

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Charakterisierung der AAA-ATPase VAT
aus *Thermoplasma acidophilum*

Alexandra Beate Gerega

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 28.06.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.08.2005 angenommen.

Abkürzungen

AAA	„ATPases associated with various cellular activities“
AFM	„atomic force microscop(e/y)“ (Rasterkraftmikroskop(ie))
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
bp	Basenpaare
D	Dalton (1 D = g/mol)
DNA	deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	Escherichia coli
EM	Elektronenmikroskop(ie)
FCS	„fluorescence correlation spectroscopy“ (Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie)
g	Gramm
h	„hour“ (Stunde)
His ₆	Hexahistidin
k	kilo (10 ³)
konz.	konzentriert
kb	Kilobasen
l	Liter
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
MSA	multivariante statistische Analyse
min	Minute
NMR	„nuclear magnetic resonance“ (magnetische Kernspinresonanz)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	„rotations per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
Tag	loses Ende, hier kurzes Peptid
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
VAT	„VCP-like ATPase from <i>Thermoplasma</i> “
v/v	„volume/volume“ (Volumen/Volumen)
w/v	„weight/volume“ (Gewicht/Volumen)
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)

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

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	2
3. EINLEITUNG	3
3.1 PHYLOGENETISCHE EINTEILUNG DER AAA-ATPASEN	3
3.1.1 <i>P-Loop-NTPasen</i>	3
3.1.2 <i>AAA⁺-ATPasen</i>	5
3.1.3 <i>AAA-ATPasen</i>	6
3.1.3.1 <i>Metalloproteasen</i>	7
3.1.3.2 <i>„Meiotische“ Gruppe</i>	7
3.1.3.3 <i>BCS1-Gruppe</i>	8
3.1.3.4 <i>Proteasomale ATPasen</i>	8
3.1.3.5 <i>D1- und D2-Domänen der Typ-II-ATPasen</i>	9
3.2 STRUKTURELLE UND MECHANISTISCHE ASPEKTE	13
3.2.1 <i>Die Struktur von AAA-ATPasen</i>	13
3.2.2 <i>Die N-Domäne</i>	15
3.2.3 <i>Die D1- und D2-Domäne</i>	16
3.2.4 <i>Die Struktur der ATPase-Domäne</i>	17
3.2.5 <i>Der ATP-Hydrolysezyklus</i>	18
3.2.6 <i>Die Strukturänderung während des ATP-Hydrolysezyklus</i>	20
3.2.7 <i>Substraterkennung</i>	22
3.3 AUFGABENSTELLUNG	23
4. MATERIAL UND METHODEN	25
4.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
4.1.1 <i>Kompetente E. coli-Zellen</i>	25
4.1.2 <i>Transformation kompetenter E. coli-Zellen</i>	25
4.1.3 <i>Klonierung von vat-nd1 und vat-d1 in pET28a</i>	25
4.1.4 <i>Ortsspezifische Mutagenese</i>	26
4.1.5 <i>Sequenzierung</i>	27
4.1.6 <i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	28
4.1.7 <i>Restriktionsverdau</i>	28
4.1.8 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	29
4.1.9 <i>Überexpression in E. coli</i>	29
4.1.10 <i>Zellaufschluss</i>	30
4.2 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	30
4.2.1 <i>SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)</i>	30
4.2.2 <i>Native PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)</i>	31
4.2.3 <i>Coomassie-Färbung</i>	32
4.2.4 <i>Proteintransfer auf Nitrozellulose („Westernblot“)</i>	32
4.2.5 <i>Antikörper-Detektion</i>	32
4.2.6 <i>Immunopräzipitation</i>	33
4.2.7 <i>Aufreinigung von VAT und seinen Punktmutanten</i>	33
4.2.8 <i>Aufreinigung von VATΔN</i>	34
4.2.9 <i>Aufreinigung von VAT-NDI</i>	34
4.2.10 <i>Aufreinigung von VAT-DI</i>	35
4.2.11 <i>Aufreinigung von VAT-N</i>	35
4.2.12 <i>Gewinnung von substratfreiem VAT</i>	36

4.2.13	<i>Aufreinigung weiterer Proteine</i>	36
4.2.14	<i>Proteinbestimmung</i>	36
4.3	ENZYMATISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	36
4.3.1	<i>Bestimmung der ATPase-Aktivität</i>	36
4.3.2	<i>Bestimmung der Entfaltungsaktivität</i>	37
4.3.3	<i>Proteasomaler Abbau von Kasein</i>	38
4.3.4	<i>Bestimmung von gebundenem Nukleotid</i>	38
4.3.5	<i>Bestimmung von Proteininteraktionen</i>	38
4.3.6	<i>Bestimmung der GFPssrA-Translokation von VAT ins 20S-Proteasom</i>	39
4.4	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN	39
4.4.1	<i>Elektronenmikroskopie</i>	39
4.4.1.1	Kolloidales Gold	40
4.4.1.2	Nanogold®	41
4.4.2	<i>Rasterkraftmikroskopie</i>	41
4.4.3	<i>Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)</i>	42
4.4.4	<i>Kristallisation</i>	42
4.5	MEDIEN	43
4.6	PUFFER UND LÖSUNGEN	43
4.6.1	<i>Enzyme</i>	45
4.6.2	<i>Chemikalien mit Abkürzungen</i>	45
4.6.3	<i>Geräte</i>	46
5.	ERGEBNISSE	49
5.1	DIE N-DOMÄNE	49
5.1.1	<i>ATPase-Aktivität von VAT</i>	49
5.1.2	<i>ATPase-Aktivität von VATΔN</i>	53
5.1.3	<i>Entfaltungsaktivität von VAT und VATΔN</i>	55
5.2	DIE D1- UND D2-DOMÄNE	59
5.2.1	<i>Isolierte Domänen</i>	59
5.2.2	<i>Punktmutanten</i>	60
5.2.3	<i>ATPase-Aktivität</i>	62
5.2.4	<i>Entfaltungsaktivität</i>	64
5.2.5	<i>Hexamerisierung</i>	65
5.3	SUBSTRATBINDUNG	66
5.3.1	<i>Porenmutanten</i>	67
5.3.2	<i>Visualisierung der Substratbindung</i>	70
5.3.2.1	Kolloidales Gold	72
5.3.2.2	Nanogold®	73
5.4	INTERAKTION ZWISCHEN VAT UND DEM 20S-PROTEASOM	74
5.4.1	<i>Biochemische Studien</i>	74
5.4.2	<i>Elektronen- (EM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM)</i>	77
5.4.3	<i>Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)</i>	79
5.5	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN	81
5.5.1	<i>Elektronenmikroskopie (EM)</i>	81
5.5.2	<i>Kristallisation für Röntgenstrukturanalyse</i>	82
6.	DISKUSSION	84
7.	LITERATURVERZEICHNIS	93

Weitere Verzeichnisse

Abbildungen

<i>Abb. 1: Phylogenetische Klassifizierung der AAA-Domänen innerhalb der P-Loop-NTPasen.</i>	4
<i>Abb. 2: Topologie der Faltung von NTPase-Domänen.</i>	4
<i>Abb. 3: Phylogenetische Einteilung von AAA-Domänen.</i>	6
<i>Abb. 4: Zelluläre Funktionen von p97/VCP/Cdc48.</i>	11
<i>Abb. 5: 3D-Rekonstruktion von VAT, basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen.</i>	14
<i>Abb. 6: Struktur der N-Domäne von VAT.</i>	15
<i>Abb. 7: Ein Ausschnitt aus der ATPase-Domäne einer AAA-ATPase.</i>	17
<i>Abb. 8: Modelle zum ATP-Hydrolysezyklus.</i>	19
<i>Abb. 9: Schema zur nukleotidabhängigen Domänenbewegung in p97.</i>	21
<i>Abb. 10: ATPase-Aktivität von VAT und VATΔN.</i>	54
<i>Abb. 11: Entfaltung von GFPssrA durch VAT und VATΔN.</i>	56
<i>Abb. 12: Entfaltung von GFP durch VAT und VATΔN.</i>	59
<i>Abb. 13: Katalytische Reste in p97, stellvertretend für AAA-Proteine.</i>	61
<i>Abb. 14: Relative ATPase-Aktivität von VAT und seinen ATPase-Mutanten.</i>	64
<i>Abb. 15: Schaubild zur Kooperativität in der ATP-Hydrolyse zwischen der D1- und D2-Domäne.</i>	64
<i>Abb. 16: Relative GFPssrA-Entfaltungsaktivität von VAT und seinen ATPase-Mutanten.</i>	65
<i>Abb. 17: Westernblot-Analyse der Substratbindung von VAT und seinen Mutanten.</i>	66
<i>Abb. 18: Porenreste in AAA- und AAA⁺-ATPasen.</i>	68
<i>Abb. 19: GFPssrA-Entfaltung durch VAT und seine Porenmutanten.</i>	69
<i>Abb. 20: ATPase-Aktivität von VAT und seinen Porenmutanten.</i>	70
<i>Abb. 21: EM-Mittelungen von VATΔN mit und ohne GFPssrA.</i>	71
<i>Abb. 22: Inhibierung der GFPssrA-Entfaltung von VAT und VATΔN durch das ssrA-Peptid.</i>	72
<i>Abb. 23: EM-Aufnahmen von VAT und VATΔN nach Inkubation mit kolloidalem Gold-ssrA.</i>	73
<i>Abb. 24: 20S-Proteasom beschleunigt die Entfaltung von GFPssrA durch VAT.</i>	75
<i>Abb. 25: Entfaltetes Substrat inhibiert die Entfaltung von GFPssrA durch VATΔN.</i>	75
<i>Abb. 26: FCS-Plot für die Diffusionszeiten von VAT und/oder 20S-Proteasom.</i>	80
<i>Abb. 27: EM-Mittlung von VAT und VAT-AA und ihre Differenz.</i>	82
<i>Abb. 28: 3D-Kristalle von VAT.</i>	82
<i>Abb. 29: Beugungsmuster eines 3D-Kristalls von VAT.</i>	83

Tabellen

<i>Tab. 1: Verwendete Primer für die Klonierung von vat-nd1 und vat-d1.</i>	25
<i>Tab. 2: PCR-Ansatz und -Zyklus bei der Klonierung von vat-nd1 und vat-d1.</i>	26
<i>Tab. 3: PCR-Ansatz und -Zyklus bei der ortsspezifischen Mutagenese.</i>	26
<i>Tab. 4: Verwendete Primer für die ortsspezifische Mutagenese.</i>	27
<i>Tab. 5: Sequenzierprimer.</i>	28
<i>Tab. 6: Restriktionsverdauansätze.</i>	28
<i>Tab. 7: Größe der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau.</i>	29
<i>Tab. 8: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamid-Gele.</i>	30
<i>Tab. 9: Pipettierschema für native Polyacrylamid-Gele.</i>	31
<i>Tab. 10: Verwendete Erstantikörper.</i>	33
<i>Tab. 11: Pipettierschema für die Herstellung von kolloidalem Gold.</i>	40
<i>Tab. 12: Kinetische Konstanten von VAT (20 mM Mg²⁺) und anderer AAA- bzw. AAA⁺-ATPasen.</i>	52
<i>Tab. 13: Vergleich der kinetischen Konstanten von VAT und VATΔN bei 20 und 120 mM Mg²⁺.</i>	57
<i>Tab. 14: Katalytische ATPase-Reste in VAT.</i>	60
<i>Tab. 15: Kinetische Konstanten der ATP-Hydrolyse von Einzelpunktmutanten der katalytischen Reste.</i>	62

<i>Tab. 16: Katalytische Porenresten in VAT.....</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 17: Diffusionszeiten von VAT und/oder Proteasom, errechnet aus den FCS-Messungen.</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 18: Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Mutagenesestudien an VAT.</i>	<i>90</i>

1. Zusammenfassung

AAA-Proteine („ATPases associated with various cellular activities“) kommen in allen Domänen des Lebens vor und sind dort an einer Vielfalt von zellulären Prozessen beteiligt. Ein wichtiger Vertreter dieser Proteinfamilie ist das eukaryontische p97/VCP/Cdc48, eine hexamere ATPase, die aus drei Domänen aufgebaut ist, der N-Domäne, die verschiedene Cofaktoren und ubiquitinierte Substrate bindet, sowie zwei ATPase-Domänen, D1 und D2. Zu den Aufgaben von p97/VCP/Cdc48 zählen u.a. die Membranfusion, genauso wie die Extraktion von Membranproteinen und ihre Weitergabe an das eukaryontische 26S-Proteasom.

In der vorliegenden Arbeit wurde das archaeale p97-Homolog VAT aus *Thermoplasma acidophilum* untersucht. Während intensive Strukturanalysen bereits in der Vergangenheit durchgeführt wurden, blieb das Protein biochemisch wenig charakterisiert. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit überwiegend mit Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von VAT und wird durch strukturelle Aspekte ergänzt.

Es wurde gezeigt, dass VAT globuläre Proteine entfalten kann. Die Entfaltung vom Modellsubstrat GFP konnte durch Variation der Mg^{2+} -Konzentration stimuliert werden, was mit der erhöhten ATPase-Aktivität in VAT korrelierte. Die Entfernung der N-terminalen Domäne, die in der Mutante VAT Δ N verwirklicht wurde, führte sowohl in der GFP-Entfaltung wie auch in der ATP-Hydrolyse zu stärkerer Aktivität. Dies lässt auf eine inhibierende bzw. regulierende Wirkung der besagten Aktivitäten durch die N-Domäne in VAT schließen.

Durch intensive Mutagenesestudien an katalytischen ATP-Bindungs- und ATP-Hydrolyseresten wurde eine intramolekulare Kommunikation zwischen den beiden ATPase-Domänen, D1 und D2, gefunden. Beide Domänen konnten sowohl ATP hydrolysieren als auch GFP entfalten. Die Entfaltungsaktivität der ersten Domäne entsprach der von Wildtyp-VAT, die Aktivität der zweiten Domäne war geringer und wurde über die ATP-Bindung in der ersten Domäne reguliert. Zusätzlich konnten aromatische und/oder hydrophobe Reste in den Porenregionen von D1 und D2 identifiziert werden, die an der Substratentfaltung, wahrscheinlich über einen Translokationsmechanismus durch die zentrale Pore von VAT, beteiligt sind. Nach der Entfaltung durch VAT konnte GFP durch das *Thermoplasma*-20S-Proteasom abgebaut werden. Mittels der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie konnten hierbei kurze Interaktionen zwischen VAT und dem Proteasom nachgewiesen werden. Eine Isolierung von VAT und Proteasom im stabilen Komplex gelang hingegen nicht.

2. Summary

AAA proteins are ubiquitously distributed and involved in an ample variety of cellular processes. An important member of this protein family is the eukaryotic p97/VCP/Cdc48, which is a hexameric ATPase, consisting of three domains, the cofactor and substrate binding N domain and the ATPase domains D1 and D2. The function of p97 reaches from a function in membrane fusion to the extraction of proteins from membranes and subsequent transport to the 26S degradation system.

These studies analyse the archaeal p97 homolog VAT from *Thermoplasma acidophilum*. While intensive structural analyses were carried out in the past, the biochemical characterisation of VAT was still incomplete. Therefore the major part of this work deals with enzymatic analyses of VAT's activity, extended by further structural investigations.

The unfolding of a globular protein by VAT was shown. The unfolding of the model substrate GFP could be stimulated with Mg^{2+} , what correlated with the enhanced ATPase activity in VAT. The deletion of the N domain, realised by the VAT Δ N mutant, resulted in a higher activity in GFP unfolding as well as in ATP hydrolysis. This leads to an inhibiting function of the N domain of VAT in these activities.

Elaborate mutagenesis studies on catalytic ATP binding and hydrolysing residues revealed a communication between the two ATPase domains in VAT, D1 and D2. Both domains were able to hydrolyse ATP and to unfold GFP. The unfolding activity of the D1 domain showed the same activity as the wild type protein, the unfolding activity of the D2 domain was reduced and seemed to be regulated through ATP binding in the D1 domain. Additionally, aromatic and/or hydrophobic residues in the pores of D1 and D2 could be identified, which participate in substrate unfolding, most probably during translocation through the central pore of VAT. After unfolding, GFP was degraded by the *Thermoplasma* 20S proteasome. Fluorescence correlation spectroscopy revealed short interactions between VAT and the proteasome, while isolation of a stable complex was not achieved.

3. Einleitung

1991 beschrieben Erdmann et al. zum ersten Mal eine neue Familie von P-Loop-ATPasen, die wegen ihrer diversen Funktionen in der Zelle als AAA („ATPasen associated with various cellular activities“) bezeichnet wird.^[1] Mittlerweile geht die Anzahl der nachgewiesenen Mitglieder dieser Familie in die Tausende und viele der ATPasen konnten schon charakterisiert werden. Von einigen existieren Röntgenkristallstrukturen, aus denen die genaue Faltung der Proteine und die Anordnung und Lokalisation der katalytischen Zentren ermittelt werden konnten. Der Reaktionsmechanismus der diversen Zellfunktionen von AAA-ATPasen ist bisher aber wenig verstanden. Die mechanistische Analyse dieser Funktionen ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg, die Vorgänge in der Zelle besser zu verstehen.

3.1 Phylogenetische Einteilung der AAA-ATPasen

3.1.1 P-Loop-NTPasen

Ein großer Teil des Proteoms eines jeden Organismus besteht aus Proteinen, die Nukleosidtriphosphate binden und hydrolysieren können, den so genannten NTPasen. Viele unterschiedliche Faltungen dieser Proteine konnten identifiziert werden, die bedeutendste Klasse bilden jedoch die P-Loop-NTPasen, welche 10-18% der vorausgesagten Genprodukte aller bisher sequenzierten prokaryontischen und eukaryontischen Genome ausmachen und ebenfalls sehr häufig in Virengenomen vorkommen.^[2]

Die meisten Vertreter der P-Loop-NTPasen hydrolysieren die β - γ -Phosphatbindung eines gebundenen Nukleosidtriphosphat-Moleküls und die hierdurch freigesetzte Energie wird zur Konformationsänderung eines anderen Moleküls (Substrats) genutzt. Die Struktur der P-Loop-Domäne besteht aus einem dreischichtigen $\alpha/\beta/\alpha$ -Sandwich, indem die meist parallelen β -Faltblätter das Zentrum bilden und auf beiden Seiten von α -Helices flankiert werden.^[3] Auf der Sequenzebene werden P-Loop-NTPasen durch zwei konservierte Motive, Walker-A und Walker-B, charakterisiert, die für die Nukleotidbindung via β - und γ -Phosphat und die Koordination des für die Hydrolyse benötigten Mg^{2+} zuständig sind.^[4]

Struktur- und Sequenzanalysen führten zu einer Einteilung der P-Loop-NTPasen in die Kinase-GTPase-Klasse und eine zweite Klasse, die ASCE-Klasse, die sich durch einen zusätzlichen β -Strang zwischen dem P-Loop und dem Walker-B- β -Strang auszeichnet (β_4 zwischen β_1 und β_3) und RecA-Faltungsklasse genannt wird (Abb. 1 und 2).^[5]

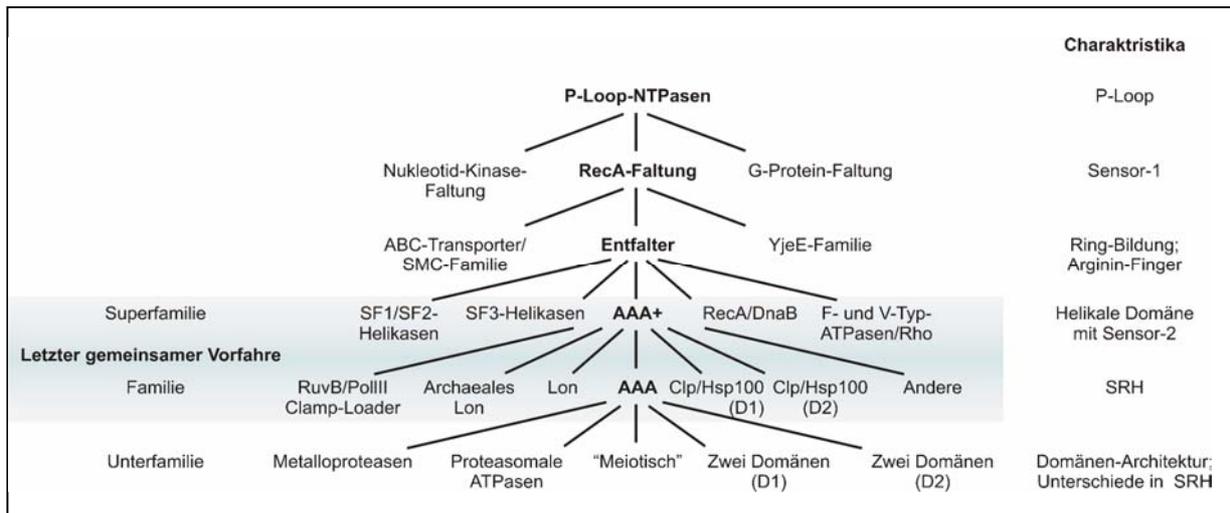


Abb. 1: Phylogenetische Klassifizierung der AAA-Domänen innerhalb der P-Loop-NTPasen. Charakteristische Merkmale, die zur Einteilung in die einzelnen Gruppen dienen, sind rechts dargestellt.^[5]

Auf dem β 4-Strang befindet sich ein konservierter Rest (Asn oder Thr), der in die Nukleotidbinde-tasche zeigt und das γ -Phosphat des ATP über ein Wassermolekül koordiniert.^[6] Die genaue Funktion dieses Restes ist noch nicht bekannt, sie wird aber in der Nukleotidhydrolyse vermutet. Ursprünglich wurde angenommen, seine Aufgabe sei die Unterscheidung von verschiedenen Nukleotidzuständen, weshalb dieser Rest als Sensor-1 bezeichnet wurde.

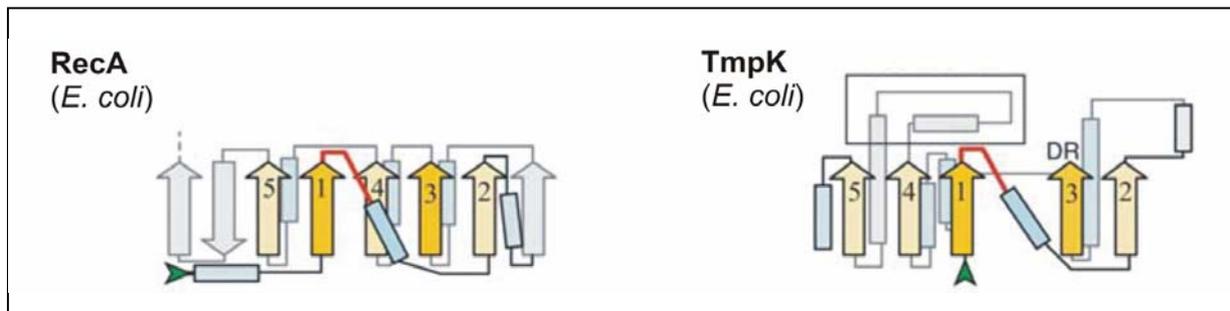


Abb. 2: Topologie der Faltung von NTPase-Domänen. TmpK repräsentiert einen Vertreter der Kinase-GTPase-Klasse, RecA ist ein typisches Protein der ASCE-Klasse, die sich durch den insertierten β 4-Strang auszeichnen. Farbkodierung: α -Helices in blau, β -Stränge in gelb; vordere Motive intensiverer Farbton.^[7]

Proteine mit der RecA-Faltung können in weitere Klassen eingeteilt werden (Abb. 1). Die Klasse der „Entfalter“, zu denen AAA⁺- und RecA/F1/F0-ATPasen, genauso wie SF1-, SF2- und SF3-Helikasen gehören, ist in der Regel in die Entfaltung aber auch Rückfaltung von verschiedenen Biomolekülen involviert. Mit Ausnahme der SF1- und SF2-Helikasen besitzen die Proteine dieser

Klasse die Fähigkeit, vorwiegend hexamere Ringe auszubilden. Da die genannten Helikasen ohne die Assoziation mit weiteren Faktoren keine volle Aktivität entwickeln können, scheint ihre Hexamerisierung eine notwendige Voraussetzung für die Entfaltungsaktivität zu sein.^[8]

Eine weitere Gemeinsamkeit innerhalb dieser Klasse ist ein konservierter Arginin-Rest in der N-terminalen Region des β 5-Stranges. Dieser als „Arginin-Finger“ bezeichnete Rest zeigt in Richtung des Nukleotids der Nachbaruntereinheit im Ring und könnte der Kommunikation zwischen benachbarten Untereinheiten dienen.^[9-11]

3.1.2 AAA⁺-ATPasen

AAA⁺-ATPasen unterscheiden sich von anderen „Entfaltern“ durch ein Bündel aus vier helikalen Segmenten, das C-terminal zum β 5-Strang der ATPase-Domäne lokalisiert ist. Diese Struktur enthält einen konservierten Arginin-Rest, der als Sensor-2 bezeichnet wird und einerseits eine Hilfsfunktion bei der ATP-Hydrolyse haben soll, andererseits abhängig vom Nukleotidzustand eine Konformationsänderung eingehen und somit als Sensor fungieren soll. Es wird vermutet, dass die helikale Unterdomäne durch ATP-Hydrolyse gewonnene freie Energie an die Substrate überträgt, woran wahrscheinlich auch der Sensor-2-Rest beteiligt ist.^[11-13] Für einige ATP-abhängige Proteasen konnte dieser Bereich als Substratbindedomäne identifiziert werden, der Mechanismus der Energieübertragung auf Substrate wird somit plausibel.^[14]

Wichtige Vertreter der AAA⁺-Familie sind bakterielle Proteasen, darunter ClpXP und ClpAP, die aus einer zentralen ClpP-Protease bestehen, die von AAA⁺-ATPasen ClpA bzw. ClpX flankiert wird, genauso wie die HslUV-Protease, die aus der HslV-Protease und der HslU-ATPase aufgebaut ist. Obwohl in allen Komplexen ein Symmetriebruch existiert (ClpP bildet Heptamere, ClpA, ClpX und HslV sind hexamer, HslU kann als Hexamer und als Heptamer vorkommen), konnten die Proteasen als stabile Komplexe isoliert werden.^[15-20]

Viele Proteine der AAA⁺-Klasse dienen als Faltungshelfer (Chaperone). Darunter sind neben der ClpA-ATPase auch das ebenfalls aus zwei ATPase-Domänen bestehende ClpB und seine Hefe- und mitochondrialen Homologe Hsp104 bzw. Hsp78, die der Hsp100-Familie angehören.^[21-24] ClpB und die Hsp100-Proteine sind für die Auflösung von Proteinaggregaten verantwortlich und arbeiten darin mit dem DnaK-Chaperonsystem zusammen, das aus DnaK, DnaJ und GrpE besteht. Während dieser Prozess energieabhängig ist und somit ATP-Hydrolyse erfordert, werden ebenfalls energieunabhängige Chaperonaktivitäten in der Verhinderung der Aggregation von denaturierten Proteinen beschrieben. Unter anderem sollen den proteasomalen ATPasen, seinem

archaealen Homolog PAN oder p97 und seinem Homolog VAT diese Aufgaben zukommen (vgl. 3.1.3.4 und 3.1.3.5).^[25-27]

3.1.3 AAA-ATPasen

AAA-ATPasen besitzen einen hoch konservierten Bereich, der als SRH („Second region of homology“) bezeichnet und in der Literatur als Unterscheidungskriterium zu anderen AAA⁺-ATPasen aufgeführt wird. Dieser Bereich enthält ca. 15-20 Aminosäuren und wird durch den Sensor-1 und den Arginin-Finger sequenziell begrenzt.

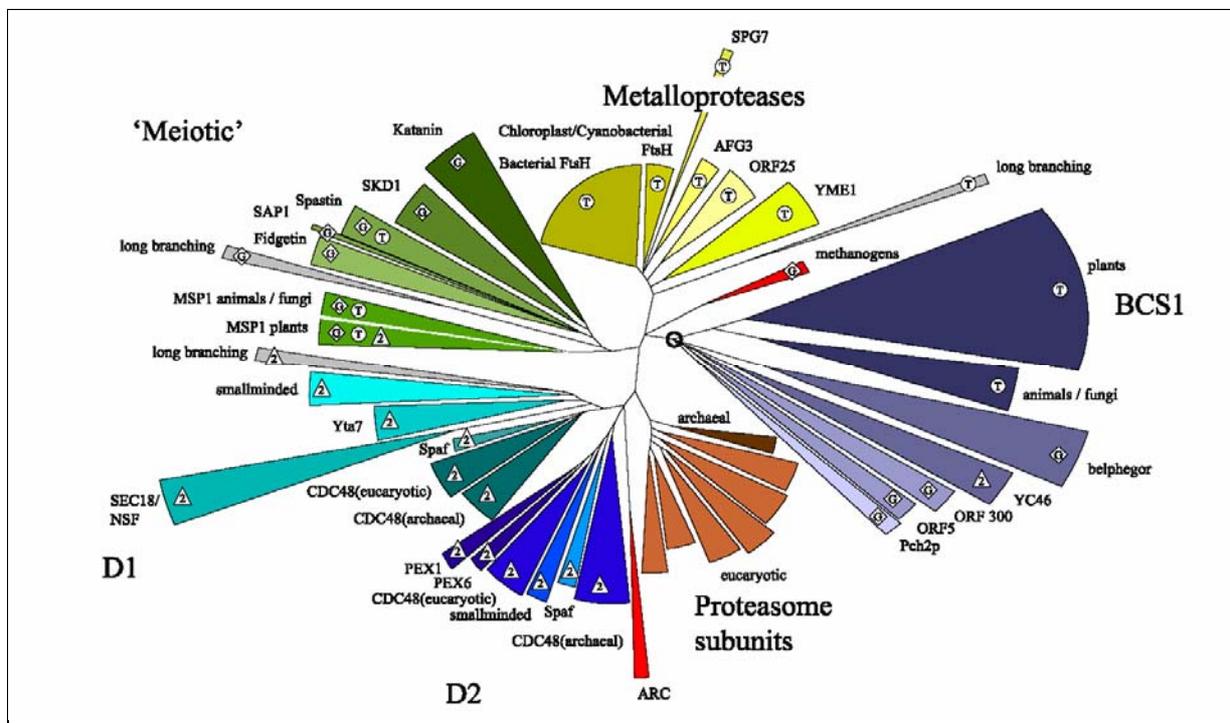


Abb. 3: Phylogenetische Einteilung von AAA-Domänen.

Die AAA-Domänen lassen sich in sechs Hauptgruppen und mehrere kleine Nebengruppen einteilen.^[28]

Ein weiterer Unterschied zu AAA⁺-ATPasen ist im Sensor-2 selbst zu finden. Während dieser Rest bei allen AAA⁺-ATPasen als konserviertes Arginin vorkommt, besitzen die meisten AAA-ATPasen an dieser Stelle ein Alanin. Hingegen enthalten AAA-ATPasen zwei zusätzliche Arginin-Reste, die bei AAA⁺-ATPasen nicht konserviert sind; C-terminal vom Walker-B-Motiv und drei Aminosäuren N-terminal vom Arginin-Finger. Mutation in einem der Reste in FtsH führte zur Aufhebung der ATPase-Aktivität, was auf eine essentielle katalytische Eigenschaft dieser Reste in der ATP-Hydrolyse hindeutet.^[10,11,13]

Die Einteilung der AAA-Domänen erfolgte bisher in fünf Gruppen: die proteasomalen AAA-ATPasen, Metalloproteasen, D1-Domänen, D2-Domänen und sog. „meiotische“ AAA-ATPasen (Abb. 1).^[5,28,29] Neue Klassifizierungen zeigen zusätzlich zu den fünf bereits genannten Gruppen eine weitere Hauptgruppe, die BCS1-Gruppe, und einige kleinere Nebengruppen (Abb. 3).^[28]

3.1.3.1 Metalloproteasen

Proteine dieser Gruppe besitzen eine spezifische Domänenarchitektur mit einer transmembranen N-Domäne, einer zentralen AAA-Domäne und einer C-terminalen Metalloprotease-Domäne. Sie sind in der inneren Membran von Bakterien lokalisiert, wo sie für den Abbau von löslichen Proteinen und Membranproteinen zuständig sind. Daneben konnten sie auch in Organellen gefunden werden, in denen sie nicht assemblierte Untereinheiten von Membrankomplexen beseitigen (m- und i-AAA-Proteasen in Mitochondrien).^[30] Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist die FtsH-Protease, welche in *E. coli* bereits sehr gut charakterisiert ist.^[31] Die N-Domäne innerhalb der Gruppe ist mit Ausnahme des eukaryontischen YME1 konserviert. Seine N-Domäne unterscheidet sich stark von den anderer Metalloproteasen und sie weist zudem große Differenzen zwischen Pflanzen einerseits und Tieren und Pilzen andererseits auf.

Mutationen in den mitochondrialen m-AAA-Proteasen können zu schweren spastischen Erkrankungen führen, worin die große physiologische Relevanz der eukaryontischen AAA-Proteasen deutlich wird.^[32]

3.1.3.2 „Meiotische“ Gruppe

Die „Meiotische“ Gruppe zeichnet sich durch zwei fehlende Reste N-terminal vom Arginin-Finger im SRH-Bereich aus. Abgesehen von einigen kleinen Nebengruppen ist dieses Charakteristikum in keiner weiteren AAA-Hauptgruppe zu finden.

Zu den wichtigsten Ästen dieser Gruppe gehören Katanin, SKD1, Spastin, Fidgetin und MSP1. Die Funktion der „meiotischen“ Proteine ist auf der molekularen Ebene noch sehr wenig untersucht, es ist aber bekannt, dass Katanin und SKD1 ohne Substrat als Dimere vorliegen und ihre Oligomerisierung erst nach Substratbindung erfolgt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass SKD1 an der vakuolären Proteinsortierung und am endosomalen Transport beteiligt ist, während Katanin zu den Proteinen zählt, die Mikrotubuli in der Mitose und Meiose teilen. Spastin spielt eine Rolle in der Mikrotubuli-Deassemblierung. Das in unserer Abteilung unter-

suchte TAA43-Protein (auch VAT-2 genannt) gehört ebenfalls zu dieser Untergruppe. Es liegt interessanterweise als Dimer vor, seine Funktion ist aber noch nicht bekannt.

Ein überraschendes Phänomen ist, dass die große N-Domäne pflanzlicher MSP1-Proteine eine degenerierte ATPase-Domäne enthält, die von der Duplizierung in Typ-II-ATPasen unabhängig ist (3.1.3.5).

3.1.3.3 BCS1-Gruppe

BCS1 ist ein Protein der inneren Membran von Mitochondrien, welches wahrscheinlich an der Faltung von Membrankomplexen beteiligt ist. In Hefe ist es für die Bildung eines funktionsfähigen Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins verantwortlich.^[33,34]

Die BCS1-Proteine in Tieren und Pilzen zeigen große Unterschiede zu den pflanzlichen Proteinen. Zudem treten in Pflanzen viele paraloge BCS-1-Proteine auf.

3.1.3.4 Proteasomale ATPasen

Zu dieser Gruppe gehören die ATPasen in den 19S-Kappen des eukaryontischen 26S-Proteasoms. Das 26S-Proteasom besteht aus einem zentralen Proteinkomplex, dem 20S-Proteasom, und aus zwei flankierenden 19S-Kappenkomplexen.^[35] Das 20S-Proteasom ist eine tonnenförmige Protease mit heptamerer Symmetrie, deren katalytische Reste abgeschirmt im Inneren der Tonne liegen. Aufgrund eines schmalen Eingangskanals kann es nur entfaltete Proteine oder nicht strukturierte Peptide abbauen. Die Entfaltung erfolgt durch die 19S-Kappen, die sechs verwandte AAA-ATPasen (Rpt1-Rpt6) beinhalten, die wahrscheinlich eine hexamere Struktur ausbilden.^[36] Zusätzlich besteht der Komplex aus acht Nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpns), die Ubiquitin-markierte Proteine erkennen und binden. Die ATPasen haben neben der Substraterkennung die Aufgabe, das Substrat zu entfalten und in das 20S-Proteasom zu translozieren. Dieser Vorgang ist mit einer Öffnung des zentralen Kanals im 20S-Proteasom verbunden.^[37] Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die ATPase Rpt5 direkt an der Erkennung von ubiquitinierten Proteinen beteiligt ist.^[38]

Während in Eukaryonten die sechs ATPasen einen Heterokomplex ausbilden und ein gegenseitiger Austausch nicht möglich ist und mit einem Funktionsverlust verbunden wäre,^[39] gibt es in den meisten Archaeen nur ein homologes Protein. Das *Methanococcus-jannaschi*-Homolog konnte als homooligomerer Komplex, PAN (Proteasome-activating Nucleotidase), isoliert werden, der in Analogie zu den eukaryontischen 19S-Kappen das 20S-Proteasom durch Substratent-

faltung und Kanalöffnung aktiviert.^[25,40] In einigen wenigen Archaeen existieren keine PAN-Homologe, was auch für *Thermoplasma acidophilum* zutrifft. In diesem Organismus kommen nur zwei AAA-ATPase vor, VAT und VAT2/TAA43.^[41] Während für das letztgenannte Protein, das zur Gruppe der meiotischen ATPasen gehört, keine Proteasom-aktivierende Aktivität nachgewiesen werden konnte,^[42] beschrieben erste Studien mit VAT, einem Vertreter der Typ-II-ATPasen, Entfaltung von Proteinsubstraten.^[27] Vielleicht kommen AAA-ATPasen wie VAT genauso für die Stimulation vom Proteasom in Frage und übernehmen die Rolle von PAN in Organismen, die keine proteasomalen ATPase-Homologe besitzen.

3.1.3.5 D1- und D2-Domänen der Typ-II-ATPasen

Zum Typ-II der AAA-ATPasen gehören Proteine, die zwei ATPase-Domänen beinhalten, D1 und D2. Typische Vertreter sind p97/VCP/Cdc48, NSF/Sec18, Pex1 und Pex6, YTA7 und SPAF. Zwischen den beiden Domänen sind große Sequenzunterschiede zu finden, so dass sie in zwei Klassen eingeteilt werden. Es wird vermutet, dass die Domänen durch Duplikation aus einer Domäne hervorgegangen sind und im Laufe der Evolution sich entsprechend ihrer Funktionen auseinander entwickelt haben. Interessanterweise kann eine der Domänen inaktiv sein. So sind die D1-Domäne von Pex1 und Pex6 und die D2-Domäne in NSF/Sec18 und YTA7 degeneriert und besitzen keine ATPase-Aktivität mehr.^[28]

Ein weiteres Merkmal der Typ-II-ATPasen ist die stark konservierte N-Domäne, die ein doppeltes ψ -Fass und eine β -Klammer-Struktur bildet, an die sich die D1-Domäne anschließt.^[43]

Zu dieser Klasse der AAA-ATPasen gehört auch das in dieser Arbeit untersuchte VAT-Protein, das ein archaeales Homolog des eukaryontischen p97/VCP/Cdc48 ist.

p97/VCP/Cdc48 kommt in den drei Domänen des Lebens ubiquitär vor und macht mehr als 1% aller Zellproteine aus. Es ist in sehr viele Zellvorgänge involviert, wobei die durchgeführten Funktionen oft von den interagierenden Cofaktoren abhängen. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten dieser Prozesse zählen die Membranfusion und die Proteolyse.

