In nachfolgendem Bild (Figur 5.3.3.2) ist dieser Sachverhalt schematisch nochmals dargestellt. Die Komplexe sind auf $(1/3, 2/3, 1/4+\delta)$ und $(2/3, 1/3, 3/4+\delta)$ lokalisiert. Die freien HslV-Dodekamere sind entlang der Schraubenachse 6_3 auf den Höhen $z=1/4+\delta$ und $z=3/4+\delta$ angeordnet.



Figur 5.3.3.1: Darstellung der asymmetrischen Einheit. Die intensiven Farben stellen den Gehalt der asymmetrischen Einheit dar.



Figur 5.3.3.2: Kristallpackung der HslVU-Kristalle. In der ersten Zeile ist die Draufsicht auf die durch x und y aufgespannte Ebene bei $z=1/4+\delta$ und $z=3/4+\delta$ dargestellt. Die roten Kugeln representieren HslV und die grünen Kugeln HslU. In der zweiten Zeile ist die Seitenansicht der Ebene, die durch die Achsen z und der Diagonalen $x=y$ aufgespannt wird dargestellt. Die Höhenlinien $z=1/4+\delta$ und $z=3/4+\delta$ sind eingezeichnet. Hier stellen die roten Quader HslV und die grünen Quader mit Stäbchen HslU dar. Die beiden Stäbe stehen als Symbole für die Intermediäre Domäne von HslU und der Quader für den globulären Teil des Proteins.

5.3.4 Verfeinerung

Zu Beginn des Modellbaus wurden durch die Dichtemodifikation SOLVENT-FLATTNING aus dem Programmpaket CCP4 [Otwinowski, 1993] die Phasen verbessert. In den Verfeinerungsschritten für die entstehenden Modelle wurden jeweils die Positionen der einzelnen Modellteile bzw. des gesamten Modells durch eine RIGID-BODY-Verfeinerung, die Positionen der einzelnen Atome durch ein POSITIONAL und die Temperaturfaktoren durch ein BREFINEMENT aus dem XPLOR-Programmpaket optimiert. Später wurden die entsprechenden Programme aus dem CNS-Programmpaket benutzt, die einen wesentlich besseren Statistiken lieferten. Dabei wurden jeweils die NCS-Gewichte in die Rechnung miteinbezogen. Außerdem wurden die Phasen durch ein-, zwei- und zehnfache impropere Mittelungen für die einzelnen Modelle im direkten Raum mit dem Programm MAIN zunehmend modellfreier. Dazu wurden jeweils zwei unabhängige Untereinheiten in der asymmetrischen Einheit miteinander gemittelt. Das Modell wurde ohne die fehlgeordneten Reste 140-152, 167-215 in Untereinheit 4 und 114-157, 164-233 in Untereinheit 5 gebaut. Am Ende ergaben sich damit folgende Statistiken:

Phasierungs-Statistik:

Datensatz	Tantal-remote	Tantal f''_{max}	Thiomersal-Remote	Thiomersal f''_{max}	Thiomersal f''_{max}
Auflösung (Å)	20,0-6,0		20,0-3,2		
Phasierungs-power	0,71	0,64	2,02	2,07	2,03
R_{cullis}	0,91	0,94	0,63	0,62	0,63
$R_{\text{cullis,ano}}$	0,87	0,87	0,98	0,94	0,98

Verfeinerungsstatistiken:

$R_{\text{cryst}}(\%)$	30,1
$R_{\text{free}}(\%)$	34,9
R_{back}	16,6
r.m.s.d. Bindungslänge (Å)	0,009
r.m.s.d. Bindungswinkel (°)	1,4
r.m.s.d. NCS (Å)	0,13

Der freie R-Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, die von der Verfeinerungsrechnung ausgeschlossen sind. Der angegebene R_{back} wurde nach 10 Zyklen zweifachen Mitteln berechnet. Die relativ hohen R-Faktoren in der Verfeinerung rühren von der fehlgeordneten I-Domäne her, wodurch das Modell nicht vollständig gebaut werden konnte.

5.4 Strukturaufklärung der HslU-Kristalle

5.4.1 Datensammlung und Raumgruppenbestimmung:

5.4.1.1 HslU mit Nukleotid und Magnesium

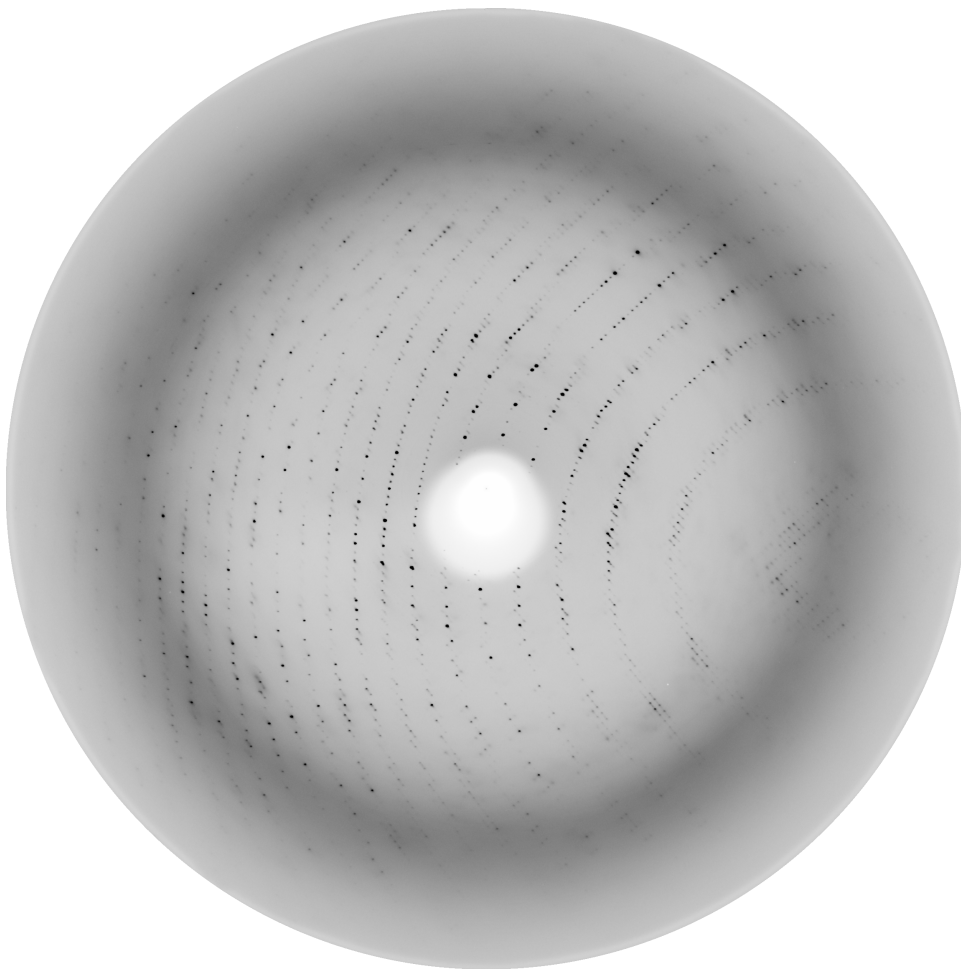


Figur 5.4.1.1.1: Beugungsbild eines HslU-Kristalles mit 1 mM ANP-PNP und 5 mM MgCl₂. Leider hatte der Kristall Eisringe. Die Aufnahme wurde mit dem marccd-Detektor im Abstand von 180 mm mit einem Drehwinkel von $\Delta\alpha=0,5^\circ$ aufgenommen. Es wurden 1000 Counts gesammelt.

Beide HslU-Kristalle wurden am DESY gemessen und mit DENZO/SCALEPACK ausgewertet. Für den HslU-Kristall mit 1 mM ANP-PNP und 5 mM MgCl₂ ist das Kristallgitter trigonal. Es wurde in P321 ausgewertet. Die Nulllinien wurden leider nicht gemessen. Die endgültige Raumgruppe war erst nach dem Finden einer Lösung des molekularen Ersatzes klar.

Gemessen wurde mit dem marccd-Detektor im Abstand von 180 mm mit einem Drehwinkel von $\Delta\alpha=0,5^\circ$ bei einer Wellenlänge von $\lambda=1,07\text{\AA}$. Für die jeweiligen Bilder wurden 1000 counts aufgenommen.

5.4.1.2 HslU



Figur 5.4.1.2.1: HslU-Kristall ohne Nukleotid und ohne Magnesium. . Die Beugungsbilder wurden mit dem mar345-Imageplate-Detektor ($\varnothing=345$ mm) im Abstand von 410 mm, einem Drehwinkel von $\Delta\alpha=0,5^\circ$ und bei einer Wellenlänge von $\lambda=1.07$ Å aufgenommen. Für jedes Bild wurden 20000 counts gesammelt.

Für den HslU Kristall ergab sich ein orthorhombisches Kristallgitter. Nach der Suche der Auslöschungen ergab sich die Raumgruppe $P2_12_12$. Die hochaufgelösten Beugungsbilder wurden mit einem mar345-Image-Plate-Detektor ($\varnothing=345$ mm) im Abstand von 410 mm,

einem Drehwinkel von $\Delta\alpha=0,5^\circ$ und bei einer Wellenlänge von $\lambda=1,07 \text{ \AA}$ aufgenommen. Für jedes Bild wurden 20000 counts gesammelt. Zusätzlich wurden bei niedriger Auflösung mit einer kleineren Platte ($\varnothing=180 \text{ mm}$) Reflexe bis zu 35 \AA aufgenommen. Der Plattenabstand betrug 410 mm. Dabei wurde allerdings in 1° -Schritten gedreht und für jedes Bild nur 1000 counts aufgenommen.

Zusammenfassend ergibt sich für die Datenqualität:

Kristall	P321	P2 ₁ 2 ₁ 2
Wellenlänge (Å)	1,0712	1,0700
Auflösung (Å)	20,0-4,0	35,0-3,0
Beobachtete Reflexe	224179	265668
Unabhängige Reflexe	32750	74040
Vollständigkeit (%)	95,8	96,9
R _{merge} (%)	10,7	7,9
Zellkonstanten (Å)	201,78 201,78 171,63	208,15 167,70 108,19

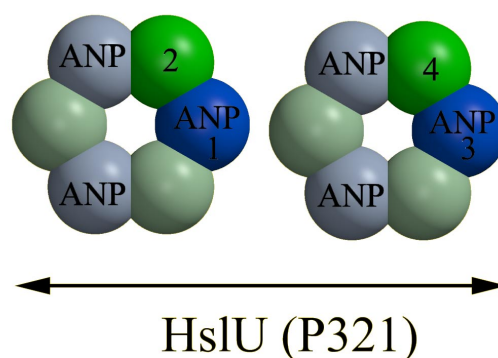
5.4.2 Strukturlösung von HslU

5.4.2.1 HslU mit Nukleotid und Magnesium

Die Struktur der HslU-Kristalle mit Nukleotid und Magnesium konnte mit den Pattersonsuchmethoden mittels des Programms AMORE aus den CCP4-Programmpaket gelöst werden. Als Suchmodell diente ein zu den Zeitpunkt vorhandenes Teilmodell von HslU aus der HslV-HslU-Struktur. Bei diesem Modell war der globuläre Teil des Moleküls und ein Teil der Intermediären Domäne vorhanden. Als Suchmodell wurde nur der globuläre Teil des Hexamers benutzt. Wie schon erwähnt, war die Raumgruppe noch nicht eindeu-

tig geklärt, da die Nulllinien nicht gemessen wurden. Die vorläufige Raumgruppe lautete P321. Weitere mögliche Raumgruppen waren P3₁21 und P3₂21.

Mit diesem Suchmodell konnte in AMORE nur in der Raumgruppe P321 eine sich schwach vom Untergrund abhebende Rotations- und Translationslösung gefunden werden, die nach einem Rigid-Body-Verfeinerungsschritt im FITING eine Korrelation von 46,4 und einen R-Faktor von 52,7 % hatten. Durch eine Kreuzsuche wurde die erste Lösung bestätigt und eine zweite Lösung mit der Korrelation 46,9 und den R-Faktor 52,5 % gefunden. Die Positionen dieser beiden Hexamere in der Zelle waren entlang der kristallographischen dreizähligen Achse in (2/3, 1/3) lokalisiert und gleichorientiert. Somit entstanden unter Anwendung der Symmetrieoperatoren zwei Partikel entlang der kristallographischen dreizähligen Achse in (1/3, 2/3) in umgekehrter Orientierung. Die genauen Positionen der beiden Hexamere nach AMORE waren in fraktionalen Koordinaten (26,14; 109,96; 98,10; 0,8446; 0,4153; 0,1431) und (94,90; 69,09; 278,14; 0,4158; 0,8454; 0,8573). In der asymmetrischen Einheit waren somit vier HslU-Untereinheiten. Der Flüssigkeitsgehalt lag bei ungefähr 80 %, was relativ hoch ist. Daher lag die Vermutung nahe, daß entlang der z-Achse ein weiteres Hexamer lokalisiert sei. Allerdings wurden trotz Suchmodell, das an Ursprung der Zelle positioniert wurde, nur die bereits vorhandenen Lösungen gefunden.



Figur 5.4.2.1.1: Darstellung der asymmetrischen Einheit der HslU-Kristalle mit ANP-PNP und Magnesiumchlorid. Die intensiven Farben zeigen den Gehalt der asymmetrischen Einheit.

Das neue Modell wurde mit denselben Programmen wie der Komplex verfeinert. Bei einer nachfolgenden properen und improperen Mittelung der Untereinheiten in den verschiedensten Kombinationen im direkten Raum mit MAIN wurde mit zunehmender Anzahl von Zyklen die Dichte schlechter. Aufschluß brachte die Berechnung einer OMIT-Map mit der Phaseninformation des Dimers aus der ersten Lösung des molekularen Ersatzes. Die Dichte für das zweite Dimer enthielt ein Monomer, das die Konformation des Suchmodells aufwies, und ein zweites, bei dem die N- und C- Domäne gegeneinander verkippt waren. Außerdem hat das zweite Monomer kein AMP-PNP gebunden. Die Domänen wurden überbaut und verfeinert. Bei der gleichen Prozedur für das andere Dimer ergab auch zwei unterschiedliche Konformationen für die beiden Monomere. Als Resultat ergab sich, daß die Untereinheiten mit und ohne Nukleotid im Hexamer alternieren. In einer nachfolgenden improperen Mittelung mit dem neuen Modell konnte eine Verbesserung erzielt werden, wobei hier die beiden Dimere miteinander gemittelt wurden. Das verfeinerte Modell, in dem die fehlgeordneten Reste 175-209 in Untereinheit 1, 135-222 in Untereinheit 2, 175-209 in Untereinheit 3 und 135-221 in Untereinheit 4 nicht eingebaut (Displayprogramm FRODO [Jones, 1978]) werden konnten, ergaben sich damit folgende Statistiken:

$R_{\text{cryst}}(\%)$	22,9
$R_{\text{free}}(\%)$	28,5
$R_{\text{back}}(\%)$	17,3
r.m.s.d. bond length (Å)	0,007
r.m.s.d. bond angles (°)	0,9
r.m.s.d. NCS (Å)	0,14

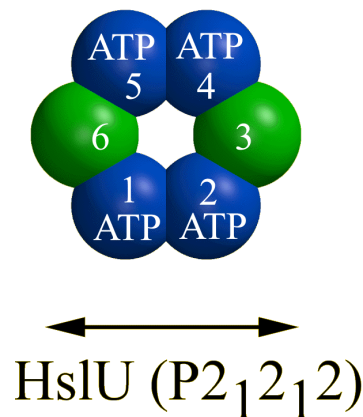
Der freie R-Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, die von der Verfeinerungsrechnung ausgeschlossen sind.

Der angegebene R_{back} wurde nach 10 Zyklen zweifachen Mittels berechnet.

Die relativ hohen R-Faktoren in der Verfeinerung rühren von der fehlgeordneten I-Domäne her, wodurch das Modell nicht vollständig gebaut werden konnte.

5.4.2.2 HslU

Die Kristalle hatten, wie schon beschrieben die Raumgruppe $P2_12_12$. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten ergab für ein Hexamer in der asymmetrischen Einheit einen Solventgehalt von 60 %, was in einem vernünftigen Bereich liegt. Die Berechnung der Selbstrotation bestätigte eine lokale sechszählige Symmetrie (nicht dargestellt). Es wurden mehrere Modelle für eine Pattersonsuche in AMORE konstruiert, ein HslU-Hexamer mit sechs Nukleotid-freien Untereinheiten und mit sechs gebundenen AMP-PNP. Die intermediäre Domäne wurde beseitigt. Weiterhin wurde das Heterohexamer des trigonalen Kristalls mit I-Domäne als drittes Suchmodell verwendet. Obwohl in den Tropfen kein Nukleotid zugegeben worden war, ergab sich mit dem Homohexamer mit Nukleotid und dem Heterohexamer eine Lösung. Dies lag daran, daß aus den Expressionszellen vier ATP-Moleküle pro Hexamer verschleppt wurden. Die Statistiken des Homohexamers ohne I-Domäne waren besser als die des Heterohexamers mit I-Domäne.



Figur5.4.2.2.1: Darstellung der asymmetrischen Einheit der HslU-Kristalle. Hier ist das gesamte Partikel in der asymmetrischen Einheit.

