Untersuchungen zur Konformationskopplung bei der Chaperonin-GroEL-gestützten Proteinfaltung

Vom Fachbereich der Universität Kaiserslautern
Zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte

DISSERTATION
(D 386)

vorgelegt von
Dipl. Chem. Tarek Zaida

Betreuer: Priv. Doz. Dr. P. D. Vogel

Kaiserslautern 2001

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 2. 11. 2001

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. D. Vogel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Trommer

Die Durchführung der vorliegender Arbeit entstand zwischen 16 April 1997 und 7 Mai 2000 im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie der Universität Kaiserslautern.

Ich danke Frau Priv. Doz. Dr. P. D. Vogel für die Überlassung des Themas, die interessanten Diskussionen und wertvollen Hinweise. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer und dem gesamten Arbeitskreis für die ideale Atmosphäre, Unterstützung und Zusammenarbeit.

Meiner Mutter, Geschwistern
und Palästina

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**1**
1.1	Molekulare Chaperone- Entdeckung und Bedeutung bei Proteinfaltung	1
1.2	Das GroEL/GroES-System- Funktion und Struktur	1
1.2.1	Struktur von Chaperonein GroEL	5
1.2.2	Struktur von GroES	6
1.3	Modell für die Chaperonin unterstützte Proteinfaltung	7
1.4	Modelle für GroELS-Reaktionszyklus	10
1.4.1	Modell nach Hartl (1996)	10
1.4.2	Modell nach Sparrer *et al.,* (1997)	11
1.5	ESR-Spektroskopie	13
2	**Problemstellung**	**17**
3	**Ergebnisse und Diskussion**	**18**
3.1	Expression, Isolierung und Reinigung der Chaperonine GroEL und GroES aus E. coli	18
3.2	Untersuchungen am Chaperonin GroEL	21
3.2.1	biochemische Charakterisierung von dmEL und deren Vergleich zum wtEL	23
3.2.1.1	Untersuchung der ATPase-Aktivität von Chaperonin GroEL	23
3.2.1.1.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL	24
3.2.1.1.2	Bestimmung der ATPase-Aktivität des wtEL	26
3.2.1.2	Untersuchung der Chaperonin GroEL-unterstützten Rückfaltung von LDH *in vitro*	28
3.2.1.2.1	Bestimmung der dmEL-unterstützten Rückfaltung von LDH	28
3.2.1.2.2	Bestimmung der wtEL-unterstützten Rückfaltung von LDH	31
3.2.1.3	Bindungsverhalten von C8-SL-ATP und Bestimmung der maximalen Nukleotidbindungsstellen bei GroEL	32
3.2.1.3.1	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL allein	33
3.2.1.3.2	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL in Anwesenheit von GroES	34

3.2.1.3.3	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei wtEL	35
3.2.2	Chemische Modifizierung des Cys 458 mit verschiedenen Spin-Labeln	36
3.2.2.1	Charakterisierung des dmEL-IAAT	36
3.2.2.1.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT	36
3.2.2.1.2	Bestimmung der dmEL-IAAT-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH in vitro	38
3.2.2.1.3	ESR-spektroskopische Untersuchungen am Chaperonin GroEL	40
3.2.2.1.3.1	Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-IAAT in Abwesenheit von Substratprotein	40
3.2.2.1.3.2	Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Struktur des dmEL-IAAT während der Rückfaltung von denaturierter Substrat-protein LDH	43
3.2.2.1.4	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL-IAAT	47
3.2.2.1.5	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL-IAAT in Anwesen-heit von ES	48
3.2.2.2	Charakterisierung des dmEL-MAL-SL	50
3.2.2.2.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-MAL-SL	50
3.2.2.2.2	Bestimmung der dmEL-MAL-SL-unterstüzten Rückfaltung von denaturier-ter LDH *in vitro*	51
3.2.2.2.3	Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-MAL in Abwesenheit von denaturierter LDH	53
3.2.2.3	Charakterisierung des dmEL-IOPI-SL	57
3.2.2.3.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI	57
3.2.2.3.2	Bestimmung der dmEL-IOPI-unterstützen Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro*	59
3.2.2.3.3	Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-IOPI in Abwesenheit von Substratprotein LDH	61
3.2.2.3.4	Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-IOPI in Anwesenheit von denaturierter Substratprotein LDH *in vitro*	63
3.2.2.3.4.1	ESR-Spektren des dmEL-IOPI-SL nach Beendigung der Chaperonin-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH	63
3.2.2.3.4.2	ESR-Spektren des dmEL-IOPI-SL während der Chaperonin-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH	65

4 Zusammenfassung 71

5 Experimentelle Methoden 75

5.1 Isolierung und Reinigung von *E. coli* GroEL 75
5.1.1 Präparation 75
5.1.1.1 Medien & Agarplatten für TG2 75
5.1.1.2 Medien & Agarplatten für DH5α 76
5.1.2 Antibiotika 77
5.1.3 Platten gießen 77
5.1.4 Zellenwachstumsbedingungen 78
5.1.5 Glycerinkulturen 78
5.1.6 Aufzucht der Zellen 78
5.1.7 Isolierung des Proteins GroEL 79
5.1.8 Reinigung des Proetins GroEL/ES 81
5.1.9 Aufkonzentrierung & Lagerung der GroEL- bzw. GroES-Lösungen 82
5.2 Bestimmung von Sulfhydryl-Gruppen (-SH) in GroEL 82
5.3 Bestimmung der ATP-Hydrolyse Aktivität des GroEL 84
5.4 Rückfaltungsaktivität 85
5.5 Chemische Modifizierung des Cysteinrest C458 des dmEL mit verschiedenen SL-Radikalen 88
5.5.1 ATPase-Aktivität des mit verschiedenen SL-Radikalen modifizierten dmEL 89
5.6 ESR-spektroskopische Untersuchungen 89
5.6.1 ESR-Untersuchungen am dmEL-SL 89
5.6.1.1 Effekte von verschiedenen Nukleotiden und ES auf die Struktur des dmEL-SL 89
5.6.1.2 Untersuchungen von Konformationsänderungen im dmEL-SL während der Rückfaltung von LDH 91
5.6.1.2.1 dmEL-IOPI-SL 91
5.6.1.2.2 dmEL-IAAT-SL 93
5.7 Effekt von GdnHCl auf dmEL bzw. dmEL in Anwesenheit von ES 94
5.8 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im GroEL 94
5.8.1 Erstellung der Eichgerade 94
5.8.2 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL 95

5.8.3	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL in Anwesenheit von ES	95
5.8.4	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL-SL	95
5.8.5	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL-SL in Anwesenheit von ES	96
5.8.6	Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im wtEL	96
5.9	Allgemeine Arbeitsmethode	97
5.9.1	Ultraviolettspektroskopie	97
5.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	98
5.9.3	Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung	98
5.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	98
5.9.5	Gelzentrifugation	99
5.9.6	Säulenchromatographie	99
5.9.7	Bestimmung der Nukleotidkonzentration	100
5.9.8	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	100
5.10	Materialien	101
6	**Literatur**	**105**
7	**Anhang**	**113**

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
AMP	Adenosin-5´-monophosphat
AMPPNP	Adenylyl-imidodiphosphat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
ATP-γ-S	Adenosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)
BSA	Rinderserumalbumin
CEA	Coupled Enzyme Assay
C138 S	Cystein an Aminosäureposition138 wurde durch Serin ersetzt.
C519 S	Cystein an Aminosäureposition 519 wurde durch Serin ersetzt.
C-8-SL-ATP	(8-(2,2,6,6- Tetramethylpiperidin-4-yl-1-oxyl)amino-adenosin-5´-triphosphat)
dm	Doppelmutant
dmEL	Doppelmutant GroEL
dmEL-IAAT-SL	modifizierter GroEL-Doppelmutant mit4-(3-Iodo-acetamido)-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl -Spinlabel
dmEL-IOPI-SL	modifizierter GroEL-Doppelmutant mit 4-(3–Iodo-2-oxopropyliden1-1)–2,2,3,5,5– pentamethyl-[d_{15}]–imidazolidin-1-oxyl - Spinlabel
dmEL-MAL-SL	modifizierter GroEL-Doppelmutant mit 4-Maleimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl - Spinlabel
DNase	Desoxyribonuklease
DTP	4,4´-Dithiodipyridin
DTT	1,4-Dithiothreitol
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´- tetraessigsäure
EL	GroEL
ES	GroES
ESR	Elektronenspinresonanz
HSP	Hitzeschock Protein
H_2O_d	destilliertes Wasser

H_2O_{dd}	Doppeltdestilliertes Wasser
IAAT	4-(3-Iodo-acetamido)-2,2,6,6- tetramethyl-piperidin-1-oxyl
IOPI	4-(3– Iodo-2– oxopropyliden-1)–2,2,3,5,5– pentamethyl-[d_{15}]–imidazolidin-1-oxyl
LDH	Lactatdehydrogenase
NADH	Nicotinamid adenindinukleotid-reduzierte Form
MAL	4-Maleimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl
MEA	Mercaptoethylamin
OD	Optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pi	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvat Kinase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spin-Label
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit = 1 µmol Produkt/min
ÜNK	Übernachtkultur
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Molekulare Chaperone - Entdeckung und Bedeutung bei Proteinfaltung

Die Proteinfaltung ist der Prozess, bei dem die Information, die innerhalb der Aminosäuren-kette eines Polypeptides existiert, zu Bildung seiner dreidimensionalen Struktur verwendet wird. Die genaue Aufklärung dieses komplizierten Prozesses ist einer der grundlegenden Probleme in der Biologie. Christian Anfinsen (1973) hat in seinen Pionierexperimenten bezüglich der spontanen Proteinfaltung *in vitro* gezeigt, daß die in der Aminosäurenkette eines Polypeptides gespeicherte Information ausreicht, um die Struktur des gefalteten Proteins zu bestimmen. Daher war es logisch anzunehmen, daß die Faltung bzw. Selbstorganisation von den neu-synthetisierten Polypeptiden *in vivo* auch spontan passiert, ohne den Einfluss von weiteren Komponenten oder Energiezufuhr. Allerdings zeigte sich, daß aufgrund der hohen Proteinkonzentration in der Zelle effiziente Faltung *in vivo* von der Anwesenheit von bestimmten Proteinen, den molekularen Chaperone, abhängig ist (Hartl, 1998). Die molekularen Chaperone befinden sich in verschiedenen zellulären Abteilen (z.B. Cytosol, Mitochondrien, Nukleus, Lysosom und Plasmamembran). Ihre Hauptaufgabe ist es, die Aggregation von entfalteten (denaturierten oder naszierenden) Polypeptiden zu verhindern (Lindquist, 1986). Es wird angenommen, daß ohne Anwesenheit von molekularen Chape-ronen ein großer Anteil von der neu-synthetisierten Polypeptiden aggregieren und damit nutzlos sein würde. Aus diesem Grund spricht man von assistierter Selbstorganisation der Proteine *in vivo*. Die molekularen Chaperone wurden nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Familien eingeteilt. Das wohl am besten untersuchte Mitglied der Chaperonen-klasse 60 ist das GroEL aus *E. coli* (Becker und Craig, 1994).