Während der mitotischen Zellteilung in Eukaryonten werden die Organellen fragmentiert und nach der gleichmäßigen Aufteilung auf die Tochterzellen wieder zu funktionsfähigen Komplexen zusammengesetzt. p97 ist an dieser homotypischen Fusion von ER-Membranen beteiligt.^[44,45]

Daneben wird es auch für das post-mitotische Wachstum des Golgi-Apparates und den Wiederaufbau der Kernhülle benötigt.^[46,47] Bei der Fusion von ER-Membranen bildet p97 einen stabilen Komplex mit dem Cofaktor p47, der wiederum eine Interaktion mit Syntaxin5, einem Mitglied

der t-SNARE-Familie, eingeht. Die genaue Aufgabe von p97 bei der Fusion ist nicht bekannt. Es wird spekuliert, dass es als Chaperon fungiert und Syntaxin5-Moleküle für die Komplexbildung vorbereitet. Mit der Bindung von p47 an die N-Domäne von p97 ist auch eine Inhibierung der ATPase-Aktivität verknüpft.^[48] Nach erfolgter Membranfusion wird der p97-p47-Syntaxin5-Komplex durch die Assoziation von VCIP135 an Syntaxin5 wieder aufgelöst und kann nicht erneut aufgebaut werden. Zusätzlich scheint VCIP135 auch mit p47 um eine Bindestelle an p97 zu konkurrieren.^[49] Ein weiteres Kontrollinstrument der Membranfusion stellt die reversible Phosphorylierung von p47 dar, das in der phosphorylierten Form keinen Kontakt mehr zu p97 herstellen kann.^[50] Bei der Assemblierung der Kernhülle benötigt p97 neben p47 noch weitere Cofaktoren. Im ersten Schritt wird ein Komplex aus p97, Ufd1 und Npl4 aufgebaut, der für die Ausbildung einer geschlossenen Kernhülle zuständig ist. Im zweiten Schritt verdrängt p47 Ufd1-Npl4 von p97 und der neu generierte p97-p47-Komplex fügt neue Membranen in die Kernhülle ein, wodurch ein Wachstum der Kernhülle erreicht wird (Abb. 4).^[47]

Bisher existieren keine Belege für Membranfusionsereignisse in Archaeen. Deshalb ist eine Rolle von VAT bei der Fusion von Membranen nicht gesichert.

Zu weiteren zellulären Aufgaben von p97 zählen die Regulation des Zellzyklus, die Stressantwort, der programmierte Zelltod, die B- und T-Zellaktivierung, die transkriptionale Regulation, ERAD („ER-associated degradation“) und der allgemeine Proteinabbau (Abb. 4). Diese Prozesse haben auf den ersten Blick nichts gemeinsam, wird die Rolle von p97 darin aber genauer betrachtet, ist auffällig, dass es immer als molekulares Chaperon fungiert und alle Prozesse mit der Proteasom-Ubiquitin-abhängigen Proteolyse verknüpft sind.

Sollen Proteine abgebaut werden, müssen sie mit Hilfe von Ligasen mehrmals mit einem 8-kD-großen Polypeptid, dem Ubiquitin, versehen werden. Daraufhin gelangen sie, wahrscheinlich über die Assoziation mit molekularen Chaperonen bzw. Transportmolekülen, in das 26S-Proteasom, wo sie, wie oben beschrieben, abgebaut werden.^[51] Es wird angenommen, dass p97 als Chaperon an der Beförderung der Substrate beteiligt ist. Tatsächlich führen Mutationen im Cdc48-Gen in Hefe zur Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen.^[52] Für Säugetiere konnte nach der Entfernung von p97 aus dem Zellextrakt ebenfalls eine Akkumulation von ubiquitiniertem CyclinE nachgewiesen werden. Die Beteiligung von p97 an der Proteasomenvermittelten Proteolyse wird darin bestärkt, dass seine N-Domäne polyubiquitinierte Proteine direkt bindet und zusätzlich auch Bindungen zu anderen Komponenten des Proteolysesystems,

wie Ufd1, Ufd2 und Ufd3, ausbildet. p97 konnte zudem mit dem 26S-Proteasom coaufgereinigt werden.^[53-55]

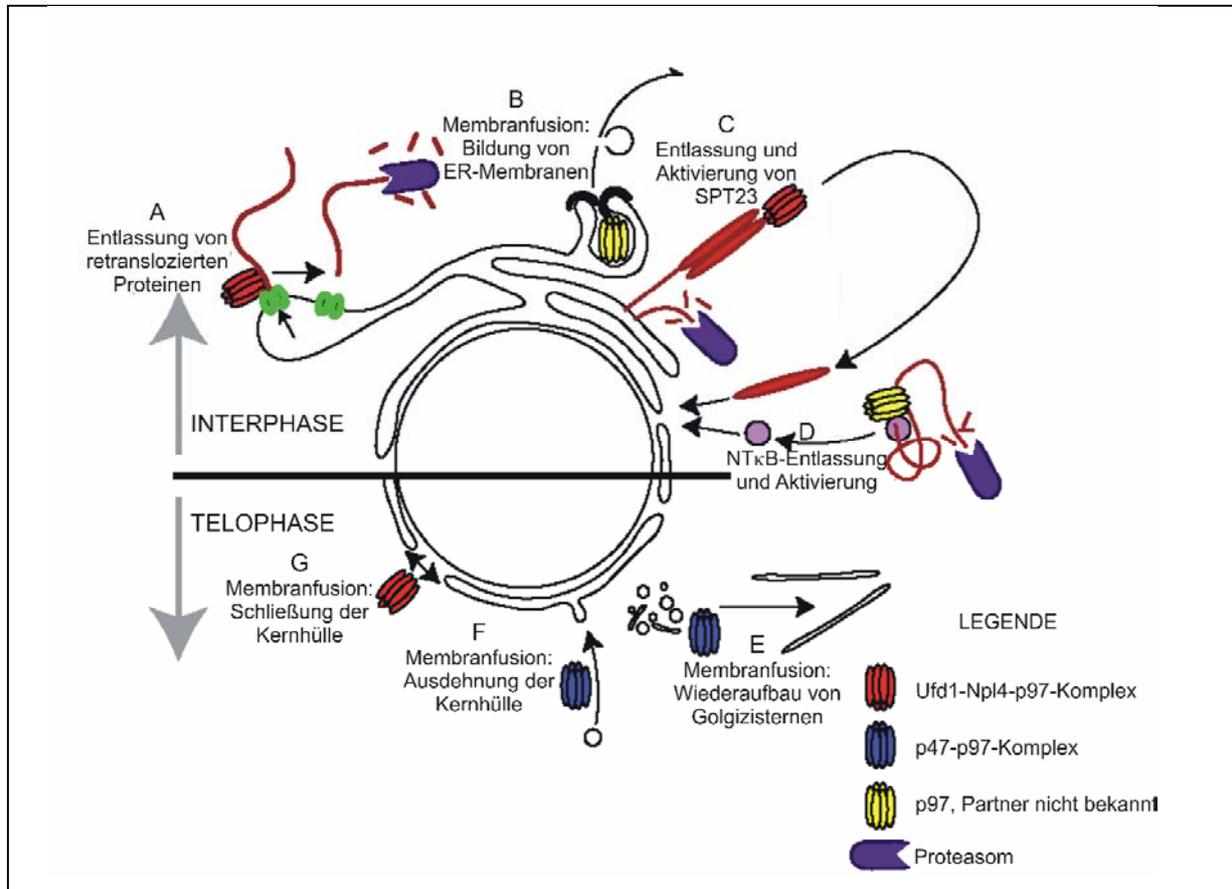


Abb. 4: Zelluläre Funktionen von p97/VCP/Cdc48.

(A) Bei der Rücktranslokation aus dem ER werden entfaltete Proteine über das Sec61-Translokon (grün) zurücktransportiert und mit Hilfe von p97 an das 26S-Proteasom weitergereicht. (B) p97 ist an der ER-Membranfusion beteiligt. (C) p97 trennt den C-terminal prozessierten Transkriptionsfaktor SPT23 vom nichtprozessierten, membranverankerten SPT23 (beide rot) und ermöglicht dadurch seinen Transport in den Zellkern. (D) Der Transkriptionsfaktor NFκB (pink) wird mit Hilfe von p97 von seinem Inhibitor IκB befreit und dadurch aktiviert. (E) p97 ist am Wiederaufbau der Golgizisterne beteiligt. (F, G) p97 ist am Aufbau der Kernhülle beteiligt: zunächst wird eine geschlossene Kernhülle gebildet, in die weitere Membranfragmente eingefügt werden.^[56]

Es ist bekannt, dass nicht-ubiquitinierte Proteasomsubstrate meistens mit anderen Proteinen komplexiert werden, um sie vor der Proteolyse zu schützen. p97 kann in der Deassemblierung von diesen Substraten nach erfolgter Ubiquitinierung eine Rolle spielen, wobei es, gemäß der Definition, als Chaperon agieren würde.^[57] Neue Studien zeigen sogar, dass p97 zwischen nativen und nicht-nativen Proteinen unterscheiden kann und dass durch die Bindung von p97 an denaturierte Proteine diese in löslichem Zustand gehalten werden.^[57,58] Erst kürzlich konnte eine

direkte Einbeziehung von p97 in die Unterdrückung von neurodegenerativen Polyglutamin-krankheiten nachgewiesen werden.^[59,60]

In eukaryontischen Zellen unterliegen neu synthetisierte Proteine nach ihrem Transport in das endoplasmische Retikulum (ER) einer strengen Qualitätskontrolle. Wenn missgefaltete oder nicht ausreichend assemblierte Proteine in das Lumen des ER gelangen, werden sie auf die zytosolische Seite zurück transportiert (Rücktranslokation) und dort für den proteasomalen Abbau ubiquitiniert. Dieser Prozess wird als ERAD („ER-associated degradation“) bezeichnet und er beinhaltet neben dem Abbau von löslichen Lumen-Proteinen auch die Beseitigung von membranständigen Proteinen. Viele Studien zeigen, dass p97 als molekulares Chaperon am ERAD beteiligt ist und ubiquitinierte Proteine aus ER-Membranen extrahiert, um sie für das 26S-Proteasom zugänglich zu machen.^[61-64] Kürzlich wurde ein neues Modell für die Rücktranslokation von Proteinen durch p97 entwickelt, worin p97 nicht-ubiquitinierte Proteine schwach und polyubiquitinierte stark bindet. Diese starke Bindung beruht auf der synergistischen Interaktion von p97 und seinen Cofaktoren Ufd1-Npl4 mit den Polyubiquitinketten.^[65]

p97 ist auch an der Aktivierung der nuklearen Transkriptionsfaktoren NF- κ B/Spt23/Mga2 beteiligt, welche für die Expression von vielen Genen verantwortlich sind. In Säugetieren bindet p97 den polyubiquitinierten Inhibitor von NF- κ B I κ B α , entfernt ihn von NF- κ B, der daraufhin seine Aktivität entfalten kann, und transportiert I κ B α zum 26S-Proteasom.^[53]

In Hefe wird der Transkriptionsfaktor Spt23 in seiner inaktiven Form als p120 synthetisiert und als Dimer über die C-terminale Transmembrandomäne in der ER-Membran verankert. Ein Monomer wird nach erfolgter Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasom in der Weise prozessiert, dass nur der 90-kD-große N-terminale Bereich (p90) übrig bleibt. Dieser ist aber weiterhin über das zweite, nicht prozessierte p120 mit der Membran verbunden. Nun kommt Cdc48, zusammen mit seinen Cofaktoren Ufd1-Npl4, die Aufgabe zu, p90 von p120 abzutrennen und in den Kern zu transportieren, um dort die Transkription der Fettsäure-Desaturase zu starten.^[61,66] Ähnliches konnte auch für Mga2 gezeigt werden.^[67,68]

Schon vor über 20 Jahren wurde die Beteiligung von Cdc48 an der Kontrolle des Zellzyklus beobachtet.^[69] Es gilt als bewiesen, dass p97 in hohem Maße in sich schnell teilenden Zellen und Krebszellen exprimiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass p97 mit dem DNA-Entfaltungsfaktor DUF interagiert, was eventuell für die DNA-Replikation notwendig ist.^[70] Daneben bindet p97 auch das BRCA1-Protein, ein Genprodukt in Brust- und Eierstockkrebs, was seine Einbeziehung in die Reparatur von DNA-Schäden impliziert.^[71]

Es gibt Belege dafür, dass p97 die Apoptose negativ beeinflusst; das p97-Gen ist ein Zielgen im sog. Cytokinstimulationsmodell, welches eine vermehrte Zellteilung aufgrund von Aktivierung der Cytokinrezeptoren beschreibt. Die Expression eines mutierten p97-Proteins führt direkt zur Apoptose.^[72] Verschiedene Regulatoren der Apoptose wurden zudem als neue Substrate im Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg identifiziert, was sie wiederum in Verbindung mit p97 bringt.^[73,74]

In keinem der bisher sequenzierten Archaeen konnten Ubiquitin oder homologe Proteine nachgewiesen werden. Der proteasomale Abbau in Archaeen scheint damit Ubiquitin-unabhängig zu sein. Es ist nicht bekannt, ob es dort überhaupt eine Erkennungssequenz für den Abbau gibt und in welcher Weise die Qualitätskontrolle durchgeführt wird. Deshalb ist die Funktion vom archaealen p97-Homolog VAT noch sehr wenig verstanden. Erste Studien zeigten indirekt, dass VAT an der Ent- und Rückfaltung von Proteinsubstraten beteiligt ist, was ihm den bifunktionalen Charakter einer Entfaltungsmaschine und eines molekularen Chaperons zuordnet.^[27] Viele der für p97 beschriebenen Aufgaben können von VAT aber nicht durchgeführt werden, weil in Archaeen z.B. aufgrund von fehlenden Zellorganellen die Voraussetzungen dafür fehlen. Deshalb müssen die Aufgaben von VAT in anderen Bereichen liegen (vgl. auch 3.1.3.4).

3.2 Strukturelle und mechanistische Aspekte

3.2.1 Die Struktur von AAA-ATPasen

Wie bereits beschrieben, können die AAA-ATPasen aus einer oder zwei ATPase-Domänen aufgebaut sein. Diese Domänen sind stark konserviert und haben die Aufgabe der Nukleotidbindung und -Hydrolyse. Bei manchen Typ-II-ATPasen mit zwei ATPase-Domänen kann eine der Domänen ihre ATP-Hydrolyseaktivität verloren haben. Diese Domänen haben wahrscheinlich andere Funktionen im Molekül, wie z.B. die der Oligomerisierung (vgl. 3.1.3.5). Daneben beinhalten alle Typ-II-AAA-ATPasen eine N-terminale Domäne (N-Domäne), die sich durch eine charakteristische Doppel- ψ - β -Fass- und β -Klammer-Faltung auszeichnet.

Die dreidimensionale Struktur des in dieser Arbeit behandelten Proteins VAT wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.^[75-77]

VAT besitzt eine sechszählige Symmetrie, wobei der hexamere Körper einen schmalen Kanal und eine zentrale Pore umschließt. Der Durchmesser der ATPase-Domänen beträgt 13.2 nm und die Höhe 8.4 nm. VAT besteht aus sechs identischen Untereinheiten von 83 kD und hat somit ein Gesamtmolekulargewicht von ca. 500 kD. Die monomere Peptidkette enthält drei Domänen, die N-, D1- und D2-Domäne, die in der kryo-elektronenmikroskopischen Rekonstruktion von VAT

gut zu unterscheiden sind. Während die D1- und D2-Domänen Ringe ausbilden, die übereinander angebracht sind, ist die N-Domäne an der Peripherie der D1-Domäne lokalisiert. Durch die hohe Flexibilität der N-Domäne stellte ihre exakte Anordnung aber große Probleme dar. So reagiert die N-Domäne im homologen p97 sehr sensitiv auf den Nukleotidzustand des Proteins und ist unter bestimmten Bedingungen im Elektronenmikroskop nicht sichtbar.^[78] Die Anordnung der beiden ATPase-Domänen in VAT war lange umstritten. Es sind sowohl eine antiparallele („Schwanz-zu-Schwanz“) als auch eine parallele („Kopf-zu-Schwanz“) Anordnung vorstellbar. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von p97 konnte eine parallele Orientierung bestätigt werden, was jetzt ebenfalls für VAT angenommen wird.^[79,80] Dies ist aber nicht für alle Typ-II-ATPasen bindend. In NSF wird zum Beispiel von einer antiparallelen Orientierung ausgegangen.^[81]

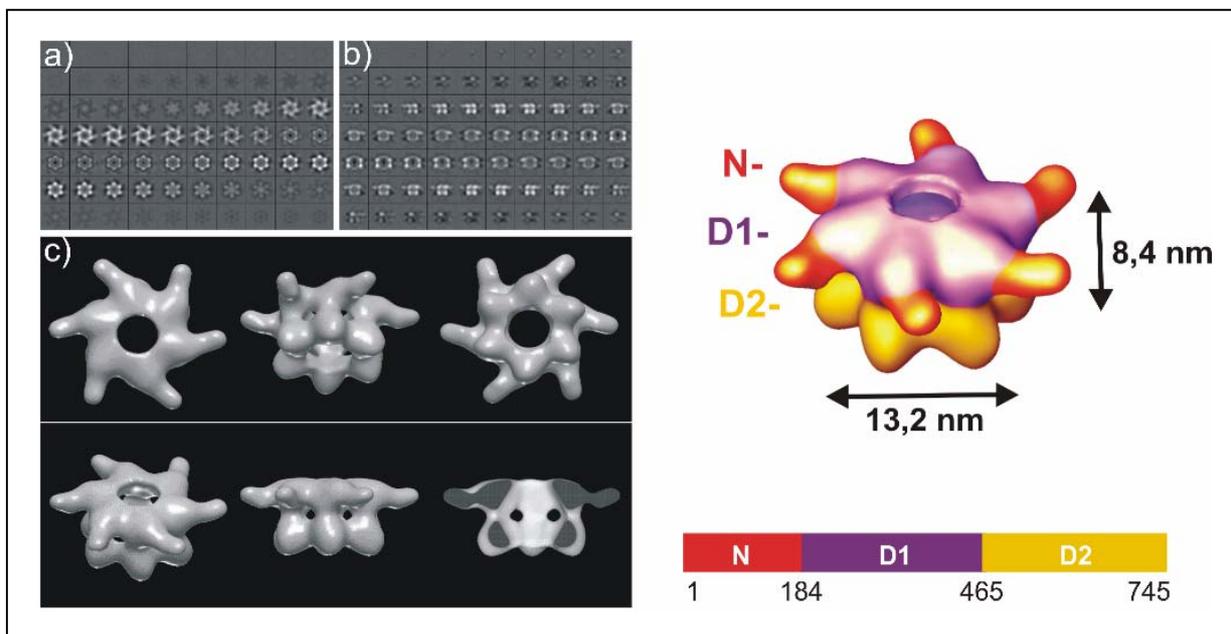


Abb. 5: 3D-Rekonstruktion von VAT, basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Links: a) x-y-Schnitte, b) x-z-Schnitte und c) Isooberflächenrepräsentation des rekonstruierten Volumens von Eis-eingebetteten VAT-Partikeln. Rechts: VAT-Hexamere (oben) und Schema zur VAT-Sequenz (unten); Farbindex: N- in rot, D1- in violett und D2-Domäne in gelb.^[75]

Aus röntgenkristallographischen Daten von p97 konnten weitere Erkenntnisse über seine Struktur und Funktionsweise gewonnen werden, die wahrscheinlich auch für VAT gelten. Die D1- und D2-Domänen besitzen 41% Sequenzidentität und 72% Sequenzähnlichkeit. Die D1-Domäne, die immer ADP gebunden hat, ist aber kompakter gebaut als die D2-Domäne. Die Verbindung zwischen den beiden Domänen, der D1-D2-Linker, ist stark ausgedehnt und ragt weit in die Nukleotidbindetasche der D2-Domäne. Der N-D1-Linker zeigt eine Ausdehnung in die D1-Domäne.

Dieses Phänomen lässt auf eine Verständigung zwischen den Domänen über die flexiblen Linker schließen.^[79,80,82,83] Die genaue Struktur der ATPase-Domäne und deren Änderung während des ATP-Hydrolysezyklus werden unter 3.2.5 und 3.2.6 detailliert beschrieben.

Interessanterweise konnte in zwei der bisher erhaltenen Kristallstrukturen von p97 ein Zn^{2+} -Ion in der D1-Pore identifiziert werden. Dieses wird von Histidin-Resten 317 aller sechs Untereinheiten stabil koordiniert und resultiert nicht aus den verwendeten Kristallisationspuffern, da diese Zn^{2+} -frei waren.^[80,83] Das Metallion versperrt den Eingang in die Pore und stützt damit die Theorie, dass p97 mit dem Substrat an der Oberfläche und nicht in der zentralen Kavität interagiert. Für viele Mitglieder der AAA⁺-Familie konnte eine Translokation von Substrat (DNA oder Protein/Peptid) durch die zentrale Pore demonstriert werden, nicht aber für p97 oder seine Homologe.^[15,17,84,85]

3.2.2 Die N-Domäne

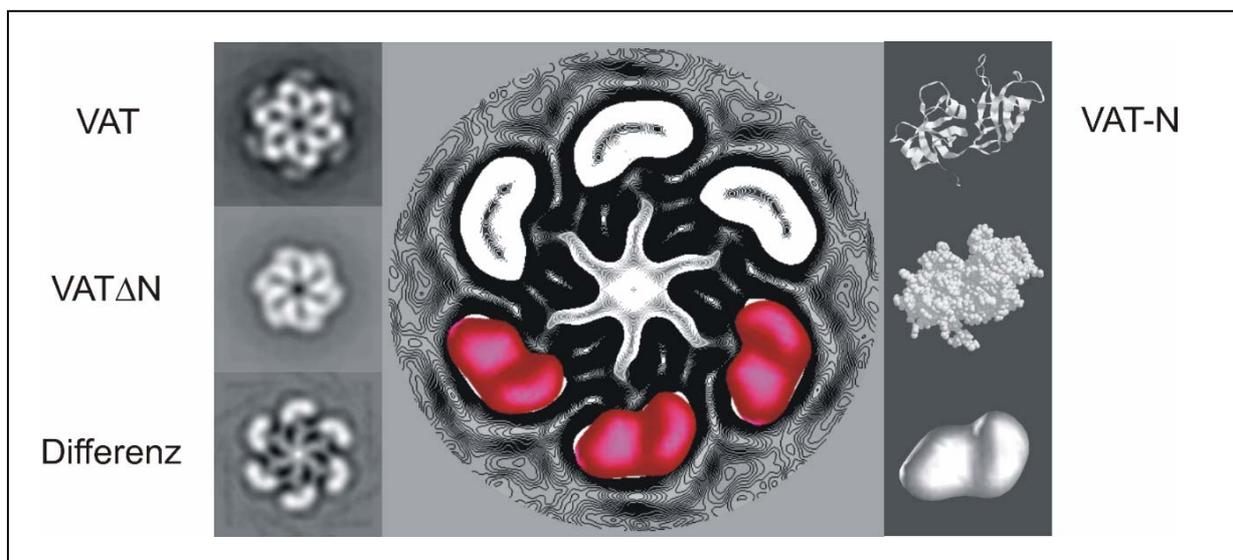


Abb. 6: Struktur der N-Domäne von VAT.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VAT, VAT Δ N und die Differenz aus beiden (links und Mitte). Struktur von VAT-N als Bänder-, Kugel- und Oberflächenmodell (rechts).^[77]

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von VAT und VAT Δ N, einer Mutante von VAT, der 183 N-terminale Reste fehlen, konnte die Lokalisation der N-Domäne bestimmt werden. Sie befindet sich an der Peripherie des hexameren Ringes und weist eine Nieren-ähnliche Form auf.^[76,77] Die atomare Struktur konnte mit der NMR-Spektroskopie gelöst werden.^[43] Sie setzt

sich aus zwei Unterdomänen zusammen, einem N-terminalen β -Fass mit einer doppelten ψ -Struktur und einer C-terminalen sechssträngigen β -Klammer (Abb. 6).

In Analogie zu Aspartat-Proteasen, die ebenfalls eine β/ψ -Struktur aufweisen, wurde die N-Domäne zur Substratbindedomäne erklärt. Das Substrat soll entweder mit einer Furche zwischen den ψ -Loops oder direkt mit den Kontaktstelle der beiden Unterdomänen interagieren.^[86,87]

Über die ATP-unabhängige Rückfaltung von denaturiertem Cyclophilin konnte die Bindung an VAT-N indirekt demonstriert werden.^[27] Für die N-Domäne von p97/Cdc48 wurde gezeigt, dass sie ubiquitinierte (insbesondere polyubiquitinierte) Proteine binden kann.^[52] Daneben ist die N-Domäne auch für die Interaktion mit verschiedenen Cofaktoren zuständig. Sie bindet, in Abhängigkeit von der geforderten Aufgabe, p47, Ufd1-Npl4 und andere Cofaktoren.^[56,88] Der Kontakt zum Cofaktor inhibiert die ATPase-Aktivität von p97. Dies deutet auf einen direkten Einfluss der N-Domäne in der ATP-Hydrolyse hin.^[48,57] Kürzlich konnte bestätigt werden, dass die Interaktion von p97/Cdc48 mit der ER-Membran ebenfalls durch die N-Domäne vermittelt wird.^[65] Gleiche Aufgaben werden auch der N-Domäne von NSF/Sec18 zugeschrieben.^[89]

3.2.3 Die D1- und D2-Domäne

Obwohl für die AAA-ATPasen sehr viele Funktionen bekannt sind, sind die mechanistischen Aspekte dieser Funktionen wenig untersucht. Bei den Typ-II-ATPasen ist die Mechanismusaufklärung besonders komplex, da zwei ATPase-Domänen vorhanden sind. Es stellt sich die Frage, ob beide Domänen die gleichen Funktionen haben und ob sie als Duplex für ein Protein notwendig sind. In NSF/Sec18 kann zum Beispiel die D2-Domäne ATP nicht hydrolysieren, sie ist aber für die Ausbildung des hexameren Komplexes notwendig. Die D1-Domäne übernimmt somit die komplette ATP-Hydrolyse und wird deshalb auch als die eigentliche funktionsaktive Domäne diskutiert. Für p97/Cdc48 konnte das umgekehrte Domänenverhalten nachgewiesen werden; durch Mutagenesestudien wurde festgestellt, dass die D2-Domäne von p97/Cdc48 die Haupthydrolyseaktivität besitzt.^[65,90] Die D1-Domäne ist hingegen für die nukleotidunabhängige Hexamerisierung notwendig.^[91] Interessanterweise entwickelt die D1-Domäne große ATP-Hydrolyseaktivität bei höheren, für Eukaryonten nicht physiologischen Temperaturen (50-55°C).^[90]

Da für das archaeale VAT aus *Thermoplasma acidophilum* die natürliche Umgebungstemperatur bei ca. 60°C liegt, ist es interessant, welche Domäne von VAT bei dieser Temperatur die Haupthydrolyseaktivität aufweist und ob VAT Ähnlichkeit zu p97 bei dessen natürlichen Temperaturbedingungen (37°C) oder einer auf 50°C erhöhten Temperatur zeigt.

3.2.4 Die Struktur der ATPase-Domäne

Die ATPase-Domäne besteht aus zwei Unterdomänen, einer N-terminalen Domäne, die eine α/β -Faltung mit einer Nukleotidbindetasche beinhaltet, und aus einer C-terminalen α -helikalen Domäne. Die N-terminale Domäne besitzt ein fünfsträngiges β -Faltblatt (Reihenfolge der Stränge: β_5 - β_1 - β_4 - β_3 - β_2), welches auf einer Seite von zwei, auf der anderen Seite von drei α -Helices flankiert wird (Abb. 7).

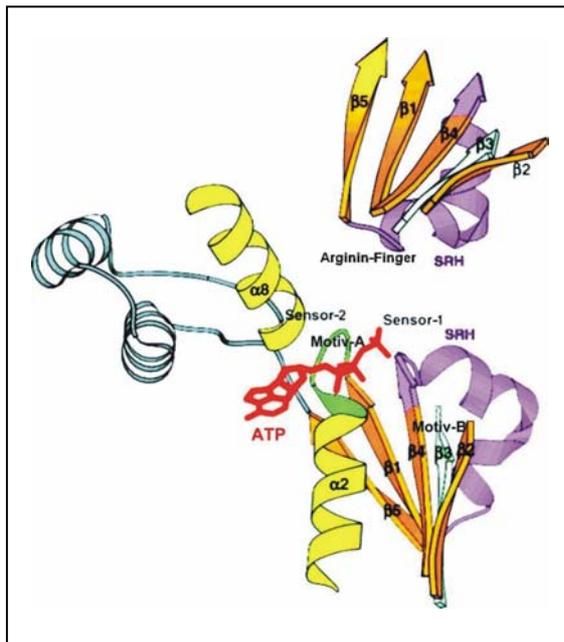


Abb. 7: Ein Ausschnitt aus der ATPase-Domäne einer AAA-ATPase.

NSF-D2 wurde hier stellvertretend für AAA-ATPasen dargestellt. Die Lokalisation von katalytischen Resten und ATP ist farbig angedeutet: Walker-A-Motiv (grün), Walker-B-Motiv (türkis), Sensor-1-Rest (violett), ATP (rot).^[11]

Für die Bindung und Hydrolyse des Nukleotids sind zwei stark konservierte Motive zuständig, Walker-A und Walker-B.^[4] Das Walker-A-Motiv bildet einen flexiblen Loop (P-Loop) zwischen dem β_1 -Strang und der α_2 -Helix und seine Glycin-reiche Sequenz (GxxxxGK[S/T], x = beliebiger Rest) dient der Orientierung der Phosphatgruppen eines gebundenen Nukleotids. Das

Walker-B-Motiv befindet sich am C-terminalen Ende des β_3 -Strangs und enthält typischerweise die Sequenz hhhDE (h = hydrophober Rest), wobei der konservierte Glutamat-Rest ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf den γ -Phosphor des Nukleotids aktiviert. Durch den Angriff entsteht ein fünffach koordinierter Phosphor als Übergangszustand, in dem die negative Ladung durch ein Mg^{2+} -Ion als essentiellen Cofaktor und durch umgebende positiv geladene Gruppen und/oder Protonendonoren stabilisiert wird. Das Mg^{2+} -Ion wird u.a. durch das konservierte Serin/Threonin des Walker-A- und den Aspartat-Rest des Walker-B-Motivs koordiniert. Ein weiterer katalytischer Rest (Asn oder Thr) befindet sich auf dem β_4 -Strang in der SRH. Er wird als Sensor-1 bezeichnet und koordiniert das γ -Phosphat des Nukleotids über ein Wassermolekül.^[6]

Die C-Domäne ist sowohl strukturell als auch von der Größe innerhalb der AAA-ATPasen weniger konserviert als die nukleotidbindende N-Domäne. Sie besteht überwiegend aus α -helikalen

Bereichen und scheint über die $\alpha 8$ -Helix ebenfalls mit den Phosphatgruppen des Nukleotids zu interagieren. In dieser Helix befindet sich bei den Vertretern der AAA⁺-ATPasen ein konservierter Arginin-Rest (Sensor-2), der aber in der AAA-Familie meistens gegen einen Alanin-Rest ausgetauscht ist. Die Orientierung der $\alpha 8$ -Helix in Richtung der Nukleotidbindetasche lässt auf eine Bewegung der C- und N-Domäne relativ zueinander während des Nukleotid-Hydrolysezyklus schließen.^[11]

Die Assemblierung der AAA-ATPasen zu Hexameren erfolgt überwiegend über die α/β -Domänen. Die Nukleotidbindetasche ist an der Schnittstelle zwischen den Untereinheiten eines Hexamers lokalisiert. Über einen konservierten Arginin-Rest, der in die Nukleotidbindetasche der benachbarten Untereinheit zeigt, stehen zwei Nachbaruntereinheiten im Kontakt. Der sog. Arginin-Finger ist nur durch eine kurze α -Helix vom Sensor-1 der gleichen Untereinheit getrennt, er koordiniert aber das γ -Phosphat des Nukleotids in der Nachbaruntereinheit. Diese Anordnung impliziert eine Kommunikation zwischen zwei benachbarten Untereinheiten in einem Ring, die durch die Bewegung der stabilen Helix zustande kommen könnte. Tatsächlich konnte die katalytische Rolle dieses Restes mittlerweile bestätigt werden.^[9,10,92] Zusätzlich existieren in AAA-ATPasen zwei weitere katalytische Arginin-Reste, die bereits unter 3.1.2 beschrieben wurden.^[13]

3.2.5 Der ATP-Hydrolysezyklus

Drei wichtige Modelle für die ATP-Hydrolyse in hexameren AAA⁺-ATPasen werden in der Literatur beschrieben; die synchronisierte, die rotierende und die sequenzielle Hydrolyse (Abb. 8). Alle Modelle beruhen auf Kristallstrukturen, in denen eine unterschiedliche Anzahl und Art an gebundenen Nukleotiden beobachtet wurde.^[82,93-96] Die meisten kristallisierten AAA⁺-Proteine binden sechs Nukleotide, was mit dem synchronisierten Modell in Übereinstimmung gebracht werden kann. Alle sechs ATP-Moleküle sollen gleichzeitig hydrolysiert und die sechsfache Symmetrie während des ganzen Reaktionszyklus beibehalten werden. Dieses Modell erscheint besonders plausibel für ATPasen, die bei der Auflösung von Aggregaten beteiligt sind, darunter auch p97/VCP/Cdc48, da dort eine starke gleichgerichtete Kraft auf das Substrat einwirken muss. Für p97 konnten mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen signifikante Strukturveränderungen während des ATP-Hydrolyse-Zyklus gezeigt werden, wobei die sechsfache Symmetrie in jedem Nukleotidzustand erhalten bleibt.^[78] Zudem wurden in der Kristallstruktur von p97-ND1 sechs gebundene ADP-Moleküle gefunden, was den synchronisierten Mechanismus weiter untermauert.^[82] In den kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen des Wildtyp-p97 treten Wider-

sprüche zu diesem Modell auf. Während die D1-Domäne immer sechs ADP-Moleküle gebunden hat und deshalb auch als hydrolyseinaktiv interpretiert wird, ist der Nukleotidbindungsanteil in der D2-Domäne sehr inkonsistent und scheint von der Art des Nukleotids abhängig zu sein.^[83]

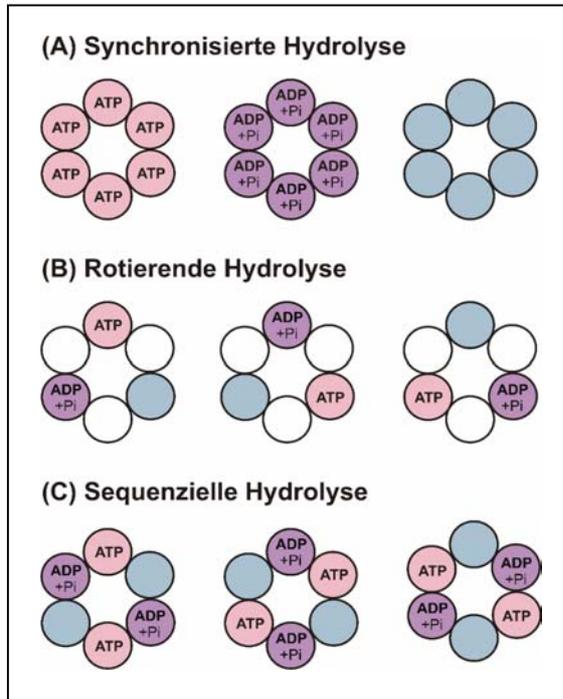


Abb. 8: Modelle zum ATP-Hydrolysezyklus.

(A) Im synchronisierten Modell erfolgt die ATP-Hydrolyse gleichzeitig in allen Untereinheiten. (B) Im rotierenden Modell sind drei Untereinheiten inaktiv, die anderen drei befinden sich in jeweils anderem Nukleotidzustand. (C) Im sequentiellen Modell sind alle Untereinheiten aktiv und die jeweils gegenüberliegenden befinden sich in der gleichen Zyklusphase.^[11]

Das rotierende Modell geht davon aus, dass drei der sechs Nukleotidbindestellen inaktiv sind und die drei aktiven Stellen sich immer in unterschiedlichen Phasen des Reaktionszyklus befinden. Vorbild für dieses Modell ist die F_1 -ATPase. Sie besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten; je drei α - und β -ATPasen, die zusammen ein alternierendes Hexamer aufbauen,

und $\gamma\delta\epsilon$, die eine Verbindung zwischen dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer und der Protonenpumpe F_0 herstellen. Die katalytisch aktiven Zentren des Komplexes sind die β -Untereinheiten, die nacheinander ADP und P_i binden, ATP synthetisieren und freisetzen. Reguliert wird der Zyklus durch die protonen-angetriebene Rotation der γ -Untereinheit und dadurch verursachte Konformationsänderungen in der β -ATPase. Die α -Untereinheiten können zwar Nukleotid binden, sind aber katalytisch inaktiv.^[97] Dieses Modell wäre zwar auch für AAA^+ -ATPasen denkbar, ist aber für die meist homooligomeren Komplexe eher unwahrscheinlich.

Das dritte, sequentielle Modell beschreibt die Hydrolyse, bei der alle Untereinheiten aktiv sind und jeweils zwei gegenüber liegende Protomere sich in der gleichen Reaktionszyklusphase befinden. Dieses Modell leitet sich von der Kristallstruktur der DnaB-homologen T7-Helikase ab, in der vier AMP-PNP-Moleküle symmetrisch gebunden sind. Hierbei wird ebenfalls von einer Rotation der Aktivität ausgegangen, wobei ein Reaktionsschritt des Protomers, die Reaktion im benachbarten Protomer stimuliert.^[84] Dieser Mechanismus wird neben den DNA-translozierenden

Helikasen auch für die AAA⁺-ATPasen und ATP-abhängige Proteasen diskutiert, die ein entfaltetes Substrat durch die zentrale Pore transportieren müssen.^[98-106]

Es ist nicht gezeigt, welcher Hydrolysemechanismus bei den AAA-ATPasen vorherrscht und ob vielleicht alle Mechanismen in Abhängigkeit von der durchgeführten Aufgabe oder des gebundenen Interaktionspartners vorkommen können. Ferner sind aber noch alternative Modelle vorstellbar. In den Clp-Proteasen, die einen Symmetriebruch zwischen der hexameren ClpA/ClpX-ATPase und dem ClpP-Heptamer aufweisen, könnte die Hydrolyse z.B. in allen sechs Untereinheiten nacheinander, verbunden mit einer Rotation der beiden Proteine zueinander, erfolgen.^[18] In allen Mechanismen wird von einer Kommunikation zwischen den Untereinheiten ausgegangen. Diese Kooperativität könnte durch den bereits besprochenen Arginin-Finger vermittelt werden.