Für die einzelnen Verfeinerungsschritte wurden RIGID-BODY, POSITIONAL, BREFFINEMENT, ANNEALING aus dem XPLOR Programmpaket verwendet. Die einzelnen Untereinheiten wurden danach mit TOP3D überlagert. Dabei paßten jeweils 1,2,4,5 und 3,6 gut aufeinander. Die Erstgenannten hatten ATP gebunden, wobei keine Dichte für das γ -Phosphat vorhanden war. Die letzteren waren Nukleotid-frei und lagen sich im Ring gegenüber. An der Stelle, an der das γ -Phosphat erwartet wurde, war Dichte vorhanden, da dort ein Sulfation aus dem Kristallisationspuffer gebunden war. Die leeren Unterein-

heiten wurden ohne Sulfat modelliert und zeigen eine Konformationsänderung im P-Loop (siehe 5.6 Strukturbeschreibung). Zur Verbesserung der Phasen wurde mit MAIN im direkten Raum das Trimer aus den Untereinheiten 1, 2, 3 mit dem Trimer aus 4, 5, 6 improper gemittelt. Das ohne die fehlgeordneten Reste 128-233 in Untereinheit 1, 139-149 in Untereinheit 2, 118-230 in Untereinheit 3, 129-229 in Untereinheit 4, 177-212 in Untereinheit 5 und 118-221 in Untereinheit 6 verfeinerte Modell (CNS) ergab am Ende folgend aufgelistete Werte:

$R_{\text{cryst}}(\%)$	29,4
$R_{\text{free}}(\%)$	34,2
$R_{\text{back}}(\%)$	14,3
r.m.s.d. bond length (Å)	0,009
r.m.s.d. bond angles (°)	1,3
r.m.s.d. NCS (Å)	0,12

Der freie R-Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, die von der Verfeinerungsrechnung ausgeschlossen sind.

Der angegebene R_{back} wurde nach 10 Zyklen zweifachen Mittels berechnet.

Die relativ hohen R-Faktoren in der Verfeinerung rühren von der fehlgeordneten I-Domäne her, wodurch das Modell nicht vollständig gebaut werden konnte.

5.5 Strukturbeschreibung

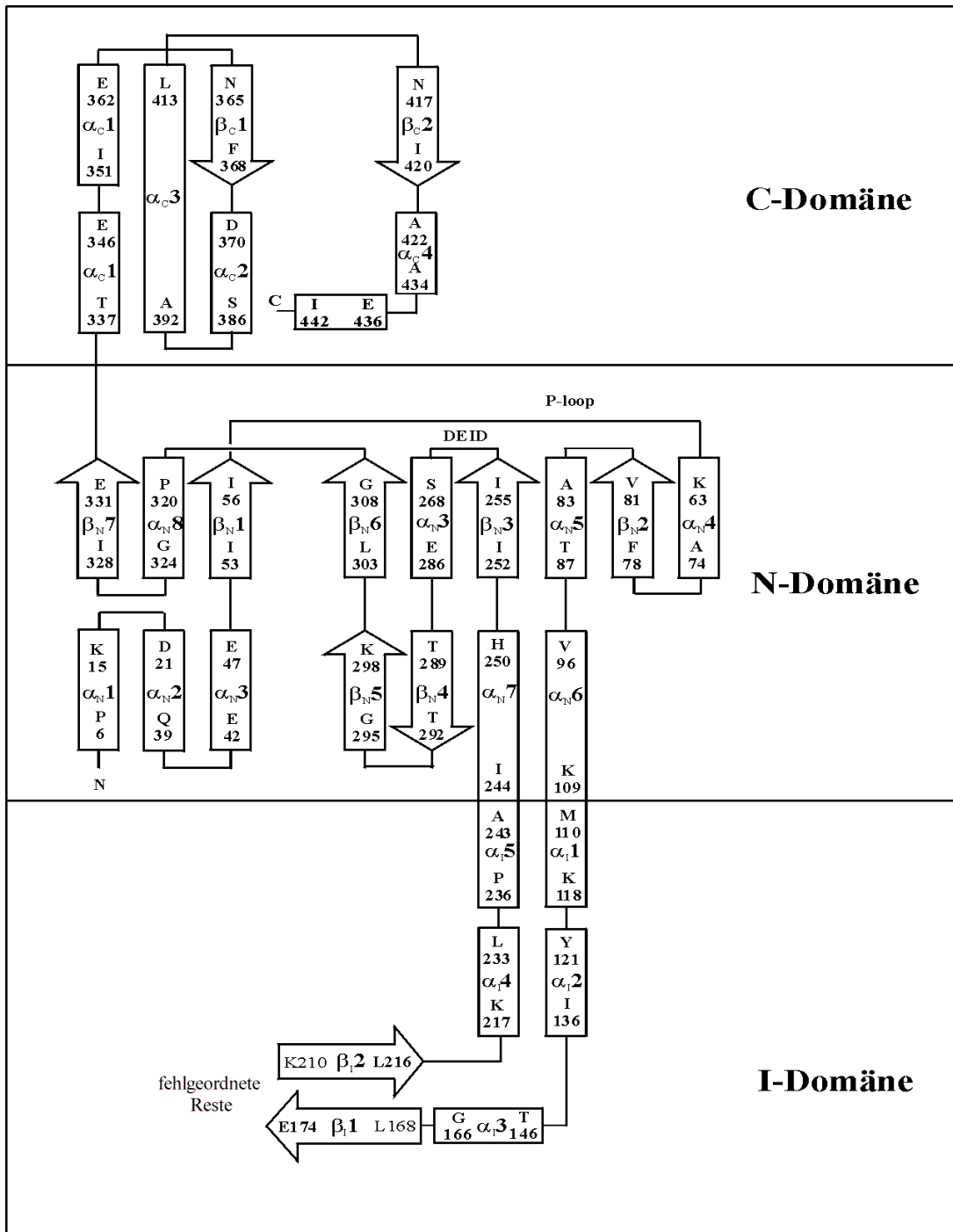
HslU gehört zu den Hsp100 (Clp) ATPasen. Auf Grund der Sequenzähnlichkeit zwischen den Hsp100-Proteinen wird für diese eine konservierte Faltung vorhergesagt. Die Kristallstruktur von HslU ist die erste gelöste Struktur eines Proteins dieser Familie. Die Clp-ATPasen wurden auf Sequenzebene als AAA-ATPasen klassifiziert [Neuwald, 1999]. Dies wird durch einen Vergleich der Strukturen der D2-Domäne der AAA-ATPase N-ethylmaleimide-sensitive fusion (NSF) Protein [Lenzen, 1998] und HslU bestätigt.

In nachfolgender Tabelle sind die Sekundärstrukturelemente von HslU mit den entsprechenden von NSF aufgelistet und in dem nachfolgenden Schema sind die Sekundärstrukturelemente von HslU zweidimensional dargestellt.

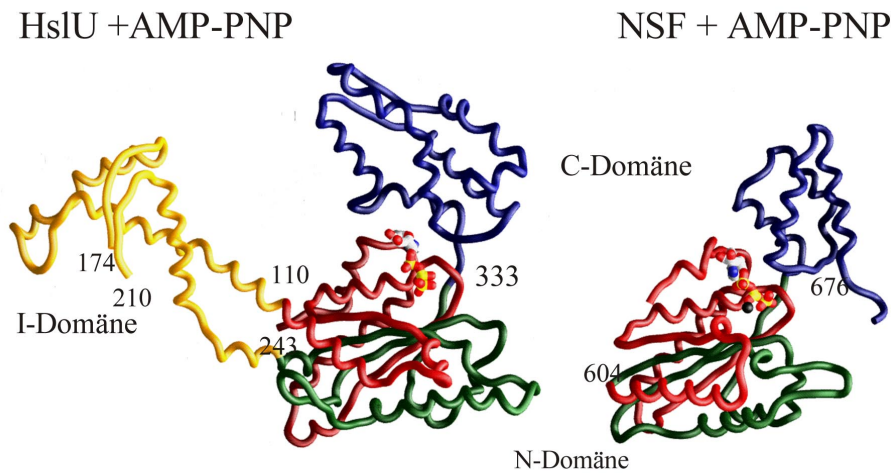
Tabelle:

α N1(P6-K15), α N2(D21-Q39), α N3(E42-E47), β N1(I53-I56) [V547-E550], α N4(K63-A74), β N2(F78-V81) [I573-C576], α N5(A83-T87), α N6(V96-K109), α I1(M110-K118), α I2(Y121-I136), α I3(T146-G166), β I1(L168-E174), β I2(K210-L216), α I4(K217-L233), α I5(P236-A243); α N7(I244-H250), β N3(I252-I255) [C607-V610], α N8(S268-E286), β N4(T289-T292), β N5(G295-K298), β N6(L303-G308) [L649-T654], α N9(P320-G324), β N7(I328-E331) [T671-H674], α C1(T337-E346), α C2(I351-E362), β C1(N365-F368), α C3(D370-S386), α C4(A392-L413), β C2(N417-N420), α C5(A422-A434), α C6(E436-I442)

Tabelle 5.5.1: Sekundärstrukturelemente von HslU und von NSF D2 Domäne. Die Angaben in den runden Klammern gelten für HslU und die Angaben in eckigen Klammern gelten für NSF-D2.



Figur 5.5.1: Schematische, zweidimensionale Darstellung der Sekundärstrukturelemente von HslU.



Figur 5.5.2: Vergleiche der Hauptkette von HslU und NSF. Beide Untereinheiten haben AMP-PNP gebunden.

HslU ist ein Hexamer, dessen Untereinheiten um ein zentrales Core angeordnet sind. Die Struktur einer Untereinheit kann in drei Domänen eingeteilt werden (Figur 5.5.2). Die Reste S2-K109 und I244-L332 gehören zur N-Domäne. Das N-terminale Histidin-Fusionspeptid war in der Dichte nicht definiert. Die C-terminale Domäne reicht von Rest Q333 bis L443. Die N- und C-Domäne bilden den globulären Teil des Hexamers. Die Reste M110-A243 wurden zur I-Domäne zusammengefaßt und fehlen sowohl in der NSF-D2-Domäne, als auch in anderen Hsp100-Proteinen. Diese intermediäre Domäne setzt sich vom globulären Teil des Hexamers ab und ist flexibel (Figur 5.5.3).

Die N-terminalen Domänen von NSF und HslU weisen dieselbe Topologie auf. Die strukturelle Ähnlichkeit der N-Domänen beider Proteine ist am größten für ein zentrales, paralleles β -Faltblatt, das ein Core in beiden Strukturen bildet und in HslU die Strangordnung β N2, β N3, β N6, β N1, β N7 aufweist. Die r.m.s Abweichung der C α Bindungslängen beider Proteine beträgt in diesem Bereich 0,7 Å. Eine Überlagerung der Strukturen beider Proteine in diesem Bereich zeigt, daß die Reste FIK von Strang β N2 in HslU um einen Rest verschoben sind, so daß PFIK in HslU auf den Resten FIKI in NSF-D2-Domäne liegt. Dadurch kommt in HslU Lysin 80 in die Nähe des Nukleotids. Das zentrale β -Faltblatt ist in HslU und NSF, wie in anderen P-Loop Triphosphatasen [Smith, 1999], zwischen zwei Lagen α -Helices lokalisiert. Der P-Loop befindet sich zwischen

dem β -Strang β N1 und der α -Helix α N4 in HslU und ist in Kontakt mit dem Nukleotid [Traudt, 1994; Saraste, 1990]. In den meisten P-Loop-Proteinen [Smith, 1996] ist das Nukleotid in *anti*-Konformation gebunden. In der AAA-Protein NSF-D2-Domäne ist im Gegensatz zu dem homologen Protein p97 N-D1-Domäne das Nukleotid in *syn* gebunden [Zhang, 2000]. In allen drei HslU Strukturen wurde für das Nukleotid in der Dichte eine *syn*-Konformation interpretiert. Eine Verfeinerungsrechnung ergab für die *anti*- und *syn*-Konformation gleiche R-Faktoren, allerdings waren die B-Faktoren für *anti*-Konformation niedriger. In größerer Entfernung von dem zentralen β -Faltblatt unterscheiden sich beide Strukturen, u. a. durch eine Insertion von zwei kurzen antiparallelen β -Strängen β N4 und β N5 in HslU, an deren Stelle in NSF ein Loop ist.

Die intermediäre Domäne (I-Domäne) ist eine flexible, aus verwundenen α -Helices aufgebaute Struktur. Eine reicht von M110 bis I136 (α I1/ α I2) und die andere von K217 bis A243 (α I4, α I5). Beide Helices sind an den Resten R120 und N235 geknickt. Die Helix α I2 endet mit den hydrophoben Resten ILDVLI (131-136) und bricht scharf an zwei nachfolgenden Prolinen (137-138) ab. Die Aminosäuren I131, L132, L135, I136 bilden zusammen mit M222 aus Helix α I4, F159 und L163 aus α I3 ein hydrophobes Zentrum. Die folgenden stark entgegengesetzt geladenen β -Stränge β I1 und β I2 bilden eine Leiter. Beide Stränge könnten als Klemme für den flexiblen Loop zwischen den Aminosäuren I175 und Q209 funktionieren. Dieser Loop ist in keiner der Dichten der einzelnen Untereinheiten in den drei Kristallen definiert. In Tabelle 5.6.2 sind nochmals zur Übersicht die fehlgeordneten Reste der einzelnen Untereinheiten in den drei Kristallformen aufgelistet:

Tabelle:

HslVU (P6₃22)

140-152, 167-215 (4); 114-157, 164-233 (5)

HslU (P2₁2₁2)

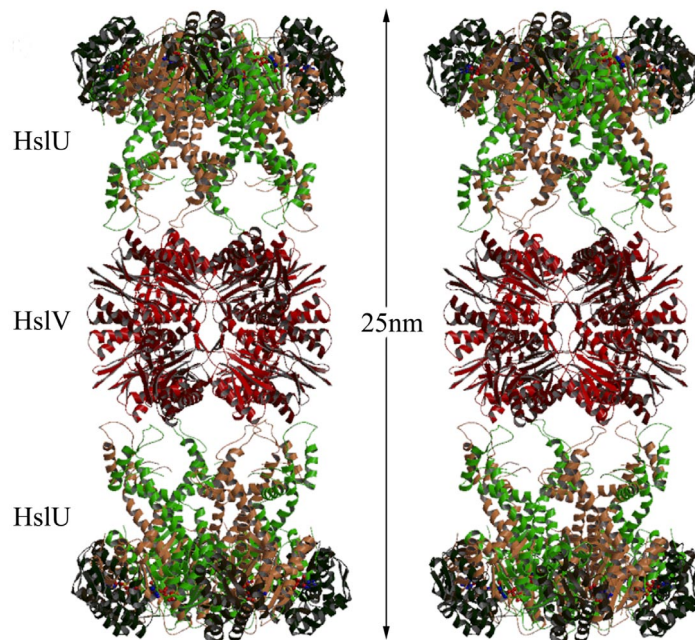
128-233 (1); 139-149, 177-212 (2); 118-230 (3); 129-229 (4); 142-150, 177-212 (5); 118-221 (6);

HslU (P321)

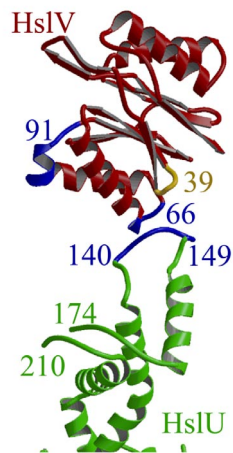
175-209 (1); 135-222 (2); 175-209 (3); 135-221 (4);

Tabelle 5.5.2: Auflistung der fehlgeordneten Reste für die verschiedenen Untereinheiten der verschiedenen Kristallformen.

Die carboxyterminale Domäne (333-443) besteht aus einem vier-Helixbündel ($\alpha C1/\alpha C2$, $\alpha C3$, $\alpha C4$, $\alpha C5/\alpha C6$) mit den voluminösen Resten T345 bis S350 und einem doppelsträngigen β -Faltblatt, das durch die Stränge $\beta C1$ und $\beta C2$ gebildet wird. Die Topologie des vier-Helixbündels in der C-Domäne in HslU ist auch in der von NSF vorhanden. Die C-Domäne von NSF ist kleiner als die von HslU, da die zusätzlichen Strukturelemente der HslU-C-Domäne nicht enthalten sind. Der C-Terminus von HslU ist hoch konserviert unter den HslU-Proteinen in den verschiedenen Spezies und umfaßt die Reste F441, I442 und L443. Dieser ist in der C-Domäne eingebettet. Seine Ladung wird durch die Arginine R394 und R329 aus der Nachbaruntereinheit ausgeglichen und somit stabilisiert.



Figur 5.5.3: Stereodarstellung der Struktur HslV-HslU. Die Wechselwirkung zwischen der ATPase- und Proteasekomponente wird durch die intermediäre Domäne vermittelt.