1.2 Das GroEL/GroES-System - Funktion und Struktur

Trotz der Ähnlichkeit mancher Eigenschaften der Chaperone bezüglich ihrer spezifischen Bindung von falsch bzw. nicht gefalteten Proteinen, nämlich der Inhibierung der Aggregation

von entfalteten Polypeptide und der Erhöhung der Faltungsausbeute von Proteinen, unterscheiden sie sich in Bezug auf ihren Mechanismus, der Substratspezifität und der Abhängigkeit von energieliefernden Prozessen, z. B. der ATP-Hydrolyse. Für das Chaperonin System GroEL/GroES wurden viele wichtige Informationen aus biochemischen, strukturellen und genetischen Studien erhalten. Obwohl die häufig verwendeten Assays *in vitro* meistens künstlich sind und nicht viel über die natürlichen Substratproteine der Chaperone in der Zelle bekannt ist, wird angenommen, daß die *in vitro* bestimmten mechanistischen Prinzipien auch *in vivo* gelten (Ehrnsperger *et al*, 1997a). Das Chaperonin System GroEL/GroES ist ein stabiles Proteinoligomer, das in ähnlicher Form sowohl in Bakterien als auch in Mito-chondrien und in Chloroplasten gefunden wird (Fenton und Horwich, 1997). Unter Streß-bedingungen, z. B. bei hohen Temperaturen oder bei Anwesenheit von verschiedenen toxi-schen Chemikalien, ermöglicht die Kooperation zwischen den beiden Komponenten des Systems, nämlich GroEL und GroES, die Faltung von Proteinen, deren spontane Faltung unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Während des Funktionszyklus bindet der GroEL/-GroES-Komplex, der unter bestimmten Bedingungen ausgebildet wird (z. B. Anwesenheit von Nukleotiden, Goloubinoff *et al*.,1989; Schmidt *et al.,* 1994a), das entfaltete Substrat-protein innerhalb eines Hohlraumes im Protein, wobei sich der GroEL/GroES-Komplex an das Substrat anpaßt. Abhängig von dem Molekulargewicht des Substrates kann der GroEL/-GroES-Komplex den Hohlraum für ein Substratprotein mit einem Molekulargewicht von 10 bis 55 KDa erweitern (Ewalt *et al*., 1997).
Wie schon erwähnt, wird die Ausbildung von GroEL/GroES-Komplex nur in Anwesenheit von ATP möglich. Das GroEL kann in Abwesenheit von Nukleotiden nicht die benötigten Konformationsänderungen in seiner Struktur durchführen. Die erforderlichen Konformationsänderungen in der apikalen Domäne, wobei das Substratprotein gebunden wird, benötigen Konformationsänderungen im Bereich der äquatorialen Domäne. Dies wird durch die Bindung von ATP erreicht. Die Bindung bzw. Hydrolyse von ATP spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des GroEL gegenüber seinen Substraten. In zahlreichen Studien (Langer *et al*., 1992 a; Chen *et al*., 1994; Liorca *et al*., 1994; Schmidt *et al*., 1994 b) wurde gezeigt, daß die Bindung von GroES an GroEL in Anwesenheit von ATP zur Ausbildung von asymmetri-schen **"** bullet-shaped **"** 1:1 **(** EL_{14mer} : ES_{7mer}) oder von symmetrischen," football-shaped " (EL_{7mer}: ES_{7mer}: EL_{7mer}) Komplexen führt (Abb. 1). Das GroEL besteht aus zwei heptameren Ringen (je 7 x 57 KDa), die einen Zylinder bestehend aus 14 identischen Einheiten (137Å Durchmesser und 146Å Länge) bilden.

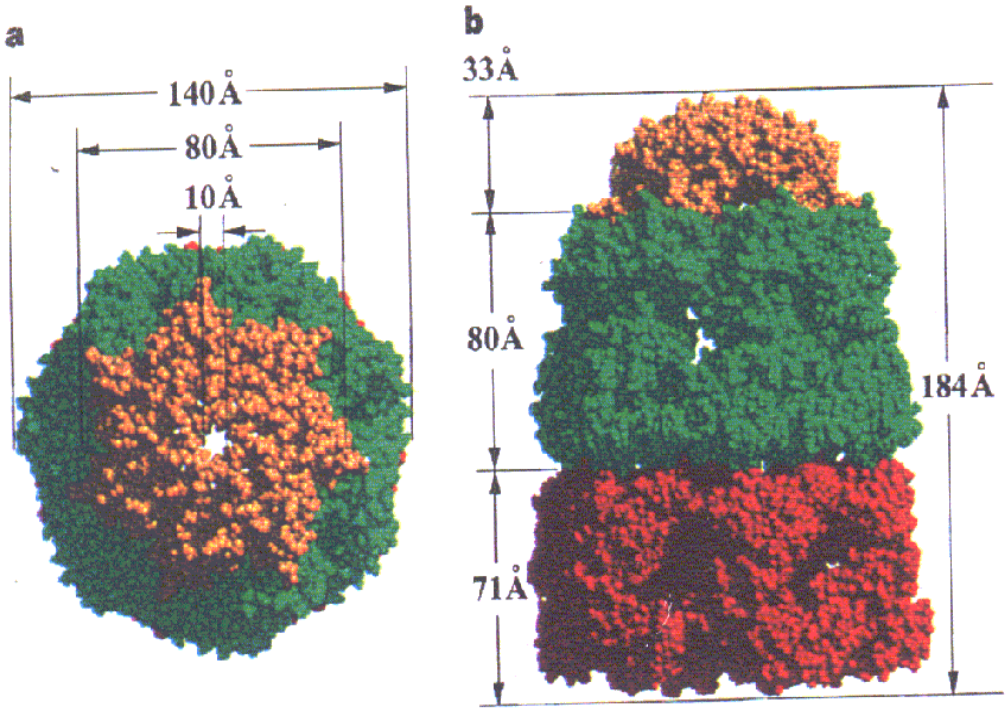


Abb.1: Architektur und Dimensionen des GroEL/GroES-Komplexes (Xu *et al*., 1997). **a**, Van der Waals "space filling" Modell des ganzen Komplexes, angesehen von oben nach unten, wobei ES an EL gebunden ist. **b**, Seitenansicht des EL/ES:Komplexes Rot entspricht dem *trans*-Ring von EL, grün dem *cis*-Ring von EL, und gold ES.

Cryo-Elektronenmikroskopische Studien (Roseman *et al*., 1996) sowie die Kristallstrukturanalyse des asymmetrischen Komplexes $GroES_7$: ADP_7: $GroEL_{14}$ (Xu *et al*., 1997) haben eine große " *en bloc* " Bewegung von ca. 4° nach innen innerhalb jeder Untereinheit des *cis*-GroEL-Ringes (dem GroES benachbarten) und 2° nach aussen innerhalb jeder Untereinheit des *trans*-Ringes bei der Bindung von GroES bestätigt (Abb. 2).

Zwischen der intermediären bzw. der apikalen Domäne gibt es eine Scharnierregion, die zu einer Bewegung der apikalen Domäne nach oben und gleichzeitig zu einer Rotation der selben während der ATP- bzw. GroES-Bindung führt. Eine zweite Scharnierregion liegt neben der äquatorialen Domäne und verursacht eine "downward/inward" Bewegung der intermediären

Domäne während der ATP-Bindung. Die Bewegung nach oben verdoppelt die zugängliche Größe des Hohlraumes für das Substratprotein in Anwesenheit von GroES in Vergleich zu dem GroEL in Abwesenheit von GroES (175000 $Å^3$ gegen 85000 $Å^3$).