Zusätzlich zu der Kommunikation innerhalb eines Rings ist in den Typ-II-ATPasen eine Verständigung zwischen den zwei Ringen vorstellbar. Kinetische Daten geben Hinweise darauf, dass der ATP-Zustand in einem Ring Auswirkungen auf den anderen Ring haben kann.^[65,107,108] Dies erscheint sinnvoll, wenn Substrate während einer Translokation durch die zentrale Pore beide Domänen passieren müssen. Die Information über Substratbindung in einem Ring muss an den zweiten Ring weitergeleitet werden. Das bekannteste Modell hierzu ist das antikorrelierte „Sperrklinken“- (Ratchet)-Modell, in dem die beiden Ringe sich gegenseitig steuern. ATP-Hydrolyse in einem Ring verursacht ADP-Ablösung im zweiten Ring, wobei eine Rotation der beiden Domänen zueinander stattfindet.^[82]

3.2.6 Die Strukturänderung während des ATP-Hydrolysezyklus

Neue Studien zeigen große Strukturänderungen an p97 in Abhängigkeit vom gebundenen Nukleotid.^[83,109] Während die D1-Domäne immer unverändert ADP gebunden hat, kann der Nukleotidzustand in der D2-Domäne durch externe Zugabe beeinflusst werden. Die D2-Domäne erfährt dadurch eine stärkere Strukturänderung als die D1-Domäne, wobei sehr große Unterschiede zwischen dem ATP- und ADP-AlF₃-Zustand (entspricht dem ATP-ADP-Übergang, hier als ATP* bezeichnet) und zwischen dem ADP-Zustand und Zustand ohne Nukleotid (hier als APO bezeichnet) auftreten. Zwischen den anderen Nukleotidzuständen (ATP* und ADP; APO und ATP) sind nur sehr geringe Veränderungen zu beobachten. Die D2 α -Domäne ist zum Beispiel nur im ATP*- und ADP-Zustand zu sehen, da sie sonst flexibel und undefiniert ist. Das gleiche gilt für den Linker zwischen der D1- und der D2-Domäne. Sowohl der Arginin-Finger als auch der be-

nachbarte, in AAA-ATPasen konservierte Arginin-Rest, die wahrscheinlich beide für die Interaktion zwischen Nachbaruntereinheiten verantwortlich sind, befinden sich auf einem Loop, der in der D2-Domäne während des Hydrolysezyklus eine starke Positionsänderungen erfährt. Er ist aber im Gegensatz zur D2 α -Domäne und zum D1-D2-Linker im APO und ATP-Zustand starr und definiert. Alle anderen Domänen (N, D1 α/β , D1 α , D2 α/β) machen ebenfalls einen Strukturwandel durch, der mit einer Translations- und Rotationsbewegung beschrieben werden kann (Abb. 9).

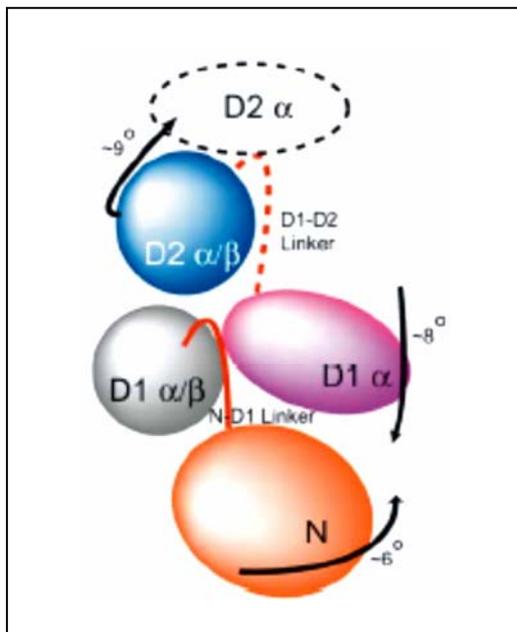


Abb. 9: Schema zur nukleotidabhängigen Domänenbewegung in p97.

Beim Übergang vom ATP- zum ATP*- Zustand kommt es zu einer Annäherung zwischen der N- und der D1 α -Domäne. Die D2 α/β -Domäne dreht sich weg von der D1 α/β -Domäne, die hier als Fixpunkt gesetzt wurde. Die D2 α -Domäne und der D1-D2-Linker werden geordnet.^[83]

Die während des ATP-Hydrolysezyklus auftretenden Konformationsänderungen in der D2-Domäne werden vermutlich an die N-Domäne weitergeleitet. Es wird angenommen, dass die Bewegung aus der ATP-Hydrolyse in der D2 α/β -Domäne über den D1-D2-Linker zunächst an die D1 α -Domäne und dann direkt weiter an die N-Domäne übertragen wird. Da

die D1 α/β -Domäne die geringste Strukturänderung erfährt, scheint sie dem Protein als Fixpunkt zu dienen, relativ zu dem sich die anderen Domänen bewegen. Die D1 α -Domäne rotiert während des Zyklus um ca. 8° im Verhältnis zur D1 α/β -Domäne, was ihren Kontakt mit den D1-D2-Linker und der N-Domäne verändert und dadurch die Regulierung der Bewegung der N-Domäne erlaubt. Tatsächlich wird ein Kontakt zwischen dem Asn³⁸⁷ der D1 α -Domäne (Loop zwischen Helix 10 und 11) und dem Arg¹⁵⁵ der N-Domäne hergestellt. Diese Reste sind für die Funktionsweise des Proteins sehr wichtig. Mutationen in einem der Reste im humanen p97 verursachen eine als Paget-Neuropathy bezeichnete Erkrankung.^[110,111] Zusätzlich interagiert Arg⁸⁹ in der N-Domäne mit Glu²⁶¹ der D1-Domäne und mit Tyr²⁰³ im N-D1-Linker. Diese Reste sind in den AAA- und AAA⁺-ATPasen stark konserviert.^[80,82]

Im hexameren Proteinkomplex verursachen diese nukleotidabhängigen Konformationsänderungen eine D2-Porenöffnung und -schließung, verbunden mit einer Änderung der N-Domänen-Lokalisierung. Dazu gibt es neben elektronenmikroskopischen Studien auch neue Ergebnisse aus Neutronenkleinwinkelstreuexperimenten.^[78,109,112] Im nukleotidfreien Zustand ist die D2-Pore am weitesten geöffnet und die N-Domäne nimmt eine coplanare Stellung mit der D1-Domäne ein. Durch ATP-Bindung kommt es zu einer 20°-Drehung der D2-Domäne im Uhrzeigersinn, die eine Reduktion der Porenöffnung auf die Hälfte bewirkt. Die N-Domäne senkt sich in Richtung der D2-Domäne. Während der ATP-Hydrolyse (beim ATP-ADP-Übergang) erfährt die D2-Domäne wieder eine Drehung, diesmal um 10° im Uhrzeigersinn, und es kommt zu einer starken Aufweitung der D2-Pore, die nun siebenfach so groß ist wie die Pore in der D1-Domäne. Die N-Domäne erreicht wieder eine coplanare Lokalisierung mit der D1-Domäne. Bei Loslösung von P_i aus der Nukleotidbindetasche rotiert die D2-Domäne um 15° gegen den Uhrzeigersinn und die Pore schließt sich wieder auf die Größe des ATP-Zustands. Die N-Domäne ist nun in der Mitte des Proteins zwischen der D1- und D2 zu finden. Die Pore der D1-Domäne erfährt während des Hydrolysezyklus kaum eine Größenänderung.

Diese nukleotidabhängige Bewegung der N-Domänen, verbunden mit der Änderung der Porengröße, lässt auf einen aktiven Transport von Substraten in die Pore schließen. Die N-Domäne nützt darin die gewonnene Energie aus der ATP-Hydrolyse in der D2-Domäne, die über den D1-D2-Linker und die D1-Domäne weitergeleitet wird.^[109]

3.2.7 Substraterkennung

Was macht ein Protein zum Substrat für eine AAA-ATPase und wo befinden sich die Substraterkennungszentren dieser ATPase? Von vielen eukaryontischen AAA-ATPasen ist bekannt, dass sie polyubiquitinierte Proteine binden können. Eine spezifische Gruppe von Ligasen (E3) ist für die Erkennung von Substraten verantwortlich, die ubiquitiniert werden sollen, um nachfolgend vom 26S-Proteasom abgebaut zu werden. Im 26S-Proteasom konnte für das Rpt5-Protein die Erkennung von Polyubiquitin nachgewiesen werden.^[38] Die Ligasen binden selektiv hydrophobe oder basische Aminosäuren am N-Terminus. Die Halbwertszeit eines Proteins in der Zelle wird deshalb durch seinen N-terminalen Rest bestimmt („N-End-Rule“).^[113] Während die bakterielle ClpP-Protease Proteine ebenfalls nach der „N-End-Rule“ abbaut, ist dieser Mechanismus in Archaeen nicht gesichert.^[114]

Die bekannteste prokaryontische Erkennungssequenz ist der *ssrA*-Tag in Bakterien. Stockt die Translation am Ribosom, werden an den C-Terminus des unkomplettierten Proteins elf Aminosäuren (AANDENYALAA) angehängt, die der Erkennung durch das bakterielle Clp-System und die FtsH-Protease dienen.^[115] Daneben scheinen prokaryontische ATP-abhängige Proteasen direkt hydrophobe Bereiche an ungefalteten oder missgefalteten Proteinen zu erkennen und konkurrieren um diese mit Chaperonen.^[116] Leider ist bisher nichts über spezifische Erkennungssequenzen in den Archaeen bekannt.

In den AAA-ATPasen wird die N-Domäne als Substratbindedomäne diskutiert. Bisher gezeigte Interaktionen beschränkten sich aber auf denaturierte Substrate. So konnte sowohl für VAT als auch für die AAA-Protease YME1 eine Substratbindung an die N-Domäne nachgewiesen werden.^[27,117]

Als weitere Substratbindemotive werden die C-terminalen α -Helices der ATPase-Domänen vorgeschlagen. Diese Unterdomäne, die als SSD-(Sensor- and substrate-discrimination)-Domäne bezeichnet wird, ist sogar in der Lage, in isolierter monomerer Form spezifisch und ATP-unabhängig mit Substraten zu interagieren.^[14] Die SSD-Domäne ist im Protein am äußeren Rand des hexameren Komplexes lokalisiert und bietet den Substraten dadurch leichte Angriffsfläche.

Zusätzlich konnten stark konservierte hydrophobe oder aromatische Reste in der Pore von AAA- und AAA⁺-ATPasen nachgewiesen werden, deren Mutation zu einer blockierten Substratinteraktion führte.^[85,96,101,118-121] Interessanterweise sind diese Porenreste auch in den D2-Domänen von Typ-II-ATPasen konserviert und ebenfalls essentiell für die Substratbindung. Dies führt zu einem Modell, bei dem Substrate zunächst über die N- und/oder SSD-Domäne energieunabhängig an der Oberfläche der ATPase gebunden und nachfolgend unter ATP-Hydrolyse durch die zentrale Pore transloziert werden. Auf diese Weise könnte die Struktur von Proteinsubstraten bereits an der Oberfläche gelockert werden, bevor sie mit dem Durchschub durch die Pore komplett entfaltet würden.

3.3 Aufgabenstellung

Das eukaryontische p97/VCP/Cdc48 ist ein für die Zelle essentielles Protein, das an sehr vielen Prozessen beteiligt ist. Die Aufgaben seines archaealen Homologs VAT („VCP-like ATPase from *Thermoplasma*“) wurden bisher wenig untersucht und sind deshalb kaum bekannt. Wegen der oft fehlenden Voraussetzungen in Archaeen, wie der Abwesenheit von Zellorganellen, mit denen p97 interagiert, kann VAT die für p97 bereits bekannten Funktionen nicht durchführen;

seine Aufgaben müssen deshalb auf anderen Gebieten liegen. Durch Untersuchungen an VAT aus dem Archaeum *Thermoplasma acidophilum*, das im Vergleich zu eukaryontischen Zellen einen weniger komplexen Zellaufbau besitzt, könnten neben der Aufgaben von Typ-II-ATPasen in Archaeen zusätzliche Erkenntnisse über die Aufgabe und Struktur von AAA-ATPasen gewonnen werden, die später sogar als Modell für p97 dienen können.

Im Rahmen der Arbeit sollte die bereits indirekt gezeigte Entfaltung durch VAT besser untersucht werden. Von Interesse waren hierbei insbesondere die Erkennungssequenzen sowohl in VAT als auch im Substrat. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war die Funktion der einzelnen Domänen. Die N-Domäne, die in p97 für die Substrat- und Cofaktorbindung verantwortlich ist, sollte in VAT ebenfalls auf die Interaktion mit Substraten untersucht werden. Da VAT eine Typ-II-ATPase ist, besitzt es zwei ATPase-Domänen D1 und D2. Es ist von großem Interesse, welche der Domänen für die hauptsächliche ATP-Hydrolyse verantwortlich ist und welche Domäne die Substratentfaltung durchführt. Im Weiteren sollte auch die postulierte Interaktion von VAT und dem 20S-Proteasom untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Kompetente *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 α von NOVAGEN für Klonierung und BL21(DE3)RIL von STRATAGENE für Expression) wurden nach dem Protokoll „Preparation of competent *E. coli*“ von QIAGEN gewonnen. Dabei wurden DH5 α in LB-Medium ohne Antibiotikum und BL21(DE3)RIL in LB-Medium mit 34 mg/l Cam kultiviert. Die Zellen wurden in 100- μ l-Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

100 μ l kompetenter Zellen (4.1.1) wurden mit 0.1-1 μ g Plasmid-DNA, 10 μ l des Ligations- (4.1.3) oder 10-30 μ l des Mutageneseansatzes (4.1.4) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 40 s Hitzeschock bei 42°C wurde die Suspension weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert und mit 500 μ l SOC-Medium versetzt. Nach 30 min bei 37°C wurden verschiedene Aliquots (10-200 μ l) auf LB-Selektivplatten ausgestrichen

4.1.3 Klonierung von *vat-nd1* und *vat-d1* in pET28a

Die Klonierung von *vat*_{His6}, *vat δ n*_{His6} und *vat-n*_{His6} in einen Expressionsvektor und die Optimierung der Sequenz für *E. coli* wurde von Vashu Pamnani und Jürgen Peters in der Abteilung durchgeführt.^[27,122] *vat-nd1*_{His6} und *vat-d1*_{His6} wurde aus dem *vat*_{His6}-pET28a-Plasmid mit den in Tab. 1 aufgelisteten Primern mittels PCR vervielfacht (Tab. 2), mit *NcoI* und *EcoRI* nacheinander verdaut (Tab. 6), unter Verwendung des QIAGEN-PCR-Kits von den Enzymen befreit (4.1.7) und mit pET28a ligiert (Ligations-Kit von TAKARA SHUZO).

Tab. 1: Verwendete Primer für die Klonierung von *vat-nd1* und *vat-d1*.
Die verwendeten Primer wurden von der Firma METABION synthetisiert.

Fragment	Primer
<i>vat-nd1</i> _{His6}	5´-ATACATACATACAGCTGAGGCCTCCATGGAATC-3´ 5´-GCGCGCGAATTCTTATCAGTGATGGTGATGGTGATGCAGGGCATTTTTG- AAGTCGTC-3´
<i>vat-d1</i> _{His6}	5´-GCGCGCGCCCATGGTTTCTAGAATTAGCTATGAG-3´

```

5´-GCGCGCGAATTCTTATCAGTGATGGTGATGGTGATGCAGGGCATTTTTG-
AAGTCGTC-3´

```

Tab. 2: PCR-Ansatz und -Zyklus bei der Klonierung von *vat-ndl* und *vat-d1*.

PCR-Ansatz		PCR-Zyklus	
<i>vat</i> -Plasmid	10-50 ng	Temperatur	Dauer
Primer	je 100 ng	94°C	1 min
<i>PfuTurbo</i> -Puffer (10x)	3 µl	58°C für <i>vat-ndl</i> und	1 min
dNTP-Mix	0.4 µl (je 100 nM)	72°C	2 min
H ₂ O _{MilliQ}	ad 50 µl		
<i>PfuTurbo</i> [®] -Polymerase	1µl (2.5 U)		36 Zyklen

4.1.4 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese von katalytischen Aminosäuren in VAT gegen Alanin wurde mit dem QuickChange[®]-Kit von STRATAGENE nach einem abgewandelten Protokoll (Tab. 3) durchgeführt. Bei dieser Methode wurde das gesamte Plasmid mittels PCR amplifiziert und die Mutation über ein Paar komplementärer Primer eingeführt. In der folgenden Tabelle wurden die Sequenzen der verwendeten Primer aufgelistet und das jeweils mutierte Codon unterstrichen (Tab. 4). Als Template für die Einführung von Einzelmutationen diente das *vat_{His6}*-pET28a-Plasmid, für die Einführung der zweiten Mutation bei Doppelmutanten (AA, BB, SS, P2-WV und PP) dienten die neu gewonnenen Einzelmutanten.

Tab. 3: PCR-Ansatz und -Zyklus bei der ortsspezifischen Mutagenese.

PCR-Ansatz		PCR-Zyklus	
Template-DNA	10-50 ng	Temperatur	Dauer
Primer	je 100 ng	95°C	30 s
Reaktions-Mix (10x)	3 µl	55°C	1 min
dNTP-Mix	0.5 µl (je 100 nM)	68°C	8 min
DMSO	3 µl		
H ₂ O _{MilliQ}	ad 30 µl		16 Zyklen
<i>PfuTurbo</i> [®] -Polymerase	1µl (2.5 U)		

Tab. 4: Verwendete Primer für die ortsspezifische Mutagenese.

Die verwendeten Primer wurden von der Firma METABION synthetisiert.

Mutation	Primer
Lys ²³⁷ (A1)	5' -CCAGGTACTGGT <u>GCG</u> ACTCTGATTGC-3' 5' -GCAATCAGAGT <u>CGC</u> ACCAGTACCTGG-3'
Lys ⁵¹⁴ (A2)	5' -CCCGGTGTTGGT <u>GCA</u> ACTCTGCTGGCAAAGGC-3' 5' -GCCTTTGCCAGCAGAGT <u>TGC</u> ACCAACACCGGG-3'
Glu ²⁹¹ (B1)	5' -CCGTCGATTATTTTCATTGAT <u>GCG</u> ATAGATTCTATTGCGCCG-3' 5' -CGGCGCAATAGAATCTAT <u>CGC</u> ATCAATGAAAATAATCGACGG-3'
Glu ⁵⁶⁸ (B2)	5' -CCATTGTTTTCTTGGAT <u>GCG</u> ATTGATTCCATTGCTCC-3' 5' -GGAGCAATGGAATCAAT <u>CGC</u> ATCAAGGAAAACAATGG-3'
Asn ³³⁴ (S1)	5' -GGCGCCACT <u>GCCC</u> GTATTGATGCCATTGATCCGGC-3' 5' -GCCGGATCAATGGCATCAATAC <u>GGGC</u> AGTGGCGCC-3'
Asn ⁶¹² (S2)	5' -CGGTGTTGTCGTTATTGGCGCAAC <u>GCCC</u> GTCCGG-3' 5' -CCGGAC <u>GGCC</u> CGTTGCGCCAATAACGACAACACCG-3'
Tyr ²⁶⁴ (P1)	5' -CGGAGATTATGAGCAAAG <u>CCT</u> ACGGTCAGAGCG-3' 5' -CGCTCTGACCGTAG <u>GCT</u> TTGCTCATAATCTCCG-3'
Trp ⁵⁴¹ (P2-W)	5' -CCGAGGTACTGAGTAAAG <u>CGG</u> TTGGTGAGAGTGAAAAAGCC-3' 5' -GGCTTTTTCACTCTCACCAAC <u>CGC</u> TTTACTCAGTACCTCGG-3'
Val ⁵⁴² (P2-V)	5' -CCGAGGTACTGAGTAAATGGG <u>GCT</u> GGTGAGAGTGAAAAAGCC-3' 5' -GGCTTTTTCACTCTCACCA <u>GCCC</u> ATTTACTCAGTACCTCGG-3'

Nach der PCR wurde die Reaktionsmischung mit 1 µl DpnI (10 U) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10-30 µl des DpnI-verdauten PCR-Ansatzes in kompetente DH5α-Zellen transformiert (4.1.1 und 4.1.2). Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen *E. coli*-Kolonien isoliert (4.1.6) und mittels Sequenzierung (4.1.5) auf die gewünschte Mutation überprüft. Bei positivem Ergebnis wurde das gesamte Gen sequenziert, um unspezifische Mutationen auszuschließen.

4.1.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG BIOTECH mit T7-, T7_{term} und den in Tab. 5 aufgeführten Primern durchgeführt.

Tab. 5: Sequenzierprimer.

Die verwendeten Primer wurden von der Firma METABION synthetisiert.

bp im <i>vat</i> -Gen	Sequenzierprimer
580 - 599	5´-GGCCTTTCAGAACAGCTGGG-3´
1181 - 1199	5´-CCTATGGTTTCGTTGGTGC-3´
1747 - 1765	5´-GGGGTCACGGAGCGTATCG-3´

4.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAprep[®]-Miniprep-Kits aus 3-5 ml oder des QIAGEN-Plasmid-Midi-Kits aus 100 ml Medium nach den entsprechenden Protokollen „QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol“, bzw. „QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Protocol“ gewonnen. Die mittels der Midiprep erhaltenen Plasmide wurden nachfolgend über die Miniprep-Säulen gewaschen, um noch vorhandene Salze abzutrennen, die einen störenden Einfluss auf die Sequenzierung haben. Zur Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle wurde nach Plasmid-Isolation ein Restriktionsverdau (4.1.7) durchgeführt.

4.1.7 Restriktionsverdau

Nach Isolierung von Plasmid-DNA (4.1.6) wurden 5 µl der DNA-Präparation mit Restriktionsenzymen 2 h bei 37°C inkubiert (Tab. 6) und anschließend mittels der Agarose-Gelelektrophorese analysiert (4.1.8). Restriktionsenzyme und Puffer wurden von NEW ENGLAND BIOLABS bezogen.

Tab. 6: Restriktionsverdauansätze.

Zur Analyse der Punktmutanten und der ND1- und D1-Domäne von VAT wurde die Plasmid-DNA mit zwei Enzymen verdaut.

Punktmutanten		ND1- und D1-Domäne	
Plasmid-DNA	5 µl	Plasmid-DNA	5 µl
<i>NcoI</i> (20 U/µl)	0.5 µl	<i>NcoI</i> (20 U/µl)	0.5 µl
<i>HindIII</i> (20 U/µl)	0.5 µl	<i>EcoRI</i> (20 U/µl)	0.5 µl
Puffer 4 (10x)	1 µl	<i>EcoRI</i> -Puffer (10x)	1 µl
H ₂ O _{MilliQ}	3 µl	H ₂ O _{MilliQ}	3 µl

Zu Klonierungszwecken wurde der Restriktionsverdau von PCR-Produkten und vom Vektor nacheinander mit den Enzymen durchgeführt, wobei nach jedem Verdau das Restriktionsprodukt mit dem QIAGEN-PCR-Kits (nach dem Protokoll „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“) von den Enzymen abgetrennt wurde.

4.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

8 µl durch Restriktionsverdau gespaltene DNA wurden nach Zugabe von 2 µl DNA-Probenpuffer in 0.8%-igen Agarose-Gelen aufgetrennt (0.8% Agarose in TAE-Puffer). Als Standardmarker (1 µl) diente der 1 kb-Marker von NEW ENGLAND BIOLABS mit folgenden DNA-Fragmenten: 10 kb (42 ng), 8 kb (42 ng), 6 kb (50 ng), 5 kb (42 ng), 4 kb (33 ng), 3 kb (125 ng), 2 kb (48 ng), 1.5 kb (36 ng), 1 kb (42 ng) und 0.5 kb (42 ng). Die Laufspannung betrug 50 V und als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Gele wurden anschließend 30 min in H₂O_{dest} mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und 20 min in H₂O_{dest} entfärbt. Unter UV-Licht ($\lambda = 320$ nm) wurden entsprechend des Restriktionsverdaus folgende Fragmente detektiert (Tab. 7):

Tab. 7: Größe der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau.

pET28a- <i>vat</i>		pET28a- <i>vat-ndl</i>		pET28a- <i>vat-d1</i>	
Vektor	5.2 kb	Vektor	5.2 kb	Vektor	5.2 kb
Insert	2.3 kb	Insert	1.4 kb	Insert	0.8 kb

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

4.1.9 Überexpression in *E. coli*

Zur Überexpression von Proteinen in *E. coli* wurden kompetente BL21(DE3)RIL-Zellen (4.1.1) mit dem gewünschten Plasmid transformiert (4.1.2). Eine vereinzelt *E. coli*-Kolonie wurde in 1-5 ml LB-Antibiotika-Medium ca. 6-10 h angezogen. Danach wurden 100 µl der Kultur in 100 ml frisches LB-Antibiotika-Medium überführt und ca. 12 h inkubiert. Anschließend wurden 20 ml Über-Nacht-Kultur in 1 l vorgewärmtes LB-Antibiotika-Medium gegeben und weitere 2-3 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7-1 kultiviert. Durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde induziert und nach 4 h Überexpression wurden die Zellen geerntet (4000xg, 10 min, 4°C).

Das Zellpellet wurde mit dem Puffer gewaschen, der bei der nachfolgenden Aufreinigung verwendet wurde.

4.1.10 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss von *E. coli* erfolgte mit einem „*Celldisrupter*“ der Firma AVESTIN bei einem Druck von 125.000 kPa. Dafür wurde das Zellpellet in 20 ml Puffer resuspendiert. Nach dem Aufschluss wurde die Suspension zunächst bei 4000xg für 20 min zentrifugiert und anschließend zur Abtrennung von Zellmembranen ultrazentrifugiert (1 h, 100000xg, 4°C oder 25°C zur Gewinnung von VAT und seiner Punktmutanten).

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde unter Verwendung von SDS-Polyacrylamid-Gelen (Dimension: 10x8x0.75 cm) nach LAEMMLI mit dem „HOEFER-Mighty-Small“-System für vertikale Elektrophorese durchgeführt (AMERSHAM).^[123] Die SDS-Gele wurden mit 12%-igem Trenngel und 6%-igem Sammelgel präpariert (Tab. 8). Die angegebenen Mengen reichten für 5 Gele in einem „HOEFER-Mighty-Small-4-Gel-Caster“.

Tab. 8: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamid-Gele.

Trenngel (12% (w/v) Acrylamid)		Sammelgel (6% (w/v) Acrylamid)	
Trenngelpuffer	7.5 ml	Sammelgelpuffer	3.75 ml
30% (w/v) Acrylamid	12 ml	30% (w/v) Acrylamid	3 ml
H ₂ O _{MilliQ}	10.5 ml	H ₂ O _{MilliQ}	8.25 ml
10% (w/v) APS	120 µl	10% (w/v) APS	120 µl
TEMED	15µl	TEMED	15µl

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1/6-tel Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 100 V ca. 2 h im Elektrophoresepuffer. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden auf jedes Gel 5 µl des SDS-PAGE „Broad-Range“-Markers von BIORAD aufgetragen: Myosin 200 kD, β-Galaktosidase 116 kD, Phosphorylase b 97.4 kD, BSA 66 kD, Ovalbumin 45 kD, Carbonat-anhydrase 31 kD, Sojabohn-

nen Trypsininhibitor 21.5 kD, Lysozym 14.5 kD, Aprotinin 6.5 kD (je 100 ng/ μ l). Zur Detektion der Proteine wurden die SDS-Gele nach Elektrophorese entweder mit Coomassie gefärbt (4.2.3) oder zur Antikörper-Detektion (4.2.5) auf Nitrozellulose transferiert (4.2.4).

4.2.2 Native PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen wurde unter Verwendung von kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen nach LAEMMLI mit dem „HOEFER-Mighty-Small“-System durchgeführt (vgl. 4.2.1).^[123] Die Gele wurden mit 7-15%-igem Trenngel und 5%-igem Sammelgel präpariert (Tab. 9) und mit Hilfe eines Gradientenmischers (MPI) gegossen. Die angegebenen Mengen reichten für 5 Gele in einem „HOEFER-Mighty-Small-4-Gel-Caster“.

Tab. 9: Pipettierschema für native Polyacrylamid-Gele.

Trenngel (7 und 15% (w/v) Acrylamid)			Sammelgel (5% (w/v) Acrylamid)	
	7%	15%		
Trenngelpuffer	6.3 ml	6.3 ml	Sammelgelpuffer	4.5 ml
30% (w/v) Acrylamid	3.8 ml	8.2 ml	30% (w/v) Acrylamid	3 ml
H ₂ O _{MilliQ}	6.6 ml	0.4 ml	H ₂ O _{MilliQ}	10.5 ml
10% (w/v) APS	72 μ l	17 μ l	10% (w/v) APS	90 μ l
TEMED	7 μ l	2 μ l	TEMED	18 μ l
Glycerin	-	2 ml	Glycerin	-

Daneben wurden kommerzielle Gradientengele (4-12%) von INVITROGEN verwendet.

Die zu untersuchende Probe wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/4 Volumen nativ-Probenpuffer (4x) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 125 V und dauerte ca. 120 min.

Als Molekulargewichtsstandard diente ein Marker von PHARMACIA mit den Proteinen: Thyroglobulin 669 kD (76 μ g), Ferritin 440 kD (50 μ g), Katalase 232 kD (36 kD), Lactatdehydrogenase 140 kD (48 μ g) und BSA 67 kD (40 μ g).

4.2.3 Coomassie-Färbung

Die PAGE-Gele wurden nach Elektrophorese (4.2.1 und 4.2.2) mit Coomassie nach NEUHOFF gefärbt.^[124] Dafür wurden sie ca. 2 Minuten mit 12.5% (w/v) TCA fixiert, mit H₂O_{dest} gewaschen und ½ h in der Färbelösung bei 50°C inkubiert. Die Färbelösung wurde aus 40 ml Neuhoff-Lösung (vgl. 4.6) mit 10 ml Methanol und 0.4 ml 5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA) frisch angesetzt (ausreichend für 1-2 Gele). Anschließend wurde unspezifisch gebundenes Coomassie mit H₂O_{dest} ausgewaschen. Zur Aufbewahrung wurden die SDS-Gele für 30 min in Trocknerlösung inkubiert und anschließend zwischen Cellophan im GelAir Dryer (beides BIORAD) getrocknet.

4.2.4 Proteintransfer auf Nitrozellulose („Westernblot“)

Zum Transfer von Proteinen nach der Gelelektrophorese (4.2.1 und 4.2.2) wurde das Gel mit einer Nitrozellulose-Membran (Optitran-Membran BA-S85, SCHLEICHER&SCHULL) zwischen je zwei Lagen Filterpapier (WHATMANN 3MM) in einer Westernblot-Kammer (INVITROGEN) platziert und im Transferpuffer (4.6) 12-20 h bei 30 V geblottet. Die Nitrozellulose-Membran wurde anschließend 3 min mit Ponceau-S-Lösung (4.6) angefärbt und mit H₂O_{dest} gewaschen, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Der Molekulargewichtsmarker (4.2.1 und 4.2.2) wurde auf der Membran mit einem Kugelschreiber markiert.

4.2.5 Antikörper-Detektion

Die Ponceau-S-gefärbte Nitrozellulose-Membran (4.2.4) wurde 1 h in PBS + 1.5% (w/v) Gelatine (SIGMA) inkubiert. Die Gelatine-gesättigte Membran wurde 10 min in PBS gewaschen und dann für 1 h in PBS mit dem entsprechenden Antikörper (Tab. 10) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (je 10 min) wurde die Membran für 1 h mit anti-Kaninchen-IgG als Zweitantikörper inkubiert (Verdünnung in PBS 1:5.000), der mit Alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase (beide SIGMA) konjugiert war.

Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in PBS (dreimal 10 min) entfernt und die Nitrozellulose-Membran entweder über die Alkalische-Phosphatase-Reaktion angefärbt oder mittels des ECL-Westernblot-Systems (AMERSHAM) über die Chemolumineszenz der Meerrettich-Peroxidase-Reaktion im UV-Bereich (428 nm). Zum Anfärben der AP-Membran wurde diese in 10 ml AP-Puffer mit 66 µl NTB- und 33 µl BCIP-Lösung bis zum Sichtbarwerden der Banden behandelt.

Tab. 10: Verwendete Erstantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Art	Quelle
anti-VAT	1:1000	affinitätsgereinigt, polyklonal, aus Kaninchen	MPI
anti-ECFP	1:500	Serum, polyklonal, aus Kaninchen	Tomohiro Tamura, AIST, Sapporo, JP
anti-Proteasom	1:1000	affinitätsgereinigt, polyklonal, aus Kaninchen	MPI
anti-His	1:1000	affinitätsgereinigt, polyoklonal, aus Kaninchen	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

4.2.6 Immunopräzipitation

50 µl Protein-A-Sepharose-Beads (AMERSHAM) wurden dreimal mit je 500 µl HM-Puffer 5 min gewaschen, wobei der Puffer über Zentrifugation der Beads abgetrennt wurde. Die Beads wurden mit 50 µl Antikörper in 200 µl HM-Puffer für 1 h bei 25°C inkubiert und dreimal mit Puffer gewaschen. 150 µg Protein I, gegen das der Antikörper gerichtet war, wurden in 200 µl Puffer zu den Beads hinzu gegeben und 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit 150 µg Protein II in 200 µl Puffer inkubiert, das an Protein I binden sollte. Nach dem Waschen wurden die Beads in 20 µl SDS-Probenpuffer (2x) aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proteine wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und über Westernblot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen Protein II detektiert.

Zusätzlich wurden während der Bindungsreaktion von Protein II an Protein I die Bedingung durch Zugabe von Nukleotid (10 mM ATP, ATP γ S oder AMP-PNP) variiert.

4.2.7 Aufreinigung von VAT und seinen Punktmutanten

Mit *vat_{His6}*-pET28a und seinen Punktmutanten transformierte BL21(DE3)RIL-Zellen (4.1.2) wurden wie unter 4.1.9 und 4.1.10 beschrieben in Gegenwart von 25 mg/l Kanamycin und 34 mg/l Chloramphenicol kultiviert, geerntet und in 20 mM HEPES, pH 7.5 aufgeschlossen. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde mit 3 M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 400 mM NaCl versetzt, da VAT und seine Punktmutanten (außer VAT-K237/514A, AA-Mutante) reversibel in der Kälte in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen präzipitieren. Die Lösung wurde 3 h bei 4°C inkubiert und das präzipitierte VAT-Protein durch Zentrifugation (5 min, 4000xg,

4°C) geerntet. Das Protein wurde in 20 mM HEPES bei 60°C wieder aufgelöst und weitere dreimal, wie beschrieben, präzipitiert. Anschließend wurde die Proteinlösung über eine Superose-6-Säule (24 ml, AMERSHAM), äquilibriert mit 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, aufgereinigt.

VAT-K237/514A wurde, wie oben beschrieben kultiviert und geerntet. Als Aufschlusspuffer wurde aber 20 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol verwendet. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (25 ml, Ni²⁺-NTA-Material: QIAGEN) aufgetragen und das Protein mit einem kontinuierlichen Gradienten von 20-500 mM Imidazol im Aufschlusspuffer über 10 Säulenvolumen eluiert. Das Eluat wurde anschließend über eine Superose-6-Säule (24 ml, AMERSHAM), äquilibriert mit 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, aufgereinigt.

4.2.8 Aufreinigung von VAT Δ N

Mit *vat δ n_{His6}*-pET28a wurde, analog zu VAT transformiert, überexprimiert, geerntet und aufgeschlossen (vgl. 4.2.6). Als Aufschlusspuffer diente 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde für 22 min bei 60°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 20,000xg, 4°C), um präzipitierte *E. coli*-Proteine zu entfernen. Im Weiteren wurde die Proteinlösung 1:3 in 20 mM HEPES, pH 7.5 verdünnt und auf eine HiTrapQ-Säule (2x5 ml, AMERSHAM) aufgetragen. Das Protein wurde mit einem diskontinuierlichen Gradienten von 50-400 mM NaCl in 20 mM HEPES, pH 7.5 und 5 mM MgCl₂ eluiert. Die VAT Δ N-Fraktionen wurden gesammelt, auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (5 ml, Ni²⁺-NTA-Material: QIAGEN) aufgetragen, mit 20 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 20 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit 500 mM Imidazol im selben Puffer eluiert. Das Eluat wurde der Aufreinigung über eine Superose-6-Säule (24 ml, AMERSHAM), äquilibriert mit 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, unterzogen.

4.2.9 Aufreinigung von VAT-ND1

Mit *vat-nd1_{His6}*-pET28a wurde, analog zu VAT transformiert, überexprimiert, geerntet und aufgeschlossen (vgl. 4.2.6). Als Aufschlusspuffer diente zunächst 20 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 20 mM Imidazol. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (25 ml, Ni²⁺-NTA-Material: QIAGEN) aufgetragen und das Protein mit einem kontinuierlichen Gradienten von 20-500 mM Imidazol im Aufschlusspuffer über 10 Säulenvolu-

men eluiert. Das Eluat wurde anschließend über eine Superose-6-Säule (24 ml, AMERSHAM), äquiliert mit 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, aufgereinigt. Da das Protein nicht in hexamerer Form erhalten wurde, wurde die Aufreinigung unter Zugabe von 1 mM ATP und/oder 5 mM MgCl₂ im Aufschlusspuffer variiert und es wurde unter verschiedenen Temperaturen (4°C und 25°C) gearbeitet. Zudem wurde auf die Aufreinigung über die Ni²⁺-NTA und Imidazol im Puffer verzichtet. Durch keine der Variationen konnte VAT-ND1 als stabiles Hexamer aufgereinigt werden.

4.2.10 Aufreinigung von VAT-D1

Mit *vat-dl_{His6}*-pET28a wurde zunächst analog zu VAT-ND1 behandelt (vgl. 4.2.9), wobei alle Puffer aber 5 mM MgCl₂ enthielten. Die Proteinfractionen nach der Ni²⁺-NTA-Säule wurden gesammelt, 1:6 in 20 mM HEPES, pH 7.5 verdünnt und auf eine HiTrapQ-Säule (2x5 ml, AMERSHAM) aufgetragen. Das Protein wurde mit einem diskontinuierlichen Gradienten von 50-400 mM NaCl in 20 mM HEPES, pH 7.5 und 5 mM MgCl₂ über 10 Säulenvolumen eluiert.

VAT-D1 konnte ebenfalls nicht in hexamerer Form erhalten werden. Deshalb wurden die Aufreinigung durch Zugabe von 1 mM ATP, Erhöhung der MgCl₂-Konzentration auf 10 mM in den Puffer und das Arbeiten unter verschiedenen Temperaturen (4°C und 25°C) variiert. Durch keine der Variationen und auch nicht durch zusätzliche analytische Gelfiltrationsläufe unter unterschiedlichen Bedingungen konnte VAT-D1 als stabiles Hexamer erhalten werden.