Figur 5.5.4: Vergrößerte Darstellung der Kontaktregion zwischen HslU und HslV in der Kristallstruktur

In der HslV-HslU Struktur ist HslV entlang und senkrecht zur sechszähligen Achse mit HslU in Kontakt. Die Partikel entlang der sechszähligen Achse wurden dem Komplex auf Grund der Stöchiometrie und Symmetrie zugewiesen. Dieser besteht aus einem HslV an dessen Polen jeweils ein HslU lokalisiert ist (Figur 5.5.3). Beide Proteine besitzen D6 Symmetrie und schließen dadurch aus, daß für die Aktivierung der Protease eine gebrochene Symmetrie zwischen beiden Komponenten vorhanden sein muß. Der Kontakt zwischen ATPase und Protease wird durch die intermediäre Domäne vermittelt. Die Dimensionen des HslV-HslU Partikels in der Kristallstruktur betragen 12 nm im Durchmesser und 25 nm in der Länge. Vergleiche mit der EM-Aufnahme bestätigen die Zusammensetzung des Komplexes aus zwei HslU und einem HslV. Die Dimensionen der Einzelkomponenten stimmen in beiden Untersuchungsmethoden überein, allerdings beträgt die Länge des Komplexes in der EM-Aufnahme 21,7 nm [Rohrwild, 1997]. Außerdem ist in der Kristallstruktur im Vergleich zur EM-Aufnahme die Hauptstreumasse von HslU 5 nm von HslV entfernt. Eine Erklärung könnte sein, daß die Komplexe in der EM-Aufnahme kollabiert sind, oder daß es eine alternative Möglichkeit gibt, einen Komplex zu bilden, indem die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist. Die EM-Aufnahmen zeigen für HslU hexamere und heptamere Spezies. Dies könnte auch ein Hinweis auf zwei alternative Assemblierungsmöglichkeiten sein [Rohrwild, 1997].

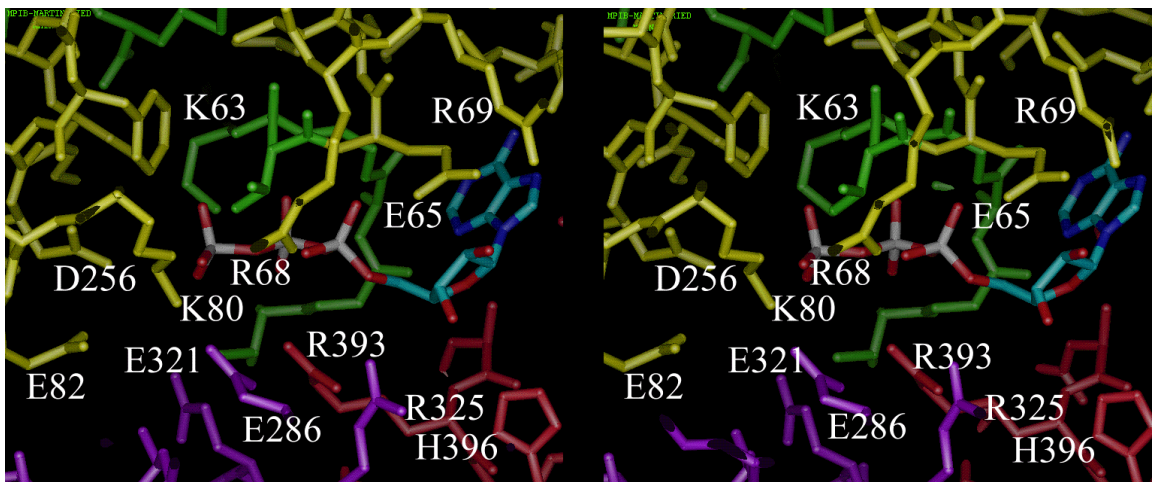
Der Kontakt zwischen Protease und Aktivator wird über die Reste 140 bis 149 der intermediären Domäne von HslU und der Region um die Reste 39 und 66 in HslV vermittelt (Figur 5.5.4). Die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen ist nicht präzise definiert, da das in die Interaktionen involvierte Segment von HslU und das Segment um den Rest 66 in HslV nur partiell in der Dichte definiert sind. An dieser Stelle sei angemerkt, daß der Komplex in Lösung instabil ist, was durch eine Analyse auf einer Superose 6 Gelfiltrationssäule zeigte. Es wurde erwartet, daß HslVU wegen des Hochsalzes in der Kristallisationsbedingung weniger aktiv ist als unter Assaybedingungen [Huang, 1997]. Deshalb wurde HslU und HslV in Anwesenheit von Resorufin-gelabeltem Casein, das sich durch Degradation violett färbt, unter der gleichen Bedingung kristallisiert. Das Resultat waren violette Kristalle. Die Anwesenheit der Degradationsprodukte wurde mit SDS-Polyacrylamidgelen nachgewiesen.

Wie schon im Kapitel 5.3.1 erwähnt, sind im Kristall gebundene und freie HslV Dodekamere. Aus dem Vergleich beider können nicht so viele Informationen gewonnen werden, da die ungebundenen HslV Dodekamere in der Dichte nicht so gut definiert sind. Dafür zeigt eine Überlagerung der HslV Struktur aus dem Komplex mit der zuvor analysierten Struktur von freiem HslV [Bochtler, 1997] eine Fehlordnung der Reste 65-69 und 84-93. Letzteres Segment ist eine α -Helix, die den Eingang des Dodekamers mit der Proteasekammer verbindet. Weiterhin sind die Untereinheiten von HslV im Komplex relativ zur früheren Struktur von HslV leicht gegeneinander verschoben. Dies kann allerdings eine Folge der Kristallpackungskräfte sein.

In HslU ist das Nukleotid mit den Resten aus N- und C-Domäne in Kontakt (Figur 5.5.5). In HslU formen die Reste V61, I17 und I118 der N-Domäne und die Reste L335, I343 und A392 der C-Domäne eine hydrophobe Tasche für den Purinring. Der Hauptstrang der Reste H16-I18 und G60-V61 sind die Wasserstoffakzeptoren der Adeninbase. Der Zuckerring ist von den Resten E56 und H396 umgeben. Die Peptidamidogruppen der Reste G60-E65 bilden Wasserstoffbrücken zu den α - und β -Phosphaten des Nukleotids aus. Die Phosphate werden zusätzlich durch eine Reihe polarer Reste koordiniert, wie K63 aus dem Walker A Motiv, D256 aus dem Walker B Motiv und das unkonservierte K80. T59 und T64 sind dem γ -Phosphat von zwei verschiedenen Seiten zugewandt. Die C-Domäne interagiert mit dem β - und γ -Phosphat über den Rest R393. Dieser Rest ist unter

den Clp ATPasen hoch konserviert [Schirmer, 1996] und ist ein Teil des Sensor 2 Motivs der AAA-ATPasen [Neuwald, 1999].

Außerdem sind die zwei sauren Reste E286 und E321 aus der Nachbaruntereinheit in Kontakt mit dem Nukleotid. Dabei ist E321 näher am γ -Phosphat als E286. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, daß durch die Oligomerisierung beide Reste in die Nähe des γ -Phosphat kommen, die Phosphatbindetasche ansäuern und so die ATP-Hydrolyse katalysieren. In der Position des unter den AAA-Proteinen unkonservierten E321 ist in der inaktiven NSF-D2-Domäne ein konserviertes K639. Dieser Hypothese steht gegenüber, daß in FtsH ein unter den AAA-ATPasen hochkonserviertes Arginin für die ATP-Hydrolyse verantwortlich gemacht wird. Diesem "Argininfinger" [Karata, 1999] entspricht in HslU R325. Dieser ist allerdings ~ 8 Å vom Nukleotid entfernt und agiert möglicherweise indirekt.

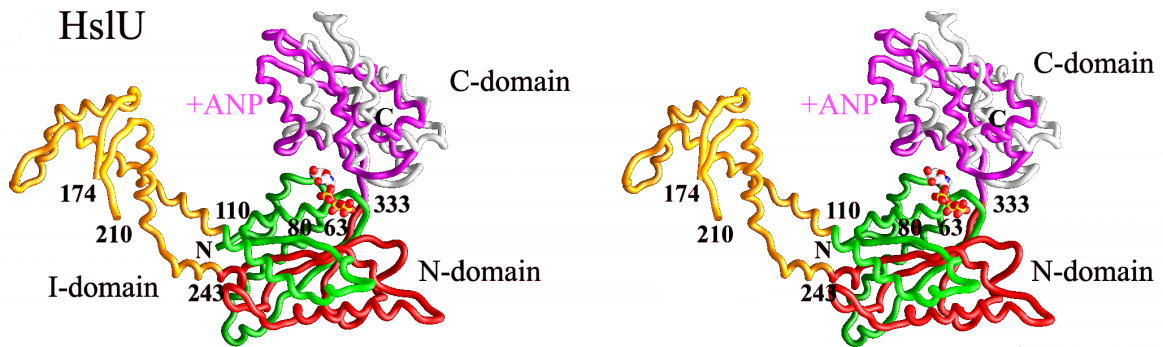


Figur 5.5.5: Stereodarstellung der ATP-Bindestelle in HslU. Das Nukleotid ist zwischen den Kontaktflächen zweier Untereinheiten gebunden. Die N- und C-Domäne sind in gelb und rot dargestellt. Der P-Loop gehört zur N-Domäne und ist grün gefärbt. Die Reste aus der Nachbaruntereinheit sind violett gefärbt.

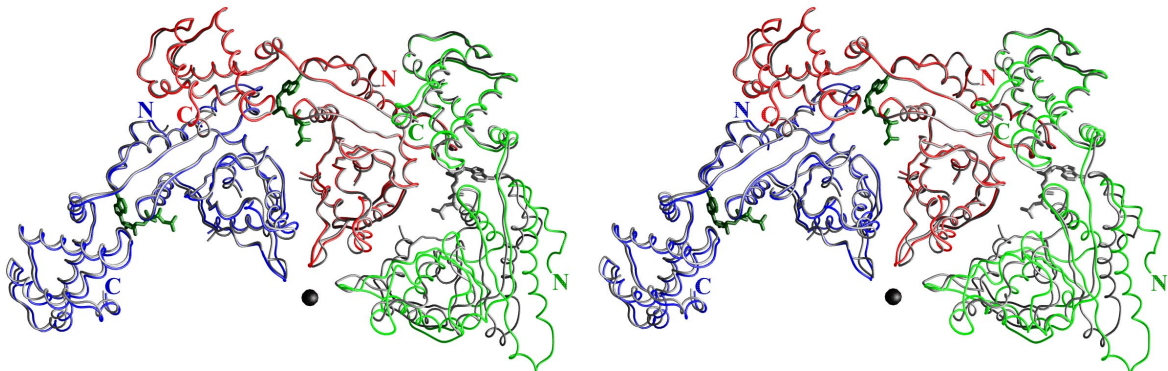
In der trigonalen und der orthorhombischen Kristallform ist nicht in allen Untereinheiten ATP gebunden. Jede ATP-freie Untereinheit ist von zwei ATP-bindenden Untereinheiten umgeben. Durch eine Überlagerung des voll mit Nukleotid beladenen HslU der Komplex-Struktur mit dem teilweise beladenen HslU der orthogonalen Kristallform zeigt, daß die sauren Reste vom γ -Phosphat weggedreht sind, wenn die Nachbaruntereinheit Nuk-

leotid-frei ist (nicht gezeigt). Dies könnte der Grund sein, warum eine Verminderung der ATP-Sättigung eine verminderte ATPase-Aktivität bewirkt und somit eine Erklärung für die unterschiedlichen Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für Peptid- und Proteinhydrolyse sein [Huang, 1997]. Die Dichte für das γ -Phosphat ist in allen drei Strukturen nicht vorhanden, obwohl das für die Kristallisation der Komplexkristalle und trigonalen Kristalle eingesetzte AMP-PNP nicht hydrolysierbar ist. Weiterhin ist in der trigonalen Kristallform keine Dichte für das Magnesiumion zu sehen, obwohl für die Kristallisation mehr $MgCl_2$ als EDTA eingesetzt wurde.

Ein Vergleich der Untereinheiten mit und ohne Nukleotid zeigt, daß das Fehlen des Nukleotids dazu führt, daß die N- und C-Domäne, die über ein Gelenk um den Rest Q333 miteinander verbunden sind, voneinander wegrotieren. Beim Betrachten der Struktur entlang der sechszähligen Achse in Richtung HslV fällt auf, daß die C-Domäne einer Untereinheit im Gegenuhrzeigersinn in engem Kontakt mit der N-Domäne aus der Nachbaruntereinheit ist (Figur 5.5.7). Die Bewegung der N-Domäne scheint von der Änderung der Orientierung relativ zur benachbarten C-Domäne verursacht zu werden. Die sauren Reste E286 und E321 sind sehr nahe an dem Gelenk lokalisiert. Während der Rotation der N- und C-Domäne um die Gelenkregion beim Übergang zwischen Nukleotidbindenden und -freien Zustand werden diese Reste stark bewegt. Im Gegensatz dazu werden die Stränge $\beta N4$, $\beta N5$ dabei fast 10 \AA versetzt. Durch diese Domänenbewegung wird auch die intermediäre Domäne verschoben. Dies könnte dazu führen, daß an die I-Domäne gebundene Substrate dissoziieren und zur Protease weitergegeben werden. Außerdem ist zu beobachten, daß in den HslU-Partikeln, die nur teilweise Nukleotid gebunden haben, die propere sechsfache Symmetrie verloren geht. Eine Folge dessen könnte sein, daß durch den Symmetriebruch zwischen der properen sechsfachen Symmetrie von HslV und der improperen sechsfachen Symmetrie von HslU die Affinität beider Proteine zueinander abnimmt. Für diese Hypothese würde sprechen, daß in den HslV-HslU Kristallen alle HslU-Untereinheiten Nukleotid gebunden haben, während die Untereinheiten in den HslU-Kristallen nur teilweise besetzt sind.



Figur 5.5.6: Stereodarstellung der Konformationen der Untereinheiten mit gebundenem Nukleotid (pink) und ohne Nukleotid (weiß). Die Abwesenheit von Nukleotid führt zu einer Domänenbewegung. Die C-Domäne rotiert von der N-Domäne weg.



Figur 5.5.7: Stereosicht auf drei Untereinheiten von HslU entlang der sechsfachen Achse, die durch die Punkte dargestellt wird. Die mit AMP-PNP vollbesetzten HslU Untereinheiten von den $P6_322$ Kristallen sind in grau dargestellt und mit partiell mit Nukleotid besetzten Untereinheiten aus $P2_12_12$ Kristallen überlagert. Diese sind in blau, rot und grün dargestellt.

Anhand der Struktur können Modelle für die Substraterkennung und Translokation aufgestellt werden. Die als Sensor und Substraterkennungsdomäne (SSD-Domäne) [Smith, 1999] identifizierte Domäne ist mit der C-Domäne in der Kristallstruktur von HslU identisch. Anders als in NSF-D2 ist diese Domäne hauptsächlich in Interaktionen zwischen benachbarten Untereinheiten involviert und steht nicht aus dem Ring heraus. Ihre Oberfläche ist entweder mit Lösungsmittel an der Außenseite des Proteins oder mit der Nachbaruntereinheit, aber nicht mit der Innenseite des Cores in Kontakt. Basierend auf der Struktur kommt dieser Teil des Proteins nicht für die Substratbindung in Frage. Außerdem kann die Identifizierung zweier PDZ-Domänen am C-Terminus von HslU auf Grund einer schwachen Sequenzhomologie dieses Bereichs zu den PDZ-Domänen widerlegt werden [Levchenko, 1997]. Die Strukturen von HslU und der PDZ-Domäne unterscheiden sich deutlich voneinander. Diese PDZ-Domänen sind in Protein-Protein Interaktionen involviert. Sie binden den Interaktionspartner am C-Terminus. Basierend auf der Struktur könne die flexible I-Domäne wie eine Schaufel funktionieren, die Substrate in HslU befördert. Die hydrophobe, sehr flexible und daher fehlgeordnete Region I175 bis Q209 könnte für die Substratbindung verantwortlich sein. Im Inneren von HslU könnten die Substrate destabilisiert oder entfaltet werden, wie in ClpA [Weber-Ban, 1999]. Durch das Ausbilden des Komplexes HslVU könnte zu einer Fehlordnung am Eingang in das dodekamere Core-Partikel, HslV, bewirken.

Die Kristallstrukturen vom 20S Proteasom aus Hefe [Groll, 1997], Archaeobakterien [Löwe, 1995] und dem eukaryontischen, ATP-unabhängigen Proteasomaktivator PA26/PA28 [Knowlton, 1997, Whitby, 2000] wurden gelöst. Doch von der 19S Regulatorkappe sind nur biochemische Daten und eine EM-Aufnahme vorhanden [Glickman, 1998]. Diese Daten zeigen, daß das Regulatorpartikel aus den Subkomplexen *lid* und *base* besteht. Der *base*-Subkomplex enthält sechs AAA-ATPasen [Glickman, 1998]. Auf Sequenzebene können diese mit der N- und C-Domäne von HslU überlagert werden. Dies ist aber zu erwarten, da HslU als AAA-ATPase klassifiziert wurde. Unerwarteterweise ist die I-Domäne 14 % identisch und 37 % homolog zu den 11-141 Aminosäuren des N-Terminus von MSS1, einer Untereinheit des humanen *base*-Subkomplexes. Daraus läßt sich folgern, daß die proteasomalen ATPasen strukturell zu HslU ähnlich sind und die I-Domäne der N-terminalen Region von MSS1 zu entsprechen scheint. Für den *base*-Subkomplex

wird deshalb eine ringförmige, oligomere Struktur wie in HslU erwartet. Über die Lokalisation der drei nicht-ATPasen, die neben den AAA-ATPasen den *base*-Subkomplex aufbauen, und die Struktur des *lid* Subkomplexes kann keine Aussage gemacht werden. All diese Hypothesen, basierend auf der Struktur, sind Ausgangspunkt einer Mutagenesestudie und weiterer nachfolgender biochemischer Charakterisierungen, die im nächsten Kapitel beschrieben werden.