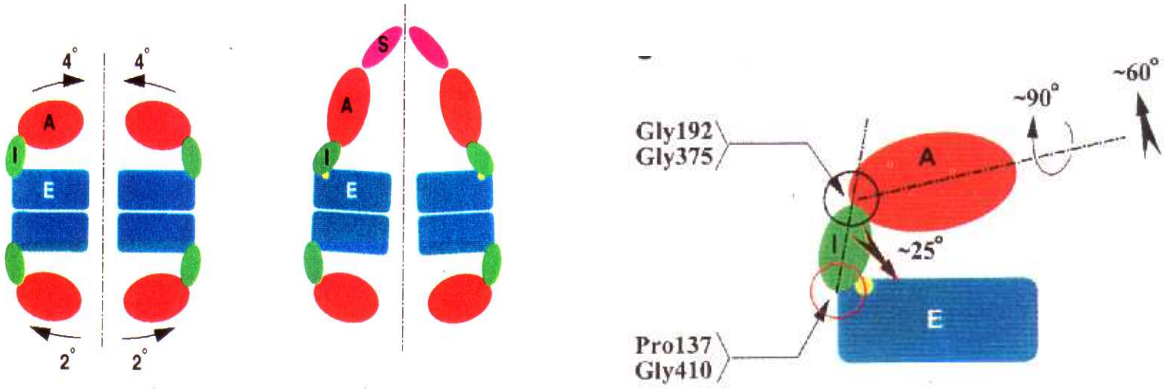


Abb. 2: Links: Schematische Darstellung der *en bloc* Bewegung der äquatorialen Domäne. E, äquatoriale Domäne; I, intermediäre Domäne; A, apikale Domäne; S, GroES-Einheit. Rechts: schematische Darstellung des EL, wobei die Richtung bzw. die Größe der Bewegung innerhalb des *cis*-Rings von EL gezeigt wird (Rye, H.S. *et al*., 1997).

Die Nukleotidbindung an GroELS-System wurde von Roseman *et al*., (1996) Cryo-Elektronen-mikroskopisch untersucht. In ihren Untersuchungen wurde festgestellt, daß das GroEL alleine eine unterschiedliche Struktur als die des GroEL in Komplex mit Nukleotiden zeigt, und daß auch die Komplexe des GroEL mit verschiedenen Nukleotide sich strukturell von einander unterscheiden. Diese strukturellen Unterschiede sind in Anwesenheit von GroES noch deutlicher zu sehen (Abb. 3).

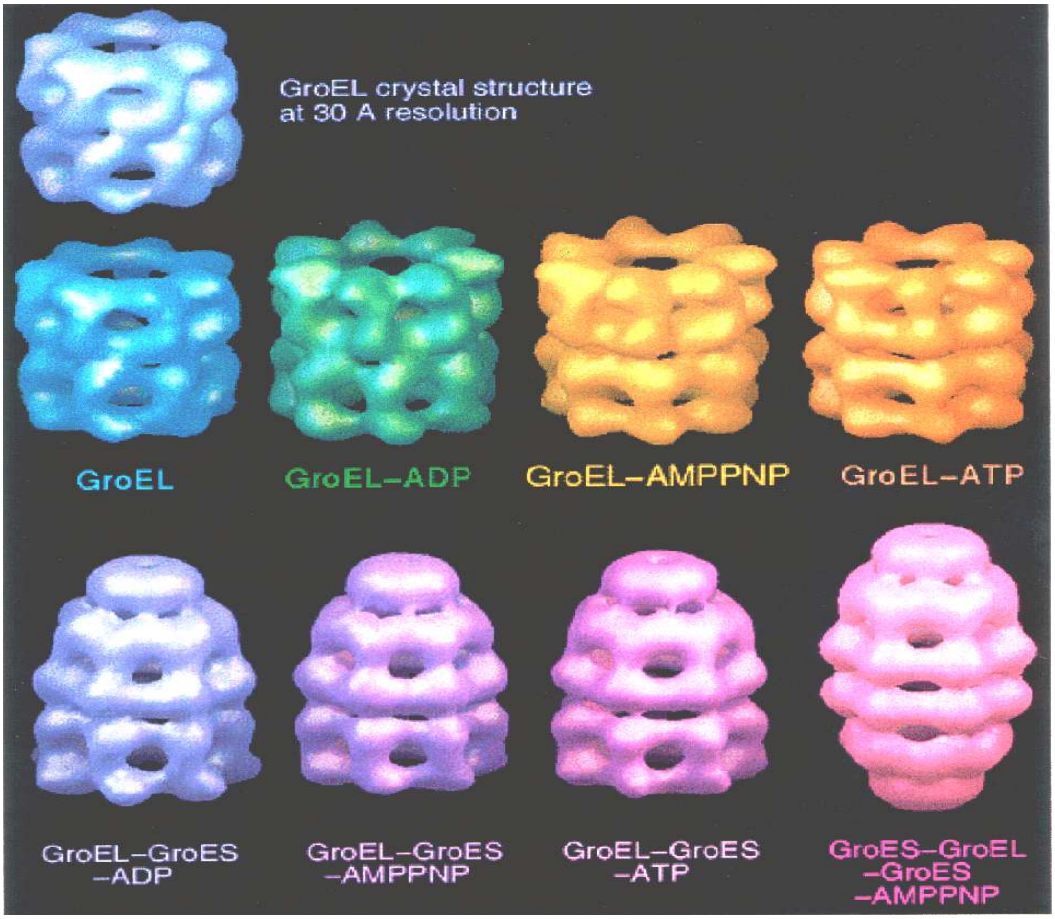


Abb. 3: Dreidimensionale Rekonstruktionen der Cryo-Elektronen-mikroskopischen Untersuchung des GroEL in Komplexe mit Nukleotiden bzw. mit GroES in Anwesenheit von Nukleotiden (Roseman *et al*., 1996).

1.2.1 Struktur von Chaperonin GroEL

Jede Untereinheit des 14-mer GroEL besteht aus drei Domänen (Abb. 4). Die äquatoriale Domäne (Reste 6-133 und 409-523) bildet den größten Teil von intra- bzw. inter-Ring-Kontakten und trägt die Nukleotidbindungsstellen, welche sich gegenüber des zentralen Kanals des Zylinders befinden. Eine kleine intermediäre Domäne (Reste 134-190 und 377-408) verbindet die äquatoriale mit der apikalen Domäne in einer Weise, die als Scharnier-region bezeichnet werden kann (Gray und Fersht 1991; Bochkareva *et al.,* 1992; Yifrach und Horovitz, 1994). Die apikale Domäne (Reste 191-376) enthält die Bindungsstellen für GroES bzw. für Substratproteine (Fenton *et al*., 1994).

Die Substratproteinbindungsstellen enthalten hydrophobe Reste, die gegenüber des Hohlraumes liegen und dadurch wird das entfaltete Substrat gebunden.

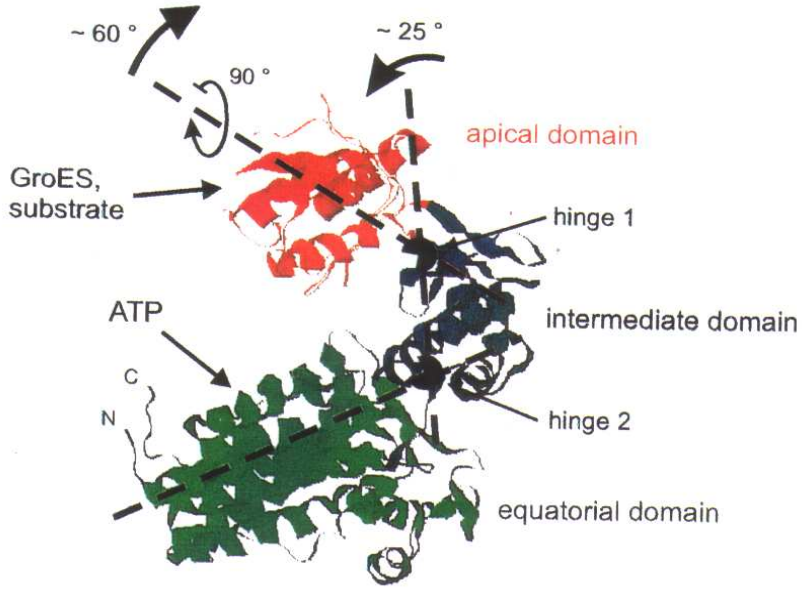


Abb. 4: Darstellung einer GroEL-Einheit, wobei die Größe bzw. die Richtung der Bewegung der Domänen in Anwesenheit von Nukleotiden und GroES gezeigt wird. (Beissinger & Buchner, 1998).

1.2.2 Struktur von GroES

Das Co-Chaperonin GroES besteht aus einem heptameren Ring, aus sieben identischen Einheiten (je 7 x 10.3 KDa, Braig *et al*., 1994). Jede Einheit besitzt eine β-Barrel-Struktur mit zwei β-Haarnadel-Loops, von denen einer eine mobile Schleife enthält (Landry *et al*., 1993). Das GroES bindet an GroEL durch einen sogenannten "mobile loop" (Abb. 5) (Xu *et al*., 1997). Mit der Bindung von Nukleotid an GroEL bilden GroEL und GroES einen asymmetri-schen "bullet-shaped" oder symmetrischen "football-shaped" GroEL/GroES-Komplex (Abb.3) (Langer *et al*., 1992a ; Chen *et al*., 1994; Liorca *et al*., 1994; Schmidt *et al*., 1994b).

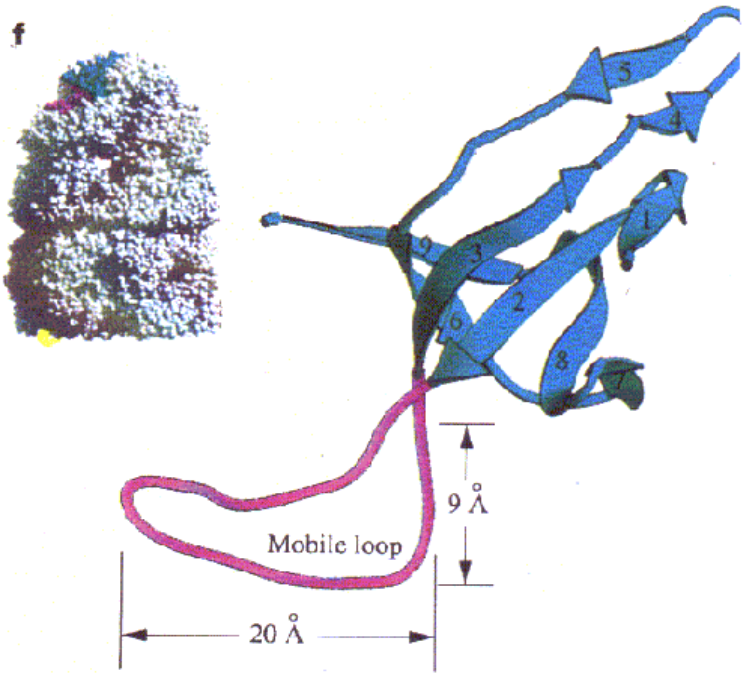


Abb. 5: Darstellung einer GroES-Untereinheit (Xu *et al*., 1997).