4.2.11 Aufreinigung von VAT-N

Mit *vat-n_{His6}*-pET28a wurde, analog zu VAT transformiert, überexprimiert, geerntet und aufgeschlossen (vgl. 4.2.6). Als Aufschlusspuffer diente 50 mM Na₃PO₄, pH 8, 300 mM NaCl. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (25 ml, Ni²⁺-NTA-Material: QIAGEN) aufgetragen, die Säule mit 50 mM Na₃PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol gewaschen und das Protein mit einem kontinuierlichen Gradienten von 10-500 mM Imidazol im Puffer, aber mit pH 6 eluiert. Das Eluat wurde gegen 40 mM Na₃PO₄, pH 5,8, 50 mM NaCl dialysiert (Dialyseschlauch 3500 K, BIOMOL und auf eine HiTrapSP-Säule (5 ml, AMERSHAM) aufgetragen. Das Protein wurde mit einem diskontinuierlichen Gradienten von 50-400 mM NaCl und einer pH-Erhöhung von pH 5.8 nach 8 in 40 mM Na₃PO₄ über 10 Säulenvolumen eluiert. Für den Einsatz in enzymatischen Reaktionen wurde VAT-N gegen 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl dialysiert.

4.2.12 Gewinnung von substratfreiem VAT

VAT und die BB-Mutante wurden mit 8 M Harnstoff in 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl durch Inkubation über Nacht bei 4°C denaturiert. Nachfolgend wurde es im gleichen Puffer inkl. 20 mM Imidazol an eine HisTrap-Säule (1ml, AMERSHAM) gebunden und mit 500 mM Imidazol im gleichen Puffer eluiert. Zur Rückfaltung wurden die Proteinlösungen in 2-M-Harnstoff-Schritten über Dialyse (je 2 h, 4°C, Dialyseschlauch 3500 K, BIOMOL) vom Harnstoff befreit. Der Oligomerisierungszustand der Proteine wurde über native PAGE (4.2.2) kontrolliert. Die Proteine wurden elektronen- und rasterkraftmikroskopisch analysiert (4.4.1 und 4.4.2).

4.2.13 Aufreinigung weiterer Proteine

Wildtyp- und $\Delta\alpha(2-12)$ -20S-Proteasom wurde nach dem Protokoll von Erika Seemüller aufgereinigt.^[125] Die Aufreinigung von GFP und GFPssrA erfolgte, wie in der Literatur beschrieben.^[126]

4.2.14 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde nach BRADFORD mit dem Protein-Assay von BIORAD bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet.

4.3 Enzymatische Charakterisierung

Alle enzymatischen Reaktionen mit VAT wurden, wenn nicht explizit beschrieben, im HM- (50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 120 mM MgCl₂, 1 mM DTT) und LM-Puffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT) bei 60°C durchgeführt.

4.3.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität wurde über den Nachweis von freigesetztem Phosphat als Komplex mit Ammoniumphosphomolybdat und Malachitgrün bestimmt.^[127] 0.1-5 µg Enzym wurden in Gegenwart von 0-10 mM ATP in einem 50 µl-Ansatz für 2-30 min bei 60°C inkubiert. Durch Zugabe von 800 µl Malachitgrün-Lösung, gefolgt von 100 µl Zitronensäure-Lösung (34% (w/v)), wurde die ATPase-Reaktion gestoppt. Nach 30 min Inkubation bei 25°C wurde die Absorption bei 640 nm in einem UV/VIS-Spektrophotometer (Lambda 40, PERKIN-ELMER) bestimmt. Die Phosphatmenge in der Probe wurde anhand einer Standardkurve mit 0-15 nmol KH₂PO₄ berechnet. Für die kinetische Analyse wurde eine ATP-Konzentration von 60 µM-3.5 mM gewählt und

die erhaltenen Messpunkte wurden mit Origin 5.0 (MICROCAL) nach Michaelis-Menten approximiert.

Zusätzlich wurde die ATPase-Aktivität in Gegenwart von 28 nM Wildtyp oder $\Delta\alpha(2-12)20S$ -Proteasom, 0.5 μM GFPssrA oder 0.3 μM VAT-N vermessen, was aber zu keiner Änderung der Werte führte.

4.3.2 Bestimmung der Entfaltungsaktivität

Die Entfaltungsaktivität wurde über die Entfaltung von GFP oder GFPssrA bestimmt. Die GFP/GFPssrA-Fluoreszenz wurde kontinuierlich in einem Fluoreszenz-Plattenleser (Fluostar Optima, BMG TECHNOLOGIES) unter Verwendung von 480-nm-Filter für die Anregung und 520-nm-Filter für die Emission verfolgt. 12 ng (2 μM) GFP oder GFPssrA wurden mit 1-5 μg (10-50 nM) Enzym in 200 μl HM-Puffer bei 60°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von ATP (10 mM) und 4 μg $\Delta\alpha(2-12)20S$ -Proteasom (28 nM) gestartet. Die aufgenommenen Graphen wurden durch eine Kontrollreaktion ohne ATP korrigiert. In den kinetischen Bestimmungen wurden unterschiedliche Mengen von GFPssrA (0-2 μM) in 0.25- μM -Schritten eingesetzt und der HM- und LM-Puffer verwendet. Nach dem Starten der Reaktionen mit 5 mM ATP wurden die Anfangssteigungen der Kurven bestimmt und diese Werte unter Verwendung von Origin 5.0 (MICROCAL) nach Michaelis-Menten approximiert.

Zusätzlich wurde die GFP-Entfaltung in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Wildtyp- (0-200 nM) oder $\Delta\alpha(2-12)20S$ -Proteasom (0-46 nM), 50 μM ssrA-Peptid, 1 μM VAT-N, 25 μM ZnCl_2 , 0.36 M GuCl und/oder 2 μM GuCl(6M)- oder HCl(50 mM)/DTT(5 mM)-denaturierten GFPssrA, wie angegeben, vermessen.

Daneben wurde die Entfaltungsaktivität von VAT und VAT Δ N indirekt über den Abbau durch das 20S-Proteasom in der SDS- (4.2.1) oder nativen PAGE (4.2.2), teils mit nachgeschalteter Westernblot-Analyse (4.2.4), untersucht. Als Substrate wurden die folgenden GFP-Varianten verwendet: natives GFP, GFPssrA, ECFP, ECFPssrA, ECFP Δ 6ssrA und ECFP Δ 9ssrA. 2 μg VAT oder 1.7 μg VAT Δ N (0.4 μM) wurden mit 1.2 μg GFP-Variante (ca. 4 μM) und 3 μg Wildtyp- oder $\Delta\alpha(2-12)20S$ -Proteasom (0,43 μM) in 10 μl HM-Puffer inkl. 10 mM ATP 0-60 min bei 60°C inkubiert und anschließend über die Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.3.3 Proteasomaler Abbau von Kasein

Zur Untersuchung einer Stimulation vom 20S-Proteasom durch VAT und VAT Δ N im Abbau eines Proteinsubstrates ohne Tertiärstruktur („natively unfolded“) wurde Fluorescein-markiertes Kasein (FITC-Kasein, SIGMA) verwendet. Dieses FITC-Kasein wurde zunächst zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 dialysiert (Dialyseschlauch 3500 K, BIOMOL). Zur Bestimmung der Protease-Aktivität wurden 25 μ g FITC-Kasein mit 10 μ g (70 nM) Wildtyp-Proteasom in 200 μ l HM- und LM-Puffer (mit und ohne 5 mM ATP) in Gegenwart von 0-10 μ g VAT und VAT Δ N (0-100 nM) bei 60°C inkubiert und kontinuierlich in einem Fluoreszenz-Plattenleser (Fluostar Optima, BMG TECHNOLOGIES) unter Verwendung von 480-nm-Filter für die Anregung und 520-nm-Filter für die Emission verfolgt. Als Standard diente eine Probe ohne Proteasom.

4.3.4 Bestimmung von gebundenem Nukleotid

Die Ermittlung des an VAT und seine Punktmutanten gebundenen Nukleotids erfolgte über die Denaturierung des Proteins und die nachfolgende chromatographische Analyse des freigesetzten Nukleotids. 200 μ l Protein (ca. 400 μ g) wurden mit 50 μ l 10% (w/v) HClO₄ denaturiert (1 min, 25°C) und mit 27.5 μ l 20% (w/v) KOH neutralisiert (2 min, 4°C). Die Probe wurde zentrifugiert (1 min, 20000xg, 4°C) und 100 μ l auf eine MonoQ-Säule (1 ml, PHARMACIA) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 5-200 mM K₃PO₄, pH 7.0, 25% CH₃CN über 10 Säulenvolumen. Zum Eichchen der Säule wurde 200 μ l 50 μ M ADP- und ATP-Lösung in gleicher Weise wie das Protein behandelt. Die Menge an Nukleotid wurde aus der Integration über die Fläche des Peaks der 254 nm Absorption berechnet.

4.3.5 Bestimmung von Proteininteraktionen

Zur Analyse der Interaktion zwischen VAT und GFPssrA bzw. VAT und 20S-Proteasom wurden die Proteine miteinander inkubiert und anschließend über unterschiedliche Methoden auf eine Interaktion hin untersucht.

0.15 mg/ml VAT (für die Interaktionsuntersuchung mit GFPssrA auch 0.15 mg/ml VAT-Mutanten) wurden mit/ohne 0.4 mg/ml GFPssrA mit/ohne 0.1-0.4 mg/ml 20S-Proteasom im HM-Puffer für 5-10 min bei 60°C inkubiert. Die Bedingungen wurden durch Zugabe von Nukleotid (10 mM ATP, ATP γ S oder AMP-PNP) und/oder 1 μ M Crosslinker variiert.

Zur Analyse diente native Gelelektrophorese (4.2.2) mit nachgeschalteter Westernblot-Analyse (4.2.4), Superose-6-Gelfiltration (2,4 ml, PHARMACIA) unter Verwendung von 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl und/oder 10 mM Mg^{2+} und/oder ATP oder Ni^{2+} -NTA-Säulenchromatographie (1 ml HisTrap, AMERSHAM) mit gleichen Puffern wie in der Gelfiltration, aber zuzüglich 20 mM Imidazol im Auftrags- und Waschpuffer und 500 mM Imidazol im Elutionspuffer. Bei der letztgenannten Methode wurde nicht-His₆-getaggtetes VAT verwendet, das analog den getaggteten Proteine (4.2.7) aufgereinigt wurde.

Zusätzliche Methoden zur Untersuchung einer Proteininteraktion waren Immunopräzipitation (4.2.6, Protein I immer VAT, Protein II GFPssrA oder 20S-Proteasom), Translokationsstudien (4.3.6), Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (4.4.3) bzw. Elektronen- (4.4.1) und Rasterkraftmikroskopie (4.4.2).

4.3.6 Bestimmung der GFPssrA-Translokation von VAT ins 20S-Proteasom

Zur Untersuchung einer aktiven Translokation von GFPssrA durch VAT in das 20S-Proteasom wurden die Proteine unter verschiedenen Bedingungen miteinander inkubiert und über die SDS-PAGE (4.2.1) aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Gele, um den Verbleib von GFPssrA zu studieren, entweder mit Coomassie (4.2.3) angefärbt oder über die Westernblot-Analyse (4.2.4) mit Anti-ECFP-Antikörper (4.2.5) detektiert.

Hierfür wurden 2 μ g VAT oder 1.7 μ g VAT Δ N (beide 0.4 μ M) mit 1.2 μ g nativen oder HCl(50 mM)/DTT(5 mM)-denaturierten GFPssrA (ca. 4 μ M) und 3 μ g Wildtyp- oder $\Delta\alpha(2-12)$ 20S-Proteasom (0,43 μ M) in 10 μ l HM-Puffer mit/ohne Nukleotid (10 mM ATP, ADP, ATP γ S oder AMP-PNP) 0-60 min bei 60°C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne VAT/VAT Δ N oder Proteasom.

4.4 Biophysikalische Methoden

4.4.1 Elektronenmikroskopie

EM-Aufnahmen wurden von Brigitte Kühlmorgen an den Transmissions-Elektronenmikroskopen CM12 und CM20 FEG (PHILIPS) durchgeführt.

Frisch gebrochener Glimmer wurde in einer Bedampfungsanlage (BALZERS) bei 5×10^{-6} Torr mit einem 10-nm-hohen Kohlefilm beschichtet. Der Kohlefilm wurde abflotiert und auf Kupfergrids übertragen. Um Adsorption und Kontrastierung zu verbessern, wurden die Grids vor

Gebrauch in einem Plasmacleaner (PDC-3XG, HARRICK) gereinigt. Die Proteinproben wurden 1 min zur Adsorption auf dem Grid belassen, mit Filterpapier abgesaugt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ gewaschen und 15 s mit 1% (w/v) Uranylacetat (pH 4.1) negativ kontrastiert.

Die Proteine (0.1-0.2 mg/ml VAT oder VAT-Mutante, und/oder 0.07 mg/ml GFPssrA und/oder 0.05-0.2 mg/ml 20S-Proteasom) wurden im HM- und LM-Puffer mit/ohne Nukleotid (5 mM ATP, AMP-PNP oder $\text{ATP}\gamma\text{S}$) 1-10 min bei 37-60°C inkubiert und vor der Auftragung aufs Grid im Verhältnis 1:4 mit 20 mM HEPES, pH 7.5 verdünnt. Die Bedingungen wurden durch Zugabe von 1 μM Crosslinker (BS^3 , PIERCE) variiert.

Zur Auswertung von Bilddaten wurde die TOM-Software für Matlab (THE MATHWORKS, INC.) und EM-Software der Abteilung verwendet. Die genaue Vorgehensweise wird unter 5.3.2 beschrieben.

4.4.1.1 Kolloidales Gold

Für die Herstellung von kolloidalen Goldpartikeln mit einer Größe von ca. 5 nm wurden beide Lösungen (Tab. 11) auf ca. 60°C erwärmt. Unter Rühren wurde Lösung 2 zu Lösung 1 zugegeben und das Gemisch aufgeköcht. Nach Abkühlen wurden 1-ml-Aliquots mit 0.5-10 μl ssrA-Peptidlösung (2 mg/ml) verrührt und nachfolgend mit 110 μl 10% (w/v) NaCl versetzt, wodurch ein schwacher Farbumschlag von rot nach blau abhängig von der ssrA-Konzentration erfolgte. Die richtige Konzentration des ssrA-Peptids, um das Gold vollständig zu koordinieren, wurde in der Probe erreicht, die blau gefärbt war und in der keine weitere Farbintensivierung im Vergleich zu höher konzentrierten Proben auftrat. 1 ml der Goldlösung wurde mit der ermittelten ssrA-Menge versetzt und 2 h zentrifugiert (20000xg, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das pelletierte Gold mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ über wiederholte Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Gold-ssrA in ca. 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ gelöst.

Tab. 11: Pipettierschema für die Herstellung von kolloidalem Gold.

Lösung 1		Lösung 2	
1% (w/v) HAuCl_4	1 ml	Tannin	50 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	79 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$	2 ml
		1% (w/v) Na-Zitrat	4 ml
		25 mM K_2CO_3	ad 20 ml

3 μg VAT, VAT-BB oder VAT ΔN wurden im HM-Puffer (aber ohne DTT, mit/ohne 5 mM ATP) mit 5-25 μl der Gold-ssrA-Lösung 1-10 min bei 37-60°C inkubiert (Endvolumen 50 μl) und, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

Um eine Absättigung der Goldpartikel zu verhindern, wurde das ssrA-Peptid vor der Inkubation mit Gold in verschiedenen Konzentrationen mit einer DTT- oder Cysteinlösung (1:10 und 1:100 ssrA:DTT/Cystein) verdünnt.

4.4.1.2 Nanogold[®]

6 nmol Monomaleimido-Nanogold (NANOPROBES) wurde in 200 μl H₂O_{MilliQ} gelöst und mit 60 μl ssrA-Peptidlösung (2 mg/ml) 12 h bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde nicht umgesetztes Peptid über eine Superdex-Peptid-Säule (AMERSHAM) vom Nanogold-ssrA-Konjugat abgetrennt. Als Laufpuffer diente 20 mM Na₃PO₄, pH 7.4 und 150 mM NaCl.

3 μg VAT oder VAT ΔN wurden im HM-Puffer (aber ohne DTT, inkl. 5 mM ATP) mit 1-20 μl Nanogold-ssrA (aus ca. 500 μl Gesamtvolumen) 10 min bei 37°C inkubiert (Endvolumen 50 μl) und, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

4.4.2 Rasterkraftmikroskopie

Die rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Jens Schiener an einem Nanoscope IIIa Multi-Mode-Rasterkraftmikroskop (DIGITAL INSTRUMENTS) durchgeführt.

Als Probenträger diente ein rundes, ca. 5 mm breites ausgestanztes Glimmerplättchen, das mit doppelseitigem Klebeband an einem Metallplättchen angebracht war. Die Glimmeroberfläche wurde durch Abziehen der obersten Schicht mit TESA-Film gereinigt. Belegt wurde die Glimmeroberfläche zuerst mit 5 μl HM-Puffer (inkl. 5 mM ATP). Direkt im Anschluss wurden 5 μl der Probenlösungen (aus EM-Versuchen, vgl. 4.4.1) aufgetragen, die 30 min bei 25°C einwirken musste. Nachfolgend wurde mit HM-ATP-Puffer gespült und in Puffer abgebildet. Für die Versuche mit Nanogold wurde DTT-freier HM-Puffer verwendet.

Zusätzlich wurde VAT auf einer HOPG-Oberfläche vermessen, es konnte aber keine stabile Adsorption erreicht werden.

4.4.3 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

Die Messungen wurden von Barbara Müller, Abt. Bräuchle, LMU München an einer Eigenbau-FCS-Apparatur durchgeführt.

VAT und 20S-Proteasom wurden für die Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie folgt, markiert: 8 nmol (4 mg) VAT wurden in 200 µl 20 mM HEPES, pH 7.5 mit 4 nmol ATTO-532-NHS-Ester versetzt und 1 h bei 25°C inkubiert. Analog wurden 4 nmol (2,8 mg) 20S-Proteasom mit 2 nmol ATTO-647-NHS-Ester inkubiert. Beide Proteine wurden direkt im Anschluss über eine Superose-6-Säule (24 ml, PHARMACIA) und nach drei Tagen noch einmal über eine HiTrap-Desalting-Säule (2x5 ml, AMERSHAM) von nicht umgesetzten Farbstoffen befreit.

Als Reaktionslösung diente HM-Puffer, wobei die Bedingungen durch Zugabe von ATP und/oder GFPssrA variiert wurden. Zusätzlich enthielt der Puffer BSA, um die Affinität vom Proteasom zum Reaktionsgefäß zu reduzieren. Nach der Vermessung der einzelnen Proteine wurden Daten unter Zugabe von nicht markiertem VAT zu markiertem Proteasom in verschiedenen Verhältnissen (2:1 bis 32:1) und umgekehrt von nicht markiertem Proteasom zu markiertem VAT aufgenommen.

4.4.4 Kristallisation

Die Kristallisationsversuche wurden in Zusammenarbeit mit Kornelius Zeth, Abt. Oesterhelt nach der „hanging drop“-Methode unter Verwendung von Crystal Screen I (48 Lösungen) und II (48 Lösungen) und Index Screen (96 Lösungen, alle HAMPTON RESEARCH) durchgeführt.

0.8 µl VAT-Probe (ca. 20 µg VAT, 20 mM HEPES, pH 7.5, mit/ohne 0.1 M MgCl₂) wurden mit 0.4 µl Reservoirlösung vermischt und der Tropfen über 500 µl der gleichen Reservoirlösung zur Kristallisation bei 20°C angebracht.

Kristalle wurden u.a. mit Crystal Screen II-43, nativ; Index Screen-92, 0.1 M MgCl₂; Index Screen-61, 0.1 M MgCl₂ und Index Screen-61, 0.1 M MgCl₂ erhalten.

Die Bedingungen wurden nachfolgend durch Zugabe von 0.25 µl Additiv (Additive Screen, HAMPTON) oder eines unhydrolysierbaren ATP-Analogons (5 mM ATPγS oder AMP-PNP, gleichzeitig nur 5 mM MgCl₂) zum Kristallisationstropfen verfeinert. Als Gefrierschutzmittel wurden 15% 2R-3R-Butandiol, 20% PEG 400, 20% Ethylenglykol bzw. 30% Glycerin eingesetzt. Die Messungen erfolgten an Beamline ID23-1 in Grenoble.

4.5 Medien

LB-(Luria-Bertani)-Medium

10 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast Extract

10 g NaCl

ad 1 l H₂O_{dest.}

Die Medien wurden durch Erhitzen auf 121°C für 20 min sterilisiert.

LB-Agar

LB-Medium

15 g/l Bacto Agar

Der Agar wurde durch Erhitzen auf 121°C für 20 min sterilisiert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde Antibiotika (34 µg/ml Cam, 25 µg/ml Kan, und/oder 100 µg/ml Amp) zugesetzt und der Agar in Petrischalen gefüllt.

SOC-Medium

20 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast Extract

0.5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl

(1.86 g KCl in 100 ml H₂O_{dest.})

ad 1 l H₂O_{dest.}

4.6 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{MilliQ} angesetzt. Puffer für chromatographische Aufreinigungen wurden entgast und filtriert (0.45 µm, Apparatur von Nalgene).

Alkalische Phosphatase-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

BCIP-Lösung

50 mg BCIP in 1 ml 100% (v/v) DMF

Elektrophoresepuffer (native PAGE)

190 mM Glycin

25 mM Tris

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)

190 mM Glycin

25 mM Tris

0.1% (w/v) SDS

HM-Puffer

50 mM HEPES, pH 7.5

100 mM NaCl

120 mM MgCl₂

1 mM DTT

LM-Puffer

50 mM HEPES, pH 7.5

100 mM NaCl

20 mM MgCl₂

1 mM DTT

Malachitgrün-Lösung

Lösung 1. 170 mg Malachitgrün

37.5 ml H₂O_{MilliQ}

Lösung 2. 5.25 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O

125 ml 4 N HCl

Lösung 1 und 2 wurden vermischt und auf 500 ml mit H₂O_{MilliQ} aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert (Faltenfilter) und mit 0.1% (v/v) Triton X-100 versetzt.

Neuhoff-Lösung

10% (w/v) (NH₄)₂SO₄

2% (w/v) H₃PO₄

NTB-Lösung

50 mg NTB in 1 ml 70% (v/v) DMF

PBS

140 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄

2.7 mM KCl

1.8 mM KH₂PO₄

Panceau-S-Lösung

3% (w/v) TCA

3% (w/v) Sulfosalicylsäure

0.2% (w/v) Ponceau-S

Probenpuffer (5x, DNA)

50% (v/v) Glycerin

0.1% (w/v) Bromphenolblau

Probenpuffer (4x, native PAGE)

0.33 M Tris-HCl, pH 6.8

20% (v/v) Glycerin

0.08% (w/v) Bromphenolblau

Probenpuffer (6x, SDS-PAGE)

0.3 M Na₃PO₄, pH 6.8

10% (w/v) SDS

30% (v/v) Glycerin

0.6 M DTT

0.1% (w/v) Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (4x, native PAGE)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Sammelgelpuffer (4x, SDS-PAGE)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

0.4% (w/v) SDS

TAE-Puffer

40 mM Tris-Essigsäure, pH 8.0

1 mM EDTA

Transferpuffer (native PAGE)

190 mM Glycin

25 mM Tris

Transferpuffer (SDS-PAGE)

190 mM Glycin

25 mM Tris

20% (v/v) Methanol

0.02% (w/v) SDS

Trenngelpuffer (4x, native PAGE)

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Trenngelpuffer (4x, SDS-PAGE)

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

0.4% (w/v) SDS

Trocknerlösung

20% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Glycerin

4.6.1 Enzyme

Enzyme	Firma
Ligasemischung	TaKaRa
Polymerasen:	
<i>Pfu</i> -Polymerase (5 U/μl) und Puffer	Stratagene
<i>PfuTurbo</i> -Polymerase (5 U/μl) und Puffer	Stratagene
Restriktionsenzyme:	
<i>BamHI</i> (20 U/ml) und Puffer	New England BioLabs
<i>NcoI</i> (20 U/ml) und Puffer	New England BioLabs
<i>EcoRI</i> (20 U/ml) und Puffer	New England BioLabs

4.6.2 Chemikalien mit Abkürzungen

Chemikalie	Abkürzung/Formel	Hersteller
Acetonitril	CH ₃ CN	Merck
Acrylamid Protogel 30% (w/v)		National Diagnostics
Adenosin-5'-Diphosphat	ADP	Roche Diagnostics
Adenosin-5'-(β,γ-Imido)-Triphosphat	AMP-PNP	Sigma
Adenosin-5'-Triphosphat	ATP	Sigma
Adenosin-5'-(γ-Thio)-Triphosphat	ATPγS	Sigma
Agarose		Sigma
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Merck
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
Ampicillin	Amp	Sigma
Bacto Agar		DIFCO
Bacto Tryptone		DIFCO
Bacto Yeast Extract		DIFCO
Bovine Serum Albumin	BSA	New England BioLabs
Bradford-Farbstoff		Biorad
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	BCIP	Sigma
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck
Chloramphenicol (kristallin)	Cam	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R250		Serva
Deionisiertes Wasser	H ₂ O _{MilliQ}	Millipore
Destilliertes Wasser	H ₂ O _{dest}	Stadtwerke München
Dimethylformamid	DMF	Merck
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck
1,4-Dithiothreitol	DTT	Merck
Ethidiumbromid	EtBr	Merck
Ethanol absolut	EtOH	Merck
Gelatine		Sigma
Gele Novex Tris-Glycine Gels (4-12%)		Invitrogen
Glukose		Merck
Glycerin 86-88%		Merck
Glycerin 100%		Sigma
Glycin		Merck
Guanidiniumchlorid	GuCl	Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	HEPES	Biomol
3-Hydroxy-4-[2-Sulfo-4-(4-Sulfophenylazo)Phenylazo]-2,7-Phtalindisulfonigesäure	Ponseau S	Sigma
Hydroxylapatit		Biorad

Imidazol		Merck
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid	IPTG	Biomol
Kaliumacetat	KAc	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck
Kaliumhydroxid	KOH	Merck
Kaliumkarbonat	K_2CO_3	Merck
Kalziumchlorid-Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Kanamycin	Kan	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck
Malachitgrün		Sigma
Mangandichlorid-Tetrahydrat	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Sigma
Marker:		
Agarose-Gel, 1kb		New England BioLabs
Native PAGE-Gel		Pharmacia
SDS-PAGE-Gel		Biorad
Methanol	MeOH	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Merck
Natriumdodecylsulfat	SDS	ROTH
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Natriumlaurylsulfat	SDS	Roth
Nitrilotriessigsäure-Agarose (Superflow)	Ni^{2+} -NTA	Qiagen
4-Nitrotetrazolium-Chloridblau	NTB	Sigma
Perchlorsäure	HClO_4	Merck
Protein A-Sepharose		Amersham
Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma
Salzsäure, konz.	HCl	Merck
Sulfosalicylsäure		Merck
Titriplex	EDTA	Merck
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Tris	Riedel de Haen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Serva
Trichloressigsäure	TCA	Merck
Tricine		Calbiochem
Triton-X100 ultrapure		Sigma
Uranylacetat		Merck
Zinkchlorid	ZnCl_2	Merck
Zinksulfat-Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Sigma
Zitronensäure-Monohydrat		Merck

4.6.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tecnomara
Bedampfungsanlage	Balzers
Blockthermostat BT-200	Kleinfeld Labortechnik
Blockthermostat TR-L288	Liebisch
Brutschrank	Haraeus
Celldisrupter EmulsiFlex-C5	Avestin
Chromatographieapparaturen:	
ÄKTA Purifier 900	Pharmacia Biotech
SMART	Pharmacia Biotech
Apparatur System Gold	Beckman
Fraktionssammler LKB Redi Frac	Pharmacia
Peristaltikpumpe LKB Pump-P1	Pharmacia
Schreiber LKB Rec 101	Pharmacia

4. Material und Methoden

Chromatographiesäulen:	
Affinitätssäule: Ni ²⁺ -NTA (5 und 25 ml)	MPI
Affinitätssäule: HisTrap (1 ml)	Amersham
Entsalzungssäule HiTrap-Desalting (5 ml)	Amersham
Gelfiltrationssäule Superdex-Peptide (24 ml)	Amersham
Gelfiltrationssäule Superose-6 (24 ml)	Pharmacia
Gelfiltrationssäule Superose-6 (2,4 ml)	Pharmacia
Hydroxylapatit-Säule (5 ml)	MPI
Ionentauschersäule HiTrapQ (5 ml)	Amersham
Ionentauschersäule HiTrapSP (5 ml)	Amersham
Ionentauschersäule MonoQ (1 ml)	Pharmacia
Dialyseschläuche 3500 und 16000 K	Biomol
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese-Zubehör:	
Elektrophoresis Power Supply-EPS 301	Pharmacia
Gelgießkassette (5 Gele)	Pharmacia
Gelelektrophoresekammer XCell II	Invitrogen
Gelelektrophoresekämme 2050 Middet	LKB Bromma
Gelschüttler Unimax 2010	Heidolph
Gradientenmischer	MPI
Westernblot-Kammer XCell II	Invitrogen
Geltrockner Gel Air Dryer	Biorad
Entgas-Apparatur für Puffer	Nalgene
Essigsäure, konzentriert	Merck
Faltenfilter	Schleicher&Schuell
Fluorometer: Luminescence Spectrometer LS 50 B	Perkin Elmer
Fluorometer: 5FM25	Kontron Instr.
Fluorometer-Thermostat Polystat cc-1	Huber
Filterpapier (Western Blot) (3 mm)	Whatman
Konzentratoren, Jumbosep 50 mL, 10K	Pall Filtron
Konzentratoren, Microsep 3,5 mL, 1 und 30K	Pall Filtron
Küvetten (1,5 ml PMMA)	Roth
Magnetrührer Ika-combimag RCT	Ika Labortechnik
Mikroskope:	
Elektronenmikroskop CM 12	Philips
Elektronenmikroskop CM 20 FEG	Philips
Rasterkraftmikroskop Nanoscope IIIa Veeco	Digital Instruments
Mikrowelle Micromat	AEG
MilliQ PLUS Ultra Pure Water System	Millipore
Nitrozellulose-Membran Optitran BA-S85	Schleicher&Schnell
PCR-Thermocycler PCR System 2400	Perkin Elmer
pH-Meter: pH525	WTW
Photomesszelle LKB Unit UV-1	Pharmacia
Photometer: Lambda 2 UV/VIS Photospectrometer	Perkin Elmer
Photographiereinrichtung für:	
Agarose-Gele: Image Reader	Herolab
PAGE-Gele und Western Blots: Image Reader LAS-1000	Fujifilm
Pipetten:	
10, 20, 100, 200 µl	Eppendorf
Pipetman, 10, 20, 200, 1000, 5000 µl	Gilson
Plasmacleaner PDC-3XG	Harrick
Power Supply EPS 301	Pharmacia
Power Supply PowerPak 300	Biorad
Präzision-Küvetten, Quarz Typ Nr. 105.251 –QS	Hellma
Reaktionsgefäße 1,5/2 mL	Eppendorf
Schüttler:	
Cellstar	Nunc

4. Material und Methoden

Innova 3000
Thermomixer 5436
Sicherheitswerkbank antair BSK
Spektrofluorometer Fluostar Optima
Vortex Genie 2
Waage
Wasserbad
Zentrifugen:
 Avanti J25, Zentrifugenrotor JA-10 und JA-25.5
 Optima 2E-80K, Zentrifugenrotor 55.2 Ti und SW 60
PMC-060
5417R, Zentrifugenrotor F 45-30-11
 Rotanta 46 RS
Zentrifugenröhrchen 50 mL/15 mL Gamma sterilisiert

New Brunswick Scient.
Eppendorf
GLW
bmg
Bender&Hobein
Sartorius
Haake

Beckman
Beckman
PolyLabo
Eppendorf
Hettich
TPP

5. Ergebnisse

Das *vat*-Gen wurde mit Hilfe der PCR unter Verwendung von Primern für die konservierten Walker-A- und Walker-B-Boxen bereits 1997 aus dem Genom von *Thermoplasma acidophilum* kloniert und rekombinant in *E. coli* hergestellt.^[122] Das *Thermoplasma*-Genomprojekt zeigte, dass VAT eine von nur zwei löslichen AAA-ATPasen ist.^[41] Erste Versuche zur Funktion von VAT und intensive elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen wurden bereits in dem Zeitraum von 1997 bis 2002 durchgeführt.^[43,75-77] In der vorliegenden Arbeit sollten die katalytischen Eigenschaften von VAT näher analysiert werden, gekoppelt mit einer weiteren strukturellen Untersuchung von VAT und seinen Mutanten.

5.1 Die N-Domäne

Die Struktur von VAT-N wurde, wie unter 3.2.2 beschrieben, bereits 1999 mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst.^[43] Nachfolgende elektronenmikroskopische Vergleichsstudien an VAT und VAT Δ N, einer Mutante von VAT, der 183 N-terminale Aminosäuren fehlen, konnten die genaue Lokalisierung der N-Domänen im hexameren Proteinkomplex aufklären.^[76,77] Die Funktion von VAT-N wurde bisher wenig untersucht. Eine Studie mit der isolierten N-Domäne zeigte indirekt eine Interaktion mit Cyclophilin; denaturiertes Cyclophilin wurde nach Inkubation mit VAT-N mit geringer Ausbeute wieder zurückgefaltet.^[27]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine alternative Methode zur Funktionsuntersuchung der N-Domäne verfolgt. So wurden die katalytischen Aktivitäten von VAT und VAT Δ N gemessen und miteinander verglichen. Die Differenzen in den Aktivitäten können direkt dem Einfluss der N-Domäne zugeschrieben werden, da diese den einzigen Unterschied zwischen den beiden Proteinen darstellt.

5.1.1 ATPase-Aktivität von VAT

Die ATPase-Aktivität von VAT wurde bereits durch Golbik et al. unter „steady-state“-Bedingungen bestimmt.^[27] „Steady-state“ bedeutet, dass eine Reaktion sich aufgrund von Substratüberschuss in einem sog. Fließgleichgewicht befindet und somit die Bildung des Substrat-Enzym-Komplexes [ES] nicht den limitierenden Schritt der Reaktion darstellt. Eine solche Reaktion erreicht ihre Maximalgeschwindigkeit (V_{\max} , auch spezifische Aktivität genannt), wenn das

Enzym bei hohen Substratkonzentrationen vollständig mit Substrat gesättigt ist und kann mit der Michaelis-Menten-Näherung beschrieben werden:

$$v_0 = (V_{\max} \cdot [S]) / (K_M + [S]) \quad \text{(Gl. 1: Michaelis-Menten-Näherung)}$$

mit: v_0 Reaktionsgeschwindigkeit
 V_{\max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 K_M Michaelis-Konstante
 $[S]$ Substratkonzentration

Die Michaelis-Konstante (K_M) bezeichnet in dieser Gleichung die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht. Ein kleiner K_M bedeutet damit eine hohe Affinität des Enzyms für das Substrat und umgekehrt ein hoher K_M eine niedrige Substrataffinität. Um die Aktivitäten zwischen zwei Enzymen unterschiedlicher Molekülmasse genauer vergleichen zu können, wird die katalytische Konstante (k_{kat} , auch Wechselzahl genannt) verwendet. Sie ist als Quotient aus Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) und Enzymkonzentration definiert und gibt an, wie viele Substratmoleküle durch ein Enzymmolekül in einem bestimmten Zeitintervall umgewandelt werden. Im Fall der ATPase-Aktivität von VAT gibt sie die Anzahl der ATP-Moleküle an, die in einer Sekunde durch eine hexamere AAA-ATPase zu ADP und P_i hydrolysiert werden. Ein Maß für die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms stellt der Quotient aus der katalytischen Konstante (k_{kat}) und der Michaelis-Konstante (K_M) dar.

In Gegenwart von 20 mM Mg^{2+} besitzt VAT ein Temperaturoptimum von 80°C und der optimale pH-Wert liegt zwischen 7 und 8. Die spezifische Aktivität (V_{\max}) von VAT wurde bei pH 7.5 und 70°C mit $33.5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (entspricht $0.56 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) und die Michaelis-Konstante (K_M) mit 0.72 mM ATP bestimmt. Die spezifische Aktivität ist eine enzymatische Konstante, die den Reaktionsumsatz eines Enzyms bezogen auf seine Einwage angibt. Der Wert für VAT liegt in der Größenordnung der ATP-Hydrolyseaktivitäten von andere AAA-ATPasen (vgl. Tab. 12). Die Michaelis-Konstante ist hoch und liegt im oberen Bereich der AAA-ATPasen.

Interessanterweise ist die Aktivität von VAT stark von der Mg^{2+} -Konzentration abhängig. VAT wird bis zu einer Konzentration von 120 mM Mg^{2+} in kooperativer Weise zur ca. zehnfachen Aktivität ($V_{\max} = 5.65 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) stimuliert. Mit der Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration verschiebt sich das Temperaturoptimum von VAT auf ca. 70°C. Darüber setzt eine Denaturierung des Proteins ein. Es konnte gezeigt werden, dass die hohe Stimulation von VAT spezifisch durch

Magnesium erreicht wird. Der Austausch von Mg^{2+} gegen andere, unter anderem auch bivalente Ionen wie Mn^{2+} oder Ca^{2+} , konnte bestenfalls eine Aktivierung um den Faktor 2-3 erzielen. Das zeigt auf, dass die ATPase-Aktivität von VAT nicht allein von der Ionenstärke des Mediums abhängig ist.

In dieser Arbeit wurden zunächst kinetische Messungen der ATP-Hydrolyseaktivität von VAT durchgeführt (vgl. 4.3.1). Dabei wurde eine Temperatur von $60^{\circ}C$ gewählt, die der physiologischen Umgebungstemperatur von *Thermoplasma acidophilum* entspricht. Zudem ist die Autohydrolyse von ATP bei der niedrigeren Temperatur geringer, was definiertere Reaktionsbedingungen und damit eine größere Messgenauigkeit bewirkt.

Die ATPase-Aktivität wurde indirekt über den Nachweis von freiem Phosphat (P_i) bestimmt, das mit Ammoniummolybdat zu einem negativ geladenen Phosphomolybdat-Komplex umgesetzt wurde. Der Komplex verursacht aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen einen Farbumschlag des Malachitgrüns von gelb-grün nach blau-grün, der bei einer Absorption bei 640 nm detektiert wird.^[127] Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M , V_{max} und k_{kat} wurde die spezifische ATPase-Aktivität von VAT bei verschiedenen ATP-Konzentrationen vermessen und gegen die entsprechenden ATP-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 10).

Die Messungen zeigen gute Übereinstimmung in der spezifischen ATPase-Aktivität mit den oben beschriebenen Daten für VAT.^[27] Der Wert bei 20 mM Mg^{2+} wurde auf $0.27 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ und bei 120 mM Mg^{2+} auf $2.59 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ bestimmt, dies entspricht ca. 50% der Aktivität bei $70^{\circ}C$, was bereits aus der Aktivität-Temperatur-Kurve von Golbik et al. zu entnehmen war. Nach der RGT-(Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur)-Regel von van't Hoff verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit und somit die Enzymaktivität bei einer Temperaturerhöhung von 10 K. Diese Regel kann folglich für die ATP-Hydrolyse von VAT angewendet werden.