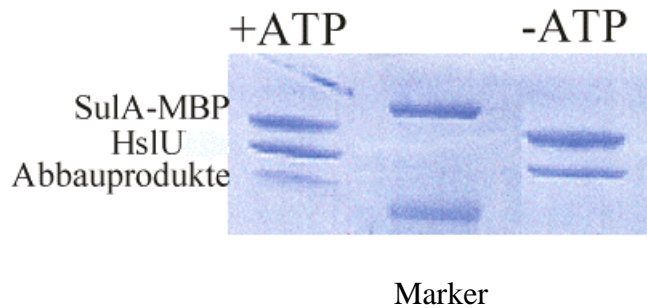
5.6 Mutagenesestudie an HslU basierend auf der Struktur

5.6.1 Assays zur Charakterisierung der Mutanten

Die Assays zur Bestimmung der amidolytischen- (Z-GGL-AMC), der caseinolytischen (FITC-Casein) Aktivitäten sowie der ATPase-Aktivität standen zur Verfügung (Kapitel 4.3.6). Darüber hinaus wurden zwei weitere Assays im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

SulA-Degradationsassay

Zur Bestimmung der Proteolyseaktivität von HslVU, HslV/HslU-Mutanten gegen das natürliche Substrat SulA wurde das Fusionskonstrukt SulA-MBP [Higashitani, 1997] verwendet. In diesem ist SulA an den C-Terminus von Maltosebindingprotein (MBP) fusioniert. In einem Reaktionsansatz von 60 µl wurde mit kleinen Abänderungen zu Seong, [Seong, 1999] 1 µg HslV, 2,5 µg HslU-Wildtyp/-Mutanten, 4 µg SulA-MBP, 3,3 mM ATP gemischt. Der Reaktionspuffer setzte sich aus 50 mM Tris pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,02 % Triton-X-100, 1,3 mM DTT zusammen. Dieser Ansatz wurde 5-7 h bei 37 °C inkubiert, dann mit 35 µl Auftragspuffer vermischt, gekocht und durch Gelelektrophorese auf einem 12 %igen Polyacrylamid-Gel nach Lämmli analysiert. Unter ATP-Verbrauch wird SulA von HslVU abgebaut. MBP wird nicht abgebaut. Die Abbauprodukte sind etwas oberhalb von 45 kDa zu sehen und sind somit etwas größer als das MBP (42 kDa).



Figur 5.6.1.1: Gel zur Darstellung des SulA-Degradationsassay. Die Reaktionszeit betrug 5 Stunden. Die eingesetzten Proteine sind Wildtyp-Proteine. Der Marker enthält die Größen 66 kDa, 45 kDa. Die erste Spur enthält die Reaktion mit ATP, die letzte Spur enthält die Negativkontrolle ohne ATP. Mit ATP sind knapp oberhalb 45 kDa die Abbauprodukte von SulA-MBP zu sehen.

SulA ist ein instabiles Protein. Eine Sekundärstrukturanalyse ergab, daß dieses Protein hauptsächlich aus Loop-Regionen, einigen β -Strängen und einigen α -Helices besteht. Es wurde direkt nach der Aufreinigung für den Assay eingesetzt. Eine Kontrollverdau mit einer Carboxypeptidase Mischung (A/D) bewies die labile Struktur von SulA. Ein Teil des Fusionskonstrukts wurde bis auf MBP verdaut, das eine globuläre, stabile Struktur hat. Ein Vergleich verschiedener Carboxypeptidaseverdaue von SulA-MBP zeigte, daß mit zunehmendem Alter von SulA-MBP dieses stärker degradiert wird. Dies spricht dafür, daß die instabile Struktur sich im Laufe der Zeit entfaltet.

Im Gegensatz zu den Substraten Casein oder Z-GGL-AMC ist für die Degradation von SulA nicht nur ATP-Bindung, sondern auch die Hydrolyse erforderlich [Seong, 1999]. Wird im Reaktionsansatz ATP durch ATP γ S ersetzt, so findet keine Reaktion statt. Dies ist ein Hinweis, daß zumindest der größte Teil des Substrats gefaltet war.

Ein eindeutiger Beweis, daß SulA gefaltet war, konnte nicht erbracht werden. Nach dem Verdau mit Faktor Xa konnte Maltosebindingprotein nicht ganz von SulA abgetrennt werden. Es nicht möglich den Faltungszustand von SulA durch NMR oder ein CD-Spektrum im fernen UV zu bestimmen, da beim Aufkonzentrieren Aggregate entstanden sind und nur das mitgeschleppte MBP in Lösung blieb.

Um auszuschließen, daß eine in geringen Mengen verschleppte Protease für die Reaktion, die 5 Stunden dauerte, verantwortlich sein könnte, wurde der SulA-Degradationsassay mit und ohne Calpain-I-Inhibitor durchgeführt. Mit diesem für HslIV spezifischen Inhibitor fand keine Reaktion statt.

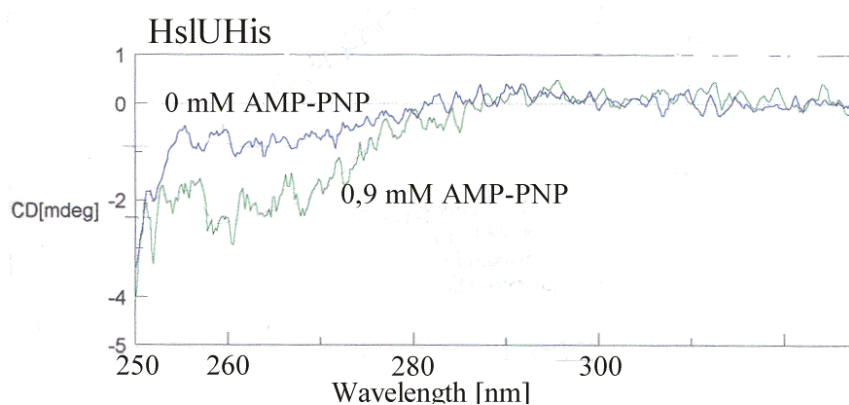
ATP-Bindung

Wie schon in Material und Methoden erwähnt, erzeugen die Aromaten eines Proteins im nahen UV-Bereich CD-Signale, wenn ihre Umgebung asymmetrisch ist. Beim Messen eines Proteins im nahen UV wird mit einer 1 cm Küvette und einer Proteinkonzentration von 1-2 mg/ml gearbeitet. Ziel dieses Assays ist es die Bindung von Nukleotid an HslU-Wildtyp/Mutanten durch eine Titrationsmessung zu bestimmen. Die CD-Spektren mit und ohne Nukleotid wurden wegen der starken Absorption von ATP/ATP-Derivate in einer 0,1 cm Küvette (Hellma, Müllheim) mit einer Proteinkonzentration zwischen 4,5 mg/ml und 9 mg/ml in einem JASCO J715 Spektropolarimeter (JASCO, Groß-Umstadt) aufgenommen. Der Puffer enthielt 20 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA. Die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen. Dazu wurde Nukleotid im stöchiometrischen Verhältnis zu den Untereinheiten dazugegeben. Alle Spektren wurden zehnmal akkumuliert und um den Leerwert des Puffers korrigiert. Gemessen wird die Änderung am Nukleotid bei 259 nm [Prodromou, 2000], dessen Umgebung durch die Bindung an das Protein asymmetrisch wird und so ein CD-Signal erzeugt. Generell ist der Beitrag der Aromaten des Proteins zum CD-Signal in diesem Bereich im Vergleich zum Nukleotid vernachlässigbar.

Bei dem Versuch AMP-PNP im stöchiometrischen Verhältnis zu den Untereinheiten zuzugeben fiel auf, daß nach der Absättigung von zwei Untereinheiten die Spektren sich nicht mehr unterschieden haben, also kein weiteres Nukleotid mehr gebunden wurde. Eine Erklärung dafür ist, daß ATP aus den Expressionszellen verschleppt wurde. Die gleiche Beobachtung wurde bei der Kristallisation von HslU ohne Zugabe von AMP-PNP und Magnesium gemacht. In vier Untereinheiten pro Hexamer war Dichte für ein ADP vorhanden. Der Versuch HslU-Wildtyp/-Mutante ATP-frei zu bekommen, schlug bis jetzt fehl. Die genauen Bindekonstanten konnten deshalb nicht bestimmt werden. Der Assay konnte nur dazu verwendet werden, um zu zeigen, ob der Wildtyp/die Mutante noch in der Lage ist, Nukleotid zu binden oder nicht. Weiterhin war zu beobachten, daß in den Spektren mit und ohne Nukleotid die Zirkulardichroismussignale der Aromaten von HslU schwach sind. Der Grund dafür ist, daß über die Hälfte aller Aromaten, alle drei Tyrosine und vier von fünf Tryptophanen sowie drei von zehn Phenylalaninen pro Untereinheit, an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind. Weiterhin fällt auf, daß bei der Zugabe von

Nukleotid das Rauschen in den Spektren zunimmt. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Absorption von ATP und seiner Derivate relativ zu ihrem Zirkulardichroismussignal hoch ist und so auch ein erhöhtes Untergrundrauschen verursacht wird. Dies konnte durch die dünnere Küvette nur teilweise unterdrückt werden. Für die Messung von ATP-Bindung an den Mutanten wurde jeweils AMP-PNP verwendet, da diese nicht hydrolysiert werden kann.

Weiterhin wurde mit diesem Assay die Bindung von ADP, AMP, Adenin, dATP und ATP an HslU-Wildtyp gemessen. Für alle Liganden konnte Bindung nachgewiesen werden. Um eine Negativkontrolle zu haben, wurde ein Spektrum mit HslV aufgenommen und AMP-PNP dazutitriert. Es wurde keine Änderung im Spektrum detektiert.



Figur 5.6.1.2: CD-Spektrum von HslU mit einer Konzentration von 4,5 mg/ml (blau). CD-Spektrum von HslU mit 0,9 mM AMP-PNP (grün). Damit sind alle Untereinheiten abgesättigt. Die Basislinie des Puffers ist abgezogen. Die Spektren sind nicht normalisiert.

5.6.2 Mutagenesestudie an der ATP-Bindestelle basierend auf der Struktur

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der biochemischen/kristallographischen Charakterisierung der Mutanten an der ATP-Bindestelle dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden. Die Mutanten wurden nach dem Protokoll in Kapitel 5.1 aufgereinigt, allerdings wurde auf den Q-Sepharoseschritt verzichtet, da diese Mutanten empfindlich auf höhere Natriumchloridkonzentrationen reagieren. Das Nukleotid ist in HslU in der Nähe der Gelenkregion zwischen N- und C-Domäne an den Kontaktflächen zweier benachbarter Untereinheiten gebunden. Die für die ATP-Hydrolyse wichtigen Reste sind

in der Nähe des γ -Phosphats des Nukleotids lokalisiert (siehe 5.5.5). Dabei stehen sich zwei Hypothesen gegenüber. In der Kristallstruktur sind die sauren Reste E321 und E286 aus der Nachbaruntereinheit in der Nähe des γ -Phosphats lokalisiert. Durch die Oligomerisierung gelangen die sauren Reste in die Nähe des γ -Phosphats, säuern die Phosphatbinde tasche an und könnten so die ATP-Hydrolyse katalysieren. Dem steht gegenüber, daß die basischen Reste eine wichtige Rolle in der ATP-Hydrolyse spielen. Ein unter den AAA-ATPasen hochkonserviertes Arginin ist in einem Katalysemodell für FtsH Sensor für das γ -Phosphats des Nukleotids aus der Nachbaruntereinheit. Diesem entspricht in HslU R325. Doch dieser Rest ist $\sim 8 \text{ \AA}$ vom γ -Phosphat entfernt. Die Mutante R325E bewirkte in HslU den Verlust aller proteolytischen- und ATPase-Aktivitäten. Eine Analyse auf einer Gelfiltrationssäule Superose 6 ergab für diese Mutante die Größe eines Monomers. Das Protein wurde mit einer Konzentration von $\sim 0,5 \text{ mg/ml}$ aufgetragen. Das native Protein lief unter denselben Bedingungen als Hexamer. Dieser Rest scheint die Oligomerisierung zu beeinträchtigen und somit indirekt die ATP-Bindung abzuschwächen. Die AMP-PNP-Titrationsmessung ergab, daß die Mutante kein Nukleotid mehr bindet. Dabei betrug die Konzentration der R325E-Mutante $4,87 \text{ mg/ml}$. Im Gegensatz dazu ist in der Kristallstruktur AMP-PNP eindeutig gebunden ($R_{\text{free}}=33,8 \%$; $R_{\text{crys}}= 30,3 \%$, Auflösung $2,8\text{-}18 \text{ \AA}$). Außer der besseren Datenqualität war keine Veränderung zu der Wildtyp Struktur zu erkennen. Zum Kristallisieren wurde die HslU-Mutante R325E mit einer Proteinkonzentration zwischen 15 mg/ml und 20 mg/ml mit 1 mM AMP-PNP gemischt und in derselben Bedingung wie der Wildtyp kristallisiert. Eine Erklärung für das unterschiedliche Ergebnis der beiden Methoden kann sein, daß die Bindung von AMP-PNP so schwach ist, daß sie durch Zirkulardichroismus nicht mehr detektiert werden kann. Eine andere Erklärung könnte sein, daß auf Grund der höheren Proteinkonzentration beim Kristallisieren die Oligomerisierung stärker erzwungen wird und so die Nukleotidbindung wieder möglich wird. Ein Grund für die Inaktivität in den ATPase- und Proteolyseassays könnte sein, daß durch die niedrige HslU Konzentration zwischen 25 ng/ml und 250 ng/ml die beeinträchtigte Oligomerisierung ins Gewicht fällt.

Der unkonservierte Rest E321 ist näher am γ -Phosphat als E286. Eine Überlagerung von HslU mit der NSF-D2-Domäne zeigt, daß dieser in der Nähe des in der Sequenz konservierten R639 in der inaktiven NSF-D2-Domäne liegt. Eine Mutante E321Q bewirkt auch

den Verlust aller Aktivitäten. In einer Analyse auf der Superose 6 Gelfiltrationssäule ergab für Wildtyp und Mutante gleiches Laufverhalten. Die Mutante ist ein Hexamer. Zwischen den CD-Spektren mit und ohne AMP-PNP bei einer Proteinkonzentration der Mutante E321Q von 4,5 mg/ml war keine Veränderung zu sehen. Die Mutante scheint kein AMP-PNP mehr zu binden. Die CD-Spektren zeigen weiterhin weniger Untergrundrauschen als die des Wildtyps und der Mutante R393A. Dies kann als Hinweis aufgefaßt werden, daß kein ATP aus den Expressionszellen verschleppt wurde. Es scheint, als läge ein ATP-freies Hexamer vor. Dadurch kann auch die Inaktivität in den einzelnen Assays erklärt werden.

Die Reste E286 und K80 spielen indirekte und nicht so wichtige Rolle. Sie wurden in Glutamat und Threonin mutiert. Beide Mutanten hydrolysierten ATP wildtypähnlich, allerdings wurde die proteolytische Aktivität gegen Casein und chromogene Substrate beeinträchtigt. Die Aktivität gegen Sula-MBP blieb von der Mutation K80T unbeeinflusst und wurde durch die Mutation E286Q auf die Hälfte reduziert. Es ist zu beobachten, daß für beide Mutanten die Aktivität gegen die Substrate von Z-GGL-AMC über Casein zu Sula -MBP zunahm. Dies konnte nicht erklärt werden. Gelfiltrationsläufe zeigten, daß die Mutanten in kleinere Einheiten zerfallen, wenn die Auftragskonzentration auf die Säule ~0,5 mg/ml beträgt. Der größte Teil von E286Q läuft als Penta-/Hexamer, während ein kleiner Teil als Di-/Trimer auf der Superose 6 Säule läuft. K80T dagegen läuft als Di-/Trimer. Da die Mutanten wildtypähnlich ATP hydrolysieren, wurden keine CD-Spektren gemessen. E286Q wurde auch kristallisiert. In der Struktur ($R_{\text{free}}=32,2\%$, $R_{\text{crist}}=29,7\%$; Auflösung 15-3.05 Å) war kein Unterschied zum Wildtyp zu sehen.

Weiterhin wurde das innerhalb der Clp-ATPasen hochkonservierte Arginin R393 in Alanin mutiert. Gelfiltrationsläufe ergaben für die Mutante die Größe eines Dimers. Die Mutante war in allen Assays inaktiv. Durch eine Titrationsmessung mittels Zirkulardichroismus bei einer Proteinkonzentration von 4,6 mg/ml konnte AMP-PNP-Bindung für die Mutante R393A nachgewiesen werden. Nicht geklärt werden konnte, ob das Nukleotid in R393A stärker oder schwächer gebunden wird als beim Wildtyp. Die Inaktivität gegen Sula-MBP kann dadurch erklärt werden, daß keine ATP-Hydrolyse stattfindet, die zur Entfaltung des Substrats notwendig ist [Seong, 1999]. In den Assays für die amidolytischen und caseinolytischen Aktivitäten wurde ATP γ S eingesetzt. Somit waren in diesen

Assays die ATP-Hydrolyse und die proteolytische Aktivität entkoppelt [Yoo, 1997]. Da eindeutig Nukleotid gebunden wurde, kann die amidolytische und caseinolytische Inaktivität dadurch erklärt werden, daß entweder das Nukleotid zu schwach gebunden oder in hoher Verdünnung des HslIU (25-250 ng/ml) unter Assaybedingungen die abgeschwächte Oligomerisierung ins Gewicht fällt.