1.3 Modell für die Chaperonin unterstützte Proteinfaltung

Die Chaperone haben eine entscheidende Rolle und große Bedeutung bei der *in vivo* Faltung von neusynthetisierten Polypeptiden bzw. denaturierten Proteinen vor allem wegen der hohen Proteinkonzentration in der Zelle (Ellis & Hartl, 1996). Durch die hohen Proteinkonzentra-tion in der Zelle können die ungefalteten Proteine bzw. Polypeptide ihre funktionelle native Struktur nur schwer korrekt erreichen, da Aggregation als Konkurenzreaktion auftritt. Das Chaperonin GroEL bietet diesen ungefalteten Proteinen einen Hohlraum, wobei sich das Substratprotein an GroEL bindet und damit seine native Struktur in einer geschützten Umgebung erreichen kann. Das Chaperonin GroEL enthält zwei solcher Hohlräume (Abb. 6) (Jaenicke & Creighton, 1993), die durch ein 23 Aminosäuren großes Segment des C-Terminus der Untereinheiten voreinander getrennt sind (Hartl, 1996).

Die funktionellen Prinzipien der verschiedenen Chaperonenklassen können mit einbezogen werden, um ein generelles Modell der Chaperonen-unterstützter Proteinfaltung *in vivo* zu erhalten (Abb. 7).

Ein in der Zelle neusynthetisiertes Polypeptid oder ein ungefaltetes Polypeptid im Reagenz-glas hat prinzipiell drei mögliche Reaktionswege:

I. Die spontane Faltung in die native Struktur.

II. Die Aggregation in unproduktive irreversible Wege.

III. Die Wechselwirkung mit Chaperonen.

1. Bei ATP-unabhängigen Chaperonen "Small heat shock proteins" (sHsps) (Horwitz 1992; Jakob *et al*., 1993; Ehrnsperger *et al*., 1997; Lee *et al*., 1997) wird das gebundene Substrat mit der selben Konformation, mit der es ursprünglich an die Chaperone gebunden wurde, freigesetzt (I in Abbildung 7).

2. Bei ATP-abhängigen Chaperonen wie GroEL ist die Situation komplizierter. Die ATP-Bindung an Chaperone bewirkt verschiedenen Konformationsänderungen innerhalb der äquatorialen Domäne und dadurch im Bereich der apikalen Domäne wobei das substratprotein an die Chaperone gebunden wird.

Es wird diskutiert, daß die Konformationsänderungen innerhalb der Chaperone von der ATP-Bindung und nicht von der ATP-Hydrolyse abhängig sind (Beissinger & Buchner, 1998). Offensichtlich ist jedoch die ATP-Hydrolyse wichtig, um die Chaperone in einem hoch Affinität-Zustand zur Substratbindung zurückzubringen, d.h. die ATP-Hydrolyse wirkt als "Timer " der Wechselwirkung zwischen Chaperon und Substratprotein.

Obwohl die Wichtigkeit der mehrfachen Wechselwirkungen zwischen Substratprotein und GroELS noch zur Debatte steht, ist es wohl so, daß zumindest manche Substratproteine erfolgreich an GroELS falten können und mit einer unterschiedlichen Konformation als die, mit der diese ursprünglich an GroELS gebunden wurden, dissoziierren (U & I* in Abbildung 7). Deshalb wird GroELS als "aktiver Spieler" in der Proteinfaltung bezeichnet.

Früher glaubte man, daß die Proteinfaltung in der Zelle ein generell Chaperonen-unterstützter Prozeß wäre. Diese Sichtweise herrscht nicht mehr, denn anscheinend kann die Mehrheit der Proteine ihre native Konformation *de novo* in spontanen Vorgängen erreichen (Beissinger & Buchner, 1998). Allerdings ist der Chaperonmechanismus sowohl in physiologischen als auch unter Streßbedingungen wegen seines flexiblen funktionellen Netzwerkes sehr wichtig für die Proteinfaltung (Buchberger *et al*., 1996, Ehrnsperger *et al*., 1997b).

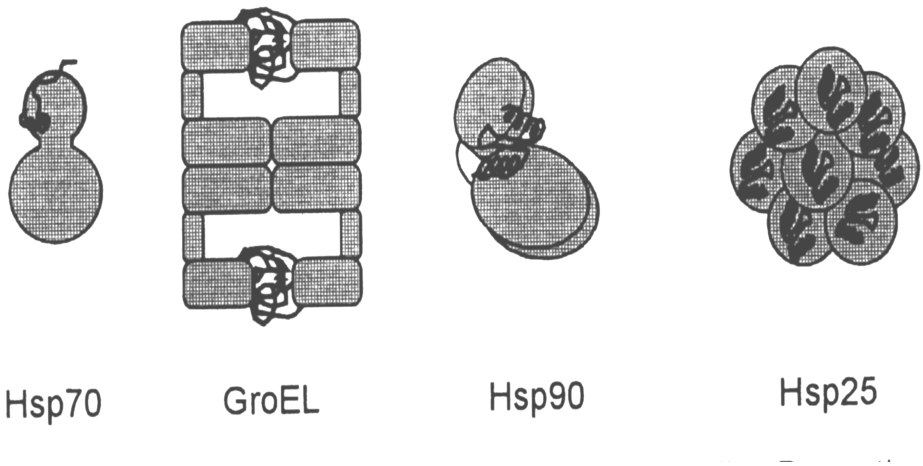


Abb. 6: Schematische Präsentation der Substratbindung an verschiedenen Chaperonklassen (Jaenicke & Creighton, 1993).

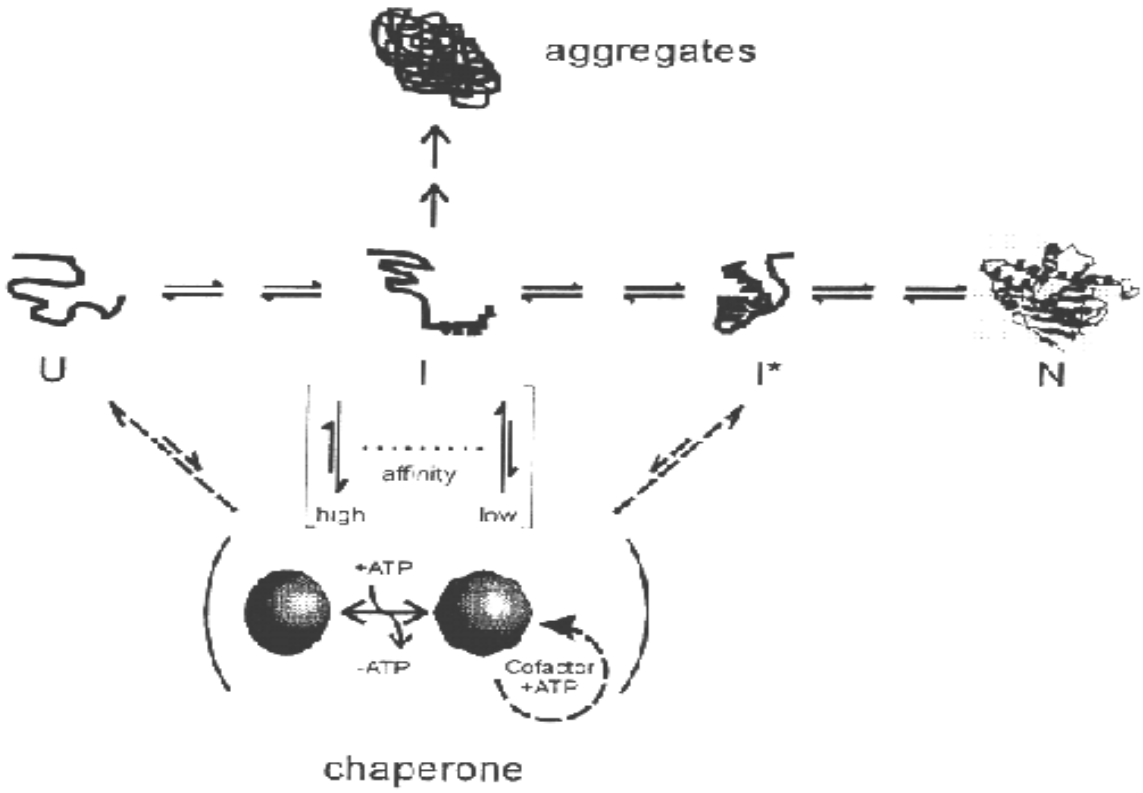


Abb. 7: Generelle Prinzipien der chaperonunterstützten Proteinfaltung (Sparrer *et al*., 1996).

1.4 Modelle des GroELS-Reaktionszyklus

Es gibt zur Zeit zwei Vorstellungen vom Mechanismen bezüglich der *in vivo* Chaperonen-unterstützten Proteinfaltung. Während des Reaktionszyklus wird nach einer Vorstellung nur der "bullet-shaped" GroEL/GroES-Komplex (Hartl, 1996) betrachtet, während nach der anderen Vorstellung sowohl der "bullet-shaped" als auch der "football-shaped" GroEL/GroES Komplex als Funktionseinheit betrachtet wird (Sparrer *et al*., 1997).