In der Bestimmung der Michaelis-Konstante kam es aber zu Differenzen zwischen der hier durchgeführten Messreihe und den Literaturdaten für VAT.^[27] Die neu ermittelten Werte waren nur ca. halb so groß wie die Literaturwerte. Dies könnte an den unterschiedlichen Auswertungsmethoden liegen. Die früheren Messwerte wurden mit der doppelt reziproken Auswertungsmethode nach Lineweaver-Burk ausgewertet, bei der niedrige Substratkonzentrationen stärker gewichtet werden, die aber in der Regel schwieriger bestimmbar und mit einem größeren Fehler behaftet sind. In dieser Arbeit wurden die Messpunkte nach Michaelis-Menten (Gl. 1) approximiert, wodurch die entsprechenden Konstanten erhalten werden konnten. Es ist außerdem nicht

bekannt, wie die Affinität von VAT zu ATP und/oder ADP durch einen Temperaturunterschied von 10 K beeinflusst wird.

In Tab. 12 sind kinetischen Daten von VAT denen anderer AAA- bzw. AAA⁺-ATPasen gegenüber gestellt. Für VAT sind an dieser Stelle nur die Werte bei 20 mM Mg²⁺ aufgeführt, da diese Konzentration der physiologischen Mg²⁺-Konzentration in *Thermoplasma* wahrscheinlich am nächsten kommt. Die Aktivität des eukaryontischen VAT-Homolog p97 liegt in der gleichen Größenordnung wie die von VAT bei 20 mM Mg²⁺. Interessanterweise wird p97, im Gegensatz zu VAT, durch höhere Mg²⁺-Konzentrationen inhibiert.^[90]

Tab. 12: Kinetische Konstanten von VAT (20 mM Mg²⁺) und anderer AAA- bzw. AAA⁺-ATPasen.

*	VAT	VAT ^[27]	p97 ^[48,90]	Hsp78 ^[128]	Hsp104 ^[129]
	<i>Th. ac.</i>	<i>Th. ac.</i>	<i>Maus / Ratte</i>	<i>Sa. cer.</i>	<i>Sa. cer.</i>
V_{max}	0.27	0.56	0.52 / 0.3	1.28	2
K_M	0.22	0.72	0.33 / 0.62	0.93	5
k_{kat}	2	4	5 / 3	10	21
k_{kat}/K_M	9 · 10 ³	7 · 10 ³	15 · 10 ³ / 5 · 10 ³	10 · 10 ³	4 · 10 ³

* V_{max} in nmol · min⁻¹ · μg⁻¹; K_M in mM ATP, k_{kat} in s⁻¹, k_{kat}/K_M in M⁻¹s⁻¹

Da AAA-ATPasen als Oligomere aktiv sind, wird für die kinetische Beschreibung ihrer Reaktionen statt der Michaelis-Menten- oft die Hill-Approximation angewendet. Bei Enzymen, die mehrere Reaktionszentren enthalten, kann die Bindung des Substrates an einer Stelle die Substrataffinität eines anderen Reaktionszentrums positiv oder negativ beeinflussen. Dieses Phänomen wird als Kooperativität bezeichnet und spiegelt die Kommunikation zwischen verschiedenen aktiven Zentren im Protein wider. Durch Ergänzung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) um den sog. Hill-Koeffizienten (n, auch allosterischer oder Kooperativitätsfaktor genannt), erhält man eine Näherung, die kooperative Enzyme beschreibt:

$$v_0 = (V_{\max} \cdot [S]^n) / (K_M + [S]^n) \quad (\text{Gl. 2: Hill-Näherung})$$

mit: v_0 Reaktionsgeschwindigkeit
 V_{\max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 K_M Michaelis-Konstante

[*S*] Substratkonzentration
n Hill-Koeffizient

Der Hill-Koeffizienten *n* wird größer 1 bei positiver Kooperativität, d.h. die Anlagerung weiterer Liganden wird begünstigt, oder kleiner 1 bei negativer Kooperativität, d.h. die weitere Ligandenbindung wird erschwert. Existiert keine Kooperativität, ist $n = 1$ und die Hill-Gleichung geht in die Michaelis-Menten-Gleichung über.

Obwohl genaue Details nicht bekannt sind, gelten AAA-Proteine als kooperative Enzyme.^[11] In Studien an ClpB und Hsp104 wurden positive Hill-Koeffizienten in der Größenordnung von 2-3 ermittelt.^[108,130] Die strukturelle Grundlage für einen möglichen kooperativen Mechanismus kann die räumliche Nähe der konservierten katalytischen Reste Sensor-1 und Arginin-Finger darstellen. Diese Reste sind nur über eine kurze α -Helix miteinander verbunden, sie sind aber zu den Nukleotidbindetaschen von zwei verschiedenen Protomeren orientiert, wodurch eine Kommunikation zwischen den beiden Protomeren grundsätzlich möglich wäre (vgl. 3.2.4).^[5]

Für VAT lag der Kooperativitätsfaktor um 1 und die Verwendung von beiden Funktionen führte somit zu vergleichbaren Ergebnissen. Die genaue Bestimmung des Hill-Koeffizienten würde Messungen bei niedrigen Substratkonzentrationen erfordern, was für die ATP-Hydrolyse nur unter Verwendung von isotoopenmarkiertem ATP durchführbar ist. Für die Fragestellungen dieser Arbeit waren Michaelis-Menten-Kinetiken ausreichend.

5.1.2 ATPase-Aktivität von VAT Δ N

Parallel wurden kinetische Daten der ATPase-Aktivität von VAT Δ N bei der Hoch- und Niedrig-Mg²⁺-Konzentration ermittelt (vgl. 4.3.1). Das *vat δ n*-Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von Tomohiro Tamura, AIST Sapporo, Japan zur Verfügung gestellt. Analog zum *vat*-Expressionsplasmid wurden alle Kodons für die Expression in *E. coli* optimiert, was zu hohen Proteinausbeuten führt.^[27] VAT Δ N wurde als stabiles Hexamer aufgereinigt.

Interessanterweise wird die ATP-Hydrolyseaktivität von VAT Δ N nur wenig durch Mg²⁺-Ionen beeinflusst. Im Gegensatz zu VAT, kommt es bei VAT Δ N zu einer geringen Inhibition der Hydrolyse durch hohe Mg²⁺-Konzentrationen. So sinkt die spezifische Aktivität von 6.49 nmol·min⁻¹· μ g⁻¹ bei 20 mM auf 5.27 nmol·min⁻¹· μ g⁻¹ bei 120 mM Mg²⁺. Die Michaelis-Konstante ändert sich dabei ebenfalls nur leicht von 0.13 mM auf 0.10 mM ATP (Tab. 13). Es wurde ermit-

telt, dass die ATPase-Aktivität von VAT Δ N bei einer Mg²⁺-Konzentration von 10 mM ihr Maximum erreicht und bei höheren Konzentrationen langsam inhibiert wird.

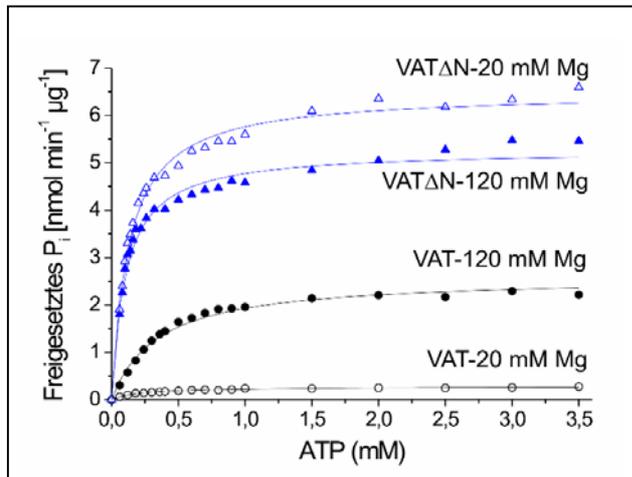


Abb. 10: ATPase-Aktivität von VAT und VAT Δ N.

Die ATPase-Aktivität von VAT ist bei 120 mM (●) ca. 10-mal so hoch wie bei 20 mM Mg²⁺ (○). Die Aktivität von VAT Δ N bei 120 mM Mg²⁺ (▲) wird, verglichen mit 20 mM Mg²⁺ (△), etwas inhibiert.

Die Gegenüberstellung von VAT und VAT Δ N zeigt, dass die spezifische Aktivität von VAT Δ N höher ist. Insbesondere macht sich der Unterschied bei niedrigen Mg²⁺-Konzentrationen bemerkbar, da dort

die Hydrolyse von VAT Δ N um einen Faktor 24 größer als die von VAT ist. Die aus der Aktivität und dem Molekulargewicht der Enzyme ermittelte katalytische Konstante (k_{kat}) ist für VAT Δ N bei 20 mM Mg²⁺ 20-fach höher als für VAT, die enzymatische Wirksamkeit ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$) sogar um den Faktor 35. Bei der Hochmagnesium-Konzentration von 120 mM macht der Unterschied nur 50% in k_{kat} aus und $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ für VAT Δ N ist nur um einen Faktor 5 höher als für VAT (Tab. 13).

Für den Effekt scheint die N-Domäne verantwortlich zu sein, da sie den einzigen Unterschied zwischen VAT und VAT Δ N darstellt. Die N-Domäne beeinflusst direkt die ATPase-Aktivität von VAT und wird stark durch hohe Mg²⁺-Konzentration stimuliert. Fehlt die N-Domäne (VAT Δ N), so besitzt das Protein eine sehr hohe Hydrolyseaktivität, die mit keiner der bisher bestimmten Aktivitäten für andere AAA- oder AAA⁺-ATPasen vergleichbar ist (Tab. 12). Ist die N-Domäne in VAT vorhanden, inhibiert sie seine ATPase-Aktivität auf eine Größenordnung von verwandten Enzymen. Durch hohe Mg²⁺-Konzentrationen lässt sich die Aktivität wieder verstärken, was eventuell mit einer Mg²⁺-abhängigen Strukturänderung in VAT-N erklärt werden kann. Wie unter 3.2.4 beschrieben, steht die N-Domäne in p97 mit der D1 α -Domäne über Arg¹⁵⁵-Asn³⁸⁷ bzw. Arg⁸⁹-Glu²⁶¹ in direktem Kontakt. Während das erstgenannte Arg¹⁵⁵ in VAT nicht konserviert ist (VAT trägt an dieser Stelle Pro¹³⁸), könnte der Kontakt zwischen den Domänen in VAT über die letztgenannten Reste (VAT: Arg⁷⁴-Glu²⁴⁶) erfolgen. Es wäre möglich, dass eine Strukturänderung in VAT-N über diese Reste an die D1-Domäne übertragen wird, was dort zu stimulierter ATPase-Aktivität führt. Für p47, einen Cofaktor von p97, der direkt an die

N-Domäne von p97 bindet, ist bekannt, dass er die ATP-Hydrolyse von p97 negativ beeinflusst.^[48,54,131] Es wäre aber auch denkbar, dass die Hydrolyse durch die Interaktion mit einem anderen Cofaktor verbessert würde. Für VAT sind bisher keine Cofaktoren bekannt, hohe Mg^{2+} -Konzentrationen können aber die Interaktion mit einem potentiellen Cofaktor simulieren und zu ähnlichen Strukturänderungen in der N-Domäne führen. Das Phänomen, dass die Entfernung der N-Domäne zu einer verstärkten ATP-Hydrolyse führt, konnte neben VAT auch für p97 (unveröffentlichte Daten der Abteilung), ClpA und ClpB gezeigt werden.^[132,133] Für keines der Proteine war der Effekt aber so stark ausgeprägt wie für VAT bei 20 mM Mg^{2+} , was der natürlichen Magnesiumkonzentration in der Zelle am ehesten entspricht. Es scheint, dass die Natur mit der N-Domäne ein Kontrollinstrument geschaffen hat, um nicht unspezifisch und funktionslos große Mengen von einer wichtigen Energiequelle wie ATP zu verbrauchen.

Interessanterweise hatte weder eine Zugabe von VAT-N noch von GFPssrA oder Proteasom einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von VAT oder VAT Δ N.

5.1.3 Entfaltungsaktivität von VAT und VAT Δ N

Die Entfaltungsaktivität von VAT konnte bereits an Penicillinase und Cyclophilin als Substraten indirekt demonstriert werden.^[27] Penicillinase ist bei penicillinresistenten Bakterien für die Penicillinspaltung verantwortlich. Cyclophilin gehört zur Gruppe der PPIasen (Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase). Beide Enzyme dienen als Modellsubstrate, deren richtige Faltung über eine spezifische enzymatische Reaktion indirekt nachgewiesen werden kann. Die Untersuchungen zeigten, dass VAT nur unter Hoch- Mg^{2+} -Bedingungen eine Entfaltungsmaschine ist. Bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen entwickelt es eine Chaperonaktivität und begünstigte die Substratrückfaltung.

In dieser Arbeit wurde die Entfaltung des Modellsubstrats GFPssrA untersucht (vgl. 4.3.2). GFP („Green fluorescent protein“) aus der Qualle *Aequorea victoria* eignet sich aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften, die von seinem Faltungszustand abhängen, und des hohen Schmelzpunktes von 78°C als gutes Substrat für Faltungs-Entfaltungs-Studien. Es besitzt eine stabile fassartige Struktur aus 11 β -Strängen, in deren Mitte ein Fluorophor über eine oxidative Zyklisierung von Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ und Gly⁶⁷ autokatalytisch ausgebildet wird. Erfährt GFP eine chemische oder enzymatische Entfaltung, bei der es zur Zerstörung oder Veränderung des fluorophoren Zentrums kommt, geht seine Fluoreszenz verloren, was spektrometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm detektiert werden kann. Der

ssrA-Tag wurde bereits unter 3.2.7 beschrieben. Er dient in *E. coli* als Erkennungssequenz für den Proteinabbau und beeinflusst die physikalischen Eigenschaften von GFP nicht.^[126]

Die Entfaltung von GFP_{ssrA} durch VAT blieb lange Zeit unentdeckt, da die Versuche bei der eher physiologischen Konzentration von 20 mM Mg²⁺ durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen war eine Entfaltung von GFP_{ssrA} kaum zu detektieren. Erst durch eine Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration konnte ein Anstieg der Entfaltung gefunden werden, die bei 120 mM Mg²⁺ ihr Maximum erreicht. Im Gegensatz zu VAT besitzt VAT Δ N schon bei niedrigen Mg²⁺-Konzentrationen eine starke GFP_{ssrA}-Entfaltungsaktivität. In Analogie zur ATP-Hydrolyse wird die Entfaltung von VAT Δ N durch einen höheren Mg²⁺-Ionenanteil nicht weiter stimuliert. Die Entfaltung durch VAT Δ N ist unabhängig von der Mg²⁺-Konzentration und in beiden Fällen höher als durch VAT.

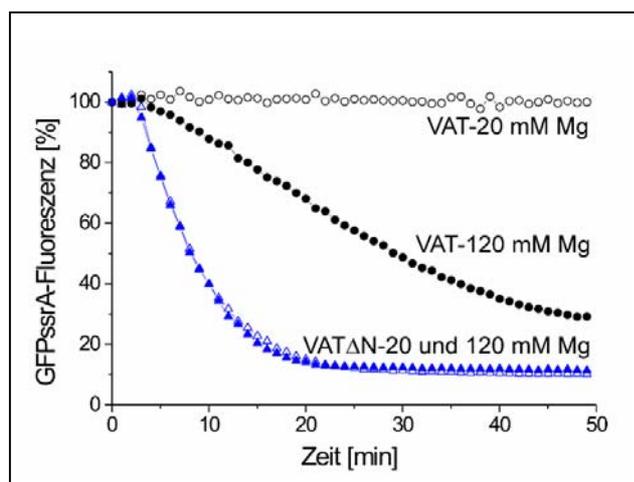


Abb. 11: Entfaltung von GFP_{ssrA} durch VAT und VAT Δ N.

Die Entfaltung von GFP_{ssrA} durch VAT ist bei 120 mM (●) höher als bei 20 mM Mg²⁺ (○). Die Aktivitäten von VAT Δ N sind bei 20 mM (△) und 120 mM Mg²⁺ (▲) identisch.

Die Entfaltungsaktivität von VAT und VAT Δ N bei den beiden Mg²⁺-Bedingungen scheint zur ATP-Hydrolyse proportional zu sein. Es stellte sich die Frage, ob die N-Domäne neben der Mg²⁺-abhängigen

Regulation der ATPase-Aktivität auch direkte Effekte auf die Substratentfaltung hat. Dazu wurden genaue kinetische Messungen der GFP_{ssrA}-Entfaltung, unter Variation der GFP_{ssrA}-Konzentration, durch VAT und VAT Δ N bei beiden Mg²⁺-Konditionen durchgeführt und mit den kinetischen Daten für die ATP-Hydrolyse verglichen (Tab. 13). Bei den Entfaltungsassays wurde darauf geachtet, dass ATP immer im großen Überschuss vorlag (ATP-Konzentration \gg K_M), um eine Limitierung der Entfaltung durch ATP-Mangel zu vermeiden.

Aus den kinetischen Daten konnte die Anzahl von ATP-Molekülen bestimmt werden, die unter den verwendeten Bedingungen von VAT oder VAT Δ N hydrolysiert werden müssen, um ein GFP_{ssrA}-Molekül zu entfalten. Bei VAT Δ N ist kein großer Unterschied für beide Mg²⁺-Konzentrationen (140 für 20 mM und 112 für 120 mM Mg²⁺) zu beobachten, was zu erwarten

war, da weder die ATPase- noch die Entfaltungsaktivität sichtlich von der Mg^{2+} -Konzentration abhängig sind. Bei VAT ist der ATP-Verbrauch pro GFPssrA höher als bei VAT Δ N und die Werte für beide Mg^{2+} -Konzentrationen unterscheiden sich um einen Faktor 3-4 voneinander. VAT besitzt bei Niedrig- Mg^{2+} -Bedingungen sowohl eine geringere ATP-Hydrolyse- als auch eine niedrigere Entfaltungsaktivität. Die Entfaltung von Substrat wird unter diesen Bedingungen so langsam durchgeführt, dass der Energieverbrauch in Form von ATP viel höher ist und VAT somit sehr ineffizient arbeitet (1511 für 20 mM und 426 für 120 mM Mg^{2+}).

Tab. 13: Vergleich der kinetischen Konstanten von VAT und VAT Δ N bei 20 und 120 mM Mg^{2+} .

*		VAT (20 mM Mg^{2+})	VAT (120 mM Mg^{2+})	VAT Δ N (20 mM Mg^{2+})	VAT Δ N (120 mM Mg^{2+})
ATP- Hydrolyse	V_{max}	0.27 ± 0.01	2.59 ± 0.05	6.49 ± 0.07	5.27 ± 0.07
	K_M	0.22 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01
	k_{kat}	2	22	41	33
	k_{kat}/K_M	$9 \cdot 10^3$	$63 \cdot 10^3$	$315 \cdot 10^3$	$330 \cdot 10^3$
GFPssrA- Entfaltung	V_{max}	0.18 ± 0.7	6.08 ± 1.39	46.29 ± 6.85	47.15 ± 5.05
	K_M	0.92 ± 0.84	3.56 ± 1.15	2.83 ± 0.63	2.52 ± 0.42
	k_{kat}	0.002	0.050	0.292	0.292
	k_{kat}/K_M	$2 \cdot 10^{12}$	$14 \cdot 10^{12}$	$103 \cdot 10^{12}$	$116 \cdot 10^{12}$
ATP/GFP		1511	426	140	112

* V_{max} in $nmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ ATP bzw. $pmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ GFPssrA; K_M in mM ATP bzw. μM GFPssrA; k_{kat} in s^{-1} , k_{kat}/K_M in $M^{-1} s^{-1}$

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die N-Domäne einen negativen Einfluss auf die Substratentfaltung haben muss. Dieser Effekt kann analog zur ATP-Hydrolyse durch hohe Mg^{2+} -Konzentrationen reduziert werden. Vielleicht führt eine Mg^{2+} -abhängige Strukturänderung in VAT-N zu einer besseren Substratbindung. Es ist vorstellbar, dass diese sehr flexible Domäne unter hohen Mg-Salzkonzentrationen eine Anordnung einnimmt, die den Zugang des Substrats zu der zentralen Pore von VAT erleichtert. VAT Δ N, in dem diese Domäne fehlt, zeigt eine viel bessere GFPssrA-Entfaltung und arbeitet viel effektiver, d.h. verbraucht viel weniger ATP zur Entfaltung, da die Pore wahrscheinlich leichter zugänglich ist. Zusätzlich besitzt VAT Δ N eine geringere Substratspezifität als VAT, was mit der Entfaltung verschiedener Proteinsubstrate bestätigt

werden konnte. Es ist sehr entfaltungsaktiv und würde ohne eine Kontrolleinheit wie der N-Domäne in der Zelle nicht nur hohe Mengen an ATP spalten, sondern auch wahllos Proteine entfalten. Die N-Domäne besitzt wahrscheinlich eine Funktion in der Substraterkennung, eine direkte Bindung von Substraten an VAT-N konnte bisher aber nicht gezeigt werden.

Die kinetischen Konstanten der GFP_{ssrA}-Entfaltung von VAT bei 120 mM Mg²⁺ und VAT Δ N bei beiden Mg²⁺-Konzentrationen liegen in der Größenordnung der verwandten ClpA-ATPase und ihrer Δ N-Mutante (ClpA Δ N).^[132] Für ClpA konnte eine katalytische Konstante (k_{kat}) von 10 min⁻¹ (= 0.17 s⁻¹, VAT: 0.05 s⁻¹), für ClpA Δ N von 29 min⁻¹ (= 0.48 s⁻¹, VAT Δ N: 0.29 s⁻¹) ermittelt werden. Die Konstante ist für das Wildtyp-ClpA etwa um einen Faktor 6 größer als für VAT, für die Δ N-Mutanten beträgt der Faktor ca. 3. Die ClpA Δ N-Mutante besitzt somit, in Analogie zum VAT-System, eine größere Entfaltungsaktivität. Bei den ClpA-Proteinen liegt die Michaelis-Konstante (K_M) bei ca. 5 μ M Substrat, bei VAT und VAT Δ N ist der Wert niedriger und nicht identisch für beide Proteine (VAT: 3.56 μ M, VAT Δ N: 2.83/2.52 μ M). Da unter den Entfaltungsbedingungen keine ATPase-Aktivität von ClpA/ClpA Δ N vermessen wurde, liegen keine Daten für den ATP-Verbrauch vor. Für die Substrattranslokation, die mit einer Entfaltungsreaktion einhergeht, wird für ClpXP aus *E. coli* aber nach dem Modell von Kenniston et al. mindestens ein ATP-Molekül pro Aminosäure des Proteinsubstrates verbraucht.^[134] Für die Entfaltung von einem GFP_{ssrA}-Molekül (inklusive His₆- und ssrA-Tag) müssten folglich mindestens 258 ATP-Moleküle hydrolysiert werden. VAT Δ N benötigt aber gerade mal 140/112 ATP-Moleküle, um ein GFP_{ssrA}-Molekül zu entfalten. Diese Hypothese wurde aber unter Verwendung von TitinI27ssrA-Mutanten als Substrate aufgestellt und es liegen keine Daten für die GFP-Entfaltung vor. Zudem ist VAT Δ N kein natürliches Protein und der ATP-Verbrauch von VAT lässt sich mit dem allgemeinen Modell vereinbaren.

Sowohl für VAT, als auch für VAT Δ N ist überraschend, dass beide in der Lage sind, auch GFP ohne den ssrA-Tag zu entfalten. Der ssrA-Tag dient als Erkennungssequenz für den bakteriellen Proteinabbau, konnte bisher aber in keinem Archaeum nachgewiesen werden. Trotzdem zeigten alle bis heute untersuchten AAA- und AAA⁺-ATPasen nur GFP-Entfaltung in Gegenwart des Tags. Das Verhalten von VAT und VAT Δ N bei der GFP-Entfaltung entspricht dem bei der getaggen Variante, mit dem Unterschied, dass Entfaltungseffizienz bei dem nativen Protein schlechter ist. VAT benötigt demzufolge keinen ssrA-Erkennungstag für die Entfaltung von GFP. Der C-Terminus von GFP ragt mit neun überwiegend hydrophoben Aminosäuren aus der Fass-

struktur heraus. Dass diese Reste nicht spezifisch durch VAT erkannt werden, konnte mit Versuchen an GFP_{ssrA}-Mutanten bestätigt werden, denen drei bis neun Aminosäuren des C-Terminus fehlten. Diese wurden trotzdem durch VAT erkannt und entfaltet (4.3.2). Eine Studie mit ClpAP, ClpXP und dem 26S-Proteasom ergab, dass die Proteasen ihre Substrate prozessiv vom Erkennungssignal her entfalten und abbauen. Entscheidend für die Substraterkennung ist hierbei weniger die Thermostabilität des Gesamtmoleküls als die direkte räumliche Umgebung nahe dem Abbausignal.^[135,136] Damit ließen sich die unterschiedlichen Entfaltungseffizienzen von GFP und GFP_{ssrA} für das VAT-System ebenfalls erklären.

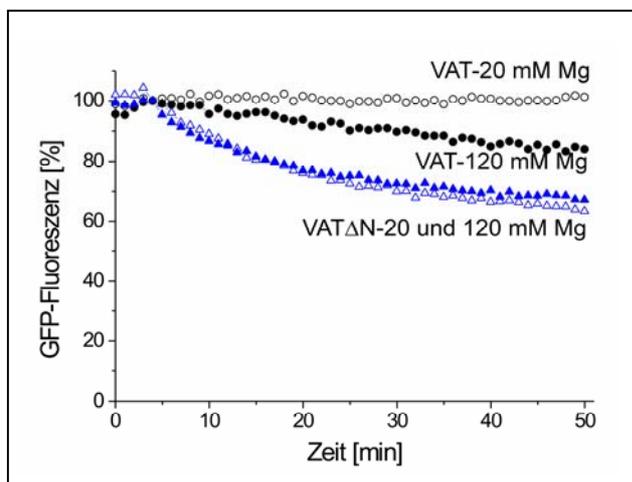


Abb. 12: Entfaltung von GFP durch VAT und VAT Δ N.

Die Entfaltung von GFP durch VAT ist bei 120 mM (\bullet) höher als bei 20 mM Mg^{2+} (\circ). Die Aktivitäten von VAT Δ N sind bei 20 mM (\triangle) und 120 mM Mg^{2+} (\blacktriangle) identisch. Die Entfaltung von GFP ist in allen Fällen schlechter als von GFP_{ssrA}.

In keinem der bisher beschriebenen Versuche hatte eine externe Zugabe der isolierten N-Domäne einen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion. Für die Funktion der N-

Domäne ist ihre kovalente Bindung an den hexameren ATPase-Komplex notwendig.

5.2 Die D1- und D2-Domäne

Da VAT zu den Typ-II-ATPasen gehört, die aus zwei ATPase-Domänen bestehen, können theoretisch beide Domänen an der ATP-Hydrolyse und Substratentfaltung beteiligt sein. Wie unter 3.1.3.5 bereits beschrieben, ist für viele ATPasen der gleichen Klasse bekannt, dass nur eine Domäne aktiv ist. In NSF ist z.B. die zweite Domäne hydrolyseinaktiv, in p97/VCP besitzt die erste Domäne unter physiologischen Temperaturen keine oder eine nur schwach ausgeprägte ATPase-Aktivität.^[65,90] Die Aufgabe der Oligomerbildung wird meistens ebenfalls nur einer Domäne zugeordnet.^[91]

5.2.1 Isolierte Domänen

Um die Domänenfunktionalität in VAT zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Einmal wurde versucht, die einzelnen Domänen isoliert aufzureinigen. VAT-ND1 und

VAT-D1 wurden kloniert, exprimiert und aufgereinigt (4.1.3, 4.2.9 und 4.2.10). Obwohl viele unterschiedliche Aufreinigungsbedingungen getestet wurden, konnte keines der Proteine als Hexamer gewonnen werden. Die Expression gelang in großen Mengen, da hier ebenfalls ein für *E. coli* optimiertes Plasmid verwendet wurde.^[27] Der größte Anteil der ND1- und D1-Proteine wurde aber in Form von Aggregaten („inclusion bodies“) gefunden. Der Oligomerisierungszustand des aufgereinigten löslichen Proteins konnte mittels der nativen PAGE und Gelfiltration auf ca. 2 für VAT-ND1 und auf 3-4 für VAT-D1 bestimmt werden. Strukturelle Untersuchungen mittels EM oder AFM lieferten kein eindeutiges Ergebnis. Aufgrund der uneinheitlichen Daten wurde auf kinetische Untersuchungen der Mutanten verzichtet.

5.2.2 Punktmutanten

Als zweiter Lösungsansatz zur Untersuchung der einzelnen Domänen wurden stark konservierte katalytische Reste in den ATPase-Domänen von VAT mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese ausgetauscht und dadurch inaktiviert (4.1.4). Durch Messungen an den mutierten Proteinen konnte indirekt die Aktivität der korrespondierenden Domäne ermittelt werden (vgl. 4.3.1 und 4.3.2). Die mutierten Reste der Punktmutanten sind in Tab. 14 zusammengestellt und ihre Lokalisation innerhalb eines AAA-Proteins ist in der Kristallstruktur von p97 angedeutet (Abb. 13).

Tab. 14: Katalytische ATPase-Reste in VAT.

Die katalytischen ATPase-Reste in VAT wurden gegen ein Alanin ausgetauscht. Die Bezeichnungen in Klammern werden im Weiteren für die Mutanten verwendet.

	D1-Domäne	D2-Domäne	beide Domänen
Walker-A-Motiv	Lys ²³⁷ (A1)	Lys ⁵¹⁴ (A2)	Lys ^{237/514} (AA)
Walker-B-Motiv	Glu ²⁹¹ (B1)	Glu ⁵⁶⁸ (B2)	Glu ^{291/568} (BB)
Sensor-1-Motiv	Asn ³³⁴ (S1)	Asn ⁶¹² (S2)	Asn ^{334/612} (SS)

Das Walker-A-Lys, das Walker-B-Glu und das Sensor-1-Asn wurden zu Alanin ausgetauscht. Wie unter 3.2.4 ausführlich beschrieben, trägt die Walker-A-Box die Aufgabe der Nukleotidbindung, wobei sie das α - und β -Phosphat des gebundenen Nukleotids über ein Lysin koordiniert. Das Glutamat der Walker-B-Box ist für die ATP-Hydrolyse verantwortlich. Es aktiviert ein Wassermolekül zum nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat des ATP.^[4] Die genaue Funktion von Sensor-1 ist nicht bekannt. Die Koordination des γ -Phosphats durch das Asparagin konnte aber

aus Röntgenstrukturdaten ermittelt und eine Beteiligung an der Nukleotidhydrolyse für viele Proteine ebenfalls bestätigt werden.^[7,10,108]

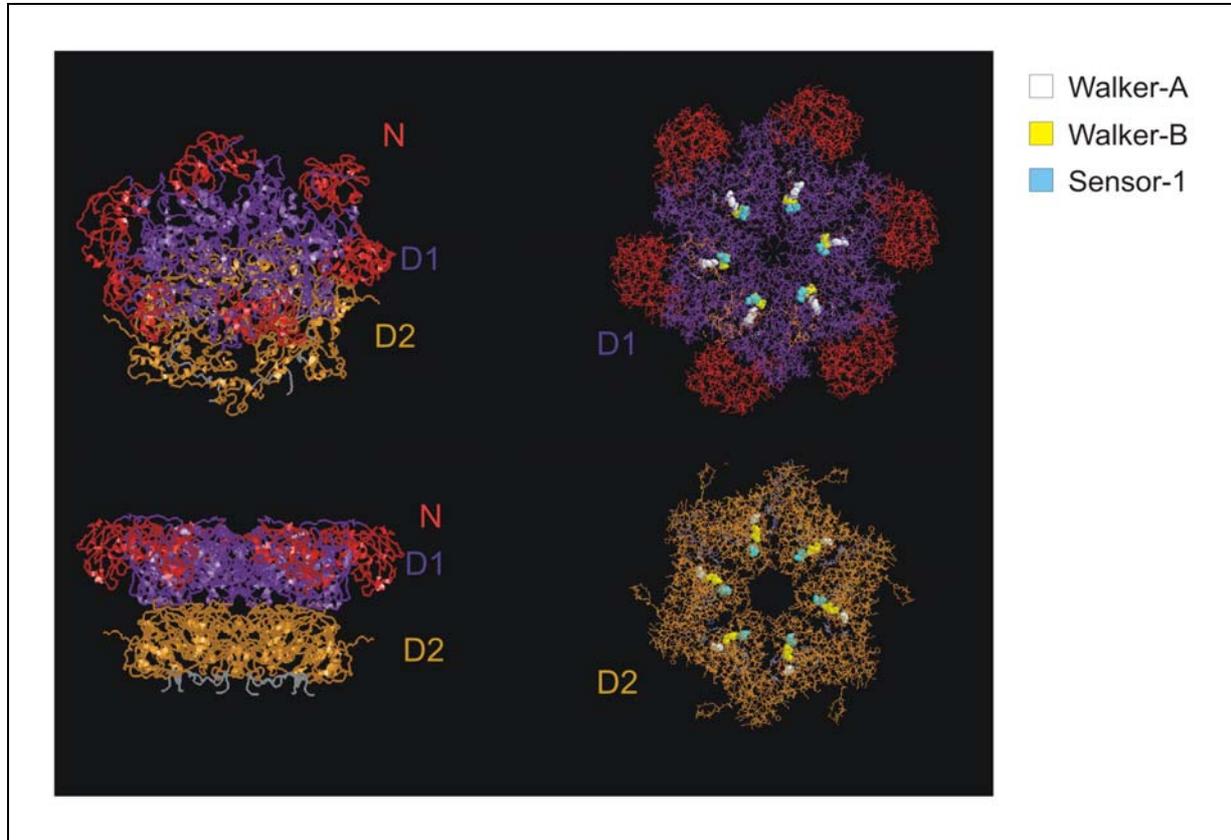


Abb. 13: Katalytische Reste in p97, stellvertretend für AAA-Proteine.

Walker-A-Lys^{251/524} (weiß), Walker-B-Glu^{305/578} (gelb) und Sensor-1-Asn^{347/624} (türkis) wurden in der Kristallstruktur von p97 (N- (rot), D1- (violett) und D2-Domäne (orange)) markiert: gekippte Aufsicht (oben links), Seitenansicht (unten links) von p97 und Aufsicht auf die D1- (oben rechts) bzw. D2-Domäne (unten rechts) in p97 mit den markierten Resten.

Die Punktmutanten tragen entweder eine Mutation in der ersten oder in der zweiten Domäne. Um sicherzustellen, dass die Hydrolyseaktivität durch den Austausch dieser Reste unterbunden ist, wurden als Negativkontrollen Proteine mit Mutationen in beiden Domänen generiert (AA, BB, SS). Daneben wurden zwei weitere Proteine exprimiert, die sowohl die Walker-A- als auch die Walker-B-Mutation in einer Domäne tragen (AB1 und AB2). In diesen Mutanten sollte durch die unterbundene Koordination aller Phosphatgruppen des Nukleotids, die Bindung des ATP und ADP innerhalb einer Domäne komplett verhindert werden.

5.2.3 ATPase-Aktivität

Mit den Einzelpunktmutanten wurden kinetische ATP-Hydrolysemessungen bei 120 mM Mg²⁺ durchgeführt (vgl. 4.3.1) und in Analogie zu VAT nach Michaelis-Menten approximiert (5.1.1). Die Ergebnisse wurden in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 15: Kinetische Konstanten der ATP-Hydrolyse von Einzelpunktmutanten der katalytischen Reste.

*		Walker-A-Lys ²³⁷	Walker-B-Glu ²⁹¹	Sensor-1-Asn ³³⁴
D1- Domäne	V_{max}	< 0.03 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.20 ± 0.01
	K_M	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.50 ± 0.02
	k_{kat}	0.3	3	2
	k_{kat}/K_M	1	11	3
*		Walker-A-Lys ⁵¹⁴	Walker-B-Glu ⁵⁶⁸	Sensor-1-Asn ⁶¹²
D2- Domäne	V_{max}	0.39 ± 0.1	0.83 ± 0.01	0.49 ± 0.01
	K_M	0.10 ± 0.84	0.18 ± 0.01	0.31 ± 0.01
	k_{kat}	3	7	4
	k_{kat}/K_M	33	38	13

* V_{max} in nmol·min⁻¹·μg⁻¹ ATP; K_M in mM ATP; k_{kat} in s⁻¹, k_{kat}/K_M in M⁻¹s⁻¹

Alle Mutanten sind hydrolyseaktiv, beide Domänen von VAT können somit ATP hydrolysieren. Die Walker-B-Mutanten weisen immer eine höhere spezifische ATPase-Aktivität als die Walker-A-Mutanten auf. Die Aktivität der Sensor-1-Mutanten nimmt einen Mittelwert ein. Die Mutationen der ersten Domäne von VAT haben einen stärkeren Effekt auf die Hydrolyse als die der zweiten Domäne. Darunter besitzt die A1-Mutanten die geringste Aktivität von nicht einmal 1% der Wildtyp-Aktivität. Folglich scheint die ATPase in VAT in einer kooperativen Weise abzulaufen, wobei die ATP-Bindung in der ersten Domäne essentiell ist. Die Kooperativität wird dadurch untermauert, dass die Summe der Einzelaktivitäten eines „Mutantenpaares“, wie A1 und A2, B1 und B2 oder S1 und S2, nicht die Hydrolyseaktivität des funktionsfähigen Wildtyp-Proteins erreicht. Kooperativität wird für viele AAA- und AAA⁺-ATPasen diskutiert, darunter auch für die eukaryontischen p97 und für Hsp104.^[65,108] Interessanterweise zeigt aber die D2-Domäne von p97 bei physiologischen Temperaturen von 37°C viel stärkere Hydrolyse als die D1-Domäne. In

der Literatur sind zwei zueinander widersprüchliche Angaben über die Aktivitäten der D1-Mutanten gemacht worden. In einem Fall sind bis auf die B1-Mutante alle anderen p97-Mutanten fast inaktiv, in der zweiten Angabe besitzen zusätzlich die Mutanten A1 und AB1 starke Hydrolyseaktivität.^[65,90] Wird die Temperatur aber erhöht, steigt die Aktivität der ersten Domäne von p97 (Messungen an A2) auf Kosten der zweiten Domäne (A1). Bei der für die VAT-Messungen verwendeten Temperatur von 60°C gleichen sich die ATPase-Aktivitäten beider Domänen an, die p97-D1 zeigt somit, wie VAT-D1, eine starke ATP-Hydrolyse.^[90] VAT ist unter den für p97 physiologischen Temperaturen nicht aktiv, eine ATP-Hydrolyse ist nicht messbar. Die domänenspezifische Aktivitätsverteilung des entfernter verwandten Hsp104 aus Hefe stimmt hingegen auch bei niedriger Temperatur gut mit VAT überein.^[129] Dort zeigt die D1-Domäne eine stärkere Aktivität als die D2-Domäne.