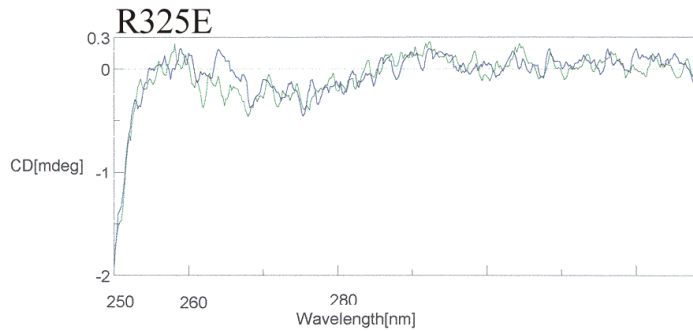
Diese Ergebnisse könnten Hinweise dafür sein, daß bei der ATP-Hydrolyse ein basischer Rest eine wichtige Rolle spielen könnte. Es ist aber nicht R325 (R315 in FtsH), sondern der Rest R393, der in HslIU diese Funktion übernehmen könnte.

Die Charakterisierung der Mutanten K63T aus dem Walker A-Motiv [Shin, 1996; Missiakis, 1996] und D256 [Missiakis, 1996] aus dem Walker B können in früheren Arbeiten von Shin, Missiakis nachgelesen werden.

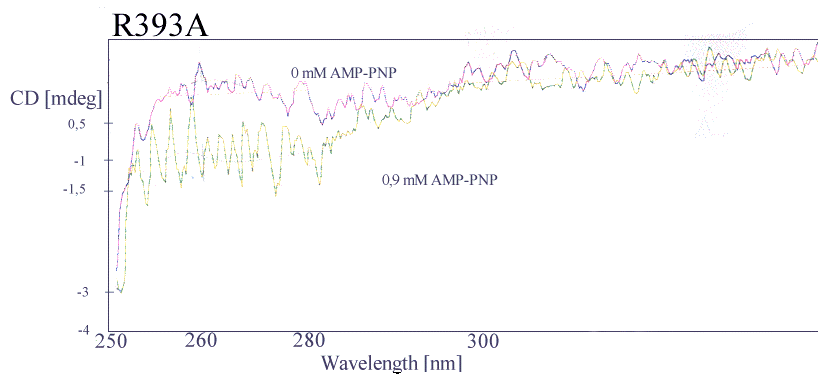
Tabelle

	Peptide	Casein	SulA	ATPase	Nukleotidbindung	Hexamer
HslIU	++++	++++	++++	++++	Ja (CD)	++++
K80T	+	++	++++	++++	Ja	++
E286Q	++	++	++	++++	Ja (Struktur)	+++
E321Q	-	-	-	-	Nein (CD)	++++
R325E	-	-	-	-	Nein (CD) Ja (Struktur)	-
R393A	-	-	-	-	Ja (CD)	++

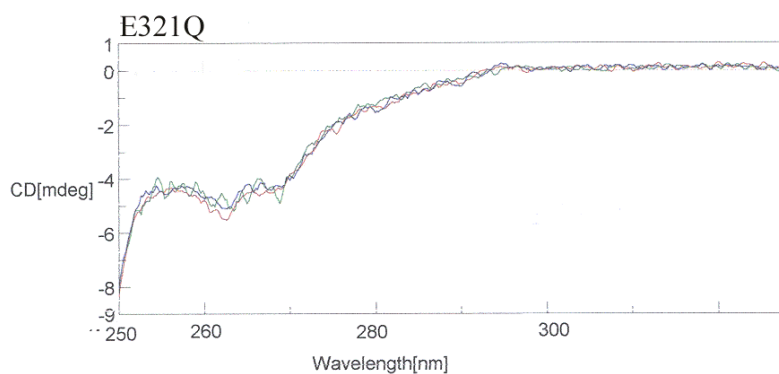
Tabelle 5.6.2.1: Zusammenfassung aller Eigenschaften der Mutanten/Wildtyp. Die Werte sind relativ zu dem Wildtyp-HslIU. (++++: 80%-100%; +++: 60%-80%; ++: 40%-60%; +: 20%-40%; -: < 20%)



Figur 5.6.2.1a: Nicht-normalisierte, aber Basislinien-korrigierte Spektren von R325E. Die Proteinkonzentration betrug $\sim 4,87$ mg/ml. Ein Spektrum wurde ohne Nukleotid aufgenommen, eines mit 0,9 mM AMP-PNP.



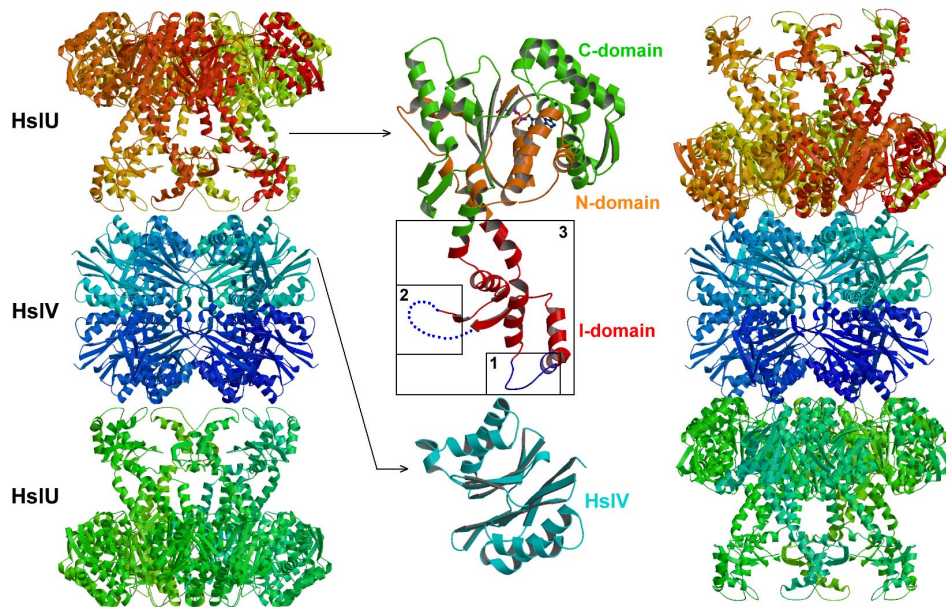
Figur 5.6.2.1b: Nicht-normalisierte, aber Basislinien-korrigierte Spektren von R393A. Die Proteinkonzentration betrug 4,6 mg/ml. Ein Spektrum wurde ohne Nukleotid aufgenommen, eines mit 0,9 mM AMP-PNP.



Figur 5.6.2.1c.: Nicht-normalisierte, aber Basislinien-korrigierte Spektren von E321Q. Die Proteinkonzentration betrug 4,5 mg/ml. Ein Spektrum wurde ohne Nukleotid aufgenommen, eines mit 0,45 mM und eines mit 0,9 mM AMP-PNP.

5.6.3 Mutagenesestudie an HslU an den möglichen Kontaktflächen zu HslV

Die in diesem Kapitel beschriebenen Mutanten wurden freundlicherweise von Dr. H. K. Song und Dr. R. Ravishankar zu Verfügung gestellt. Diese waren bereits mittels Peptidase-, Casein-Degradations-, ATPase-Assay und Gelfiltration charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sula-Degradationsassay an diesen Mutanten durchgeführt.



Figur 5.6.3.1: Links ist die Komplexform von HslV-HslU der Kristallstruktur dargestellt. Der Kontakt zwischen Aktivator und Protease wird über die I-Domäne vermittelt. In der Mitte ist eine Untereinheit von HslV und HslU in der Komplexform der Kristallstruktur dargestellt. Rechts sind die Kristallstrukturen von HslV und HslU in einer alternativen Komplexform entsprechend den EM-Aufnahmen dargestellt, in der die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist.

Deletionsmutanten an der I-Domäne.

Die I-Domäne reicht von M110 bis A243. Die Deletion der Reste 137-150 in HslU, die in der Kristallstruktur mit HslV in Kontakt sind, hatte keinen Einfluß auf die Aktivität gegen Z-GGL-AMC, Casein und Sula-MBP. Dieser Teil scheint deshalb nicht an der Komplexbildung zwischen HslV und HslU beteiligt zu sein.

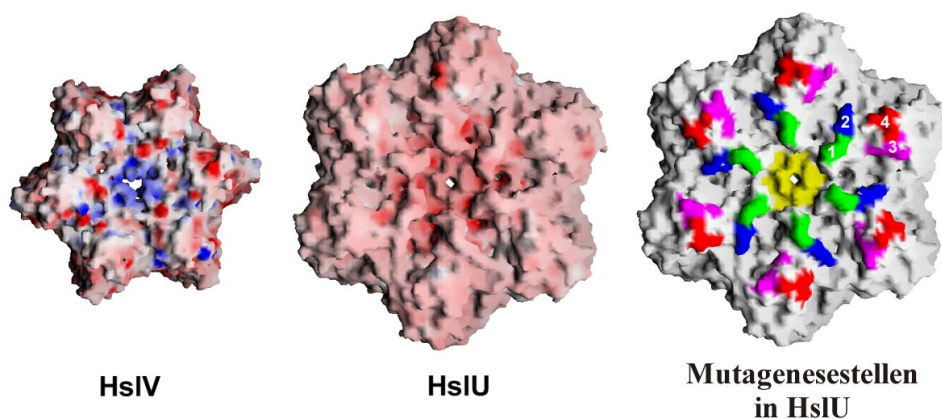
Die Deletionsmutante $\Delta 175-209$ zeigte gegen Z-GGL-AMC und Casein wildtypähnliches Verhalten. Im Gegensatz dazu war die Mutante gegen Sula-MBP komplett inaktiv. Die Deletion der Reste 111-239 bewirkte eine leichte Verminderung der Aktivitäten gegen Casein und Z-GGL-AMC und eine Inaktivität gegen Sula-MBP. Die I-Domäne ist für die Degradation von Sula-MBP essentiell. Die I-Domäne hat keine strukturelle Ähnlichkeit mit der Substratbindedomänen anderer Chaperone [Sabil, 1999]. Trotzdem läßt sich aus den Mutagenesergebnissen der Schluß fassen, daß die I-Domäne, und besonders die Reste 175-209 in die Substraterkennung/Substratbindung von Sula involviert sind.

Mutationen an den alternativen Kontaktstellen zwischen HslU und HslV basierend auf den EM-Aufnahmen

In der nächsten Stufe wurde die Einwirkung von Mutationen an der Oberfläche von HslU auf die Aktivität untersucht, die in der alternativen Komplexform (Figur 5.6.3.1 rechts) in Kontakt mit HslV sein könnten. Die Ladungen in der Kontaktregion zwischen HslU und HslV in der EM-Konformation scheinen entgegengesetzt zu sein. Deshalb wurden die Punktmutanten E266Q, E266Q/E385K und D436K/D437K nahe des Carboxyterminus analysiert (Figur 5.6.3.2). Letztere ergaben einen Verlust der Aktivität gegen Sula-MBP, nicht aber der anderen Aktivitäten, die allerdings für Z-GGL-AMC etwas reduziert war. Die anderen Mutanten zeigten in allen Assays einschließlich dem Sula-Degradationsassay wildtypähnliches Verhalten.

Um die Einwirkung drastischer Änderungen auf die Aktivität zu untersuchen, wurden Mutanten an der potentiellen Kontaktfläche zwischen HslU und HslV analysiert, in denen

zwischen 265, 266 und 387, 388 und 311, 312 jeweils ein Pentaglycinloop eingefügt war (Figur 5.6.3.2). Die Aktivitäten gegen Casein und Z-GGL-AMC waren bei den ersten beiden wildtypähnlich, aber SulA-MBP wurde nicht mehr abgebaut. Die letzte Insertionsmutante zeigte in allen Assays reduzierte Aktivität, während I312W mindestens so aktiv wie Wildtyp war. Dies war überraschend, daß die Insertionsmutanten kein SulA-MBP degradierten, obwohl Z-GGL-AMC und Casein noch abgebaut wurden.



Figur 5.6.3.2: Elektrostatische Oberfläche von HslV und HslU, die die Interaktionen in der alternativen Komplexform entsprechend den EM-Aufnahmen ausbilden. Negativ geladene Regionen sind rot und positive sind blau dargestellt. In dem Modell rechts sind die Mutagenesestellen in HslU markiert. Nummer 1 (grün) und 3 (pink) sind die Stellen, an denen die Pentaglycinloops nach den Resten 264 und 387 eingefügt sind, und die Ladung ausgetauscht ist (E266Q; E266Q/E385K). Nummer 2 zeigt die Punktmutante I321W und Nummer 4 (rot) ist die Stelle, an der die Ladung ausgetauscht wurde (E436K/D437K). Die hexamere Öffnung ist gelb eingefärbt.

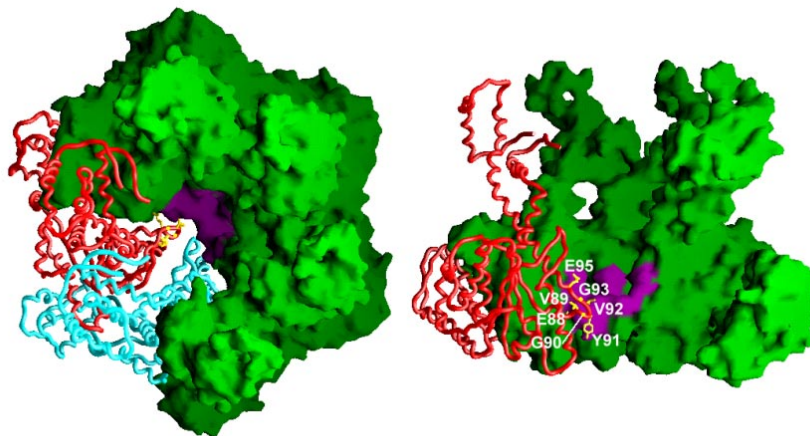
Mutationen an der hexameren Poreöffnung von HslU

Die Reste 87-95 in HslU formen den Eingang in den Innenraum von HslU. Sie sind in den HslU-Sequenzen verschiedener Spezies konserviert. Es wurden die Mutanten Y91G, V92G, G93A, Δ 88-92, E95W, E88Q, E266Q/E88Q und Δ 89-92 analysiert (Figur 5.6.3.3).

Die Deletionsmutanten Δ 88-92, Δ 89-92 zeigten in all den Assays keine oder stark reduzierte Aktivität. Die Mutationen Y91G und V92G hatten keinen bzw. kaum Einfluß auf die amidolytischen und caseinolytischen Aktivitäten, aber SulA-MBP wurde nicht mehr

degradiert. Die Mutante E88Q führte in der Einzel- und Doppelmutante zu einer reduzierten Aktivität in allen Assays, außer dem ATPase-Assay, dessen Resultat dem Wildtyp entsprach. Im Kontrast dazu wurden Mutanten analysiert, in denen die Flexibilität des Eingangsloops eingeschränkt oder die Poregröße verringert war. Dies waren G93A und E95W. E95W zeigte in allen Assays außer im Sula-Degradationsassay, in dem die Aktivität reduziert war, wildtypähnliches Verhalten. G93A zeigte in allen Assays reduzierte Aktivitäten. Daraus kann gefolgert werden, daß dieser Teil entweder auch für die Substraterkennung und/oder Translokation von Sula verantwortlich ist. Die amidolytischen und caseinolytischen Aktivitäten blieben von diesen Mutationen unbeeinflusst.

Es scheint, als wären verschiedene Komplexformen in die Degradation verschiedener Substrate involviert. Dabei scheint die EM-Komplexform eine wichtigere Rolle in der Degradation von Sula-MBP und die Komplexform der Kristallstruktur eine wichtigere Rolle für die amidolytische- und caseinolytische Aktivität zu spielen.



Figur 5.6.3.3: Mutierte Stellen am hexameren Eingang in der Draufsicht und Seitenansicht. Die Seitenkettenatome sind für eine Untereinheit in gelb dargestellt. Zwei dem Leser zugewandten Untereinheiten wurden beseitigt, um das Inneren von HslU zu zeigen.

	Peptide	Casein	SulA	ATPase	Hexamer	Kommentare
<i>I-Domänen-Mutanten</i>						
Δ 137-150	++++	++++	++++	++++	++++	2 Glycinlinker
Δ 175-209	++++	++++	–	++++	++++	2 Glycinlinker
Δ 111-239	+++	+++	–	+++	++++	3 Glycinlinker
<i>Kontaktregion in the EM-Komplexform</i>						
E266Q	++++	++++	++++	++++	++++	
E266Q/E385K	++++	++++	++++	++++	++++	
I312W	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	
Ins(264,265)	++++	++++	–	++++	++++	5 Glycininsertion
Ins(311,312)	–	–	–	+	++	5 Glycininsertion
Ins(387,388)	++++	+++	–	+++++	–	5 Glycininsertion, *
E436K/D437K	+++	++++	–	++++	++++	
<i>HslU-Mutanten an der hexameren Öffnung</i>						
E88Q	++	–	–	++++	++++	
E88Q/E266Q	++	–	–	++++	++++	
Y91G	+++	+++	–	++++	++++	
V92G	++++	++++	–	++++	+++	
G93A	+	+	–	++	++++	
E95W	++++	++++	+	++++	+++	
Δ 88-92	–	–	–	–	++	3 Glycinlinker
Δ 89-92	++	++	–	++	+++	1 Glycinlinker

Tabelle 5.6.3.1: Zusammenfassung aller Eigenschaften der Mutanten/Wildtyp. Die Werte sind relativ zu dem Wildtyp-HslU. (++++: 80%-100%; +++: 60%-80%; ++: 40%-60%; +: 20%-40%; -: < 20%)

*Hexamer in der Anwesenheit von Nucleotid.