1.4.1 Modell nach Hartl (1996)

1. Ausgangspunkt in diesem Modell ist die Ausbildung eines asymmetrischen GroEL/GroES-Komplexes, der ein Substratprotein im *trans*-Ring bezogen auf GroES beinhaltet (Martin *et al*., 1993; Chen *et al*., 1994; Engel *et al*., 1995).

2-3. Bindung bzw. Hydrolyse von ATP im *trans*-Ring führen zur Freisetzung von ADP und GroES aus dem *cis*-Ring (Martin *et al*., 1993; Todd *et al*., 1994; Hayer & Hartl *et al*., 1995).

4. GroES und ATP können in diesem Schritt mit gleicher Wahrscheinlichkeit an beiden Ringen des GroEL binden. Findet die Bindung von ATP an dem von Substrat besetzten Ring statt, wird dessen Faltung fortgesetzt. Die Bindung an dem substratfreiem Ring führt im Gegensatz dazu zur Freisetzung des Substrates in nicht-nativer Form.

4-5. Die Hydrolyse von ATP in dem von GroES besetzten Ring führt zur Ausbildung des stabilen $(ADP)_7$-GroEL/GroES-Komplexes.

6. Das gefaltete Substrat wird freigesetzt.

Total oder teilweise entfaltete Substrate können von dem GroELS-Reaktionszyklus erneut erkannt werden.

1.4.2 Modell nach Sparrer *et al*., (1997)

Dieses mechanistische Modell ist sehr interessant, denn im Gegensatz zu anderen Modellen koppelt jede ATP-Hydrolyse-Runde mit einer produktiven *cis*-Faltungsreaktion im Gegensatz zu anderen Modellen, die entweder "bullet-shaped" oder "football-shaped" Komplexe in Anwesenheit von nur einem Substratproteines betrachten. Daher ist die geforderte Menge von ATP, die für die Fortsetzung der Faltung des Substratproteines notwendig ist, um die Hälfte reduziert. Während das GroELS unter physiologischen Bedingungen möglicherweise mit nur einem beschränkten Teil (5–10 %) der *E. coli* Proteine reagiert, kann diese Energieforderung unter Streßbedingungen hoch steigen, wenn die Konzentration der ungefalteten Proteinen rasch steigt und gleichzeitig die Energiebestände sinken (Lorimer, 1996; Ewalt *et al*; 1997). In diesem Modell werden drei verschiedene GroELS-Komplexe in Bezug auf die Nukleotid-, Substrat-, und GroES-Bindungen betrachtet (Abb. 8):

1. Ausgangspunkt in diesem Modell ist die Ausbildung von asymmetrischen Komplexen ("bullet-shaped") GroEL/GroES, der ein Substratprotein im *cis*-Ring beinhaltet. Nach dieser Kopplung im *cis*-Ring ist die Affinität der Bindungsstelle im *trans*-Ring ein zweites ungefaltetes Protein zu binden, gesteigert.
2. Im zweiten Schritt dieses Modells können ATP bzw. GroES an den *trans*-Ring binden, um den symmetrischen Komplex ("football-shaped") GroES/GroEL/GroES zu formieren.
3. Im dritten Schritt werden GroES, ADP und das Substratprotein aus dem *cis*-Ring entlassen, wobei das Substratprotein entweder in gefalteter oder teilweise gefalteter Form vorliegen kann.

4-6. Diese Schritte sind äquivalent zu den Schritten 1-3 in Abbildung 8. In diesen Schritten wird das in dem vorherigen-*trans*-Ring gebundene Substratprotein gefaltet und von dem GroELS-Komplex freigesetzt. Der GroELS-Komplex kann erneut ein entfaltetes Substrat erkennen (Schritt 1).

Falls das Substratprotein seine native Struktur in diesem Reaktionszyklus nicht erfolgreich erreicht hat, kann es erneut von dem GroELS erkannt werden, und noch einmal in den Reaktionszyklus eintreten (Schritte 1- 4) (Todd *et al*., 1996).

Bei diesem Prozeß können Substrate, die in einer Form zwischen entfalteten und teilweise nativ gefalteten sind, von GroELS erkannt werden (Zahn *et al*.,1994; Lilie und Buchner, 1995; Gervasoni *et al*., 1996; Hoshino *et al*., 1996).

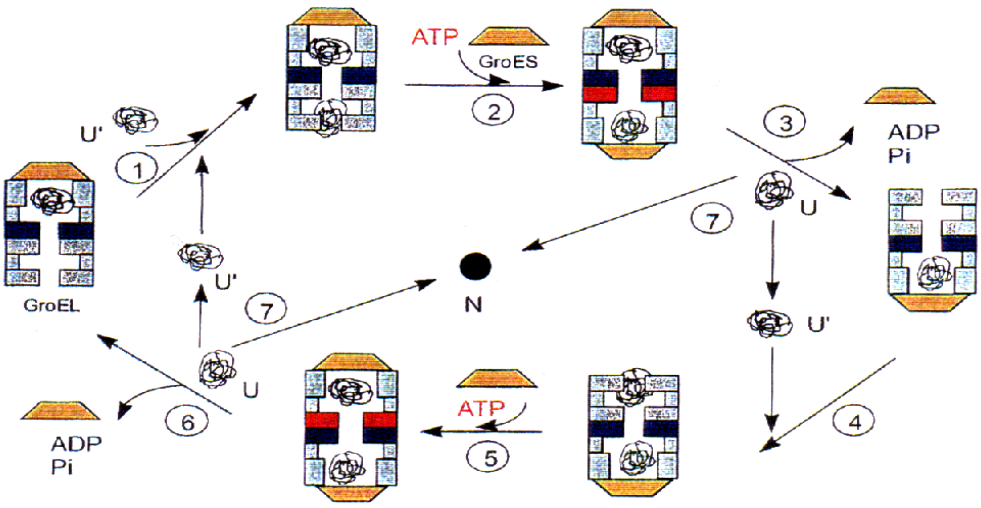


Abb. 8: Modell des GroELS-Reaktionszyklus nach Sparrer *et al*., 1997.

Trotz der Fähigkeit beider Modelle zur Erklärung des *in vivo* Proteinfaltungsprozesses vieler Substratproteine, kann weder das erste noch das zweite Modell alle experimentell beobachteten Ergebnisse deutlich erklären, wie z.B. die Faltung von relativ großen Substrat-proteinen, die noch größeren Raum zum Falten brauchen, als den, den das GroELS-System für sie bieten kann. Ebenso ist bislang nicht geklärt wie manche Substrate *in vitro* auch in Abwesenheit von GroES oder ATP lediglich mit GroEL-Unterstützung erfolgreich gefaltet werden können (Jaenicke, 1993).

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der funktionellen und strukturellen Kopplungen bei GroEL gestützten Proteinfaltung, um näheren Informationen über den Funktionsmechanismus des Chaperonins GroELS zu erhalten. Für die Untersuchung wurde die Lactatdehydrogenase (LDH) als Modellprotein verwendet.

1.5 ESR-Spektroskopie

Die ESR-Spektroskopie (Elektronen-Spin-Resonanz) ist eine biophysikalische Methode, die zur Verfolgung von Strukturveränderungen innerhalb eines Biomoleküles unter bestimmten Bedingungen verwendet werden kann. Es handelt sich um eine Form der Absorptions-spektroskopie, bei der paramagnetische Substanzen vermessen werden. Dabei nimmt die Substanz Energie in Form elektromagnetischer Strahlung auf (Nordio, 1976; Marsh, 1981). In biologischen Systemen gibt es viele Substanzen, die schon von Natur aus paramagnetische Eigenschaften besitzen, z.B. Enzyme mit Übergangsmetallionen wie, Fe^{+3}, Co^{+2}, Mn^{+2}, Mo^{+5}, Ni^{+2}, $V^{+2, +3, +4, +5}$, sowie die bei einigen biochemischen Teilreaktionen, z.B. der Photosynthese, als Zwischenstufen entstehenden freien Radikale. Beim Fehlen solcher paramagnetischer Komponenten können auch stabile organische Nitroxidradikale, sogenannte Spinsonden oder Spinlabel, in ein Biomolekül eingeführt werden (Hamilton & McConnell , 1968; Review siehe z. B. Trommer,1987). Diese Spinsonden können entweder ein Teil des Substrats sein, wie z. B. Spinlabelmodifizierte Nukleotide (z.B. Vogel *et al*., 1992; Burgard *et al*., 1994; Lösel *et al*., 1997) oder kovalent an bestimmte Aminosäure-Seitenketten gebunden werden. Insbesondere Cystein-Reste eignen sich gut für diese spezifische Art der Modifizierung, da sie im physiologischen pH-Bereich ausreichend aktiv sind und kaum störende Konkurrenzreaktionen, z.B. mit anderen Aminosäureresten und dem Spinlabel, auftreten (Lundblad, 1991). Derartige Spinlabel-Verbindungen müssen zwei Kriterien erfüllen:

Sie müssen zum einen über einen längeren Zeitraum stabil sein und zum anderen dürfen sie in den zu untersuchenden Reaktionsprozeß nicht eingreifen, d.h. sie dürfen Informationen nur vermitteln und nicht selbst erzeugen.