Die Michaelis-Konstanten fallen für die VAT-Mutanten der ersten Domäne kleiner aus als für die der zweiten und zeigen für beide Domänen eine Zunahme in der Reihe von Walker-A über Walker-B zu Sensor-1. Der K_M -Wert der S2-Mutante übersteigt als einziger die Konstante von Wildtyp-VAT. Die Michaelis-Konstante gibt, vereinfacht dargestellt, die Affinität des Enzyms zum Substrat und Produkt wieder. Da die genaue Bedeutung der Konstante für komplexe Reaktionen aber nicht bekannt ist, können keine weiteren Schlüsse aus den Messungen gezogen werden. Für VAT wird die Interpretation zusätzlich dadurch erschwert, dass nicht gesichert ist, ob die Substratbindung (ATP) nur in einer Domäne erfolgt oder vielleicht Mischeffekte von beiden Domänen gemessen werden. Zudem ist nicht bekannt, ob durch die vorgenommenen Mutationen die Freisetzung des ATP-Hydrolyseprodukts (ADP) durch eine gestörte Kooperativität erschwert wird. Die ATP-Hydrolyse muss nicht synchron innerhalb einer Domäne ablaufen (vgl. 3.2.5), was wiederum zur Bestimmung von Mittelwerten führen würde. Die Auswertung kinetischer Daten von Typ-II-ATPasen ist extrem schwierig und wird wahrscheinlich erst nach der Kenntnis aller Einzelschritte von Vorgängen in weniger komplizierten Eindomänen-ATPasen möglich sein. Für diese ATPasen gibt es bisher aber noch kein zuverlässiges Modell. Aus diesen Gründen wurde im Weiteren auf die genaue kinetische Analyse verzichtet. Stattdessen wurden relative ATPase-Aktivitäten, das heißt die Freisetzung von ADP und P_i nach einer definierten Zeit, bestimmt (Abb. 14).

Um eine Vorstellung über die Domänen-Aktivität unter physiologischen Bedingungen zu erhalten, wurde die ATP-Hydrolyse auch bei 20 mM Mg^{2+} vermessen. Für alle Mutanten wurde eine um ca. 90% niedrigere ATP-Hydrolyse als bei Hoch- Mg^{2+} -Bedingungen gefunden. Dabei ergab

sich mit einem Unterschied die gleiche Aktivitätenverteilung; die Aktivität von A2 lag etwas höher als die von B2. Die B2- lässt sich demzufolge stärker mit Mg^{2+} stimulieren als die A2-Mutante, Mg^{2+} scheint somit einen direkten Einfluss auf die katalytischen Reste Lys⁵¹⁴ und/oder Glu⁵⁶⁸ auszuüben.

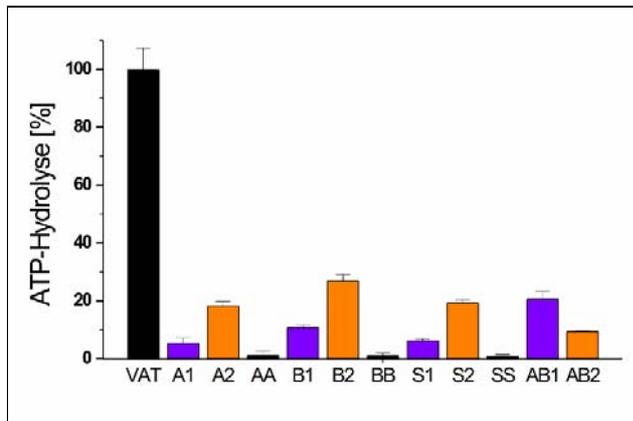


Abb. 14: Relative ATPase-Aktivität von VAT und seinen ATPase-Mutanten.

Die Punktmutanten der katalytischen ATPase-Reste der zweiten Domäne in VAT (orange) zeigen meistens eine höhere ATPase-Aktivität als die der ersten Domäne (violett), wobei keine der Mutanten die Aktivität von Wildtyp-VAT (schwarz) erreicht. Die Daten wurden bei 120 mM Mg^{2+} aufgenommen, vergleichbare Ergebnisse wurden bei 20 mM Mg^{2+} erzielt.

Zusammenfassend wird gefunden, dass die beiden Domänen D1 und D2 in Bezug auf die ATPase-Aktivität miteinander in Verbindung stehen. Wie im unteren Schaubild (Abb. 15) angedeutet, verstärkt die Nukleotidbindung in D1 die Hydrolyse in D2 (Walker-B- aktiver als Walker-A-Mutante). Analog erhöht die Bindung in D2 die Hydrolyse in D1. Dies entspricht einer zueinander sequentiellen ATPase-Aktivität in den beiden Domänen von VAT.

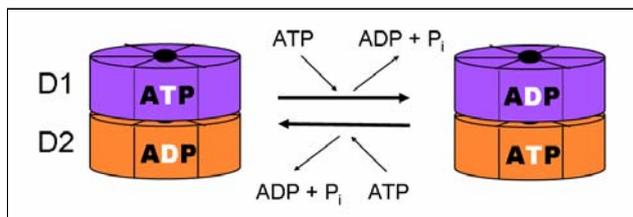


Abb. 15: Schaubild zur Kooperativität in der ATP-Hydrolyse zwischen der D1- und D2-Domäne.

ATP-Hydrolyse in der D1-Domäne (violett) stimuliert die Hydrolyse in der D2-Domäne (orange) und vice versa.

5.2.4 Entfaltungsaktivität

Nachdem bekannt war, dass beide Domänen in VAT ATP hydrolysieren können, stellte sich die Frage, ob auch beide Domänen an der Substratentfaltung beteiligt sind.

Die Mutanten vom vorherigen Kapitel wurden für GFPssrA-Entfaltungsassays unter Hoch- Mg^{2+} -Bedingungen eingesetzt (vgl. 4.3.2). Der Abfall der GFPssrA-Fluoreszenzkurve während der Entfaltungsreaktion wurde gemessen und der Betrag der negativen Steigung (im linearen Bereich) im Balkendiagramm dargestellt.

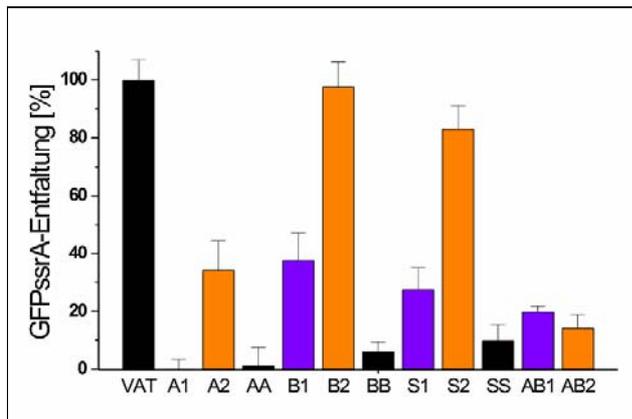


Abb. 16: Relative GFPssrA-Entfaltungsaktivität von VAT und seinen ATPase-Mutanten.

Die Punktmutanten der katalytischen ATPase-Reste der zweiten Domäne in VAT (orange) zeigen meistens eine höhere GFPssrA-Entfaltung als die der ersten Domäne (violett). Die B2- und S2-Mutanten erreichen fast die Aktivität von Wildtyp-VAT (schwarz).

Die Entfaltungsaktivitäten von B2 und S2 sind sehr hoch und erreichen fast das Wildtyp-Niveau. Unter der Berücksichtigung,

dass diese Mutanten höchstens ca. 30% der ATPase-Aktivität von VAT besitzen, arbeiten sie sehr effizient. Die Hydrolyse in VAT-D1 reicht also aus, um ein Substrat schnell und effektiv zu entfalten. Wird die Nukleotidbindung in D2 (A2-Mutante) blockiert, verlangsamt sich die Substratentfaltung auf 40%. Somit verläuft auch die Entfaltung in kooperativer Weise. Bis auf A1 zeigen alle Mutanten der ersten Domäne eine Entfaltungsaktivität, die aber im Vergleich zu D2-Mutanten geringer ausgeprägt ist. Die Effizienz der Entfaltung (ATP-Verbrauch pro entfaltetes GFPssrA) der D1-Mutanten ist aber vergleichbar mit der von D2-Mutanten. Die geringere Entfaltungsaktivität könnte aus der schwächeren ATP-Hydrolyse resultieren. VAT-D2 ist ebenfalls in der Lage, Substrate effektiv zu entfalten. Hingegen kann durch die Mutation von Walker-A-Lys in der ersten Domäne von VAT die Entfaltung komplett unterbunden werden, was mit einer inhibierten Substratinteraktion erklärt werden kann (Abb. 17). Native Gelelektrophorese zeigte, dass GFPssrA von A1 nicht gebunden wird (4.3.5). Für die A1-Mutante von p97 konnte ebenfalls eine gestörte Substratbindung, die über die D1-Domäne vermittelt wird, nachgewiesen werden.^[65]

5.2.5 Hexamerisierung

Alle Mutanten konnten ohne externe Zugabe von Nukleotid als stabile Hexamere aufgereinigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Oligomerisierung von VAT unabhängig von der Nukleotidbindung ist. Versuche zum Nachweis des Nukleotidbindungszustands zeigten, dass z.B. die AA-Mutante kein Nukleotid gebunden hat, trotzdem aber ihre hexamere Struktur beibehält (4.3.4 und 5.5.1). Mit Hilfe der Walker-Mutanten konnte deshalb die Frage nicht beantwortet werden, welche Domäne für die Oligomerisierung von VAT zuständig ist. Die Versuche mit den isolierten ND1- und D1-Domänen (vgl. 5.2.1), die nicht in hexamerer Form erhalten werden konnten, deuten darauf hin, dass die D2-Domäne für die Ausbildung eines stabilen Komplexes notwendig

sein könnte. Für p97 konnten aber sowohl die ND1- als auch die D2-Domäne als stabile Hexamere isoliert werden, was einen Beitrag beider Domänen zur Hexamerisierung zeigt.

5.3 Substratbindung

Wie unter 3.2.7 beschrieben, werden drei verschiedene Bereiche der AAA-ATPasen als Motive für die Substratbindung diskutiert; die N-Domäne, die SSD-Domäne und hydrophobe und/oder aromatische Reste in der zentralen Pore der Proteine (hier als Porenreste bezeichnet).^[85,96,118,119] Für die N-Domäne von VAT konnte indirekt die Interaktion mit denaturiertem Cyclophilin über seine Reaktivierung nachgewiesen werden.^[27] Eine Isolierung von Substraten im Komplex mit VAT oder der isolierten N-Domäne gelang bisher nicht. Hierfür wurde unter anderem VAT oder VAT-N an einer Säulenmatrix immobilisiert und bei unterschiedlichen Temperaturen mit *Thermoplasma*-Zelllysat inkubiert (unveröffentlichte Daten der Abteilung). In keinem Fall konnte eine spezifische Substratbindung erreicht werden. Gelfiltrations- und Immunoprecipitationsversuche mit GFPssrA als Substrat unter Einsatz verschiedener Nukleotide (auch nicht-hydrolysierbarer ATP-Analoga) führten ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis. Als Erklärung hierfür könnte eine sehr kurze Verweildauer des Substrats an der ATPase angeführt werden, die eine Isolierung der VAT-Substrat-Komplexe nicht erlaubt. Interessanterweise konnte aber mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese und anschließender Westernblot-Analyse in Gegenwart von ATP an VAT oder seinen Mutanten gebundenes Substrat nachgewiesen werden (Abb. 17).

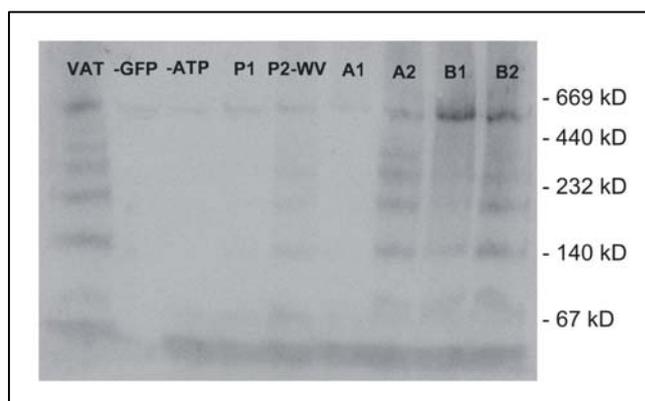


Abb. 17: Westernblot-Analyse der Substratbindung von VAT und seinen Mutanten.

VAT, die Punktmutanten der katalytischen ATPase- und Porenresten wurden mit GFPssrA und ATP inkubiert, mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit einem Anti-ECFP-Antikörper nachgewiesen.

Hierfür wurden VAT und seine Mutanten mit GFPssrA unter ATP-Bedingungen bei

60°C inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Intensität der visualisierten Proteinbanden ist proportional zur Entfaltungsaktivität. Dies kann darauf hindeuten, dass die Substratbindung während der Entfaltung an der ATPase z.B. durch die Abtrennung des Nukleotids „eingefroren“ wird. Die 500-kD-Banden, die dem hexameren VAT entsprechen, sind in den meisten Fällen sehr schlecht sichtbar, die Proteinbanden mit niedrigem Molekulargewicht sind stärker ausgeprägt.

Diese Banden reagieren zum Teil mit dem VAT-Antikörper, weshalb es sich hier um Substratgebundenes VAT handeln könnte, das entweder prozessiert wurde oder in verschiedenen Oligomerisierungszuständen und/oder Konformationen vorliegt. Andererseits könnte es sich um entfaltetes GFPssrA (in unterschiedlichem Aggregationszustand) handeln, das während der Elektrophorese von der ATPase wieder abgelöst wurde.

Die NMR-Spektroskopie eignet sich zur Untersuchung von langen, aber auch von kurzen Wechselwirkungen zwischen Proteinen. In Kooperation mit der Abt. Prof. Kessler, TU, München wurden NMR-Messungen an VAT-N mit unterschiedlichen Substraten wie Barstar, GFPssrA, Kasein oder Ubiquitin durchgeführt. Sie lieferten aber kein positives Ergebnis.

Um die Beteiligung von in AAA- und AAA⁺-ATPasen konservierten Porenresten an der Substratbindung zu untersuchen, wurden Mutationen dieser Reste in VAT vorgenommen (Tab. 16) und die aufgereinigten Proteine kinetisch vermessen (vgl. 4.3.1 und 4.3.2), was im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

5.3.1 Porenmutanten

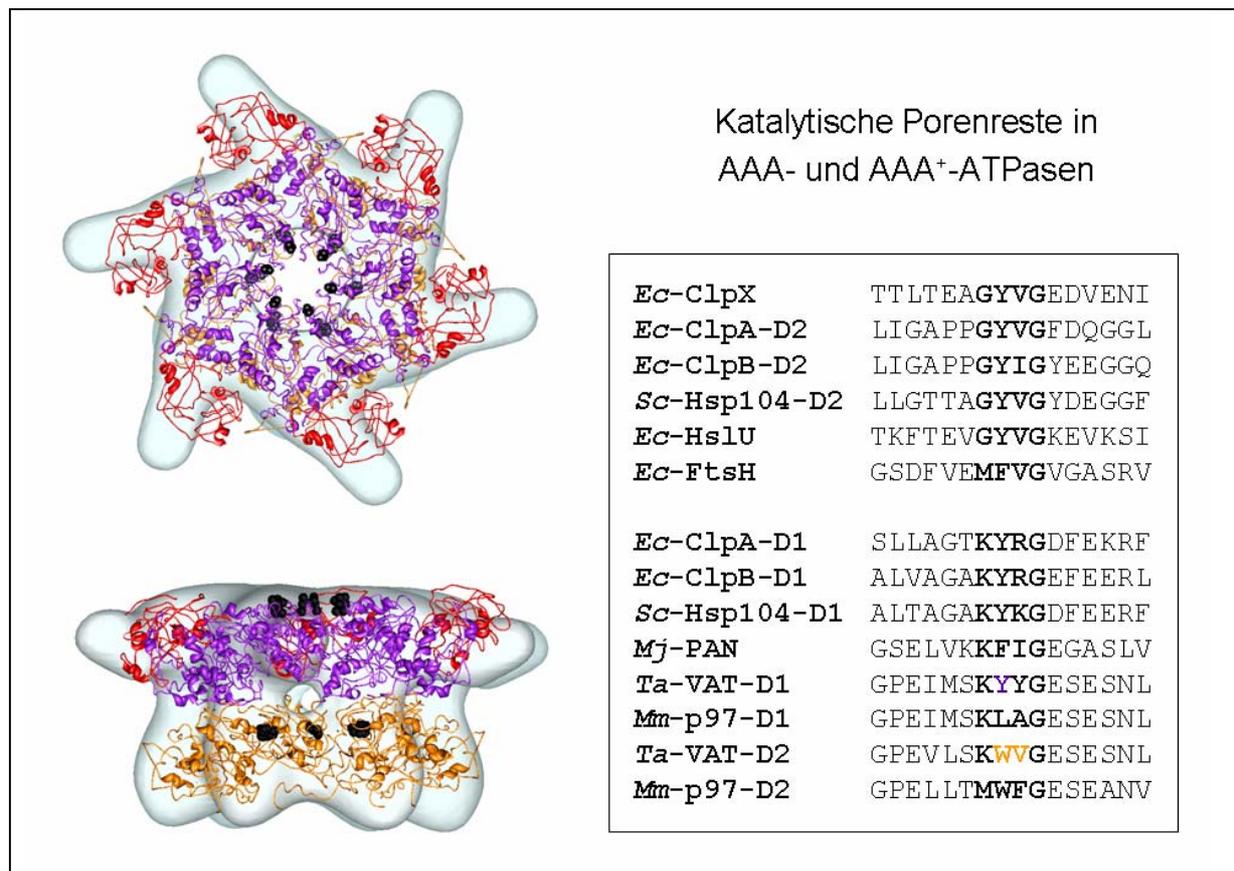
Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen AAA- und AAA⁺-ATPasen zeigten stark konservierte Reste in der Porenregion der Proteine. In diesem Bereich befindet sich eine Sequenz von hydrophoben und/oder aromatischen Aminosäuren, die in zwei charakteristische Klassen eingeteilt werden können; die GYVG- und KabG-Gruppen (a = aromatische, b = basische, aromatische oder hydrophobe AS). Die Verteilung der beiden Klassen auf die verschiedenen ATPasen ist in sich nicht konsistent und es kann keine Regel für ihr Vorkommen abgeleitet werden. Beide Klassen existieren sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten. Die Typ-II-ATPasen können zwei gleiche oder zwei unterschiedliche Sequenzklassen beinhalten. Sowohl VAT als auch p97 tragen in beiden Domänen die KabG-Sequenz. Interessant ist, dass der aromatische Rest in der ersten Domäne von p97 gegen ein Leucin ausgetauscht ist, während VAT in der D1-Pore zwei Tyrosin-Reste besitzt. Der aromatische Rest in der zweiten Domäne ist bei beiden Proteinen ein Tryptophan.

Bei vielen AAA- und AAA⁺-Proteinen konnte nach Mutation der konservierten Reste eine veränderte oder inhibierte Substratinteraktion nachgewiesen werden.^[85,96,101,118,119,121] In VAT wurden deshalb Tyr²⁶⁴ in der ersten und Trp⁵⁴¹ und/oder Val⁵⁴² in der zweiten Domäne gegen ein Alanin ausgetauscht. Tab. 5 enthält eine Zusammenfassung der mutierten Porenreste. In Abb. 18 ist die Lokalisation der Porenreste in der Kristallstruktur von p97 gekennzeichnet.

Tab. 16: Katalytische Porenresten in VAT.

Die katalytischen Porenreste in VAT wurden gegen ein Alanin ausgetauscht. Die Bezeichnungen in Klammern werden im Weiteren für die Mutanten verwendet.

	D1-Domäne	D2-Domäne	beide Domänen
Poren-Motiv	Tyr ²⁶⁴ (P1)	Trp ⁵⁴¹ (P2-W) Val ⁵⁴² (P2-V) Trp ⁵⁴¹ /Val ⁵⁴² (P2-WV)	Tyr ²⁶⁴ /Trp ⁵⁴¹ (PP)

**Abb. 18: Porenreste in AAA- und AAA⁺-ATPasen.**

Sequenzvergleich der Porenregion in AAA- und AAA⁺-ATPasen: stark konservierte Reste sind hervorgehoben, die mutierten Reste in VAT sind violett für D1 (Tyr²⁶⁴) und gelb für D2 (Trp⁵⁴¹ und Val⁵⁴²) markiert (rechts). Auf Kryo-EM-Daten basierende Oberflächendarstellung von VAT zusammen mit der Röntgenkristallstruktur von p97 (links). Leu²⁷⁸ in p97-D1 (schwarz in violetter Struktur) und Trp⁵⁵¹ in p97-D2 (schwarz in orangener Struktur) wurden markiert.

In Analogie zu p97 befindet sich der P1-Rest bei VAT am Eingang in den zentralen Kanal der D1-Domäne, der P2-Rest hingegen ist im Inneren der Pore lokalisiert, und zwar an der Kontaktfläche der beiden Domänen D1 und D2 (Abb. 18). Der aromatische Tyrosin-Rest in der ersten

Domäne von VAT ist für die Entfaltung von GFPssrA essentiell. Eine Mutation an dieser Stelle führt zur kompletten Unterbindung der Substratinteraktion und damit zur Verhinderung der Entfaltung (vgl. P1 und PP in Abb. 19). Der Austausch des aromatischen Tryptophan-Restes der zweiten Domäne beeinflusst die GFPssrA-Entfaltung zwar auch, das Substrat wird aber weiterhin entfaltet, jedoch mit einer verminderten Reaktionsgeschwindigkeit (P2-W). Dies lässt auf eine Beteiligung dieses Restes an der Substratinteraktion schließen, d.h. für die Entfaltung wird das Substrat durch die zentrale Pore von VAT transloziert. Die Mutation in P2-Valin hat allein keine Auswirkung auf die Substratentfaltung. Interessanterweise führt eine simultane Entfernung beider Reste in der zweiten Domäne (P2-WV) aber zu einer stark verminderten Aktivität, was den postulierten Translationsmechanismus durch die Pore weiter untermauert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das P2-Trp der eigentliche katalytische Rest für eine Substratbindung ist. Wird dieser Rest eliminiert, interagiert VAT mit dem Substrat über den benachbarten Valin-Rest. Wenn dieser aber ebenfalls entfernt wird, kann das Substrat nicht mehr in der Pore gebunden und aktiv hinein transportiert und damit entfaltet werden.

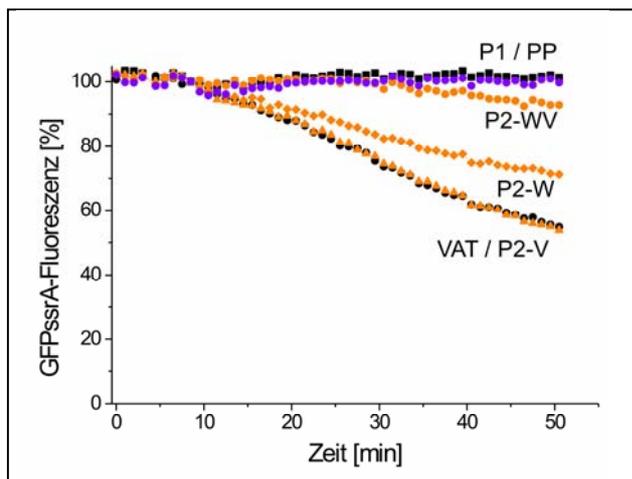


Abb. 19: GFPssrA-Entfaltung durch VAT und seine Porenmutanten.

Proteine, die eine Porenmutation in der D1-Domäne tragen, wie P1 (●) und PP (■) können GFPssrA nicht mehr entfalten. Mutation von Val⁵⁴² in der D2-Pore (▲) hat keinen, Mutation von Trp⁵⁴¹ (◆) nur einen mäßigen Einfluss auf die Entfaltung. Simultane Mutation beider Reste (●) inhibiert die Entfaltung auf < 20% der Wildtyp-Aktivität (●).

Um sicherzustellen, dass die verminderte Entfaltungsaktivität der Mutanten nicht aus einer verminderten ATP-Hydrolyse resultierte,

wurden alle Mutanten auf ihre ATPase-Aktivität getestet (Abb. 20). Erstaunlicherweise ist die ATP-Hydrolyse von Mutanten, die anstelle von P1-Tyr oder P2-Trp ein Alanin tragen (P1, P2-W, P2-WV und PP), viel höher als von Wildtyp-VAT. Dieses Phänomen kann nicht genau erklärt werden, es deutet aber auf eine Kommunikation dieser Reste mit den katalytischen ATPase-Zentren in VAT hin. Es ist vorstellbar, dass die Information über Substratbindung an diesen Porenresten an die ATPase-Unterdomänen weitergegeben und die ATP-Hydrolyse dadurch stimuliert wird. Für unser Modells substrat GFPssrA konnte dies aber nicht bestätigt werden, da we-

der die Aktivität von Wildtyp-VAT noch einer der Mutanten durch die Gegenwart von GFPssrA beeinflusst werden (vgl. 4.3.1).

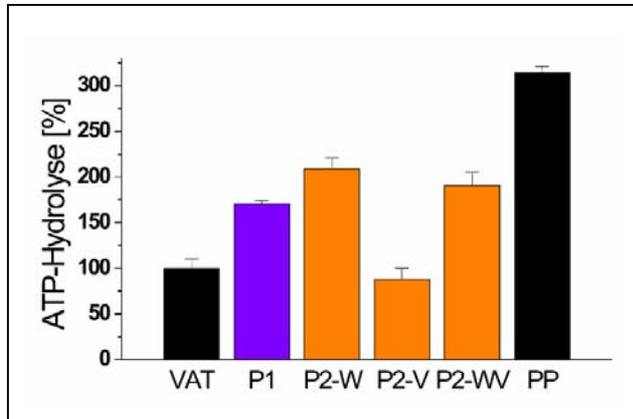


Abb. 20: ATPase-Aktivität von VAT und seinen Porenmutanten.

Die Punktmutanten der Porenreste, in denen Tyr²⁶⁴ und/oder Trp⁵⁴¹ (violett in der D1-, orange in der D2 und schwarz in beiden Domänen) eliminiert wurden, zeigen im Vergleich zu VAT (schwarz) erhöhte ATPase-Aktivität.

Für Chaperone wie GroEL ist allgemein bekannt, dass sie über hydrophobe Bereiche mit den exponierten hydrophoben Res-

ten entfalteter Substrate interagieren.^[137] Die gleiche Wechselwirkung könnte ebenso bei Entfaltungsmaschinen wie VAT für die Substratinteraktion zuständig sein. Das P1-Tyr könnte am hydrophoben ssrA-Tag von GFPssrA angreifen und ihn dann an das P2-Trp übergeben. Dass natives GFP ebenfalls durch VAT entfaltet wird, steht nicht im Widerspruch zu diesem Mechanismus, da die neun nativen Reste, die aus dem GFP-Fass ragen, überwiegend hydrophob sind.

5.3.2 Visualisierung der Substratbindung

Um die Theorie der Entfaltung während der Translokation durch die zentrale Pore von VAT zu bestätigen, wurde versucht, an VAT gebundenes Substrat mit Hilfe des Elektronenmikroskops sichtbar zu machen. Als Motivation dienten bereits durchgeführte Studien an ClpP im Komplex mit ClpA und/oder ClpX, bei denen das Substrat in der Pore von ClpP sichtbar ist.^[16,17,138]

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Proben von VAT, VAT Δ N und von den Mutanten P2-W und BB wurden durchgeführt. VAT Δ N wurde verwendet, weil die N-Domäne große Affinität zu vielen Oberflächen aufweist und VAT deshalb schwierig in geringen Konzentrationen zu handhaben ist. Die P2-W-Mutante zeigt eine verlangsamte Entfaltungsaktivität, was die Chance zur Visualisierung des Substrats an der ATPase erhöhen könnte. Für die BB-Mutante zeigten kürzlich veröffentlichte Studien mit ClpB eine „Substrat-Fallenwirkung“, so dass stabile Substrat-ClpB-Komplexe isoliert werden konnten.^[139]

VAT, VAT Δ N und die zwei Punktmutanten wurden unterschiedlich lange unter Variation von Pufferbedingungen und Temperaturen mit GFPssrA inkubiert. Nach der elektronenmikroskopischen Aufnahme der Partikel erfolgte die Auswertung unter Verwendung der TOM-Software für

Matlab (THE MATHWORKS, INC.). Dazu wurden zunächst 64 VAT-Partikel manuell ausgewählt, aufeinander aligniert und zentriert. Nach Verfeinerung der Alignierung diente diese erste Mittelung als Matrize zur automatischen Partikelsuche in den Aufnahmen von VAT- und seinen Mutanten. Nach einer Alignierungsverfeinerung wurden die Partikelmittelungen von Proben, die GFPssrA enthielten mit Mittelungen GFPssrA-freier Proben verglichen. Als zusätzliche Standards dienten GFPssrA-haltige Proben, die ohne ATP inkubiert wurden. Da durch den Vergleich der EM-Mittelungen keine Unterschiede festzustellen waren, wurde eine Klassifizierung der Partikel mit der multivariaten statistischen Analyse („multivariant statistical analysis“, MSA) durchgeführt. Hierbei werden die Partikel durch eine Eigenwertzerlegung in sog. selbstähnliche Klassen aufgeteilt und die erhaltenen Eigenwerte beschreiben die wesentlichen Hauptkomponenten und Unterscheidungsmerkmale zwischen den vorhandenen Klassen. Die Visualisierung der Klassen erfolgte mit der EM-Software der Abteilung.

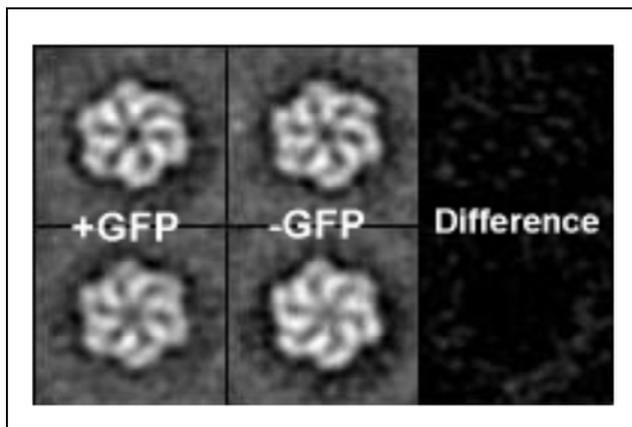


Abb. 21: EM-Mittelungen von VAT Δ N mit und ohne GFPssrA.

EM-Mittelungen von VAT Δ N nach Inkubation mit (links) und ohne GFPssrA (Mitte) führten zu keiner Strukturänderung des Proteins, noch konnte das Substrat visualisiert werden, was aus den Differenzbildern (rechts) deutlich wird. In beiden Fällen treten VAT Δ N-Spezies auf, bei denen die Pore offen (oben) oder geschlossen (unten) erscheint.

Bis auf die VAT Δ N-Proben konnten keine signifikanten Unterschiede der Partikel

festgestellt werden. In den VAT Δ N-Aufnahmen wurden Proteine mit offener und geschlossener Pore identifiziert (Abb. 21). Beide Partikelklassen traten aber sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von GFPssrA auf, weshalb die Änderung des Porendurchmessers wohl nicht auf die Interaktion mit dem Substrat zurückzuführen ist.

Die Vermutung, dass schon aus *E. coli*-Lysat Substrate eingefangen würden und deshalb der Vergleich zu GFPssrA-gebundenen VAT-Partikeln zu keiner signifikanten Veränderung führte, konnte nicht bestätigt werden. Zur Entfernung eines eventuell gebundenen Substrats wurden VAT und BB mit Harnstoff denaturiert und anschließend gegen einen substratfreien Puffer dialysiert, was zu ihrer Rückfaltung führte, und elektronen- bzw. rasterkraftmikroskopisch vermessen.

Als weitere Strategie wurde der isolierte *ssrA*-Tag mit Gold markiert und anstelle von GFP*ssrA* mit VAT und VAT Δ N inkubiert. Eine Inhibierung der GFP*ssrA*-Entfaltung durch das *ssrA*-Peptid wurde zuvor für beide Proteine gefunden (Abb. 22).

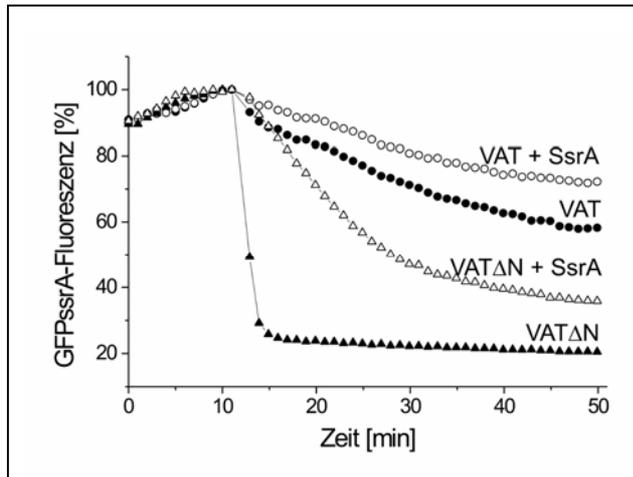


Abb. 22: Inhibierung der GFP*ssrA*-Entfaltung von VAT und VAT Δ N durch das *ssrA*-Peptid.

Die GFP*ssrA*-Entfaltung durch VAT (●) und VAT Δ N (▲) wird in Gegenwart vom *ssrA*-Peptid inhibiert (VAT (○) und VAT Δ N (△)).

Als Goldmarker wurden einerseits selbst bereitete kolloidale Goldpartikel von ca. 5 nm Durchmesser (vgl. 4.4.1.1) verwendet. Andererseits wurde das kommerziell erworbene Nanogold[®] der Firma NA-

NOPROBES mit einem Durchmesser von 1.4 nm eingesetzt (4.4.1.2), das nur eine einzige Bindungsstelle besitzt und deshalb die Bindung nur eines Substrats pro Goldpartikel garantiert.

5.3.2.1 Kolloidales Gold

Das kolloidale Gold wurde nach der Herstellung mit einem Überschuss an Substrat inkubiert, um eine Gold-Substrat-Bindung zu erreichen. Nach anschließender Zentrifugation wurde das so erhaltene Gold-*ssrA*, das frei von isoliertem Substrat und nicht umgesetztem Gold war, bei unterschiedlichen Temperaturen und Inkubationszeiten und in verschiedenen Verhältnissen mit VAT, VAT Δ N oder der BB-Mutante zur Reaktion gebracht (4.4.1.1). Die Reaktionsgemische wurden auf ein Kupfernetz aufgebracht, mit Uranylacetat negativ kontrastiert, um im EM analysiert zu werden. Der größte Anteil der Goldpartikel wurde in Form von Aggregaten gefunden, in denen nicht nachzuweisen war, in wieweit das Gold an einzelne ATPase-Moleküle gebunden war. Daneben wurden VAT- oder VAT-Mutanten-Moleküle gefunden, von denen aber nur wenige mit Gold beladen waren (Abb. 23). Diese wenigen Partikel besaßen eine ungleichmäßige Struktur und einen vergrößerten Durchmesser. Hierbei könnte es sich um mehrfach mit VAT belegtes Gold handeln. Das ist möglich, da die Oberfläche eines Goldpartikels mit dem *ssrA*-Peptid abgesättigt sein sollte und so viele VAT-Moleküle gleichzeitig an das Gold binden können. Andererseits könnte eine Bindung der großen Goldpartikel zu einer denaturierenden Vergrößerung von VAT geführt haben, was eventuell zusätzlich hydrophobe Bezirke freisetzte und weitere VAT-

Moleküle binden ließ. Eine Abhilfe sollte die Verwendung eines Substrat-Cystein- oder Substrat-DTT-Gemisches bringen, welche statt der reinen ssrA-Peptidlösung mit dem kolloidalen Gold inkubiert wurden und eine geringere Belegung des Goldes mit dem ssrA-Peptid erreichen sollte. Dies führte aber ebenfalls zu keinen definierten VAT-Gold-Komplexen.

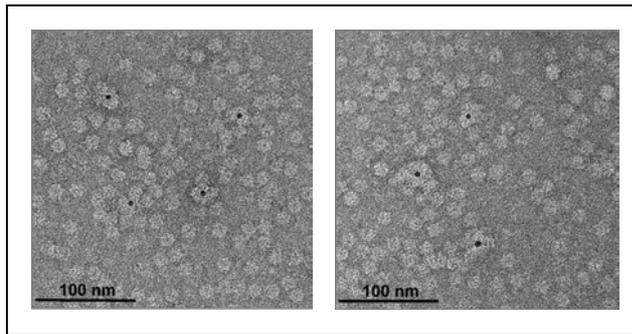


Abb. 23: EM-Aufnahmen von VAT und VAT Δ N nach Inkubation mit kolloidalem Gold-ssrA.

Nur wenige VAT- (links) oder VAT Δ N-Partikel (rechts) haben mit dem Gold-ssrA reagiert. Diese Partikel weisen einen größeren Durchmesser als nicht umgesetzte Proteine auf.

5.3.2.2 Nanogold[®]

Alternativ wurde statt des kolloidalen Gold Nanogold[®] (NANOPROBES) verwendet (4.4.1.2). Letzteres hat den Vorteil, dass es einen kleineren Partikeldurchmesser besitzt und deshalb den VAT-Komplex weniger stören sollte. Außerdem kann nur ein Substratmolekül an ein Nanogold-Partikel gebunden werden, eine substratvermittelte Mehrfachbindung von VAT an Gold kann somit ausgeschlossen werden. Um das Nanogold-ssrA zu erhalten, wurde Nanogold mit dem ssrA-Peptid im Überschuss inkubiert und zur Abtrennung von nicht umgesetzten Bestandteilen über Gelfiltration aufgereinigt. Das Arbeiten mit Nanogold erwies sich aber als nicht vorteilhaft für die Reaktion mit VAT, da wegen seiner empfindlichen organischen Matrix eine Inkubation über 37°C vom Anbieter nicht empfohlen wurde. VAT besitzt aber unter niedrigen Temperaturen kaum ATPase-Aktivität und deshalb wahrscheinlich auch schlechtere Substratbindungseigenschaften, weil das Substrat ohne ATP-Hydrolyse nicht in die ATPase transloziert werden kann. Zudem war das Nanogold nach negativer Kontrastierung sehr schlecht oder gar nicht im EM sichtbar. Ein Arbeiten mit VAT unter geringen Konzentrationen stellt, wie oben beschrieben, zusätzlich ein Problem dar, weshalb auf Kryo-EM-Analysen verzichtet wurde. Deshalb wurde versucht, das VAT-Nanogold-ssrA-Gemisch mit dem Rasterkraftmikroskop („atomic force microscope“, AFM) abzubilden. In der Rasterkraftmikroskopie wird mit einer sehr feinen Spitze die Oberfläche einer Probe abgetastet. Die Wechselwirkung zwischen der Spitze und der Probe wird über den Federbalken (Cantilever), auf den ein Laserstrahl fokussiert ist, direkt in ein Höhensignal umgewandelt. Mit dem Rasterkraftmikroskop können kleine Höhenänderungen von < 1 nm

aufgelöst werden, die laterale Auflösung einer Messung unter wässrigen Bedingungen kann bis ca. 2 nm realisiert werden, wobei die Eigenschaften der verwendeten Spitze neben der Stabilität der Probe der limitierende Faktor sind.