6.0 Diskussion

6.1 Expression und Aufreinigung

Die *E.coli* Gene HslU und HslV konnten unter der Kontrolle des T7-Promotors zytosolisch mit Ausbeuten von 80 –120 mg pro Liter Zellkultur in BL21(DE3) Zellen überexprimiert werden. Dabei war an den N-Terminus von HslU und an den C-Terminus von HslV jeweils ein His₆-Peptid fusioniert. HslV wurde nach einem bereits vorhandenen Protokoll aufgereinigt [Bochtler, 1997]. Das Reinigungsprotokoll [Bochtler, 1997] von HslU wurde im Rahmen dieser Arbeit so optimiert, daß der Reinheitsgrad und die Homogenität des Proteins erheblich verbessert werden konnte. Ein Hauptproblem war, daß HslU während der Aufreinigung relativ schnell abgebaut wurde, und die Abbauprodukte nicht von unabgebautem HslU getrennt werden konnten. Dies wurde wie folgt gelöst: Der Abbau konnte weitgehend durch wiederholte Zugabe von PMSF während der gesamten Aufreinigung verhindert werden. Weiterhin wurde das von der Zn²⁺-Chelating Sepharose eluierte HslU auf einer Q-Sepharose unter Anwesenheit von EDTA nachgereinigt. Dabei wurden einige Fremdproteine und die Abbaufragmente von HslU abgetrennt. Das dann in Anwesenheit von EDTA aufkonzentrierte Protein ergab auf der Gelfiltration ein symmetrisches Elutionsprofil mit dem Laufverhalten eines Hexamers. Die Verwendung von EDTA bewirkt zum einen, daß die Metallionen-abhängigen Proteasen inhibiert werden und zum anderen, daß eventuelle Verbrückungen der Histidinfusionspeptide durch verschleppte Zinkionen verhindert werden. Die Gefahr der Aggregation von HslU ist nicht so groß, da HslU mit dem His₆-Peptid nicht so starke Koordinationsbindungen zu den Zinkionen ausbildet, wird aber bei höheren Konzentrationen größer. Das Protein wurde auf 20 mg/ml aufkonzentriert und durch Zugabe von 1 mM AMP-PNP stabilisiert. Es konnte so wochenlang auf 4 °C gelagert werden und ergab reproduzierbare Kristalle.

6.2 Kristallisation

HslU (20 mg/ml) wurde mit HslV (16 mg/ml) im molaren Verhältnis 2:1 gemischt. Da das Histidinfusionspeptid von HslV stark exponiert ist, werden in Anwesenheit von zweiwertigen Ionen besonders leicht Aggregate gebildet. Zum Kristallisieren des Kom-

plexes wurden deshalb keine Magnesiumionen zugegeben. Diese Lösung wurde mit der *sitting drop* Methode in einer schon vorhandenen (100mM MES, pH 6,3, 2,0M Natriumacetat) Bedingung [Bochtler, 1999] zum Kristallisieren angesetzt. Die höhere Proteinqualität, erreicht mit dem optimierten Reinigungsprotokoll für HslU (6.1), ergab beim Kristallisieren bessere Kristalle, die zur Strukturlösung führten. Weiterhin wurde ein Kryopuffer gefunden, der sich aus Reservoirpuffer und d(-)-2,3-Butandiol im Verhältnis 17:3 (v/w) zusammensetzt. In diesem Puffer konnten die Kristalle im Stickstoffstrom bei 90 K schockgefroren und am Synchrotron gemessen werden.

Außerdem wurde für HslU in Anwesenheit von AMP-PNP und $MgCl_2$ eine neue Kristallbedingung gefunden. Diese (100 mM Natriumcacodylat, 500 mM Ammoniumsulfat, 15% Glycerin, 10,5% PEG 8K) Bedingung wurde weiter verfeinert. Die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid als Additiv und E_6C_{12} als Detergenz bewirkten reproduzierbare Kristalle besserer Qualität. Unter der gleichen Bedingung entstanden auch ohne Magnesium und Nukleotid Kristalle. Für beide Fälle wurde ein Kryopuffer gefunden, der sich im Verhältnis 17:3 aus Reservoirpuffer und 87 % Glycerin zusammensetzt. In diesem Puffer konnten die Kristalle im Stickstoffstrom schockgefroren und am Synchrotron gemessen werden. Beide Kristalle führten zur Strukturlösung. Der Versuch HslU mit ADP und Magnesiumionen zu kristallisieren ergab unter dieser Bedingung keine auswertbaren Kristalle.

6.3 Strukturlösung von HslU und HslV-HslU

Die Daten für alle drei Kristalle wurden am DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron Hamburg) gesammelt.

HslVU kristallisierte in der Raumgruppe $P6_322$. Die Beugungsbilder der HslVU Kristalle waren relativ leicht auswertbar, zeigten allerdings in c-Richtung einen leichten Schmier. Die Struktur konnte durch eine Kombination von molekularen Ersatz und MAD (Multiples Anomalous Dispersion) gelöst werden. Für das Messen der anomalen Daten wurden die in Tanatabromid ($Ta_6Br_{12}^{2+}$) oder Thiomersal ($C_9H_9HgNaO_2S$) eingelegten HslVU Kristalle verwendet. Beide Derivate waren zu schwach, um die Lagen der Schweratome durch herkömmliche Pattersonsuchmethoden bestimmen zu können. Doch

die beiden starken Pseudoursprungspeaks bei $(2/3, 1/3, 1/2)$ und $(1/3, 2/3, 1/2)$ und die Selbstrotationsfunktion führten zur Schlußfolgerung, daß eines der HslV-Dodekamere auf einer der beiden 32-Punktlagen lokalisiert ist. Dies konnte dann durch die Methode des molekularen Ersatzes mit dem HslV-Dodekamer als Suchmodell bestätigt werden. Obwohl die beiden unabhängigen Untereinheiten von HslV weniger als ein viertel der Streumasse in der asymmetrischen Einheit ausmachten, konnten partielle Phasen berechnet werden, die gut genug waren, um die Lagen der Schweratome durch anomale und dispersive Differenzfouriermaps zu bestimmen. Alle Lagen konnten durch die Kreuzvektorverifizierung bestätigt werden. Die Lagen wurden zur Phasierung benutzt und mit den Modellphasen kombiniert. Die darauf resultierende Dichte konnte zum Modellbau benutzt werden. Dieses konnte bis auf Teile der intermediären Domäne erstellt werden, die auf Grund ihrer hohen Flexibilität fehlgeordnet sind.

HslU mit AMP-PNP und Magnesiumchlorid kristallisierte in der Raumgruppe P321. Die Struktur wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Als Suchmodell wurde ein HslU Hexamer aus der zuvor gelösten HslV-HslU Struktur benutzt, in dem die intermediäre Domäne deletiert wurde. Die Replacement-Lösungen setzten sich nur schwach vom Untergrund ab. Dies lag daran, daß im Gegensatz zur den HslV-HslU Struktur in nicht allen Untereinheiten Nukleotid gebunden war und die Konformationen der Untereinheiten mit und ohne Nukleotid unterschiedlich sind. Die HslU Hexamere in dieser Kristallform bauen sich alternierend aus Nukleotid-freien und Nukleotid-bindenden Untereinheiten zusammen.

HslU ohne Nukleotid und Magnesiumionen kristallisierte in der Raumgruppe P2₁2₁2. Die Struktur wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes mit dem HslU-Hexamer der HslV-HslU Struktur als Suchmodell gelöst, in der die intermediäre Domäne deletiert wurde. In vier Untereinheiten des HslU Hexameres dieser Kristallform war Nukleotid gebunden. Dieses wurde aus den Expressionszellen verschleppt. Die Nukleotid-freien Untereinheiten liegen sich im Hexamer gegenüber.

Sowohl in der trigonalen als auch in der orthorhombischen Kristallform waren Teile der intermediären Domäne fehlgeordnet.

6.4 Strukturbeschreibung

HslU gehört zu den Hsp100 (Clp) ATPasen. Die Kristallstruktur von HslU ist die erste eines Proteins aus dieser Familie. HslU ist ein Hexamer, dessen Untereinheiten um ein zentrales Core angeordnet sind. Die Struktur einer HslU-Untereinheit kann grob in drei Teile eingeteilt werden. Die Reste S2-K109 und I244-L332 gehören zur N-Domäne, die Reste M110-A243 zur I-Domäne und die Reste Q333-L443 zur C-Domäne (Figur 5.5.2). Die N- und C-Domäne bilden den globulären Teil des HslU Hexamers, von dem sich die flexible I-Domäne absetzt (Figur 5.5.3). Der Bereich um die ATP-Bindestelle weist die konservierte Faltung der AAA-ATPasen auf. Diese setzt sich aus einer N-terminalen α/β -Subdomäne, in der ein zentrales β -Faltblatt zwischen zwei Lagen α -Helices lokalisiert ist, mit der ATP-Bindestelle und einem C-terminalen 4-Helixbündel zusammen, das auf der ATP-Bindestelle liegt. Dadurch wird die Klassifizierung der Clp-ATPasen als AAA-ATPasen auf Grund von Sequenzanalysen durch die HslU Struktur bestätigt [Neuwald, 1999]. Das Nukleotid wird in *anti*-Konformation gebunden, wie in anderen P-Loop Proteinen [Smith, 1996] und ist mit den Resten der N- und C-Domäne in Kontakt. Der P-Loop ist zwischen dem β -Strang β N1 und der α -Helix α N4 lokalisiert (G57-G62) und mit dem Nukleotid in Kontakt (Figur 5.5.1). Dabei bilden die Peptidamidogruppen der Reste G60-E65 Wasserstoffbrücken zu den α - und β - Phosphaten des Nukleotids aus. Zusätzlich werden die Phosphate durch eine Reihe polarer Reste koordiniert. Diese sind K63 aus dem Walker A Motiv, das unkonservierte K80, die im Abstand einer Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat des Nukleotids lokalisiert sind, und D256 aus dem Walker B Motiv. Ein unter den Clp-ATPasen konserviertes Arginin R393 [Schirmer, 1996] ist der einzige Rest aus der C-Domäne, der mit den β -, γ - Phosphaten des Nukleotids in Kontakt ist. Weiterhin sind zwei saure Reste E321 und E286 aus der Nachbaruntereinheit in der Nähe des γ -Phosphats lokalisiert (Figur 5.5.5).

In allen drei Kristallformen ist keine Dichte für das γ -Phosphat des Nukleotids vorhanden. Die N- und C-Domänen sind über ein Gelenk um den Rest Q333 miteinander verbunden. In der trigonalen und orthorhombischen Kristallform ist in nicht allen Untereinheiten Nukleotid gebunden. Bei der Überlagerung der Untereinheiten mit und ohne Nukleotid

zeigte sich, daß die C-Domäne von der N-Domäne im Nukleotid-freien Zustand weggedreht ist (Figur 5.5.7). Die intermediäre Domäne ist eine bewegliche, instabile Struktur, die hauptsächlich aus α -Helices besteht. Besonders die hydrophoben Reste I175 bis Q209 sind auf Grund ihrer extrem hohen Flexibilität in keiner der Elektronendichten der einzelnen Untereinheiten in den drei Kristallformen definiert. Ein Sequenzvergleich bestätigte die Sequenzverwandschaft der Clp ATPasen und zeigte, daß die I-Domäne in den anderen Proteinen dieser Familie fehlt (nicht dargestellt).

Die Oberfläche der C-terminalen Domäne ist entweder an Interaktionen mit der Nachbaruntereinheit beteiligt oder mit dem Lösungsmittel an der Außenseite des Proteins in Kontakt, nicht aber an der Innenseite des Cores lokalisiert. Damit kann basierend auf den strukturellen Ergebnissen ausgeschlossen werden, daß diese in die Substratbindung involviert ist. Damit wird das Modell der C-Domäne als SSD-Domäne (Sensor und Substraterkennungsdomäne) [Smith, 1999] widerlegt. Die Identifizierung zweier PDZ-Domänen am C-Terminus von HslU auf Grund einer schwachen Sequenzhomologie zwischen der PDZ-Domäne und der entsprechenden Bereiche in den Clp-ATPasen kann widerlegt werden [Levchenko, 1997, Feng, 1998]. Die Strukturen von HslU und der PDZ-Domäne unterscheiden sich deutlich. Basierend auf der Struktur kommt die I-Domäne, besonders die hydrophoben Reste I175-Q209, als Substratbindestelle in Frage.

In der Struktur der HslV-HslU Kristalle sind die HslU Partikel an den beiden Polen von HslV entlang der sechszähligen Achse lokalisiert (Figur 5.5.3). Beide Proteine besitzen D6 Symmetrie und schließen dadurch aus, daß für die Aktivierung der Protease eine gebrochene Symmetrie zwischen beiden Komponenten vorhanden sein muß. Der Kontakt zwischen Aktivator und Protease wird über die Reste 140-149 der intermediären Domäne von HslU und über die Region um die Reste 39 und 66 in HslV vermittelt (Figur 5.5.4). Die Dichte des Segments in HslU, das in die Interaktion mit HslV involviert ist, und der Region um den Rest 66 in HslV ist nicht präzise definiert. Ein Vergleich zwischen der zuvor analysierten Struktur von HslV [Bochtler, 1997] und der in der HslV-HslU Struktur gebundenen HslV zeigte, daß die Reste am Eingang eines gebundenen HslV (65-69; 84-93) fehlgeordnet sind. Das Segment 84-93 ist eine Helix, die den Eingang des Cores mit der Proteasekammer in HslV verbindet. Außerdem sind in nicht allen Untereinheiten im Hexamer der freien HslU Partikel Nukleotid gebunden, während in der HslV-HslU

Struktur in allen Untereinheiten Nukleotid gebunden ist. Die Dimensionen des HslV-HslU Partikels sind in der Kristallstruktur 12 nm im Durchmesser und 25 nm in der Länge. Vergleiche mit den EM-Aufnahmen von HslVU bestätigen die Dimensionen der Einzelkomponenten, aber ergeben für die Länge des Komplexes 21,7 nm [Rohrwild, 1997]. Weiterhin fällt in diesem Vergleich auf, daß die Hauptstreumasse des HslU Partikels 5 nm von HslV entfernt liegt. Dies könnte bedeuten, daß HslU in der EM-Komplexkonformation mit der zur I-Domäne entgegengesetzten Seite Kontakte zu HslV ausbildet (Figur, 5.6.3.1), oder in der EM-Struktur kollabierte Spezies dargestellt sind. Biochemische Daten zeigten, daß HslV durch das dem konservierten C-Terminus von HslU entsprechende Peptid EDLSRFIL gegen kleine Substrate ebenso stark aktiviert wird wie durch den natürlichen Aktivator HslU [Bochtler, 1999]. Für eine alternative Komplexkonformation (Figur 5.6.3.1) spräche, daß der in der C-Domäne eingebettete, konservierte C-Terminus von HslU in die Nähe von HslV käme und eine Aktivierung durch den C-Terminus wie bei PA26/PA28 und Proteasom [Knowlton, 1997, Wilk, 1997; Whitby, 2000] möglich werden könnte. Dies warf die Frage auf, ob es zwei verschiedene Möglichkeiten der Komplexbildung (Figur 5.6.3.1) gibt und war deshalb neben der Frage nach der Substratbindung/Substraterkennung und Antrieb der ATP-Hydrolyse ein wichtiger Ausgangspunkt für eine Mutagenesestudie.

Die ATP-abhängige Protease HslVU steht in Verbindung zum 26S Proteasom. Die Kristallstrukturen von HslV und 20S Proteasom [Bochtler, 1997; Groll, 1997], sowie der eukaryontischen, ATP-unabhängigen Aktivatoren PA26/PA28 [Knowlton, 1997, Whitby, 2000] sind analysiert. Die Untereinheiten des HslV Dodekamers und die β -Untereinheiten des 20S Proteasoms, das sich aus den α -, β -Untereinheiten in einer $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Architektur zusammensetzt, haben ~20 % Sequenzähnlichkeit und eine konservierte Faltung gemeinsam. Doch von dem 19S Regulatorpartikel existieren nur biochemische Daten und EM-Aufnahmen [Glickman, 1998]. Dieses ist ein großer Heterokomplex, wodurch die Kristallstrukturanalyse erschwert wird. Daher ist HslVU ein interessantes Modellsystem für das 26S Proteasom. Das 19S Regulatorpartikel setzt sich aus dem *lid* und der *base* Subkomplex zusammen. Auf Sequenzebene können die sechs AAA-ATPase Untereinheiten des *base*-Subkomplexes mit der C- und N-Domäne von HslU überlagert

werden. Unerwarteterweise ist die I-Domäne 14 % identisch und 37 % homolog zu den 11-141 Aminosäuren des N-Terminus von MSS1, einer Untereinheit des humanen *base*-Subkomplexes. Daraus läßt sich folgern, daß die proteasomalen ATPasen strukturell zu HslU ähnlich sind, daß allerdings die I-Domäne an den N-Terminus fusioniert sein könnte. Erwartet wird daher für den *base* eine ringförmige, oligomere Struktur. Keine Aussagen können über den *lid*-Subkomplex und die drei Rpn-Untereinheiten gemacht werden, die neben den sechs ATPasen den *base*-Subkomplex aufbauen.