Erstmals angewandt wurden Spin-Label von Ohnishi & McConnel (1965). Man verwendet hierzu im allgemeinen stabile Nitroxidradikale in Form von Piperidin- (2), Pyrrolidin- (3), 3-Pyrrolin- (4) und Oxazolidin-Derivaten (5), die sich von dem Di-*tert*-butylnitroxidradikal (1) ableiten (Abb. 9):

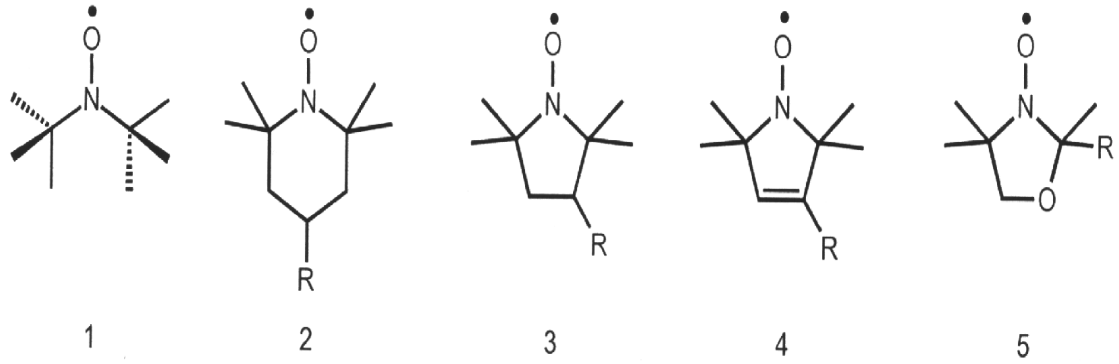


Abb. 9: Strukturen einiger stabiler Nitroxidradikale (R = -I, -NH_2, -COOH, usw.).

Ein Beispiel eines spinlabel modifizierten Nukleotids ist das C-8-SL-ATP, das in dieser Arbeit für die Bestimmung der zugänglichen Nukleotidbindungsstellen an GroEL verwendet wurde (Abb. 10):

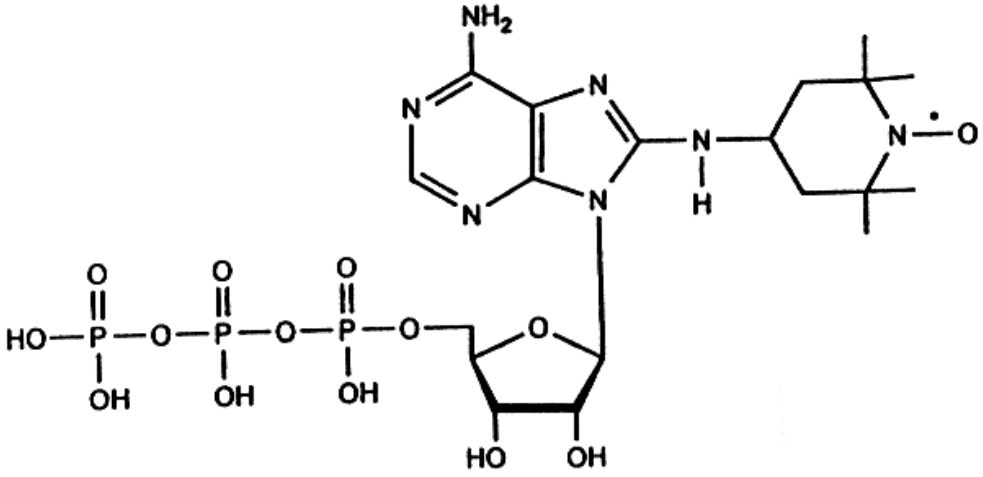
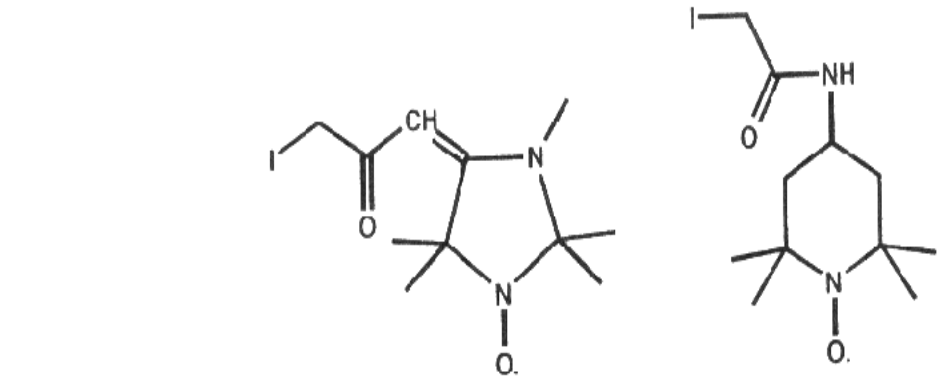
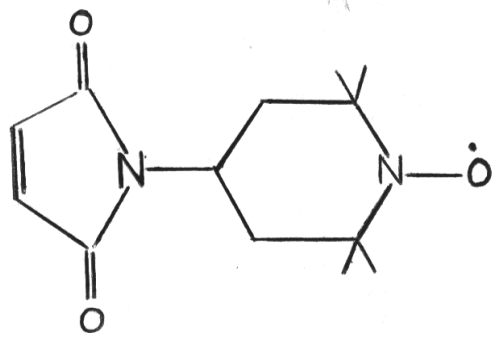


Abb. 10:Strukturformel des spinmarkierten ATP (C-8-SL-ATP) (Glöggler *et al*., 1981).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch folgende SH-spezifische oder selektive Spin-Label verwendet: **a.** Iodoxopropyliden -pentamethyl-imidazolidin (IOPI), **b.** Iodacetamido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl (IAAT), **c.**4-Maleinimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl (Maleinimido-TEMPO) (Abb. 11):



a **b**



c

Abb. 11: Einige häufig verwendeten Spin-Label: **a.** Iodoxopropyliden-pentamethyl-imida-zolidin (IOPI), **b.** Iodacetamid-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl (IAAT), **c.** 4-Maleinimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl.

Durch die Flankierung der radikalischen Nitroxidgruppe mit den stabilisierenden Methyl-gruppen wird die Reaktivität der Radikale soweit herabgesetzt, daß sie auch in Lösung relativ stabil sind. Die Spinlabel binden über eine reaktive Gruppe R kovalent an die zu unter-suchenden Moleküle bzw. deren Liganden.

Aufgrund des Zeitfensters der Meßmethode (10^{-11} -10^{-7} s) kann man aus der Form des resultierenden ESR-Spektrums Informationen über die Struktur der Moleküle und mögliche Konformationsänderungen erhalten. Durch Titrationsexperimente, bei denen man den freien Anteil an Spinlabel-Substrat oder Co-Faktor bestimmt, können Informationen über die Anzahl der Bindungsstellen und die entsprechenden Dissoziationskonstanten des Protein-Substrat-Komplexes gewonnen werden.

In den letzten Jahren gewinnt insbesondere die “site-specific-spin-labeling“-Methode an Bedeutung, bei der durch gezielte Mutagenese an interessanten Positionen eines Proteins Aminosäuren durch Cysteine ausgetauscht werden, die dann nach kovalenter Modifizierung mit Spinlabeln Aussagen über diese Region des Proteins liefern können. Ein Beispiel dieser Methode sind Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Wayne Hubble. An 18 spezifischen Positionen von Bacteriorhodopsin wurden Cysteine eingeführt und jeder Cysteinrest der 18 verschiedenen Mutanten mit einem Spin-Label kovalent modifiziert. Die ESR-Spektren lieferten Aussagen über Struktur dieser Region des Proteins, welches innerhalb des Membran-bereiches liegt (Altenbach *et al*., 1990).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der ESR-Spektroskopie stellt die Abstandsmessung zwischen zwei paramagnetischen Zentren dar. Kommen sich die Radikale zweier Spinlabel näher als 20 Å, so werden Dipol-Dipol-Wechselwirkung hervorgerufen (Wilder *et al*., 1989). Die dabei auftretenden dipolaren Spin-Wechselwirkungen, sind im ESR-Spektrum durch Verschiebungen der Linienposition sowie zusätzliche Aufspaltungen der ESR-Signale zu erkennen. Ein Beispiel dieser Art von Dipol-Dipol-Wechselwirkung bietet das Enzym Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Komplex mit N^6-d-SL-NAD^+ (Wilder *et al*., 1989).

2 Problemstellung

Die molekularen Chaperone und besonders das Proteinsystem GroELS, das aus dem großen vierzehn-mer GroEL (je 14 x 57 KD) und dem kleinen sieben-mer GroES (je 7 x 10 KD) (Braig *et al*., 1994) besteht, hat seit vielen Jahren wegen seiner wichtigen Rolle in vielen Prozessen (Faltung von falsch gefalteten oder nicht gefalteten Proteinen sowie die Inhibierung der Polypeptidenaggregation nach der Proteinbiosynthese) *in vivo* große Aufmerksamkeit von den Wissenschaftlern erhalten (Morimoto, 1993; Frydman *et al*., 1994; Hartl, 1998). Trotz der zahlreichen Studien sind viele Einzelheiten des Funktionsmechanismus in Bezug auf die Bindung der Co-Chaperone und Substratproteine bzw. ATP-Bindung und Hydrolyse. Ebenso sind Strukturänderungen, die dadurch innerhalb des GroEL-Komplexes, während Bindung bzw. Freigabe des gefalteten Substrats stattfinden, noch nicht eindeutig geklärt.

Um nähere Informationen über den Zusammenhang zwischen den Konformationsänderungen des Proteins und den einzelnen Schritten im Faltungsmechanismus zu erhalten, sollte die ESR-Spektroskopie als konformationssensitive Methode eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Doppelmutant von GroEL, bei dem die Cysteine 138 und 519 gegen Serine ausgetauscht waren, und der deshalb nur noch in Position C458 ein einzelnes Cystein enthält, mit verschiedenen thiolspezifischen Spin-Labeln modifiziert werden. Mit Hilfe des modifizierten GroEL sollten Änderungen in der Konformation des Chaperonins bei Nukleotid- und GroES-Bindung sowie der Rückfaltung von Protein sichtbar gemacht werden. Zusätzlich sollten die modifizierten Mutanten in Bezug auf ihre ATPase- und Rückfaltungsaktivität untersucht werden, und mit ungelabeltem Mutant bzw. Wildtyp GroEL verglichen werden.