Ein eindeutiges Ergebnis konnte aber auch hier nicht erhalten werden. Nur ein geringer Anteil an VAT-Molekülen (eines von ca. 200) enthielt, unabhängig von dem eingesetzten Verhältnis zwischen VAT und Substrat, eine Erhöhung von ca. 1-2 nm, was dem Nanogold-ssrA in etwa entsprechen würde. Bei solch geringen Ausbeuten könnte es sich um eine Verunreinigung der Probe handeln, außerdem können daraus keine Statistiken über die Lokalisation des Substrats in der ATPase abgeleitet werden.

5.4 Interaktion zwischen VAT und dem 20S-Proteasom

Das 20S-Proteasom ist in allen drei Domänen des Lebens, den Eukaryonten, Eubakterien und Archaeobakterien, vertreten, wo es für den Abbau von Proteinen verantwortlich ist (vgl. 3.1.3.4). Da es aber nur entfaltete Proteine abbauen kann, benötigt es die Zusammenarbeit mit weiteren Enzymen, die Substrate erkennen, binden und vielleicht sogar aktiv in das 20S-Proteasom translozieren können. In Eukaryonten übernehmen die 19S-Kappenkomplexe diese Aufgaben, die zusammen mit dem 20S- das 26S-Proteasom bilden und unter anderem aus sechs verschiedene AAA-ATPasen bestehen. In den meisten Archaeen konnte ein als PAN bezeichnetes Protein nachgewiesen werden, welches homolog zu den proteasomalen AAA-ATPasen ist und Proteine entfalten kann.

Im Genom von *Thermoplasma acidophilum* konnte dagegen keine Sequenz für PAN gefunden werden. VAT ist dort eine von insgesamt nur zwei AAA-ATPasen. Da VAT ebenfalls an der Proteinentfaltung beteiligt ist, wird schon lange darüber spekuliert, dass es die Rolle des Proteasomenaktivators in *Thermoplasma* innehat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese vermeintliche Interaktion von VAT mit dem 20S-Proteasom mit unterschiedlichen Methoden analysiert.

5.4.1 Biochemische Studien

Die zuvor beschriebenen Entfaltungsassays von GFPssrA oder GFP mit VAT und seinen Mutanten wurden immer in Gegenwart von *Thermoplasma*- $\Delta\alpha$ -20S-Proteasom durchgeführt. In dieser Mutante wurden elf N-terminale Reste der α -Untereinheit entfernt, was zu einer permanenten Porenöffnung des Proteasoms und in der Folge zu einer stärkeren Proteolyseaktivität führt. In Anwesenheit des Proteasoms wird die durch VAT vermittelte GFP-Entfaltung verstärkt (Abb. 24,

vgl. 4.3.2). Die Verwendung von Wildtyp-20S-Proteasom beschleunigt die Reaktion zwar auch, nicht aber in dem Maße wie die $\Delta\alpha$ -Mutante.

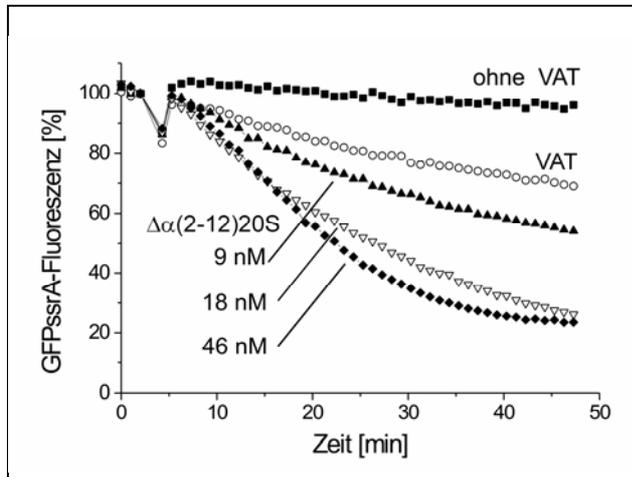


Abb. 24: 20S-Proteasom beschleunigt die Entfaltung von GFPssrA durch VAT.

Die GFPssrA-Entfaltung durch VAT wird in Gegenwart von *Thermoplasma* $\Delta\alpha$ -20S-Proteasomen beschleunigt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Wildtyp-20S-Proteasom erreicht.

Die Gegenwart von 20S-Proteasom wirkt sich positiv auf die Entfaltungsaktivität von VAT aus. Der genaue Grund dafür ist unklar, denn die Substratentfaltung ist direkt, ohne einen nachgeschalteten Substratabbau, schwierig zu ermitteln.

In Anwesenheit von Guanidiniumchlorid- oder Salzsäure-entfaltetem GFPssrA wird die Entfaltung von intaktem Substrat stark inhibiert, was sich in einem verlangsamten Abfall der GFPssrA-Fluoreszenz bemerkbar macht (Abb. 25, vgl. 4.3.2).

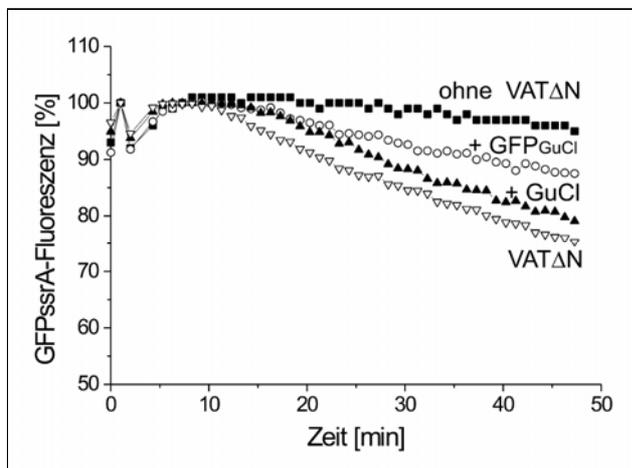


Abb. 25: Entfaltetes Substrat inhibiert die Entfaltung von GFPssrA durch VAT Δ N.

Die Entfaltung von GFPssrA durch VAT Δ N wird durch chemisch (durch Guanidiniumchlorid) denaturiertes GFPssrA verlangsamt. VAT Δ N wurde wegen der besseren Entfaltungsaktivität anstelle von VAT verwendet.

Im Laufe der Reaktion konkurriert wahrscheinlich bereits entfaltetes mit nicht entfaltetem GFPssrA um die aktiven Zentren der ATPase und verlangsamt dadurch die

Gesamtreaktion. Das Proteasom entfernt das entfaltete Substrat aus dem Reaktionsgleichgewicht, verschiebt dieses auf die Seite der entfaltenen Substrate und beschleunigt damit die Gesamtreaktion. Diese Annahme erklärt ebenfalls, warum die Entfaltung in Gegenwart von $\Delta\alpha$ -20S-Proteasom schneller verläuft; die Mutante ist proteolyseaktiver als das Wildtyp-Proteasom und entfernt deshalb das denaturierte Substrat schneller aus der Reaktionslösung.

Für PAN aus *Methanococcus jannaschii* wird die Öffnung des zentralen Kanals im 20S-Proteasom beschrieben, der durch die im $\Delta\alpha$ -20S-Proteasom fehlenden elf Reste verdeckt wird.^[40] Säuredenaturiertes GFPssrA konnte von Wildtyp-20S-Proteasom, im Gegensatz zum $\Delta\alpha$ -20S-Proteasom, unter den verwendeten Bedingungen nicht abgebaut werden und erst die Gegenwart von PAN bewirkte einen Substratabbau. PAN soll die Pore im Proteasom öffnen und das Substrat aktiv hinein translozieren. Unter den für VAT optimalen Bedingungen (auf 60°C erhöhte Temperatur, hohe Mg^{2+} -Konzentration) wurde aber denaturiertes GFPssrA direkt, ohne eine aktive ATPase, auch vom Wildtyp-Proteasom abgebaut. Eine Proteasom-Aktivierung oder eine aktive Translokation des Substrats waren deshalb nicht notwendig. Die Zugabe von VAT beschleunigte den Abbau von denaturiertem Substrat nicht. Weitere Studien unter Verwendung unterschiedlicher Nukleotide, u.a. von AMP-PNP, das die Interaktion von PAN und 20S-Proteasom stabilisieren soll, lieferten für VAT keine Hinweise auf eine aktive Translokation des GFPssrA-Substrats in das Proteasom.^[25,40]

Für Translokationsstudien an Proteasen wird oft fluoreszenzmarkiertes Kasein (FITC-Kasein) verwendet. α - und β -Kaseine bilden den Hauptproteinbestandteil der Milch und haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 24 kD. Da α - und β -Kasein keine definierte Tertiärstruktur besitzen, werden sie von ATP-abhängigen Proteasen als „ungefaltet“ erkannt und abgebaut. ClpAP wurde anhand dieser Aktivität entdeckt, isoliert und benannt (*clp* = „caseinolytic protease“).^[140,141] Über Fluorescein-markiertes Kasein kann der Proteinabbau kontinuierlich im Spektrofluorometer verfolgt werden.^[142,143] Diese Methode beruht auf einem internen Quenching, dem die Kasein-gebundenen Fluorescein-Moleküle durch ihre räumliche Nähe unterliegen. Durch Proteolyse wird Kasein in Peptide zerlegt und die dadurch voneinander isolierten Fluorescein-Moleküle können zur Fluoreszenz angeregt werden.

Wildtyp-20S-Proteasom wurde in Gegenwart verschiedener VAT-Konzentrationen mit FITC-Kasein inkubiert und die Abbaureaktion wurde kontinuierlich über die Fluoreszenzdetektion beobachtet. Die Versuche lieferten für das VAT-System aber keine eindeutigen Ergebnisse. Der Abbau von Kasein wurde durch VAT nicht verstärkt. Interessanterweise wurde Kasein aber in Gegenwart von VATAN schneller abgebaut, was für eine aktive Translokation in das Proteasom spricht.

Für eine Translokation des Substrats wäre ein direkter Kontakt von der ATPase und des Proteasoms notwendig. Deshalb wurde auf verschiedene Arten versucht, diese Interaktion nachzuweisen. Doch weder Gelfiltrationsanalysen noch native Gelelektrophorese oder Immunopräzipitation

unter Verwendung unterschiedlicher Nukleotide lieferten Hinweise auf eine solche Interaktion. Die Verwendung von chemischen Crosslinkern, die durch eine chemische Bindung kurze Kontakte zwischen beiden Proteinen „einfrieren“ sollten, um sie mit oben genannten biochemischen Methoden nachweisen zu können, zeigte ebenfalls keine Komplexbildung zwischen VAT und dem 20S-Proteasom.

Im Weiteren wurden mikroskopische und spektroskopische Methoden eingesetzt, um eine Interaktion zu detektieren, darunter EM, AFM und die FCS.

5.4.2 Elektronen- (EM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Unter Verwendung der Elektronenmikroskopie konnten bereits die Strukturen von sowohl eukaryontischen als auch prokaryontischen Proteolyse-Systemen dargestellt werden.^[15,19,35,37]

Das eukaryontische 26S-Proteasom konnte als relativ stabiler Komplex isoliert und elektronenmikroskopisch untersucht werden. In EM-Aufnahmen sind immer drei unterschiedliche Spezies zu sehen; das 20S-Proteasom alleine und mit einer oder zwei 19S-Kappen komplexiert. Daneben konnte das 20S-Proteasom auch mit seinen Aktivatoren PA200 und PA28 im Komplex nachgewiesen werden.^[37,144-148]

Die prokaryontischen Clp-Proteasen bilden stabile Komplexe aus der zentralen ClpP-Protease und den flankierenden AAA⁺-ATPasen ClpA bzw. ClpX, wobei eine oder zwei ClpA-, eine oder zwei ClpX- oder je eine der unterschiedlichen ATPasen gleichzeitig an das ClpP andocken.^[16,138]

Sowohl im 26S-Proteasom als auch im bakteriellen Clp-System kommt es zu einem Symmetriebruch zwischen der heptameren Protease und der hexameren ATPase. Dieser scheint aber für die Ausbildung einer stabilen Interaktion keine Rolle zu spielen.

Bisher konnte elektronenmikroskopisch kein Komplex zwischen dem 20S-Proteasom und einer prokaryontischen ATPase nachgewiesen werden. Frühere unveröffentlichte Studien unserer Abteilung zeigten einen Kontakt zwischen VAT Δ N und dem 20S-Proteasom über jeweils eine Proteinkante, die wegen ihrer Form als „open can“-Strukturen bezeichnet wurden. Für diese Untersuchungen wurde statt VAT die Mutante VAT Δ N verwendet, weil, wie bereits beschrieben, die Handhabung von VAT in geringen Konzentrationen sehr schwierig ist. Zudem werden von VAT keine Seitenansichten in den EM-Aufnahmen beobachtet, die für diese Analysen hilfreich wären. Die Ausbeuten der „open can“-Struktur waren sehr gering und änderten sich nicht in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen, wie z.B. der Zugabe von Substrat. Diese Ergebnisse ließen

sich nicht reproduzieren, weshalb eine zufällige Anordnung der beiden Proteine auf dem Kohlefilm nicht ausgeschlossen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteasom-VAT- und Proteasom-VAT Δ N-Proben unter Variation der Reaktionsbedingungen inkubiert und elektronenmikroskopisch analysiert (4.4.1). In keiner der Proben konnten Hinweise auf eine räumliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen gefunden werden. Da bereits beschriebene biochemische Nachweise keinerlei Anzeichen für eine solche Interaktion ergaben, war das negative Ergebnis der EM-Analyse nicht sehr überraschend. Sowohl für das eukaryontische 26S-Proteasom als auch für die prokaryontischen Clp-Proteasen gibt es eine Reihe von eindeutigen biochemischen Belegen für einen stabilen Komplex.^[15-17,19,35]

Ein interessantes Phänomen, das bei diesen Untersuchungen beobachtet wurde, war die Kettenbildung von VAT Δ N. Nach einer Inkubation > 5 min bei $\geq 45^\circ\text{C}$ formten VAT Δ N-Moleküle unabhängig von den gewählten Reaktionsbedingungen (vgl. 4.4.1) Ketten unterschiedlicher Länge. Als Vermutung lag nahe, dass verschiedene VAT Δ N-Moleküle auf eine Substrat-Polypeptidkette eingefädelt seien. Die Kettenbildung trat aber auch in Abwesenheit von GFPssrA auf. Obwohl beide Proteine in höher oligomeren Komplexen vorkommen, was während der Aufreinigung über die Gelfiltration beobachtet wurde, konnte für VAT eine Kettenformation nicht gefunden werden. Ein Einfluss der Oligomerisierung bei VAT Δ N auf die Aktivität kann aber ausgeschlossen werden, da Messungen über einen längeren Zeitraum (> 5 min) zu keiner Aktivitätsänderung führten. Daneben wurde versucht, das 20S-Proteasom mit VAT oder VAT Δ N mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) abzubilden (4.4.2). Durch die Oberflächeneigenschaften des als Unterlage für die Proben verwendeten Glimmers bildeten die Proteine zwei Schichten; einen Proteasomen-„Teppich“ als erste Schicht, an die VAT bzw. VAT Δ N in zweiter Schicht adsorbierten. Die Ausbildung der Schichten resultierte wahrscheinlich aus unterschiedlichen Wechselwirkungskräften zwischen dem hydrophilen Glimmer und den Proteinen. Deshalb konnte das AFM nicht für die Beantwortung der Fragestellung nach einem stabilen Komplex eingesetzt werden. Bestünde ein räumlicher Kontakt zwischen VAT und dem Proteasom, würde er wahrscheinlich durch die hohe Affinität vom Proteasom zur Oberfläche zerstört werden. Austausch von Glimmer gegen hydrophobes HOPG (hochorientierter pyrolytischer Graphit) als Oberflächenmaterial resultierte in einer schlechten Absorption beider Proteine.

5.4.3 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Mit allen bisher verwendeten Methoden hätte nur eine starke Interaktion zwischen dem Proteasom und VAT nachgewiesen werden können. Die Zusammenarbeit der beiden Proteine kann aber auch über eine transiente Wechselwirkung erfolgen, in der das entfaltete Substrat von der ATPase zum Abbau an das Proteasom weitergereicht wird. Für den biochemischen Nachweis sind zudem große Mengen an Komplexen notwendig.

Zur Untersuchung von transienten Wechselwirkungen an Einzelmolekülen wird die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) eingesetzt. Diese Methode misst im Gegensatz zu anderen Fluoreszenzspektroskopietechniken nicht die Emissionsintensität von Fluoreszenzstrahlung, sondern spontane Intensitätsfluktuationen, die durch kleine Abweichungen der Bewegungen der Proteine vom thermischen Gleichgewicht auftreten. Im Allgemeinen lassen sich mit der FCS alle physikalischen Parameter bestimmen, die eine solche Fluktuation der Fluoreszenz hervorrufen. Die FCS könnte somit zur Analyse von lokalen Konzentrationen, Beweglichkeitskoeffizienten oder charakteristischen Umsatzkonstanten von inter- und intramolekularen Reaktionen von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen in nanomolaren Konzentrationen hinzugezogen werden. Die auftretende Fluktuation wird in ihrer Stärke und Dauer durch die als Autokorrelationsanalyse bezeichnete mathematische Prozedur quantifiziert, die auf der „Selbst-Ähnlichkeit“ eines Signals über die Zeit beruht.^[149,150]

In Kooperation mit Abt. Prof. Bräuchle an der LMU, München wurde die FCS an dem VAT-Proteasom-System durchgeführt. Dabei wurde die Diffusionszeit von fluoreszenzmarkiertem VAT und Proteasom durch einen beugungslimitierten Fokus gemessen und über autokorrelierende zeitabhängige Änderungen der Signalintensität analysiert. Die mit der Autokorrelationsfunktion assoziierte Halbwertszeit der Diffusion ist ein Maß für den translationalen Diffusionskoeffizienten, welcher direkt von der Größe (Stokes-Radius) des diffundierenden Proteins abhängt. Eine Komplexbildung zwischen VAT und Proteasom würde sich in der Änderung der Diffusionszeit bemerkbar machen.

Für die Untersuchungen wurden ATTO-532-markiertes VAT und ATTO-647-markiertes Proteasom (beide Farbstoffe ATTO-TEC) eingesetzt (4.4.3). Zunächst wurden die markierten Proteine einzeln, unter Zugabe von nicht markiertem Protein gleicher Art, vermessen, um sicher zu gehen dass der richtige Proteinkonzentrationsrahmen gewählt wurde, bei dem die Diffusionszeit konstant blieb. Dabei stellte sich heraus, dass noch nicht gebundener Farbstoff in der Lösung vorlag, der entfernt werden musste. Zudem wies das Proteasom eine hohe Affinität zum Reaktionsgefäß

auf und setzte sich während der Diffusionsmessung ab, was zu einer Änderung der Zählrate führte. In nachfolgenden Reaktionen wurde das Reaktionsgefäß deshalb vorher mit BSA abgesättigt und BSA-haltiger Puffer verwendet.

Anschließend wurde eine Titrationsmessreihe durchgeführt, wobei sowohl das markierte Proteasom unter Zugabe unterschiedlicher Mengen nicht markierten VAT, als auch markiertes VAT mit nicht markiertem Proteasom analysiert wurde.

Tab. 17: Diffusionszeiten von VAT und/oder Proteasom, errechnet aus den FCS-Messungen.

VAT	VAT + Proteasom	Proteasom	Proteasom + VAT
5.431 ± 0.016	5.563 ± 0.019	5.551 ± 0.019	6.011 ± 0.021
Änderungsfaktor 1.024		Änderungsfaktor 1.083	

Die Diffusionszeit ist in ms angegeben.

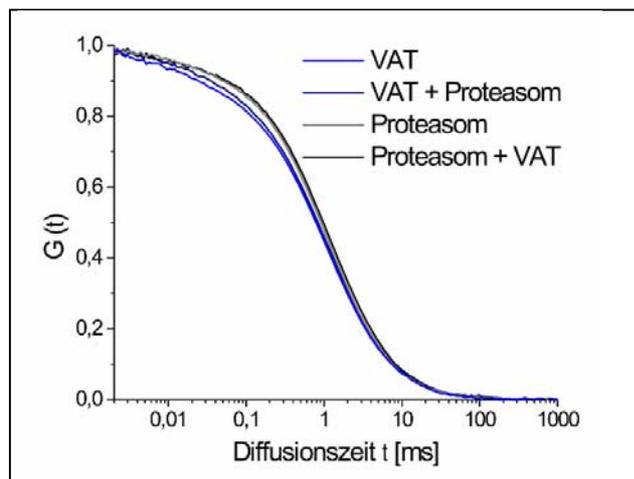


Abb. 26: FCS-Plot für die Diffusionszeiten von VAT und/oder 20S-Proteasom.

Die Diffusionszeit von VAT ändert sich nur leicht in Gegenwart von 20S-Proteasomen. Analog kommt es zu einer kleinen Änderung der Diffusionszeit von Proteasom bei Anwesenheit von VAT.

Bei einem Verhältnis von markiertem Proteasom zu VAT 1:32 und markiertem VAT zu Proteasom 1:8 konnte eine schwache Änderung der Diffusionszeit um den Faktor 1.08 bzw. 1.02 beobachtet werden

(Abb. 26 und Tab. 17). Die Messungen lassen darauf schließen, dass kein stabiler Komplex zwischen VAT und dem Proteasom ausgebildet wird. Für einen erwarteten Komplex von ca. 1200 kD würde der Änderungsfaktor bei ca. 1.2 - 1.3 liegen. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass beide Proteine zwar miteinander interagieren, die Wechselwirkungszeit aber sehr kurz ist (kürzer als die Diffusionszeit von einigen ms). Die Bedingungen wurden durch Zugabe von GFPssrA und/oder ATP zum Hoch-Mg²⁺-Puffer variiert, es konnten aber keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Da die Reaktionstemperatur aus gerätespezifischen Gründen immer ca. 25°C betrug, kann eine für eine stabile Komplexbildung zwischen VAT und dem 20S-Proteasom zu niedrige Temperatur nicht ausgeschlossen werden.

Kreuzkorrelationsversuche unter Verwendung beider fluoreszenzmarkierter Proteine, die eine gleichzeitige Lokalisation der Proteine aufzeigen sollten, waren negativ.

5.5 Strukturuntersuchungen

Wie unter 3.2.1 beschrieben, konnte die dreidimensionale Struktur von VAT bereits 2002 mit Hilfe von Kryo-EM dargestellt werden.^[75] Eine Strukturänderung von VAT unter Einsatz unterschiedlicher Nukleotide konnte aber, im Gegensatz zu eukaryontischem p97, nicht gefunden werden (unveröffentlichte Daten der Abteilung).^[78] In p97 ist eine nukleotidabhängige Gesamt- und Porengrößenänderung zu beobachten. Bei Punktmutanten von VAT konnten u.a. unterschiedliche Nukleotidbindungseigenschaften festgestellt werden, weshalb sie der EM-Analyse unterzogen wurden.

Die EM-Struktur erlaubt aber keinen Einblick in die atomare Anordnung von VAT. Für viele AAA- und AAA⁺-ATPase wurden die Strukturen röntgenkristallographisch gelöst, was auch für p97 der Fall ist. Von VAT konnten bisher keine röntgenstreuenden Kristalle erhalten werden. Insbesondere wegen des einzigartigen Verhaltens der N-Domäne von VAT wäre die Struktur dieser Domäne im hexameren Komplex sehr aufschlussreich, weshalb Kristallisationsversuche mit VAT durchgeführt wurden.

5.5.1 Elektronenmikroskopie (EM)

Von negativ kontrastierten Proben aller VAT-Mutanten wurden elektronenmikroskopische Daten aufgenommen und die Mittelungen mit Hilfe der TOM-Software für Matlab, wie bereits unter 5.3.2 beschrieben, erstellt. Differenzbilder, wie in Abb. 27, wurden durch die EM-Software der Abteilung angefertigt. Alle Mutanten wiesen ohne externe Nukleotidzugabe eine stabile hexamere Struktur auf, Unterschiede zwischen den Proteinen waren aus den EM-Mittelungen aber nicht zu entnehmen.

Um den Nukleotidbindungszustand der Mutanten zu definieren, wurden zuvor Proben der denaturierten Proteine mit Hilfe der Anionentauscherchromatographie analysiert. Für die AA-Mutante konnte gezeigt werden, dass sie kein Nukleotid gebunden hat. Für VAT wurde nach Eichung mit freiem Nukleotid die Bindung von 16 ADP-Molekülen pro Hexamer nachgewiesen. Dieser Wert ist auf jeden Fall zu hoch, es lässt sich aber nicht bestimmen, ob die tatsächliche Bindungszahl 12 oder 6 beträgt. Für die anderen Mutanten wurden Werte für die ADP-Bindungszahl ermittelt, die

zwischen VAT-AA und VAT lagen. Interessanterweise konnte für keines der Proteine gebundenes ATP nachgewiesen werden.

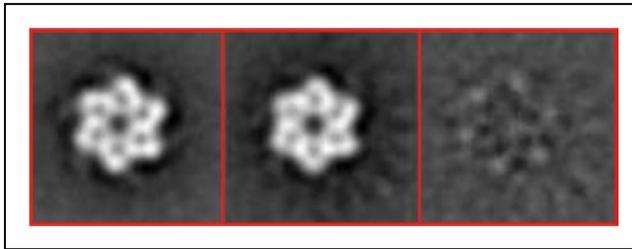


Abb. 27: EM-Mittlung von VAT und VAT-AA und ihre Differenz.

Mittelungen von nativ kontrastierte EM-Aufnahmen von VAT (links) und VAT-AA (Mitte) wurden erstellt und ein Differenzbild gebildet (rechts). Eine Strukturänderung ist nicht erkennbar.

Zur Unterscheidung der VAT-Struktur in verschiedenen Nukleotidzuständen wurde aus den EM-Mittelungen der AA-Mutante und VAT ein Differenzbild erstellt, das aber keine eindeutigen Strukturänderungen zwischen den Proteinen zeigt (Abb. 27). Eine weitere Auswertung mit Hilfe des EM-Programms offenbarte keine signifikanten Änderungen.

5.5.2 Kristallisation für Röntgenstrukturanalyse

Von VAT oder seinen Domänen existiert bisher keine Röntgenkristallstruktur. Für verwandte ATPasen liegen aber Strukturdaten vor. Von NSF wurde die Struktur der N- und der D2-Domäne gelöst, vom VAT-Homolog p97 konnte die ND1-Struktur bereits 1999 veröffentlicht werden, erst kürzlich wurde die Struktur des kompletten p97-Proteins durch zwei verschiedene Gruppen gelöst.^[79,80,82,83]

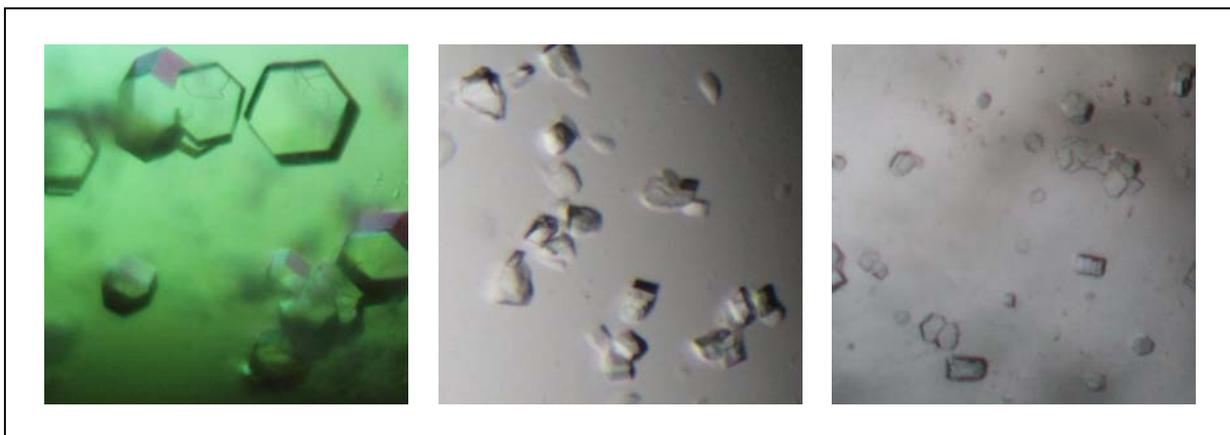


Abb. 28: 3D-Kristalle von VAT.

Die Kristallisationsbedingungen waren: Index Screen-63, 0,1 M MgCl₂, 30% v/v Dioxan (links), Crystal Screen I-36, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATPγS (Mitte) und Crystal Screen II-43, 0,1 M Harnstoff (rechts).

Vor einigen Jahren wurden bereits Versuche zur Kristallisation von VAT in der Abteilung durchgeführt. Es ist damals aber nicht gelungen, einen röntgenstreuenden Kristall zu gewinnen. Die N-Domäne von VAT verursacht bei hoher Ionenstärke des Puffers in Kälte ein reversibles Aggregieren des gesamten Proteins, das aber durch Temperaturerhöhung wieder in Lösung gebracht werden kann. Deshalb wäre eine atomare Auflösung der VAT-Struktur, inklusive der N-Domäne bei hohen Salzkonzentrationen interessant, die wahrscheinlich Unterschiede zu p97 aufzeigt.

Die Kristallisationsansätze wurden in Kooperation mit Kornelius Zeth von der Abt. Prof. Oesterhelt durchgeführt. Hierbei kamen neue Kristallisations-Screens zum Einsatz, die bei früheren Versuchen noch nicht kommerziell zugänglich waren. Durch Verwendung der „hanging drop“-Methode mit Crystal Screen I und II und Index Screen der Firma HAMPTON RESEARCH konnten durch Zugabe verschiedener Fällungsmittel (4.4.4) bereits streuende Kristalle erhalten werden (Abb. 28).

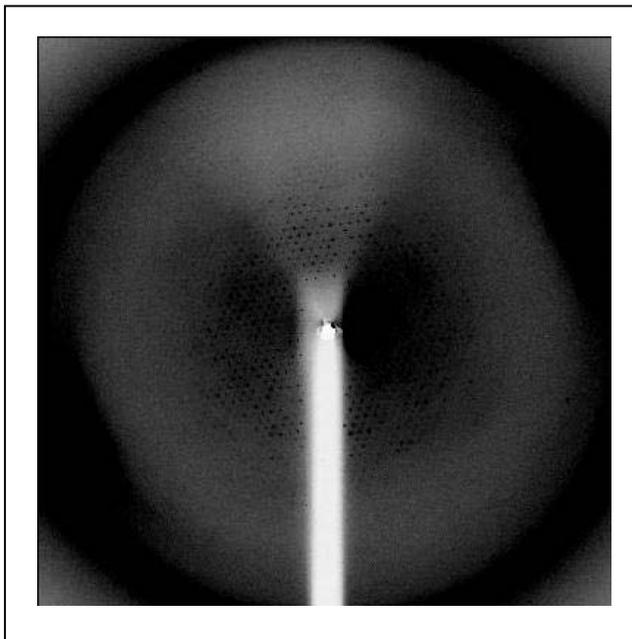


Abb. 29: Beugungsmuster eines 3D-Kristalls von VAT.

Der Kristall wurde unter Verwendung von Index Screen-61, 0.1 M $MgCl_2$ erhalten und die beste Auflösung lag bei 4.2 Å.

Die beste Auflösung ergab die Index Screen-61-Bedingung und lag bei ca. 4.2 Å (Abb. 29). Dabei wurde VAT unter Hochsalz-Bedingungen von 100 mM Mg^{2+} kristallisiert. Zur Aufnahme eines kompletten Datensatzes der Röntgenbeugung war der Kristall nicht geeignet, zudem war auch die Auflösung nicht ausreichend. Die Kristallisationsexperimente werden in der Abt.

Prof. Oesterhelt weitergeführt.

6. Diskussion

Proteine der AAA⁺-Superfamilie kommen in allen Domänen des Lebens vor und sind dort an einer Vielfalt von zellulären Prozessen beteiligt.^[151] Ein gemeinsames Merkmal dieser Familie ist die Ausbildung oligomerer Komplexe, die Proteine und Nucleinsäuren unter ATP-Spaltung strukturell umformen.^[152] AAA-Proteine bilden eine Unterfamilie der AAA⁺-Superfamilie und werden, abhängig von der Anzahl ihrer ATPase-Domänen, in die Typ-I- (eine ATPase-Domäne) und Typ-II-ATPasen (zwei ATPase-Domänen) eingeteilt (vgl. 3.1.3). Das eukaryontische p97/VCP/Cdc48-Protein gehört zu den letztgenannten ATPasen, da es aus zwei benachbarten ATPase-Domänen, D1 und D2, besteht, die eine hexamere Struktur ausbilden. Zusätzlich besitzt das Protein eine flexible N-Domäne, die an der Peripherie der D1-Domäne lokalisiert ist (vgl. 3.2).^[78-80,82]

Die Aufgaben von p97/VCP/Cdc48 reichen von der Beteiligung in der Membranfusion, über die Extraktion und den Abbau von Membranproteinen bis zur Proteinumformung, wie in der Loslösung von Transkriptionsfaktoren aus der Membran oder der Deassemblierung von Proteinspindeln (vgl. 3.1.3.5).^[57,61,89,153,154] Bei den meisten dieser Prozesse interagiert p97/VCP/Cdc48 mit Zellorganellen oder mit Ubiquitin, welches als Proteinabbausignal in Eukaryonten dient.^[57] In den bisher sequenzierten Archaeen konnten kein Ubiquitin oder homologe Proteine nachgewiesen werden. Zudem zeichnen sich Archaeen durch die Abwesenheit von Zellorganellen aus. Die Funktionen der archaealen p97-Homologe müssen demzufolge in anderen Bereichen liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das p97-Homolog VAT aus dem Archaeum *Thermoplasma acidophilum* untersucht. Die Struktur von VAT wurde bereits in der Vergangenheit gut charakterisiert und erste enzymatische Studien zeigten indirekt einen bifunktionalen Charakter von VAT in der Ent- und Rückfaltung von Proteinsubstraten.^[27,43,75-77]

Während der enzymatischen Analyse von VAT wurde zunächst seine ATPase-Aktivität unter Anwendung der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt. Die ATP-Hydrolyse bei einer Mg²⁺-Konzentration von 20 mM, die wahrscheinlich in der Größenordnung der nativen Konzentration im Zytoplasma von *Thermoplasma acidophilum* liegt, stimmte sehr gut mit der Hydrolyse verwandter AAA- oder AAA⁺-ATPasen überein. Die Aktivität konnte durch Erhöhung Mg²⁺-Konzentration auf 120 mM um den Faktor 10 gesteigert werden (5.1.1). VAT Δ N, eine VAT-Mutante, der die konservierte N-Domäne fehlte, war hingegen mit Mg²⁺ nicht stimulierbar. Das Protein zeigte aber bei beiden Mg²⁺-Konzentrationen eine sehr hohe Aktivität, die die von VAT

und anderen ATPasen deutlich überstieg (5.1.2). Dies deutet auf eine Regulation der ATP-Hydrolyse über die N-Domäne hin, wobei ihre Präsenz einen inhibierenden Einfluss auf die Hydrolyse ausübt. Aus der Kristallstruktur vom eukaryontischen p97 konnte auf atomarer Ebene ein direkter Kontakt zwischen der N- und der D1-Domäne nachgewiesen werden.^[80,82] Dieser kann ebenfalls über die konservierten Arg⁷⁴- und Glu²⁴⁶-Reste in VAT stattfinden (5.1.2). Die Mg²⁺-Abhängigkeit von VAT kann über eine Konformationsänderung in der N-Domäne erklärt werden, die über die besagten Reste auf die D1-Domäne übertragen wird und diese zu verstärkter Hydrolyse stimuliert. Im Gegensatz hierzu wird die ATP-Hydrolyse von p97 durch hohe Mg²⁺-Konzentrationen inhibiert, genauso wie sie durch die Bindung des Cofaktors p47 negativ beeinflusst wird.^[48,90] Neue Studien haben gezeigt, dass p47 an die N-Domäne von p97 bindet, dagegen erfolgt keine Bindung an die p97 Δ N-Mutante, die sich durch die fehlende N-Domäne vom Wildtyp-Protein unterscheidet.^[54,131,155] Im Gegensatz dazu hatte der heterodimere Cofaktor Npl4-Ufd1, der ebenfalls an die N-Domäne bindet, keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität.^[156] Für NSF, einer weiteren eukaryontischen Typ-II-ATPase, konnte hingegen eine Stimulation der ATPase-Aktivität durch Bindung des α -SNAP-SNARE-Cofaktor-Substrat-Komplexes an die N-Domäne gezeigt werden.^[157] Dies zeigt, dass nicht nur die ATPase-Aktivität von VAT, sondern auch die anderer AAA-ATPasen wie der eukaryontischen p97- und NSF-Proteine über die N-Domäne gesteuert werden. Parallel dazu gibt es erste Hinweise auf einen analogen Mechanismus bei Vertretern der AAA⁺-Superfamilie. Δ N-Mutanten von bakteriellem ClpA und ClpB sind ebenfalls hydrolyseaktiver als die Wildtyp-Proteine.^[132,133]

Neben der ATP-Hydrolyse wurde die VAT- und VAT Δ N-vermittelte Entfaltung von Proteinsubstraten studiert. Hierfür wurden natives GFP und seine Mutanten verwendet, darunter eine Fusion aus dem 11-Aminosäuren-langen ssrA-Tag an den C-Terminus von GFP (5.1.3).^[126] Die Ergebnisse spiegelten das Verhalten der Proteine bei der ATP-Hydrolyse wider; VAT war, im Gegensatz zu VAT Δ N, stark durch Mg²⁺ stimulierbar, besaß aber eine niedrigere Entfaltungsaktivität als VAT Δ N. Der genaue Vergleich der kinetischen Daten der ATPase- und der Entfaltungsaktivität offenbarte eine zusätzliche Inhibition der Entfaltung durch die N-Domäne, die nicht aus der verminderten ATP-Hydrolyse resultierte. Dies könnte mit einer sterischen Abschirmung der zentralen Pore in VAT durch die N-Domäne erklärt werden, die Substraten den Eintritt in die Pore verwehrt. Hohe Mg²⁺-Konzentrationen könnten dagegen eine Konformationsänderung in der N-Domäne bewirken, die diese in einen Zustand bewegt, der den Zugang von Substraten zur Pore erleichtert und somit deren Entfaltung ermöglicht. Nukleotidabhängige Bewegungen der p97-N-

Domäne wurden mit Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse bereits demonstriert, analoge EM-Untersuchungen von VAT führten bisher zu keinem Ergebnis (vgl. 5.5.1).^[78] Abhilfe sollen bereits begonnene Kristallisationsstudien an VAT unter verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen schaffen (5.5.2). Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu der ursprünglich angenommenen Funktion der N-Domäne. Die N-Domäne in AAA-Proteinen wird aufgrund von Strukturähnlichkeit zu der Domäne in Aspartat-Proteasen als substratbindende Domäne diskutiert.^[5,86] Durch ihre Flexibilität soll die N-Domäne in einem ergänzenden Modell wie ein Tentakel wirken und die Substratkonzentration in der Nähe der Pore erhöhen und somit ihre Entfaltung begünstigen.^[132] Die N-Domäne ist aber nicht notwendig für die Substraterkennung durch VAT und zeigt sogar einen negativen Effekt auf die Substratentfaltung. In p97 erfolgt die Erkennung und Bindung von polyubiquitinierten Proteinsubstraten entweder direkt über die N-Domäne oder über seinen Cofaktor p47.^[54,55] Die sog. UBX-Sequenz, die ein typisches Ubiquitin-Bindemotiv ist und sowohl in der N-Domäne von p97 als auch in p47 vorkommt, ist aber in vielen AAA-Proteinen, darunter auch in VAT und NSF nicht konserviert.^[131] Dies erklärt, warum weder für VAT noch für NSF eine Interaktion mit Ubiquitin nachgewiesen wurde. Für VAT sind keine nativen Substrate bekannt, weshalb nicht klar ist, ob in der Tat Proteine über spezifische Sequenzen von der VAT-N-Domäne erkannt werden. Die unspezifische Bindung von Substraten erfolgt in VAT wahrscheinlich über Substratbindemotive in der Pore (3.2.7 und 5.3), die im Weiteren noch näher vorgestellt werden.