6.5 Biochemische Charakterisierung

Die Assays zur Bestimmung der amidolytischen, caseinolytischen sowie ATPase-Aktivität standen zur Verfügung. Darüber hinaus wurde sowohl ein Assay für eine Nukleotidbindestudie mittels Zirkulardichroismus, als auch zur Bestimmung der Proteolyseaktivität gegen das natürliche Substrat Sula etabliert.

Für den Sula-Degradationsassay wurde das Sula-MPB Fusionskonstrukt verwendet. Sula ist ein instabiles, leicht aggregierendes Protein. Mittels dieses Assays sollte die Einwirkung von Mutationen an HslU auf die Degradation von gefalteten, natürlichen Substraten untersucht werden. Ein eindeutiger Beweis mittels NMR oder Zirkulardichroismus, daß dieses Substrat gefaltet war, konnte nicht erbracht werden, da Sula beim Aufkonzentrieren aggregierte. Im Gegensatz zu den Substraten Casein oder Z-GGL-AMC ist für die Degradation von gefalteten Substraten (Sula) nicht nur Nukleotid-Bindung, sondern auch die Hydrolyse erforderlich [Seong, 1999]. Wird im Reaktionsansatz des Sula-Degradationsassays ATP durch ATP γ S ersetzt, so findet keine Reaktion statt. Dies ist ein Hinweis, daß zumindest der größte Teil des Sula im Sula-MBP Fusionskonstrukts gefaltet war. Für den Assay wurde nur frisch aufgereinigtes Sula-MBP eingesetzt.

Die Nukleotid-Bindung an HslU-Wildtyp/-Mutanten wurde in einer Titrationsmessung mittels Zirkulardichroismus bestimmt. Gemessen wird die Änderung am Nukleotid, die durch die Bindung an HslU entsteht. Nachteil diese Assays ist, daß die CD-Signale von ATP und seiner Derivate relativ zur starken Absorption schwach sind. Dies konnte teilweise durch die Benutzung einer schmäleren Küvette kompensiert werden, was aber trotzdem die Sensitivität des Assays eingeschränkt hat. Da HslU Nukleotid aus den Expressionszellen verschleppt hat, war es nicht möglich, die Bindungskonstanten zu be-

stimmen. Es war nur möglich eine Aussage zu treffen, ob HslU-Wildtyp/-Mutanten Nucleotid binden oder nicht. Mittels dieses Assays konnte außerdem die Bindung von ATP, ADP, AMP, dATP und Adenin an HslU nachgewiesen werden.

6.6 Mutagenesestudie

Mutagenese basierend auf den zwei möglichen Komplexkonformationen der EM- und Kristallstruktur

In der Kristallstruktur wechselwirken die Reste 140-149 der I-Domäne von HslU mit HslV. Eine Deletion der Reste P137-Q150 hatte keinen Einfluß auf die Aktivitäten in allen Assays. Die Deletion der Reste I175-Q209 der I-Domäne bzw. der gesamten I-Domäne bewirkten, daß SulA-MBP nicht mehr abgebaut wurde. Dagegen wurden die amidolytischen und caseinolytischen Aktivitäten von der Mutation Δ 175-209 in HslU nicht beeinflußt und durch die Deletion der gesamten I-Domäne etwas reduziert. Der Bereich I175-Q209 ist für die SulA-MBP Degradation essentiell. Er könnte in die Substraterkennung/Substratbindung involviert sein, obwohl die I-Domäne keine strukturelle Ähnlichkeit zu den Substratbindedomänen in anderen Chaperonen hat [Sabil, 2000] (Tabelle 5.6.3.1.; Figur 5.5.4)

Die Insertion von Pentaglycinloops in HslU an den potentiellen Kontaktstellen zwischen beiden Partikeln in der alternativen Komplexform, in der die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist, waren alle gegen das Substrat SulA-MBP inaktiv. Diese Mutation hatte allerdings bis auf eine keinen Einfluß auf die Aktivität gegen chromogene Substrate und Casein. Die Mutation der geladenen Reste, die durch ihre Position für die alternative Komplexbildung wichtig erscheinen, in entgegengesetzt geladene Aminosäuren hatte bis auf eine Doppelmutante nahe am konservierten C-Terminus keinen Einfluß auf die Aktivität (Figuren 5.6.3.1, 5.6.3.2). Diese zeigte, daß die Proteolyseaktivität gegen SulA-MBP verloren geht, während die gegen Casein erhalten bleibt und die Peptidaseaktivität im Vergleich zu Wildtyp etwas niedriger ist (Tabelle: 5.6.3.1).

Mutanten an der Öffnung des HslU-Hexamers (Figur 5.6.3.3) zeigten, daß der Eingangslöcher von Rest 88 bis 92 für die Degradation von SulA essentiell ist, während die anderen Aktivitäten von den Mutanten mehr oder weniger unbeeinflußt blieben. Die Mutanten in dieser Region waren so gestaltet, daß die Pore-Größe eingeschränkt, die Flexibilität des

Eingangslöops reduziert war oder Teile dessen deletiert waren. Dieser Bereich scheint auch als Substraterkennungsdomäne und/oder für die Translokation des Substrats Sula verantwortlich ist. Diese Ergebnisse geben den Hinweis, daß unterschiedliche HslV-HslU Komplexe in die Degradation unterschiedlicher Substrate involviert sein könnten. Dabei scheint die EM-Komplexform wichtiger für die Degradation von Sula-MBP und die Kristallstrukturkonformation wichtiger für den Abbau von Casein und chromogene Substrate sein (Tabelle 5.6.3.1).

Mutationen an der Nukleotidbindetasche

Der Einfluß der positiv und negativ geladenen Reste auf die ATP-Hydrolyse wurde durch eine Mutagenesestudie an der ATP-Bindetasche untersucht (Figur 5.5.5).

In der Struktur sind in der Nähe des γ -Phosphats die sauren Reste E321 und E286 aus der Nachbaruntereinheit lokalisiert. Durch die Oligomerisierung gelangen diese Reste in die Nähe des γ -Phosphats und säuern so die Phosphatbindetasche an. Dies führte zu der Hypothese, daß dadurch die ATP-Hydrolyse katalysiert wird. Eine Mutation E321Q bewirkte, daß kein ATP mehr gebunden wird. Eine Analyse mittels Gelfiltration zeigte, daß die Mutante immer noch ein Hexamer bildet.

Die biochemischen Ergebnisse der Mutanten E286Q und K80T deuten eher auf einen indirekten Einfluß dieser Reste auf die Funktion hin.

Für ein unter den AAA-ATPasen hochkonserviertes Arginin wird in dem intermolekularen Katalysemodell für FtsH die Rolle eines Sensors für das γ -Phosphat des Nukleotids aus der Nachbaruntereinheit vorgeschlagen [Kararta, 1999]. Der entsprechende Rest in HslU (R325) ist $\sim 8 \text{ \AA}$ vom γ -Phosphat entfernt. Eine Mutation dessen in Glutamat beeinträchtigte die Oligomerisierung von HslU und somit indirekt die ATP-Bindung.

Außerdem wurde ein unter den Clp-ATPasen hochkonserviertes Arginin [Schirmer, 1996] R393 in Alanin mutiert. Dieses ist nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids aus der gleichen Untereinheit lokalisiert. Die biochemischen Eigenschaften weisen auf eine wichtige Rolle des Restes in der ATP-Hydrolyse hin. Diese Mutante bindet immer noch Nukleotid, hydrolysiert dieses aber nicht mehr. Nicht geklärt werden konnte, ob die Nuk-

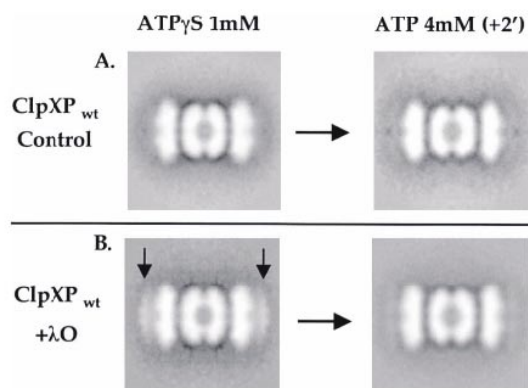
leotidbindung durch die Mutation R393A im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt wird. Die Mutante läuft in der Gelfiltration als Dimer.

E321Q, R325E und R393A hatten drastische Einwirkung auf die proteolytischen Aktivitäten. Die Mutanten waren gegen Z-GGL-AMC, Casein und SulA-MBP inaktiv.

Diese Resultate bedeuten darauf hin, daß in HslU das basische, unter den Clp-ATPasen konservierten R393 aus dem Sensor 2 Motiv, die Sensorfunktion des unter den AAA-ATPasen konservierten R325 übernehmen könnte. Dadurch würde aus dem intermolekularen Katalysemodell [Karata, 1999] für die ATP-Hydrolyse der AAA-ATPasen ein intramolekulares Katalysemodell für die Clp-Proteine entstehen (Tabelle 5.6.2.1).

6.7 EM-Aufnahmen und Mutagenesestudie in ATP-abhängigen Proteasen

Kristallstruktur von ClpXP ist nicht bekannt. Eine elektronenmikroskopische Seitenansicht des ClpXP zeigte, daß in Gegenwart von ATP γ S und dem Substrat λ O Protein zusätzliche Dichte an den Polen des ClpXP-Komplexes vorhanden ist. Ohne Nukleotid oder mit ATP fehlt diese [Ortega, 2000]. In vitro wurde gezeigt, daß ohne Nukleotid kein Substrat gebunden wird, mit ATP γ S dieses gebunden und nicht hydrolysiert wird und mit ATP dieses abgebaut wird [Hoskins, 2000; Singh, 2000].



Figur 6.7.1: EM Aufnahmen der ATP-abhängigen Protease ClpXP aus E.coli. Mit ATP γ S und dem natürlichen Substrat λ O Protein ist zusätzliche Dichte an den Polen des ClpXP Komplexes vorhanden [Ortega, 2000].

Für das ClpXP-System konnte in vivo und in vitro gezeigt werden, daß durch Mutationen der unter den Clp-ATPasen konservierten Reste IGF zwischen Sensor I und Box VII die Substraterkennung und Chaperonaktivität erhalten bleibt, allerdings die Proteolyse des natürlichen Substrates MuA verhindert wird. Eine Mutation an dieser Stelle verhindert die Interaktion zwischen ClpP und ClpX [Kim, 2001]. Dieser Sequenz entspricht in HslU der Loop von 311 bis 317 an der Kontaktfläche zwischen HslU und HslV in der alternativen Komplexform, in der die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist (Figur 5.6.3.1 rechts). Eine Insertion eines Pentaglycinloops an dieser Stelle von HslU führte zur Proteolyseinaktivität gegen SulA-MBP (Kapitel 5.6.3). Die biochemischen Daten und die EM-Aufnahmen von ClpXP übertragen auf das HslVU System wäre ein weiterer Hinweis, daß die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist und Substrate bindet. Sequenzüberlagerungen zwischen HslU und ClpX ergaben, daß die I-Domäne in ClpX nicht vorhanden ist, daß aber ein Loop am N-Terminus diese Funktion übernehmen könnte und auf der Seite der I-Domäne lokalisiert sein könnte [Ortega, 2000].

Weiterhin ist in einer Kryo-EM-Aufnahme des HslVU-Komplexes deutlich zu erkennen, daß die intermediäre Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist [Ishikawa, 2000].

6.8 Kristallstrukturen von HslVU in der alternativen Komplexkonformation

Basierend auf der in dieser Arbeit analysierten Struktur für HslV-HslU aus *E.coli* wurde die Kristallstruktur von HslVU aus *H. influenzae* bestimmt [Sousa, 2000]. Die Interaktionen zwischen HslV und HslU in dieser Struktur werden nicht über Segmente in der intermediären Domäne vermittelt, sondern über die entgegengesetzte Seite. Die Dimensionen des HslVU-Komplexes in der Kristallstruktur entsprechen denen in den EM-Aufnahmen. Die Konformation wurde durch Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS) des HslVU-Komplexes aus *H. influenzae* in Lösung bestätigt [Sousa, 2000]. Weiterhin ist dieser biochemisch stabil [Sousa, 2000]. Im Gegensatz dazu war der Komplex zwischen HslV und HslU aus *E.coli* biochemisch nicht stabil, aber unter Kristallisationsbedingungen aktiv. Die Einzelkomponenten in der HslVU Struktur aus *E.coli* sehen als freie und

als im “Komplex” gebundene Partikel bis auf einige fehlgeordnete Reste am Eingang von HslV gleich aus. Außerdem sind im HslV-HslU Partikel in allen HslU Untereinheiten Nukleotid gebunden, während in den HslU-Strukturen in nicht allen Untereinheiten Nukleotid gebunden ist. In der HslVU-Struktur aus *H. influenzae* werden durch die Komplexbildung drastische Änderungen im Vergleich zu den freien Partikeln hervorgerufen [Sousa, 2000]. Dies deutet auf eine allosterische Aktivierung von HslV durch HslU hin. In diesem Komplex bewegen sich die N- und C-Domäne von HslU leicht um die Gelenkregion. Die 14 C-terminalen Reste in HslU, die in freien Partikel in der C-Domäne eingebettet sind, bilden über L444 in HslU und K28 in HslV Salzbrücken und über die Peptidbindung zwischen I443 und L444 in HslU und R35 in HslV Wasserstoffbrücken aus [Sousa, 2000]. Die hydrophobe Oberfläche der C-terminalen kurzen Helix in HslU bindet an die benachbarte Untereinheit in HslV. Dadurch wird die Reste der Eingangshelix 47-92 in HslV verschoben und binden über die Reste Q68 und H70 in der Region 386-390 in HslU [Sousa, 2000]. Die Reste 391-393 sind in HslU mit dem Nukleotid in Kontakt [Sousa, 2000], wobei zu bemerken ist, daß R394 das unter den Clp ATPasen hochkonservierte Sensorarginin [Schirmer, 1996] ist, dem in HslU aus *E.coli* R393 entspricht. Eine weitere Struktur von HslVU aus *E.coli* wurde vor kurzem gelöst, in der die I-Domäne auf der von HslV abgewandten Seite lokalisiert ist. Die Einzelkomponenten dieses HslVU Komplexes zeigen weniger Unterschied zu den freien Partikeln als der Komplex aus *H. influenzae*, so daß keine weiteren Informationen gewonnen werden konnten, die Autoren berichten nur über einige asymmetrische Änderungen im elektrostatischen Oberflächenpotential, Oberflächenkrümmung und Poregröße von HslV [Wang, 2001].

7. Literatur

A

Aravind, L. & Ponting, C. P. (1998). Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* **7**, 1250-1254.

B

Beyer, A. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* **6**, 2043-2058.

Blow, D., M. & Crick, H., C. (1959). The treatment of errors in the isomorphous replacement method. *Acta Cryst.* **12**, 794-802.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M. & Huber, R. (1997). Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **94**, 6070-6074.

Bochtler, M., Klonierung, Expression, Reinigung, biochemische Charakterisierung und Röntgenstrukturanalyse des Proteasekomplexes der ATP-abhängigen Protease Heat Shock Locus VU (HslVU) aus *E.coli*, Dissertation, Technische Universität München.

Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Ravischankar, R. & Huber, R. (2000). Docking of components in a bacterial complex. *Nature*, **408**, 667-668.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. & Huber, R. (1999). The proteasome. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **8**, 295-317.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Stock, D., Löwe, J., Hartmann, C., Dorowski, A. & Huber, R. Proteasomes. Landes Publishing Company, eds. Hilt, W. and Wolf, D. H., (in press).

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

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

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloezel, P. M., Finley, D. & Schmidt, M. (1999). The base of the regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell. Biol.* **1**, 221-226.

Brünger A., T. (1992a). X-PLOR (Version 3.1.), A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven and London.

Brünger A., T. (1992b). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.

Brünger A., T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Niges, M., Pannu, N. S., et al. (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.

C

Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriot, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K. & Varshavski, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.

Chung, C. H. & Goldberg, A. L. (1981). The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **78**, 4931-4935.

Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G. 3d, Daniels, D. L. & Blattner, F. R (1993). Sequence analysis of four new heat shock genes constituting the hslTS.ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**, 1-6.

Chuang, S. E. & Blattner, F. R. (1993). Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 5242-5252.

Choi, H. S., Seol, W & Moore, D. D. (1996). A component of the 26S proteasome binds on orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily. *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**, 1-6.

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. & Hershko, A. (1981a). "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**, 2537-2542.

Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R. & Hershko, A. (1981b). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **78**, 761-765.

Ciechanover, A., Finley, D. & Varshavski, A. (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**, 57-66.

Coffino, P. (1998). Degradation of ornithine decarboxylase. In ubiquitin and the biology of the cell, Peters, J., Harris, J. and Finley, D. eds. (New York: Plenum Press).

Confalonieri, F. & Duguet, M. (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays*. **17**, 639-650.

D

Drenth, J. (1992). Principles of X-ray crystallography. Springer-Verlag, New York, USA.

E

Erickson, J. W. & Gross, C. A. (1989). Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* **3**, 1462-1471.

Engh, R., A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angles parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta. Cryst.* **A47**, 392-400.