Die Anzahl an zugängliche Nukleotidbindungsstellen an GroEL vor und nach der chemischen Modifizierung mit Spin-Label sollte mit Hilfe von SL-Nukleotiden und ESR-Spektroskopie in An- und Abwesenheit von GroES bestimmt werden. Die Bestimmung der Nukleotid-bindungsstellen am Wildtyp GroEL diente dabei als Vergleich.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression, Isolierung und Reinigung der Chaperonine GroEL und GroES aus *E. coli*

Die Wildtyp Chaperone GroEL und GroES wurden aus dem *E. coli* Stamm DH5α pGroESL (Goloubinoff *et al*., 1989) isoliert (Abb. 12). Das Plasmid wurde unserem Arbeitskreis freundlicherweise von Dr. G. H. Lorimer (Central Research & Development Department, Du Pont de Nemours and Co., Wilmington, Delaware) zur Verfügung gestellt. Goloubinoff *et al.,* (1989) konstruierten das Plasmid pGroESL durch Klonierung des *E. coli* groE Operon, einem 2,3 kb EcoRI-HindIII Fragment aus dem Plasmid pOF39 (Fayet *et.al*., 1986), in den Expres-sionsvektor pTG 10. Die Anwesenheit des Plasmides pGroELS in *E. coli* erhöht den Anteil an GroEL im Vergleich zum Gesamtanteil an Zellprotein von 1-2 % auf etwa 10 % (Goloubinoff *et al*., 1989).

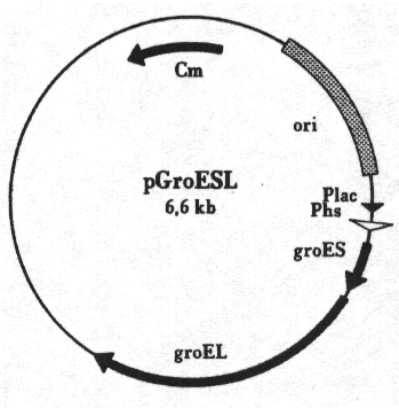


Abb. 12: Schematische Skizze des Plasmides pGroESL (Goloubinoff *et al*., 1989 Plac: lac-Promotor, Phs: Hitzeschock-Promotor; Cm: Chloramphenicolresistenzgen.

Die Expression der GroEL- und GroES-Gene steht unter Kontrolle des Hitzeschock Promotors (Phs) und ist somit durch Erhöhung der Wachstumstemperatur der *E. coli*-Zellen induzierbar. Das gesamte GroE-Operon (Phs, GroES, GroEL) wird zusätzlich durch das *lac*-Operon kontrolliert.

Die Expression des GroEL mit der Doppelmutation C138S/C519S wurde aus dem TG2 *E. coli*-Stamm mit dem Plasmid pOA, das unserem Arbeitskreis freundlicherweise von Prof. A. Horovitz (Weitzmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Isolierung der Chaperone GroEL und GroES wurde nach Vorschrift von Hendrix (1979) mit Modifikationen nach Erbse (1995) und Neuhofen (1997) durchgeführt. Die Zellen wurden in einem NaCl-, $MgCl_2$-, KCl-haltigen Trypton-Hefeextrakt-Medium (10 x SOC-Medium für DH5α) bzw. NaCl-haltigen Trypton-Hefeextrakt-Medium (2 x YT-Medium für TG2) gezüch-tet, wobei durch Zugabe des Antibiotikums Chloramphenicol (im Falle des pGroESL) und Ampicillin (im Falle des pOA) das Wachstum nicht erwünschter Zellen verhindert wurde. Zur Kontrolle des Zellenwachstums wurde die optische Dichte (Süßmuth *et al*., 1987) bei 600 nm stündlich gemessen (Abb. 13 und 14). Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die *E. coli* Zellen durch Zentrifugation von Kulturmedium getrennt. Tabelle 1 zeigt die Zellausbeute von DH5α- bzw. TG2-Zellen.

Tabelle 1: Zellenausbeute und Rohprotein der zwei Stämme DH5α bzw. TG2 aus 2 l Kultur-medium.

Stamm	**Wachstumsmedium (l)**	**gewonnene Zellen (g)**	**Rohprotein (mg)**
DH5α (w-Typ)	2	12	650
TG2 (dm-Typ)	2	7	400

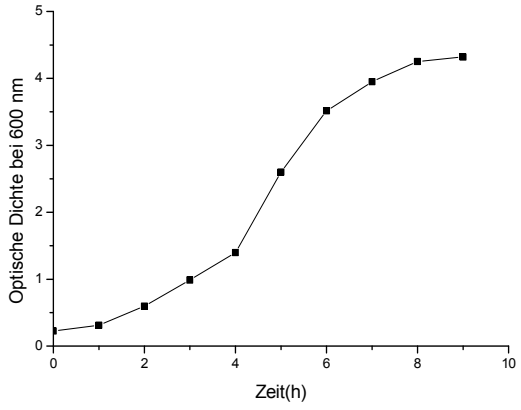


Abb. 13: Wachstumskurve von TG2/pOA mit Mutation C138S/C519S in 500 ml 2 x YT-Flüssigmedium bei 37 °C und 210 rpm.

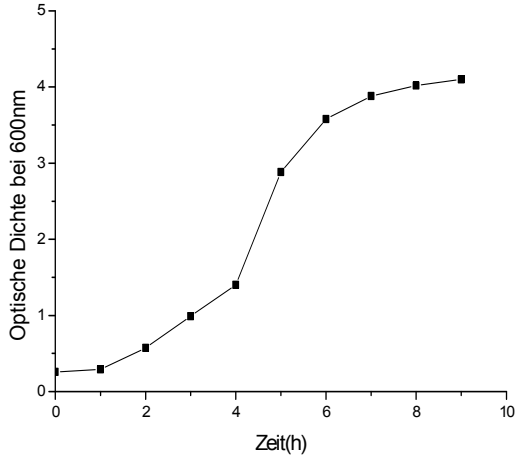


Abb. 14: Wachstumskurve von DH5α/pGroESL in 500 ml 10 x SOC-Flüssigmedium bei 37°C und 210 rpm.

Der Zellaufschuß erfolgte durch Lyse mittels eines Lysozymhaltigen Puffer (5.1.7). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von DNase und RNase abgebaut. Die Membranbruchstücke wurden durch Zentrifugation von der Proteinlösung abgetrennt. Um die Proteine aus dem Lysispuffer in den Elutionspuffer zu überführen, wurde die Rohproteinlösung mit 100 ml Elutionspuffer verdünnt und in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon) mittels einer Membran PM 30 auf ca. 50 ml aufkonzentriert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und schließlich wurde die Rohproteinlösung auf 30 ml aufkonzentriert. Die Reinigung des GroEL bzw. GroES erfolgte über eine Sephacryl S-300-HR-Gelfiltrationssäule (2,8 x 90 cm, V = 425 ml, Flussrate = 30 ml/h). GroEL eluierte als erste Fraktion und GroES eluierte als letzte Fraktion. Das Elutionsdiagramms wurde mit Hilfe eines Bradford-Profils (Bradford, 1977) bestätigt (5.9.2). Die Reinheit der Fraktionen wurde mit Hilfe von SDS-Page (5.9.4) überprüft (Abb. 15). Die reinen Fraktionen wurden mit Hilfe von Amicon Ultrafiltrations-kammer und einer Membran PM 30 im Falle des GroEL und PM 10 oder YM 3 im Falle des GroES in Lagerungspuffer überführt, auf eine Konzentration von ca. 19 µg/µl GroEL bzw. 10 µg/µl GroES gebracht und in 200 µl-(GroEL) bzw. (GroES) 50 µl-Aliquoten bei –80 °C bis zur Verwendung gelagert.
Abbildung 15 zeigt das SDS-Gel von reinem GroEL und GroES aus *E. coli*:

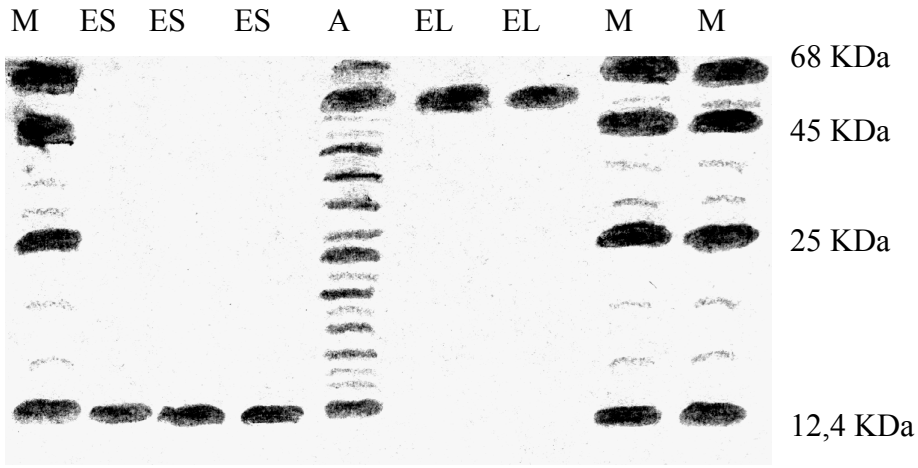


Abb.15: 15%iges SDS-Gel von GroEL & GroES wobei:
M: Markerprotein wobei: BSA = 68 KDa; Ovalbumin = 45 KDa; Chymotrypsin A = 25 KDa; Cytochrom C = 12,4 KDa.
ES: reines GroES.
A: Rohprotein (Lysat).
EL: reines GroEL.