Da VAT und VAT Δ N GFP sowohl mit als auch ohne ssrA-Tag entfalten, ist keine bestimmte Erkennungssequenz für die Entfaltung notwendig, was im Gegensatz zu vielen bakteriellen und eukaryontischen Systemen steht.^[126] Für die Entfaltung durch VAT war lediglich eine leicht zugängliche Angriffsstelle wichtig, die im nativen GFP durch die 9-Aminosäuren-lange Sequenz, die aus der globulären Struktur des Proteins herausragt, realisiert wird. Wurde dieser Abschnitt verlängert, wie in GFPssrA, konnte VAT daran effektiver angreifen, und die Substratentfaltung wurde beschleunigt. Es muss noch genauer geklärt werden, wie diese Angriffsstelle beschaffen sein muss, da sowohl die native 9-Aminosäuren-Sequenz als auch der ssrA-Tag aus überwiegend hydrophoben Resten bestehen. Hydrophobe Bereiche dienen in der Proteinfaltung als Erkennungssignal für viele Chaperone.^[137] Ob VAT ebenfalls hydrophile Reste erkennen würde, bleibt zu untersuchen.

Im Gegensatz zu VAT konnte für p97 keine Entfaltung von Proteinsubstraten nachgewiesen werden. Als Ursache hierfür kommt die niedrige ATPase-Aktivität in Frage, die mit der von VAT bei

20 mM Mg^{2+} vergleichbar ist. Unter diesen Bedingungen ist die GFP-Entfaltung durch VAT ebenfalls kaum nachweisbar. p97 wird aber, anders als VAT, durch hohe Mg^{2+} -Konzentrationen inhibiert und es sind bisher keine Stimulatoren für die ATPase-Aktivität von p97 bekannt. In zwei der veröffentlichten Kristallstrukturen des Proteins (im ADP- und ADP·AlF₃-Zustand) wurde zudem ein Zn^{2+} -Ion in der D1-Pore gefunden. Das Ion wurde über sechs His³¹⁷-Reste der Porenregion stabil koordiniert und verschloss dadurch den Porenzugang für Substrate.^[80,83] Während das Zn^{2+} -Ion in p97 nur in zwei Nukleotidzuständen beobachtet wurde, konnten verwandte Kristallstrukturen von p97 oder seiner ND1-Domäne dieses Phänomen nicht bestätigen.^[79,82,131] In VAT ist der Histidin-Rest weder konserviert noch sind in der näheren Umgebung Reste zu finden, die ein Kation koordinieren könnten. Eine Zugabe von Zn^{2+} -Ionen hatte zudem keinen Einfluss auf die GFP-Entfaltung durch VAT.

Die Translokation von Substraten durch die zentrale Pore wird für viele AAA⁺-Proteine diskutiert und konnte sogar in den bakteriellen ClpAP- und ClpXP-Proteasen mit der Elektronenmikroskopie visualisiert werden.^[15-17] Entsprechende Versuche am VAT-System zeigten bisher aber keine stabile Substratbindung (5.3.2). Ein Sequenzvergleich von Porenregionen verschiedener AAA- und AAA⁺-ATPasen offenbarte stark konservierte hydrophobe und/oder aromatische Reste am Eingang der Poren, die in vielen der ATPasen an der Substratinteraktion beteiligt sind (5.3.1).^[85,96,101,118-121] Durch Mutation dieser Reste in VAT (Tyr²⁶⁴ in der D1- und Trp⁵⁴¹ und/oder Val⁵⁴² in der D2-Domäne) zu Alanin konnte ihre Beteiligung an der Entfaltung von Proteinsubstraten demonstriert werden. Der Tyr-Porenrest der ersten Domäne stellte sich als absolut essentiell für die Bindung und Entfaltung von GFP heraus. Der Austausch des Trp-Restes in der zweiten Pore führte ebenfalls zu einer verschlechterten Substratentfaltung, wobei die Entfaltung, im Gegensatz zur Mutation in der ersten Domäne, noch stattfand. Durch simultane Mutation beider Reste der zweiten Domäne konnte die GFP-Entfaltung aber fast komplett inhibiert werden. Da in VAT der D1-Rest den Eingang zur zentralen Pore ausbildet, die D2-Reste hingegen an der Kontaktfläche der beiden Domänen, also im Inneren des Proteins lokalisiert sind, lassen die besagten Ergebnisse auf eine Translokation der Substrate durch die zentrale Pore von VAT schließen. Während dieser Bewegung werden sie entfaltet, wobei sie mit den hydrophoben und/oder aromatischen Porenresten interagieren. In ClpB, für das eine stabile Substratbindung über die analogen Porenreste verwirklicht wurde, liegen beide Reste direkt an den entgegengesetzten Enden der Pore, so dass die Substratbindung nicht zwingend auf eine Translokation durch die Pore schließen lässt.^[85,158] Die Visualisierung der Substratbindung über die Porenreste von VAT steht noch aus.

Die ATP-Hydrolyse der VAT-Proteine, die eine Mutation des D1-Tyr- und/oder D2-Trp-Restes aufwiesen, war im Vergleich zum Wildtyp-VAT unerwartet erhöht. Dies kann ein Hinweis auf die Kommunikation dieser Porenreste mit den ATPase-Domänen sein. Diese Reste könnten aufgrund von Substratbindung eine Konformationsänderung bewirken, welche die Information über das gebundene Substrat an die ATPase-Domänen überträgt und dort zur verstärkten Hydrolyse führt. Mit dem Modells substrat GFP konnte diese Annahme aber nicht bestätigt werden (5.1.1). Alternativ kann der Austausch des großen Tyr-Restes gegen Ala eine erhöhte Beweglichkeit der Porenreste und daraus resultierend einen beschleunigten ATP-Zyklus bewirken. Kürzlich erschienene Mutagenesestudien an HslU, in denen ein Austausch der Porenreste gegen unterschiedliche Aminosäuren vorgenommen wurde, demonstrieren eine Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von der Größe und Beweglichkeit der gewählten Aminosäure.^[159]

Das zu VAT homologe p97-Protein trägt in der D1-Domäne einen Leucin-Rest, der ansonsten bei keiner anderen ATPase konserviert ist. Möglicherweise hat die Abwesenheit eines großen aromatischen Restes wie Tyrosin oder Tryptophan in p97-D1 zur Folge, dass die Interaktion mit GFP verhindert wird und dieses folglich nicht über Translokation durch die Pore entfaltet werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der domänenspezifischen Aktivität von VAT. Die Leitfrage war hierbei, welche der beiden Domänen, die D1- oder die D2-Domäne, für die hauptsächliche ATPase- und somit auch Entfaltungsaktivität zuständig ist. Zur Analyse wurden katalytische ATPase-Reste in beiden Domänen von VAT zu Alanin ausgetauscht und enzymatisch vermessen (5.2.2). Dazu gehörten die Lysine in der Walker-A-Box und Glutamate in der Walker-B-Box, welche die zentralen ATP-Binde- und ATP-Hydrolyse-Motive darstellen, genauso wie der sog. Sensor-1-Rest (konserviertes Asparagin), dessen Beteiligung an der ATP-Hydrolyse für einige AAA⁺-ATPasen ebenfalls nachgewiesen wurde.^[92,108] Durch die Mutation von Walker-B in der zweiten Domäne (B2) wurde die GFP-Entfaltung nicht beeinflusst und die Mutante zeigte die gleiche Aktivität wie Wildtyp-VAT. Dies bedeutet, dass die aus der Hydrolyse in der D1-Domäne gewonnene Energie von ca. 30% des Wildtyp-Proteins ausreichend für die GFP-Entfaltung ist. Die B1-Mutante (Walker-B-Mutation in D1) war ebenfalls entfaltungsaktiv, die Entfaltungsaktivität wurde aber auf ca. 40% des Wildtyp-Niveaus reduziert. Unter Berücksichtigung der verminderten ATPase-Aktivität des B1-Proteins (ca. 10%) ist die Entfaltungseffizienz der beiden Walker-B-Mutanten vergleichbar. Während der Walker-B-Rest die ATP-Hydrolyse via nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls durchführen soll, liegt die Aufgabe

des Walker-A-Restes in der Koordination des Nukleotids. Die Mutationen des letztgenannten Restes hatten einen größeren Einfluss auf die Aktivitäten von VAT als die der erstgenannten. Für die A1-Mutante (Walker-A-Mutation in D1) lag die ATP-Hydrolyse unter 1% der Wildtyp-Hydrolyse und die Entfaltung von GFP war nicht messbar. Substratbindungsstudien bewiesen, dass die A1-Mutante, in Analogie zur Porenmutante der ersten Domäne, GFP nicht mehr binden konnte und dieser Rest deshalb für die Entfaltung absolut essentiell war. Dies stimmt mit dem Verhalten der entsprechenden A1-Mutante von p97 überein, deren D1-vermittelte Substratinteraktion ebenfalls gestört war.^[65] Die Tatsache, dass sowohl die ATP-Hydrolyse als auch die GFP-Entfaltung durch Mutanten der Walker-A- und Walker-B-Reste nicht zu gleichen Ergebnissen führte, deutet auf eine Kommunikation zwischen den beiden Domänen hin, die über ATP-Bindung und wahrscheinlich auch ATP-Hydrolyse stattfindet. Die ATP-Bindung und Hydrolyse in D1 ermöglicht die Bindung und Hydrolyse in D2 und vice versa. Würden beide Domänen unabhängig voneinander arbeiten, dürfte kein Unterschied in der Aktivität einer Domäne auftreten, egal ob die Nachbardomäne im ATP-gebundenen (B-Mutanten können ATP binden aber nicht hydrolysieren) oder im nicht-gebundenen Zustand (A-Mutanten binden kein ATP) vorliegt. Zudem müsste ohne Kommunikation der Domänen die Summe der Aktivitäten analoger Mutanten (wie A1 und A2 oder B1 und B2) den Wildtyp-Betrag widerspiegeln. Diese sog. Kooperativität gilt für AAA- und AAA⁺-ATPasen als gesichert und wurde u.a. für Maus-p97, zytoplasmatisches Hsp104 bzw. mitochondriales Hsp78 aus Hefe und bakterielles ClpB beschrieben.^[65,108,128,130] Für das Hsp104-Protein konnte ebenfalls eine höhere ATPase-Aktivität der ersten Domäne gefunden werden, dessen Walker-Mutanten der ersten Domäne fast inaktiv waren.^[129] Für das direkte VAT-Homolog p97 wurde eine temperaturabhängige ATPase-Verteilung auf die beiden Domänen beschrieben, bei der physiologischen Temperatur von 37°C ist die D2-Domäne stärker aktiv. Nach Temperaturerhöhung auf 60°C, was der physiologischen Temperatur von *Thermoplasma acidophilum* entspricht, liefert aber die erste Domäne den gleichen Beitrag zur Nukleotidhydrolyse wie die zweite.^[90] Mutationen der Sensor-1-Reste in VAT hatten einen vergleichbaren Einfluss auf die ATPase-Aktivität und GFP-Entfaltung wie Mutationen der Walker-B-Reste. In VAT hat der Sensor-1 demnach, in Analogie zu eukaryontischem Hsp104 oder archaealem Lon, ebenfalls katalytische Eigenschaften in der ATP-Hydrolyse.^[92,108] Die folgende Tabelle (Tab. 18) fasst die Ergebnisse der Mutagenesestudien noch mal zusammen:

Tab. 18: Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Mutagenesestudien an VAT.

Mutante		ATP-Hydrolyse	GFP-Entfaltung	GFP-Bindung	Schlussfolgerung
Wildtyp	VAT	+++	+++	ja	
Walker-A ATP-Bindung	A1	-	-	nein	Substratbindung erfolgt erst nach ATP-Bindung in D1
	A2	+	++	ja	
	AA	-	-	nein	
Walker-B ATP-Hydrolyse	B1	+	++	ja	Substratentfaltung durch D1 und D2, D1 alleine ausreichend für Wildtyp-Aktivität
	B2	++	+++	ja	
	BB	-	-	n.u.	
Sensor-1 ATP-Hydrolyse	S1	+	++	ja	Katalytische Eigenschaften von Sensor-1 in der ATP-Hydrolyse in Analogie zum Walker-B-Rest
	S2	+	+++	ja	
	SS	-	-	n.u.	
Porenreste	P1	++++	-	nein	Substratbindung in der D1-Pore, D2-W in der Pore wichtig für Substratinteraktion, D2-V: Hilfsfunktion, ⇒ Translokation von Substraten durch zentrale Pore in VAT von D1 nach D2
	P2-W	++++	++	ja	
	P2-V	+++	+++	ja	
	P2-WV	++++	+	ja	
	PP	++++	-	nein	

Symbole: (-) <5%, (+) 5-30%, (++) 30-70%, (+++) 70-100% und (++++) >100% der VAT-Wildtyp-Aktivität; n.u. für nicht untersucht.

Anhand der Daten kann ein Mechanismus für Substratentfaltung durch VAT aufgestellt werden, an dem beide Domänen beteiligt sind. Hiernach wird das Substrat über den Tyr-Porenrest der ersten Domäne gebunden und in die zentrale Pore transportiert. Die Entfaltung kann anschließend durch eine der Domänen erfolgen, woran im Wildtyp-Protein wahrscheinlich beide Domänen beteiligt sind. Hierbei essentiell ist der Walker-A-Rest der D1-Domäne, der nur im ATP-gebundenen Zustand die Substratentfaltung erlaubt oder sogar initiiert. Aufgrund des kooperativen Verhaltens der beiden Domänen könnte das Substrat von der D1-Domäne unter abwechselnder ATP-Hydrolyse beider Domänen an die D2-Domäne weitergereicht und dabei entfaltet werden. In der zweiten Domäne ist der Trp-Porenrest an der Substrattranslokation beteiligt, dessen Funktion durch den benachbarten Val-Rest unterstützt wird. Das entfaltete Substrat wird wahrscheinlich am äußeren Ende der D2-Domäne wieder in Lösung freigesetzt.

Die Freisetzung von entfaltenen Proteinen würde in der Zelle aber fatale Folgen haben. Da entfaltete Proteine leicht zur Aggregatbildung neigen könnten sie die Zelle dauerhaft schädigen. Deshalb wird eine Interaktion von VAT mit einer Protease postuliert, wodurch die Proteinsubstrate gleich im Anschluss an ihre Entfaltung abgebaut werden könnten. Für einige AAA⁺- oder AAA-ATPasen konnte eine solche Interaktion gezeigt werden; sie ist z.B. in der Ausbildung von ClpAP-, ClpXP-, HslUV- oder 26S-Proteasom-Komplexen verwirklicht.^[19,37,138] Zudem existieren lösliche und membranständige ATP-abhängige Proteasen, die sowohl eine ATPase als auch eine Protease auf einer Polypeptidkette vereinigen. Hierzu zählen das bakterielle und archaeale Lon, sowie FtsH aus *E. coli* und die verwandten m- und i-AAA-Proteasen in Mitochondrien.^[30] In *Thermoplasma acidophilum* ist VAT eine von nur zwei löslichen AAA-ATPasen. Dort kommen z.B. keine Homologe zu den eukaryontischen ATPasen des 19S-Komplexes vor, die mit dem 20S-Proteasom den 26S-Komplex aufbauen.^[37] Das 20S-Proteasom wird in *Thermoplasma* in großen Mengen exprimiert. Es kann alleine aber keine gefalteten Substrate abbauen und ist auf eine Entfaltungsmaschine wie VAT angewiesen. Zur Analyse der vermuteten Interaktion zwischen VAT und dem 20S-Proteasom wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt (5.4). Weder biochemisch noch elektronen- oder rasterkraftmikroskopisch konnten aber eindeutige Hinweise auf die besagte Interaktion gefunden werden. Nach der VAT-vermittelten Entfaltung kann GFP vom Proteasom abgebaut werden. Wird GFP chemisch denaturiert, erfolgt der proteasomale Abbau in gleicher Weise und wird nicht durch die Gegenwart von VAT beeinflusst. Bei einer aktiven Substrattranslokation durch VAT in das Proteasom wäre aber eine Verstärkung des Abbaus zu erwarten. Die nachgewiesene Beschleunigung der GFP-Entfaltung durch das Proteasom kann umgekehrt mit der Unterdrückung der Konkurrenzreaktion zwischen gefaltetem und ungefaltetem oder sogar wieder zurückgefaltetem Substrat erklärt werden. Das 20S-Proteasom baut bereits entfaltetes Substrat aus der Lösung ab und verhindert damit, dass dieses mit VAT wieder interagieren kann. Dadurch verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht wieder auf die Seite des entfaltenen Substrats, was eine verstärkte Entfaltungsaktivität zur Folge hat. Messungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, die zur Analyse von transienten Wechselwirkungen angewendet wird und Reaktionen zwischen Einzelpartikeln auflösen kann, zeigten eine kurze Interaktion zwischen VAT und dem Proteasom. Da die Versuche aus gerätetechnischen Gründen bei Raumtemperatur durchgeführt werden mussten, bleibt offen, wie die Interaktionsdauer unter nativen Temperaturbedingungen verändert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entfaltung eines globulären Proteins durch die archaeale VAT-ATPase demonstriert. Eine solche Entfaltungsfunktion wurde bereits für einige AAA⁺-ATPasen beschrieben, nicht aber für die eukaryontischen p97/VCP/Cdc48-Proteine oder deren Homologe. Für die Entfaltung wird ein Translokationsmechanismus durch die zentrale Pore von VAT vorgeschlagen, woran hydrophobe und/oder aromatische Porenreste beider Domänen beteiligt sind. Eine Interaktion von Substrat mit der N-Domäne war für die Substraterkennung nicht notwendig. Die N-Domäne hatte sogar einen inhibitorischen Einfluss auf die Entfaltung, u.a. wegen der Verminderung der ATP-Hydrolyse. Nach ATP-Bindung in der D1-Domäne von VAT kann das Proteinsubstrat über den Porenrest der ersten Domäne mit VAT interagieren, was seine Entfaltung initiiert. Durch anschließende Translokation durch die Pore, woran der hydrophobe Porenrest der zweiten Domäne beteiligt ist, wird das Substrat durch abwechselnde ATP-Hydrolyse beider Domänen entfaltet. Nachdem es die D2-Domäne in entfaltetem Zustand verlässt, kann es vom 20S-Proteasom abgebaut werden. Für die vermutete stabile Interaktion zwischen VAT und Proteasom sind möglicherweise bisher nicht identifizierte Cofaktoren notwendig. Der Grund dafür, dass p97 nicht in der Lage ist, Proteine zu entfalten, könnte in seiner verminderten ATPase-Aktivität im Vergleich mit VAT und/oder in der Blockierung der zentralen Pore durch ein stabil koordiniertes Zn²⁺-Ion liegen. Es ist aber nicht zwingend notwendig, dass p97 die Entfaltung von Proteinen durchführt, denn in eukaryontischen Zellen erfolgt die Proteinkontrolle durch das 26S-Proteasom. Es ist dabei eher unwahrscheinlich, dass dieser energieaufwendige Prozess durch ein weiteres Proteinsystem ausgeführt wird. Die Rolle vom eukaryontischen p97 in der Extraktion von ungefalteten Proteinen aus ER-Membranen gilt als gesichert. Das Hefehomologe Cdc48 konnte mit dem 26S-Proteasom zusammen isoliert werden, was darauf hindeutet, dass p97/VCP/Cdc48 die extrahierten Proteine nach erfolgter Ubiquitinierung an das Proteasom übergibt.^[53,160] Aufgrund des oben Genannten und der Tatsache, dass VAT eine starke Affinität zu jeglicher Art von Membranen aufweist, könnte das archaeale VAT die Funktion der Proteinextraktion von p97 und der Proteinentfaltung der proteasomalen 19S-Komplexe in einem Protein vereinigen. Die Extraktion von Proteinen aus der Membran muss für VAT aber noch gezeigt werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Erdmann, R., Wiebel, F.F., Flessau, A., Rytka, J., Beyer, A., Frohlich, K.U. and Kunau, W.H. (1991) *Cell* 64, 499-510.
- [2] Koonin, E.V., Wolf, Y.I. and Aravind, L. (2000) *Adv Protein Chem* 54, 245-75.
- [3] Milner-White, E.J., Coggins, J.R. and Anton, I.A. (1991) *J Mol Biol* 221, 751-4.
- [4] Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) *Embo Journal* 1, 945-951.
- [5] Lupas, A.N. and Martin, J. (2002) *Current Opinion in Structural Biology* 12, 746-753.
- [6] Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V. (1999) *Genome Res* 9, 27-43.
- [7] Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2004) *J Struct Biol* 146, 11-31.
- [8] Caruthers, J.M. and McKay, D.B. (2002) *Curr Opin Struct Biol* 12, 123-33.
- [9] Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. and Wittinghofer, A. (1997) *Nat Struct Biol* 4, 686-9.
- [10] Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A.J., Tatsuta, T. and Ogura, T. (1999) *J Biol Chem* 274, 26225-32.
- [11] Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001) *Genes Cells* 6, 575-97.
- [12] Hattendorf, D.A. and Lindquist, S.L. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2732-7.
- [13] Ogura, T., Whiteheart, S.W. and Wilkinson, A.J. (2004) *J Struct Biol* 146, 106-12.
- [14] Smith, C.K., Baker, T.A. and Sauer, R.T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6678-82.
- [15] Ortega, J., Singh, S.K., Ishikawa, T., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2000) *Mol Cell* 6, 1515-21.
- [16] Ortega, J., Lee, H.S., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2002) *Embo J* 21, 4938-49.
- [17] Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4328-33.
- [18] Beuron, F., Maurizi, M.R., Belnap, D.M., Kocsis, E., Booy, F.P., Kessel, M. and Steven, A.C. (1998) *J Struct Biol* 123, 248-59.
- [19] Ishikawa, T., Maurizi, M.R., Belnap, D. and Steven, A.C. (2000) *Nature* 408, 667-8.
- [20] Sousa, M.C., Kessler, B.M., Overkleeft, H.S. and McKay, D.B. (2002) *J Mol Biol* 318, 779-85.
- [21] Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K. and Maurizi, M.R. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12218-22.
- [22] Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13732-7.
- [23] Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1994) *Nature* 372, 475-8.
- [24] Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) *Cell* 94, 73-82.
- [25] Benaroudj, N. and Goldberg, A.L. (2000) *Nat Cell Biol* 2, 833-9.
- [26] Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999) *Nat Cell Biol* 1, 221-6.
- [27] Golbik, R., Lupas, A.N., Koretke, K.K., Baumeister, W. and Peters, J. (1999) *Biol Chem* 380, 1049-62.
- [28] Frickey, T. and Lupas, A.N. (2004) *J Struct Biol* 146, 2-10.
- [29] Frohlich, K.U. (2001) *J Cell Sci* 114, 1601-2.
- [30] Langer, T. (2000) *Trends Biochem Sci* 25, 247-51.
- [31] Schumann, W. (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23, 1-11.
- [32] Casari, G. et al. (1998) *Cell* 93, 973-83.
- [33] Nobrega, F.G., Nobrega, M.P. and Tzagoloff, A. (1992) *Embo J* 11, 3821-9.

- [34] Cruciat, C.M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1999) *Embo J* 18, 5226-33.
- [35] Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J. and Baumeister, W. (1998) *J Struct Biol* 121, 19-29.
- [36] Glickman, M.H. et al. (1998) *Cell* 94, 615-23.
- [37] Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) *Annu Rev Biochem* 68, 1015-68.
- [38] Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L. and Pickart, C.M. (2002) *Nature* 416, 763-7.
- [39] Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998) *Embo J* 17, 4909-19.
- [40] Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemuller, E., Baumeister, W. and Goldberg, A.L. (2003) *Mol Cell* 11, 69-78.
- [41] Ruepp, A. et al. (2000) *Nature* 407, 508-13.
- [42] Santos, L., Frickey, T., Peters, J., Baumeister, W., Lupas, A. and Zwickl, P. (2004) *Biol Chem* 385, 1105-11.
- [43] Coles, M. et al. (1999) *Curr Biol* 9, 1158-68.
- [44] Latterich, M., Frohlich, K.U. and Schekman, R. (1995) *Cell* 82, 885-93.
- [45] Patel, S.K., Indig, F.E., Olivieri, N., Levine, N.D. and Latterich, M. (1998) *Cell* 92, 611-20.
- [46] Rabouille, C., Levine, T.P., Peters, J.M. and Warren, G. (1995) *Cell* 82, 905-14.
- [47] Hetzer, M., Meyer, H.H., Walther, T.C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G. and Mattaj, I.W. (2001) *Nat Cell Biol* 3, 1086-91.
- [48] Meyer, H.H., Kondo, H. and Warren, G. (1998) *FEBS Lett* 437, 255-7.
- [49] Uchiyama, K. et al. (2002) *J Cell Biol* 159, 855-66.
- [50] Uchiyama, K., Jokitalo, E., Lindman, M., Jackman, M., Kano, F., Murata, M., Zhang, X. and Kondo, H. (2003) *J Cell Biol* 161, 1067-79.
- [51] Ciechanover, A. (1998) *Embo J* 17, 7151-60.
- [52] Dai, R.M. and Li, C.C. (2001) *Nat Cell Biol* 3, 740-4.
- [53] Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M. and Li, C.C. (1998) *J Biol Chem* 273, 3562-73.
- [54] Meyer, H.H., Wang, Y. and Warren, G. (2002) *Embo J* 21, 5645-52.
- [55] Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F. and Varshavsky, A. (1996) *Embo J* 15, 4884-99.
- [56] Woodman, P.G. (2003) *J Cell Sci* 116, 4283-90.
- [57] Wang, Q., Song, C. and Li, C.C. (2004) *J Struct Biol* 146, 44-57.
- [58] Thoms, S. (2002) *FEBS Lett* 520, 107-10.
- [59] Hirabayashi, M. et al. (2001) *Cell Death Differ* 8, 977-84.
- [60] Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y.H., Fujikake, N., Matsukage, A. and Kakizuka, A. (2002) *Cell Death Differ* 9, 264-73.
- [61] Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H. and Jentsch, S. (2001) *Cell* 107, 667-77.
- [62] Bays, N.W., Wilhovsky, S.K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K. and Hampton, R.Y. (2001) *Mol Biol Cell* 12, 4114-28.
- [63] Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H. and Sommer, T. (2002) *Nat Cell Biol* 4, 134-9.
- [64] Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K.U., Diamant, N. and Bar-Nun, S. (2002) *Mol Cell Biol* 22, 626-34.
- [65] Ye, Y., Meyer, H.H. and Rapoport, T.A. (2003) *J Cell Biol* 162, 71-84.

- [66] Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. and Jentsch, S. (2000) *Cell* 102, 577-86.
- [67] Lin, L., DeMartino, G.N. and Greene, W.C. (1998) *Cell* 92, 819-28.
- [68] Shcherbik, N., Zoladek, T., Nickels, J.T. and Haines, D.S. (2003) *Curr Biol* 13, 1227-33.
- [69] Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C. and Botstein, D. (1982) *Genetics* 100, 547-63.
- [70] Yamada, T., Okuhara, K., Iwamatsu, A., Seo, H., Ohta, K., Shibata, T. and Murofushi, H. (2000) *FEBS Lett* 466, 287-91.
- [71] Zhang, H., Wang, Q., Kajino, K. and Greene, M.I. (2000) *DNA Cell Biol* 19, 253-63.
- [72] Shiogane, T., Fukada, T., Muller, J.M., Shima, D.T., Hibi, M. and Hirano, T. (1999) *Immunity* 11, 709-19.
- [73] Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M. and Ashwell, J.D. (2000) *Science* 288, 874-7.
- [74] Huang, H., Joazeiro, C.A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J.D. and Hunter, T. (2000) *J Biol Chem* 275, 26661-4.
- [75] Rockel, B., Jakana, J., Chiu, W. and Baumeister, W. (2002) *J Mol Biol* 317, 673-81.
- [76] Rockel, B., Guckenberger, R., Gross, H., Tittmann, P. and Baumeister, W. (2000) *J Struct Biol* 132, 162-8.
- [77] Rockel, B., Walz, J., Hegerl, R., Peters, J., Typke, D. and Baumeister, W. (1999) *FEBS Lett* 451, 27-32.
- [78] Rouiller, I., DeLaBarre, B., May, A.P., Weis, W.I., Brunger, A.T., Milligan, R.A. and Wilson-Kubalek, E.M. (2002) *Nat Struct Biol* 9, 950-7.
- [79] Huyton, T. et al. (2003) *J Struct Biol* 144, 337-48.
- [80] DeLaBarre, B. and Brunger, A.T. (2003) *Nat Struct Biol* 10, 856-63.
- [81] Furst, J., Sutton, R.B., Chen, J., Brunger, A.T. and Grigorieff, N. (2003) *Embo J* 22, 4365-74.
- [82] Zhang, X. et al. (2000) *Mol Cell* 6, 1473-84.
- [83] DeLaBarre, B. and Brunger, A.T. (2005) *J Mol Biol* 347, 437-52.
- [84] Singleton, M.R., Sawaya, M.R., Ellenberger, T. and Wigley, D.B. (2000) *Cell* 101, 589-600.
- [85] Weibezahn, J. et al. (2004) *Cell* 119, 653-65.
- [86] Castillo, R.M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T.L. and Murzin, A.G. (1999) *Structure Fold Des* 7, 227-36.
- [87] Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D. and Haganir, R.L. (1998) *Neuron* 21, 393-400.
- [88] Meyer, H.H., Shorter, J.G., Seemann, J., Pappin, D. and Warren, G. (2000) *Embo J* 19, 2181-92.
- [89] Brunger, A.T. and DeLaBarre, B. (2003) *FEBS Lett* 555, 126-33.
- [90] Song, C., Wang, Q. and Li, C.C. (2003) *J Biol Chem* 278, 3648-55.
- [91] Wang, Q., Song, C. and Li, C.C. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 300, 253-60.
- [92] Besche, H., Tamura, N., Tamura, T. and Zwickl, P. (2004) *FEBS Lett* 574, 161-6.
- [93] Lenzen, C.U., Steinmann, D., Whiteheart, S.W. and Weis, W.I. (1998) *Cell* 94, 525-36.
- [94] Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. and Huber, R. (2000) *Nature* 403, 800-5.
- [95] Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S. and McKay, D.B. (2000) *Cell* 103, 633-43.
- [96] Wang, J. et al. (2001) *Structure (Camb)* 9, 177-84.
- [97] Boyer, P.D. (2002) *J Biol Chem* 277, 39045-61.
- [98] Wang, J. et al. (2001) *Structure* 9, 177-184.

- [99] Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4328-4333.
- [100] Ortega, J., Singh, S.K., Ishikawa, T., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2000) *Molecular Cell* 6, 1515-1521.
- [101] Song, H.K., Hartmann, C., Ramachandran, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. and Huber, R. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14103-14108.
- [102] Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K. and Ogura, T. (2003) *Journal of Biological Chemistry* 278, 50182-50187.
- [103] Siddiqui, S.M., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2004) *Genes & Development* 18, 369-374.
- [104] Schlieker, C. et al. (2004) *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 607-615.
- [105] Lum, R., Tkach, J.M., Vierling, E. and Glover, J.R. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 29139-29146.
- [106] Weibezahn, J. et al. (2004) *Cell* 119, 653-665.
- [107] Schirmer, E.C., Ware, D.M., Queitsch, C., Kowal, A.S. and Lindquist, S.L. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 914-9.
- [108] Hattendorf, D.A. and Lindquist, S.L. (2002) *Embo J* 21, 12-21.
- [109] Davies, J.M., Tsuruta, H., May, A.P. and Weis, W.I. (2005) *Structure (Camb)* 13, 183-95.
- [110] Schroder, R. et al. (2005) *Ann Neurol* 57, 457-61.
- [111] Watts, G.D. et al. (2004) *Nat Genet* 36, 377-81.
- [112] Beuron, F., Flynn, T.C., Ma, J., Kondo, H., Zhang, X. and Freemont, P.S. (2003) *J Mol Biol* 327, 619-29.
- [113] Varshavsky, A. (1992) *Cell* 69, 725-35.
- [114] Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G. and Varshavsky, A. (1991) *Science* 254, 1374-7.
- [115] Keiler, K.C., Waller, P.R. and Sauer, R.T. (1996) *Science* 271, 990-3.
- [116] Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1999) *Science* 286, 1888-93.
- [117] Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W. and Langer, T. (1999) *Nature* 398, 348-51.
- [118] Schlieker, C. et al. (2004) *Nat Struct Mol Biol* 11, 607-15.
- [119] Siddiqui, S.M., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2004) *Genes Dev* 18, 369-74.
- [120] Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K. and Ogura, T. (2003) *J Biol Chem* 278, 50182-7.
- [121] Lum, R., Tkach, J.M., Vierling, E. and Glover, J.R. (2004) *Journal of Biological Chemistry* 279, 29139-29146.
- [122] Pannani, V., Tamura, T., Lupas, A., Peters, J., Cejka, Z., Ashraf, W. and Baumeister, W. (1997) *FEBS Lett* 404, 263-8.
- [123] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-5.
- [124] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988) *Electrophoresis* 9, 255-62.
- [125] Seemuller, E., Lupas, A., Zuhl, F., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1995) *FEBS Lett* 359, 173-8.
- [126] Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D. and Horwich, A.L. (1999) *Nature* 401, 90-3.
- [127] Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. and Candia, O.A. (1979) *Anal Biochem* 100, 95-7.
- [128] Krzewska, J., Konopa, G. and Liberek, K. (2001) *J Mol Biol* 314, 901-10.
- [129] Schirmer, E.C., Queitsch, C., Kowal, A.S., Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1998) *J Biol Chem* 273, 15546-52.

- [130] Schlee, S., Groemping, Y., Herde, P., Seidel, R. and Reinstein, J. (2001) *J Mol Biol* 306, 889-99.
- [131] Dreveny, I., Kondo, H., Uchiyama, K., Shaw, A., Zhang, X. and Freemont, P.S. (2004) *Embo J* 23, 1030-9.
- [132] Xia, D., Esser, L., Singh, S.K., Guo, F. and Maurizi, M.R. (2004) *J Struct Biol* 146, 166-79.
- [133] Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J. and Bukau, B. (2003) *J Biol Chem* 278, 17615-24.
- [134] Kenniston, J.A., Baker, T.A., Fernandez, J.M. and Sauer, R.T. (2003) *Cell* 114, 511-20.
- [135] Lee, C., Schwartz, M.P., Prakash, S., Iwakura, M. and Matouschek, A. (2001) *Mol Cell* 7, 627-37.
- [136] Kenniston, J.A., Burton, R.E., Siddiqui, S.M., Baker, T.A. and Sauer, R.T. (2004) *J Struct Biol* 146, 130-40.
- [137] Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) *Science* 295, 1852-8.
- [138] Ortega, J., Lee, H.S., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2004) *J Struct Biol* 146, 217-26.
- [139] Weibezahn, J., Schlieker, C., Bukau, B. and Mogk, A. (2003) *J Biol Chem* 278, 32608-17.
- [140] Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S. and Maurizi, M.R. (1987) *J Biol Chem* 262, 4477-85.
- [141] Holt, C. and Sawyer, L. (1988) *Protein Eng* 2, 251-9.
- [142] Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L. and Rock, K.L. (1997) *J Biol Chem* 272, 13437-45.
- [143] Lo, J.H., Baker, T.A. and Sauer, R.T. (2001) *Protein Sci* 10, 551-9.
- [144] Ortega, J., Heymann, J.B., Kajava, A.V., Ustrell, V., Rechsteiner, M. and Steven, A.C. (2005) *J Mol Biol* 346, 1221-7.
- [145] Ma, C.P., Slaughter, C.A. and DeMartino, G.N. (1992) *J Biol Chem* 267, 10515-23.
- [146] Gray, C.W., Slaughter, C.A. and DeMartino, G.N. (1994) *J Mol Biol* 236, 7-15.
- [147] Kuehn, L. and Dahlmann, B. (1996) *Arch Biochem Biophys* 329, 87-96.
- [148] Hendil, K.B., Khan, S. and Tanaka, K. (1998) *Biochem J* 332 (Pt 3), 749-54.
- [149] Matayoshi, E. and Swift, K. (2001) in: *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, pp. 84-98 (Rigler, R. and Elson, E.S., Eds.) Springer, New York.
- [150] Schwille, P. and Haustein, E. (2004) in: *Biophysics Textbook online* (Schwille, P., Ed.).
- [151] Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2004) *Journal of Structural Biology* 146, 1-1.
- [152] Maurizi, M.R. and Li, C.C. (2001) *EMBO Reports* 2, 980-985.
- [153] Patel, S. and Latterich, M. (1998) *Trends Cell Biol* 8, 65-71.
- [154] Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S. and Jentsch, S. (2002) *Embo J* 21, 615-21.
- [155] Ye, Y., Meyer, H.H. and Rapoport, T.A. (2001) *Nature* 414, 652-6.
- [156] Bruderer, R.M., Brasseur, C. and Meyer, H.H. (2004) *J Biol Chem* 279, 49609-16.
- [157] Matveeva, E.A., May, A.P., He, P. and Whiteheart, S.W. (2002) *Biochemistry* 41, 530-536.
- [158] Shorter, J. and Lindquist, S. (2005) *Nat Struct Mol Biol* 12, 4-6.
- [159] Park, E. et al. (2005) *J Biol Chem* 280, 22892 - 22898.
- [160] Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegge, C. and Jentsch, S. (2005) *Cell* 120, 73-84.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Zwickl für seine kompetente und stets freundliche Betreuung während der Doktorarbeit.

Herrn Dr. Jürgen Peters und Frau Dr. Beate Rockel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in allen „VAT-Fragen“ und die Zurverfügungstellung wichtiger Materialien.

Bei meiner Laborkollegin Frau Dr. Henrike Besche bedanke ich mich für die Bereitstellung vieler Materialien und für viele gute Ratschläge und fruchtbare Diskussionen.

Herrn Dr. Erik Roth danke ich für die Hilfestellung in molekularbiologischen Fragen.

Frau Brigitte Kühlmorgen danke ich sehr für die Anfertigung von vielen VAT-Grids und die Aufnahme von sehr vielen elektronenmikroskopischen Bildern.

Ich möchte mich auch bei den Kooperationspartnern bedanken:

Frau Barbara Müller und Herrn Dr. Don Lamb danke ich für die FCS-Messungen, Herrn Dr. Cornelius Zeth für die Kristallisationsansätze und die Vermessung der Kristalle und Herrn Dr. Mandar Deshmukh für die NMR-Messungen.

Zum Schluss richte ich meinen Dank an alle Kollegen am Max-Planck-Institut für die angenehme Arbeitsatmosphäre.