Ewald, P. P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.* **56**, 129-156.

F

Faßmann, G. D. (1996). Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, *Plenum Publishing Corporation, 233 Spring Street, New York, New York 10013-1578*.

Feng, H. P., Gierasch, L. M. (1998). Molecular chaperones: clamp for the Clps? *Curr. Biol.* **8**, 464-467.

Finley, D., Özkaynak, E. & Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell* **48**, 1035-1046.

Freilich, S., Oron, E., Kapp, Y., Nevo-caspi, Y., Orgad, S., Segal, D. & Chamovitz, D. A. (1999). The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **9**, 1187-1190.

G

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

Georgopoulos, C., Liberek, K., Zylicz, M. & Ang, D. (1994). Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock proteins of the heat shock response. In Morimoto, r., Tissieres, A. & Georgopoulos, C. (eds), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY

Glickman M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., Finley, D. A. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623.

Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the δ' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* **91**, 335-345.

Goldberg, A. and Rock, K. L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* **357**, 375-379.

Goldberg, A. L. (1972). Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 422-426.

Goff, S. A. and Goldberg, A. L. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates in transcription of lon and other heat shock genes. *Cell* **41**, 587-595.

Gottesman, S. & Maurizi, M. R. (1992). Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* **56**, 592-621.

Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 465-506.

Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. N. & Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**, 1338-1347.

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

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. & Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.

Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R. Glickman, M. H. & Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasom core particle. *Nature Struct. Biol.* **7**, 1062-1067.

Gross, C. A. (1996). Function and regulation of the heat shock proteins. In Neidhard, F. C. (ed), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd edn. American Society for Microbiology. Washington, DC.

H

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

- Hartmann, C., Song, H. K., Ravishankar, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. & Huber, R. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *PNAS* **97**, 14103-14108.
- Hayer-Hartl, M. K., Weber, F. & Hartl, F. U. (1996). Mechanism of chaperonin action: GroES binding and release can drive GroEL-mediated protein folding in the absence of the ATP hydrolysis. *EMBO J.* **15**, 6111-6121.
- Heinemeyer, W., Simeon, A., Hirsch, H. H., Schiffer, H. H., Teichert, U. & Wolf, D. H. (1991). Lysosomal and non-lysosomal proteolysis in the eukaryotic cell: studies on yeast: *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 724-725.
- Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R. & Boulloc, P (1995). Degradation of σ^{32} , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **92**, 3516-3520.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. & Rose, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **77**, 1783-1786.
- Hershko, A., Ciechanover, A. & Rose, I. A. (1981). Identification of the active amino acid residue on the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J. Biol.Chem.* **256**, 1525-1528.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. (1982). Components of the ubiquitin-protein-ligase system. *J. Biol. Chem.* **258**, 8206-8214.
- Hershko, A. & Heller, H. (1985). Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **128**, 1079-1086.
- Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 445-449.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 761-807.
- Hershko A & Ciechanover A (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-409.
- Hofmann, K. & Bucher, P. (1998). The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 204-206.
- Hoffman, L., Pratt, G. & Rechsteiner, M. (1992). Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **267**, 22362-22368.
- Hoskins, J. R., Pak, M., Maurizi, M. R. & Wickner, S. (1998). The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **95**, 12135-12140.
- Hoskins, J. R., Singh, S. K., Maurizi, M. R. & Wickner, S. (2000). Proteine binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **97**, 8892-8897.
- Hendrickson, W. A. & Lattmann, E., E. (1970). Representation of phase probability distributions for simplified combination of independent phase information. *Acta.Crystallogr.* **B26**, 136-143.
- Higashitani, A., Ishii, Y., Kato, Y. & Horiuchi, K. (1997). Functional dissection of a cell-division inhibitor, Sula, of *Escherichia coli* and its negative regulation by Lon. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 351-357.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltmolekülmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta. Cryst.* **10**, 750-751.

Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta. Cryst.* **19**, 353-356.

Huang, H. C. & Goldberg, A.L. (1997). Proteolytic activity of the ATP-dependent protease HslVU can be uncoupled from ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 21364-21372.

Huang, J., Cao, C. & Lutkenhaus, J. (1996). Interactions between FtsZ and inhibitors of cell division. *J. Bacteriol.* **178**, 5080-5085.

Huisman, O., D'Ari, R. & Gottesman, S. (1984). Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 4490-4494.

I

Ishikawa, T., Maurizi, M. R., Belnap, D., & Steven, A. C. (2000). Docking of components in a bacterial complex. *Nature* **408**, 667-668.

J

Jariel-Enconte, I., Pariat, M., Martin, F., carillo, S., Savat, C. & Piechacyk, M. (1995). Ubiquitination is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26S proteasom. *J. Biol. Chem.* **270**, 11623-11627.

Jones, A. T. (1978). A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Crystallogr.* **11**, 268-272.

K

Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H. & Yura, T. (1997). Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of σ^{32} and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **179**, 7219-7225.

Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1999). Marked instability of the σ^{32} heat shock transcription factor at high temperature. *J. Biol. Chem.* **274**, 22002-22007.

Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1999). The ATP-dependent HslVU/ClpQY protease participates in turnover of cell division inhibitor Sula in *E.coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3674-3680.

Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A. J., Tatsuta, T. & Ogura, T. (1999). Dissecting the role of conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. *J. Biol. Chem.* **274**, 26225-26232.

Karle, J. (1986). Triplet phase invariants from single isomorphous replacement or one-wavelength anomalous dispersion data, given heavy atom information. *Acta. Cryst.* **A42**, 246-253.

Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S., Clark, W. P. and Maurizi, M. R. (1988). The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15226-15236.

Kedzierska, S., Staniszewska, M., Wegrzyn, A. & Taylor A. (1999). The role of DnaK/DnaJ and GroEL/GroES systems in the removal of endogenous proteins aggregated by heat-shock from *Escherichia coli* cells. *FEBS Lett.* **446**, 331-337.

Keiler, K. C., Waller, P. R. & Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**, 990-993.

Kessel, M., Maurizi, M. R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B. L., Singh, S. K. & Steven, A. C. (1995). Homology in structural organization between *E.coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26S proteasom. *J. Mol. Biol.* **250**, 587-594.

Kim, Y. I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R. V., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2001). Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nature* **8**, 230-233.

Kitagawa, M., Wada, C., Yoshioka, S., Yura, T. (1991). Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock sigma factor (sigma 32). *J. Bacteriol.* **173**, 4247-4253.

Khattar, M. M., (1997). Overexpression of the hslVU operon suppresses SOS-mediated inhibition of the cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **414**, 402-404.

Knop, M., Schiffer, H. H., Rupp, S. & Wolf, D. H. (1993). Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**, 990-996.

Knowlton, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M. & Hill, C. P. (1997). Structure of the proteasome activator REG α (PA28 α). *Nature* **390**, 639-643.

Koonin, E. V. (1993a). A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2541-2547.

Koonin, E. V. (1993b). A Superfamily of ATPases with Diverse Functions Containing Either Classical or Deviant ATP-binding Motif. *J. Mol. Biol.* **229**, 1165-1174.

Koopmann, J. O., Hämmerling, G. J. & Momburg, F. (1997). Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immun.* **9**, 80-88.

Kunau, W. H., Beyer, T., Franken, K., Gotte, M., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A. & Wiebel, F. F. (1993). Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie* **75**: 209-224.

Krappmann, D., Wulczyn, F. G. & Scheidereit, C. (1996). Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo. *EMBO, J.* **15**, 6716-6726.

Kroh, H. E. & Simon, L. E. (1990). The ClpP component of Clp protease is the sigma 32-dependent heat shock protein F21.5. *J. Bacteriol.* **172**, 6026-6034.

Kopitzki, K., (1989). Einführung in die Festkörperphysik, Teubner Studienbücher.

L

Laachouch, J. E., Desmet, L., Geuskens, V., Grimaud, R. & Toussaint, A. (1996). Bacteriophage Mu repressor as a target for the *Escherichia coli* ATP-dependent Clp protease. *EMBO J* **15**, 437-444.

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

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

Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. & Weiss, W. I. (1998). Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* **94**, 525-536.

Levchenko, I., Smith, C. K., Walsh, N. P., Sauer, R. T. & Baker, T. (1997). PDZ-like domains mediate binding specificity in the Clp/Hsp100 family of chaperone and protease regulatory subunit. *Cell* **91**, 939-947.

Liberek, K. & Georgopoulos, C. (1993). Autoregulation of the *Escherichia coli* heat shock response by the DnaK and DnaJ heat shock proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **90**, 11019-11023.

Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. & Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T.acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.

Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

M

Mach, H., Middaugh, C. R. & Lewis, R. V. (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficient of tryptophan and tyrosine residue in native proteins. *Anal biochem.* **200**, 74-80.

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

Matsuka, Y. V., Pillai, S., gubba, S., Musser, J. M. & Olmsted, S. B. (1999). Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. *Infect. Immun.* **67**, 4326-4333.

van Melderen, L., Thi M. H. D., Lecchi, P., Gottesman, S., Couturier, M. & Maurizi M. R. (1996). ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. *J. Biol. Chem.* **271**, 27730-27738.

Matthews, B. W. (1968). Solvent contents of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.

Mizusawa, S & Gottesman, S. (1983). Protein degradation in *Escherichia coli*: the lon gene controls the stability of SulA protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **80**, 358-362.

Missiakis, D., Schwager, F., Betton, J. M., Georgopoulos, C. & Raina, S. (1996). Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**, 6899-6909.

N

Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. & Koonin, E. V. (1999). AAA⁺: A class of chaperon-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27-43.

O

Orlowski, M & Wilk, S, (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **101**, 814-22

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

Otwinowski, Z. (1993). Oscillation Data Reduction program. In Proceedings of the CCP4 study weekend "Data collection and processing", L. Sawyer, N. Isaacs and S. Bailey, eds.: SERC Daresbury Laboratory, England), pp. 56-62.

P

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

Patterson, A. L. (1934). A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.* **46** 372-376.

Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. & North A. C. T. (1960). Structure of hemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **185**, 416-422.

Peters, J. M., Harris, J. R. & Kleinschmidt, J. A. (1991). Ultrastructure of the ~26S complex containing the ~20S cylinder particle. *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 422-432.

Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, R. J., Kleinschmidt, J. A. & Baumeister, W. (1993). Structural features of the 26S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 932-937.

Peters, J. M., Franke, W. W. & Kleinschmidt, J. A. (1994). Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **269**, 7709-7718.

Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J.* **11**, 1055-1066.

Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Roe, S. M., Piper, W. P. & Pearl, L. H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO* **19**, 4383-4392.

R

Richmond, C., Gorbea, C. & Rechsteiner, M. (1997). Specific Interactions between ATPase Subunits of the 26S Protease. *J. Biol. Chem.* **272**, 13403-13411.

Rivett, A. J. (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immun.* **10**, 110-114.

Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H. C., Moerschell, R. P., Soon, J. Y., Soel, J. H., Chung, C. H. & Goldberg, A. L. (1996). A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **93**, 5808-5813.

Rohrwild, M., Pfeifer, G., Sanatarius, U., Müller, S. A., Huang, H. C., Engel, A. Baumeister, W. & Goldberg, A. L. (1997). HslV-HslU: The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 133-139.

Rossmann, M., G. & Blow, D., M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta. Cryst.* **15**, 15-31.

S

Sanger, F., Nickler, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **74**, 5463-5467.

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

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 386-379.

Scheffner, M., Nuber, U. & Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81-83.

Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer M. A. & Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289-296.

Schulz, G. E. (1992). Binding of nucleotides by proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 61-67.

Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Huber, R. & Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonin protease. *Science* **268**, 579-581.

Seol, J. H., Yoo, S. J., Shin, D. H., Shim, Y. K., Kang, M. S., Goldberg, A. L. & Chung, C. H. (1997). The heat-shock protein HslVU from *Escherichia coli* is a protein activated ATPase as well as an ATP-dependent proteinase. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1143-1150.

Seong, I. S., Oh, J. Y., Yoo, Soon, S. J., Seol J. H. & Chung, C. H. (1999). ATP-dependent degradation of SulA, cell division inhibitor, by the HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **456**, 211-214.

Seong, I. S., Oh, J. Y., Yoo, S. J., Seol, J. H. & Chung, C. H. (1999). ATP-dependent degradation of SulA, a cell division inhibitor, by the the HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **456**, 211-214.

Seong, I. S., Oh, J. Y., Lee J. W., Tanaka, K. & Chung, H. C. (2000). The ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **477**, 224-228.

Sheaff, R. J., Singer, J. D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J. M. & Clurman, B. E. (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell* **5**, 403-410.

Singh, S. K., Grimaud, R., Hoskins, J. R., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (2000). Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **97**, 8898-8903.

Smith, C. K., Baker, T. A. & Sauer, R. T. (1999). Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **96**, 6678-6682.

Smith, C. A. & Rayment, I. (1996). Active site comparison highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J.* **70**, 1590-1602.

Sonezaki, S., Ishii, Y., Okita, K., Sugino, T., Kondo, A., Kato Y. (1995). Overproduction and purification of SulA fusion protein in *Escherichia coli* and its degradation by Lon protease in vitro. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 304-309.

Song, H. K., Hartmann, C., Ravishankar, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. & Huber, R. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *PNAS* **97**, 14103-14108.

Song, X., von Kampen, J., Slaughter, C. A. & DeMartino, G. N. (1997). Relative Functions of the α and β subunits of the proteasome activator, PA28. *J. Biol. Chem.* **272**, 27994-28000.

Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S. & McKay, D. B. (2000). Crystal and solution structures of an HslVU protease-chaperone complex. *Cell* **103**, 633-643.

Subramani, S. (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* **78**, 171-188.

Sun, D., Sathyanarayana, U. G., Johnston, S. A. & Schwartz, L. M. (1996). A member of the phylogenetically conserved CAD family of transcriptional regulators is dramatically up-regulated during the programmed cell death of skeletal muscle in the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*. *Dev Biol* **173**, 499-509.

Suzuki, C. K., Rep, M., van Dijl, J. M., Suda, K., Grivell, L. A. & Schatz, G. (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 118-123.

Squires, C. L., Pederson, S., Ross, B. M. & Squires, C. (1991). ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**, 4254-4262.

T

Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. & Varshavski, A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science* **254**, 1374-1377.

Torres-Cabassa, A., Gottesman, S., Frederick, R. D., Dolph, P. J. & Coplin, D. L. (1987). Control of extracellular polysaccharide synthesis in *Erwinia stewartii* and *Escherichia coli* K-12: a common regulatory function. *J. Bacteriol.* **169**, 4525-4531.

Traut, T. W., (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding sites. *Eur. J. Biochem.* **222**, 9-19.

Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichtemanipulation und seine Anwendung auf verschiedene Proteinstrukturaufklärungen, Dissertation, Technische Universität München.

Twining S. S. (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal Biochem* **143**, 30-34.

V

Varshavski, A. (1997). The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 383-387.

Velluz, L., Optical Circular Dichroism (1965), Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße Academic Press Inc., New York and London.

Voellmy, R. W. & Goldberg, A. L. (1981). ATP-stimulated endoprotease is associated with the cell membrane of *E. coli*. *Nature* **290**, 419-421.

W

Walker, J. E., Saraste, M. J., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.

Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Kloster, A. J. & Baumeister, W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **121**, 19-29.

Wang, B. C. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods Enzymol.* **115**, 90-112.

Wang, J., Hartling, J. A. & Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**, 447-456.

Wang, J., Song, J. J., Franklin, M. C., Kamtekar, S., Im, Y. J., Rho, S. H., Seong, C. S., Lee, C. S., Chung, C. H. & Eom, S. H. (2001). Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent Proteolysis mechanism. *Structure* **9**, 177-184.

Waterham, H. R. & Cregg, J. M. (1997). Peroxisome biogenesis. *Bioessays* **19**, 57-66.

Wawrzynow, A., Banecki, B. & Zylicz, M. (1996). The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol. Microbiol.* **21**, 895-899.

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

Wei, N., Chamovitz, D. A. & Deng, X. W. (1994). Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**, 117-124.

Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yoo, Y., Wang, C. C. & Hill, C. P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasom by 11S regulators. *Nature* **408**, 115-120.

Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1999). Here's the hook: Similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **96**, 8318-8320.

Wilk, S. & Chen, W. E. (1997). Synthetic peptide based activators of the proteasome. *Mol. Biol. Rep.* **24**, 119-124.

Wu, W. F., Zhou, Y. & Gottesman, S. (1999). Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslVU) protease. *J. Bacteriol.* **181**, 3681-3687.

Y

York, I. A. & Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immun.* **14**, 369-396.

Yu, R. C., Hanson, P. I., Jahn, R. & Brünger, A. T. (1998). Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nature Struct. Biol.* **5**, 803-811.

Yoo, S. J., Soel, J. H., Shin, D. H., Rohrwild, M., Kang, M. S., Tanaka, K., Goldberg, A. L. & Chung, C. H. (1996). Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 14035-14040.

Z

Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M. & Freemont, P. S. (2000). Structure of AAA ATPase p97. *Mol. Cell.* **6**, 1473-1484.

Zolkiewski, M. (1999). ClpB cooperates with DnaK, DnaK, and GrpE in suppressing protein aggregation. *J. Biol. Chem.* **274**, 28083-28086.

Zwickl, P., Ng, D., Woo, K. M., Klenk, H. P. & Goldberg, A. L. (1999). An archaebacterial ATPase, homologous to the ATPases in the eukaryotic 26S proteasome activates protein breakdown by the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **274**, 26008-26014.