3.2 Untersuchungen am Chaperonin GroEL

Während der Chaperonin unterstützten Proteinfaltung spielt die ATP-Bindung und Hydrolyse eine Schlüsselrolle. Buchberger *et al.,* (1996) haben berichtet, dass die Bindung eines Substrats an der apikalen Domäne des GroEL bestimmte konformelle Änderung in der äquatorialen Domäne erfordert. Diese konformelle Änderung im Bereich der Nukleotidbindungs-stellen an der äquatorialen Domäne wird durch die Bindung von ATP hervorgerufen. Cheng *et al*., (1989); Horwich *et al*., (1993); Zheng *et al*., (1993) haben berichtet, dass die Faltung von entfalteter oder denaturierter humaner Ornithintranscarbamylase (OTC) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Chaperonin-abhängig ist und dass dieses Enzym in Abwesenheit von GroEL aggregiert. Die produktive Freisetzung des OTC von GroEL benötigt MgATP und GroES.
Krystalstrukturanalysen am Wildtyp GroEL haben die Positionen von der Cysteinresten C138, C458, und C519 bestimmt (Abb. 16) (Braig *et al*., 1994). Aus der Abbildung 16 sieht man, dass während C458 und C519 sich in der äquatorialen Domäne befinden, befindet sich das C138 ganz nah zu der intermediären Domäne.

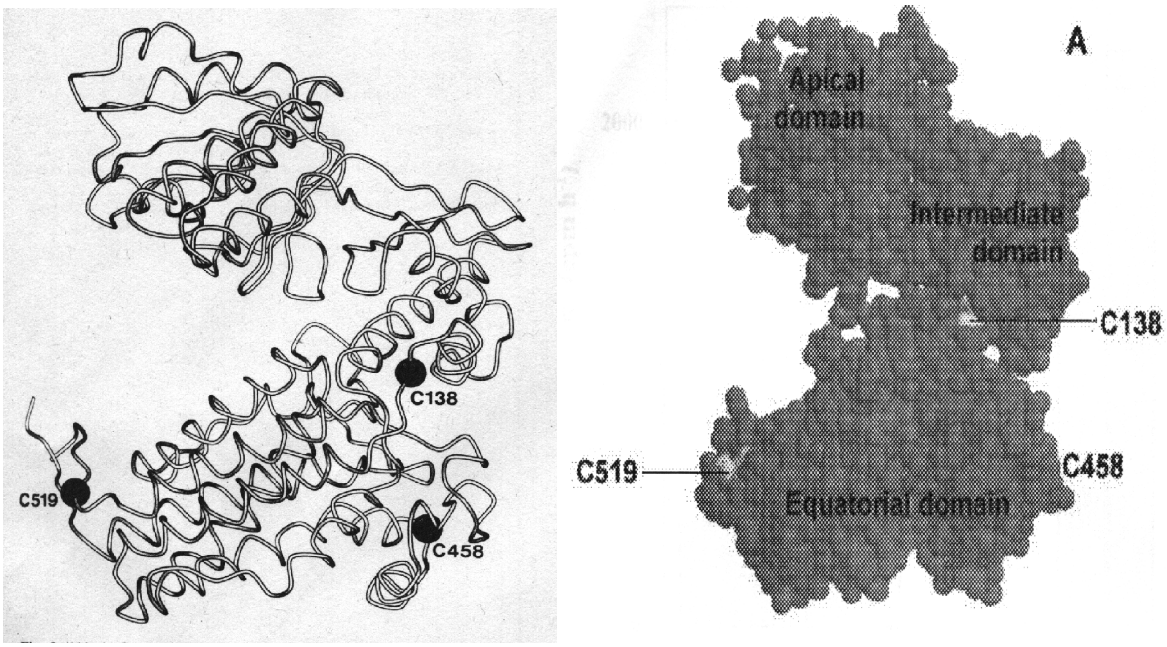


Abb. 16: GroEL-Untereinheit wobei die Positionen von C138, C458, und C519 in der äquatorialen Domäne (C458, C519) und in der intermediären Domäne (C138) gezeigt werden (Braig *et al*., 1994).

Die Krystalstruktur von *E. coli* GroEL mit gebundenem ATP-γ-S an jeder der vierzehn Untereinheiten des GroEL haben gezeigt, dass ATP-γ-S an bestimmten Stellen in der äquatorialen Domäne bindet und signifikante Änderungen in der Struktur der äquatorialen Domäne bewirkt (Braig *et al*., 1994).

Wie in Problemstellung erwähnt, war das Ziel der vorliegender Arbeit diese Konformations-Änderungen in der GroEL-Struktur bei Substrat- bzw. Nukleotid-Bindung zu untersuchen. Nach der Doppelmutation C138S/C519S besitzt das resultierende GroEL nur ein Cystein an der Position 458. Verlaufen strukturelle Veränderungen während der Bindung und Hydrolyse von Nukleotid bzw. Bindung und Freisetzung von Substrat bis zu diesem Cystein, sollten diese nach chemischen Modifikation mit Spin-Labeln, die an dieser Cystein-Gruppe kovalent gebunden sind, mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachweisbar werden. Die Mutanten bzw. die modifizierten Mutanten sollten biochemisch charakterisiert werden. Zu dieser Charakterisie-rung wurden ATPase-Aktivitäts-Assays, Faltungs-Assays, ESR-spektroskopische Unter-suchungen, und die Bestimmung der zugänglichen Nukleotidbindungsstellen durchgeführt.

3.2.1 biochemische Charakterisierung von dmEL und deren Vergleich zum wtEL

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der:

1. ATPase-Aktivität des dmEL in Ab- und Anwesenheit von ES.
2. Rückfaltung von denaturierter LDH in Ab- und Anwesenheit von ES *in vitro*.
3. Bestimmung der zugänglichen Nukleotidbindungsstellen am dmEL in Ab- und Anwesen-heit von ES, dargestellt und diskutiert. Zusätzlich werden diese Ergebnisse mit der am wtEL experimentell beobachteten Ergebnissen verglichen.

3.2.1.1 Untersuchung der ATPase-Aktivität von Chaperonin GroEL

Die Untersuchung der ATPase Aktivität des dmEL bzw. wtEL erfolgte durch einen gekop-pelten Enzymtest, coupled enzym assay (CEA), nach Vogel und Steinhardt (1976). Das Prin-zip dieses Enzymtests gründet sich auf den folgenden drei Reaktionen:

1. $$ATP \xrightleftharpoons{EL} ADP + Pi$$

2. $$ADP + PEP \xrightleftharpoons{PK} ATP + Pyruvat$$

3. $$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightleftharpoons{LDH} Lactat + NAD^+$$

Wobei: PK = Pyruvat-Kinase, und LDH = Lactatdehydrogenase.

In der ersten Reaktion, die von GroEL katalysiert wird, wird ATP zu ADP und Pi hydrolysiert und in einem weiteren Schritt reagiert ADP mit Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und ATP. Diese Reaktion wird von der Pyruvat-Kinase (PK) katalysiert. Das entstandene Pyruvat rea-giert mit NADH in einer Reaktion, die von Lactatdehydrogenase katalysiert wird. Es wird Lactat als Hauptprodukt gebildet, während NADH zu NAD^+ oxidiert wird. Die Extinktions-Abnahme des NADH ist direkt proportional zu der katalytisch durch GroEL hydrolysierten Menge des ATP, deshalb besteht die Möglichkeit, diese hydrolysierte Menge von ATP und dessen Konzentration in der Lösung zu bestimmen, und zwar durch Verfolgung der NADH-

Extinktionsabnahme mit einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 334 nm der Absorptionswellenlänge von NADH.
Eine genaue Beschreibung der ATP-Hydrolyse-Assays befindet sich im experimentellem Teil 5.3 dieser Arbeit. Die einzelnen Daten setzen sich aus mindestens zwei Versuchsreihen zusammen und wurden gemittelt. Dabei werden auch die Fehlerbalken angegeben.

3.2.1.1.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL

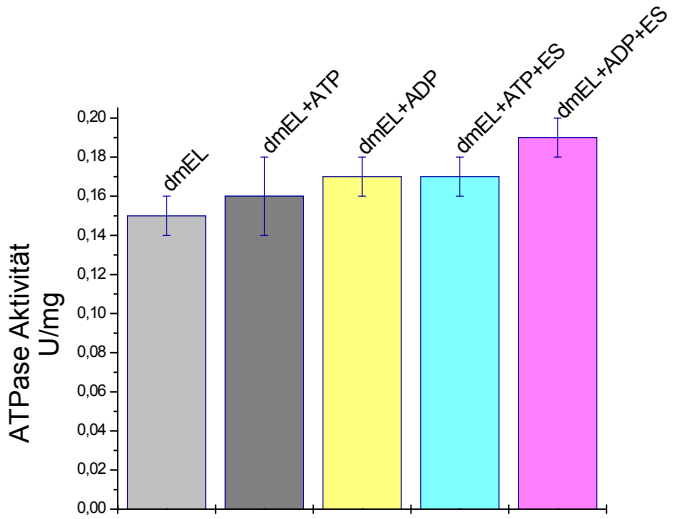
Die Abbildung 17a zeigt die ATPase-Aktivität des dmEL bei 37 °C:

1. allein (nach Vorinkubation).
2. nach Vorinkubation mit 2 mM MgATP.
3. nach Vorinkubation mit 2 mM MgADP.
4. nach Vorinkubation mit 2 mM MgATP in Anwesenheit von 24 µM ES.
5. nach Vorinkubation mit 2 mM MgADP in Anwesenheit von 24 µM ES.

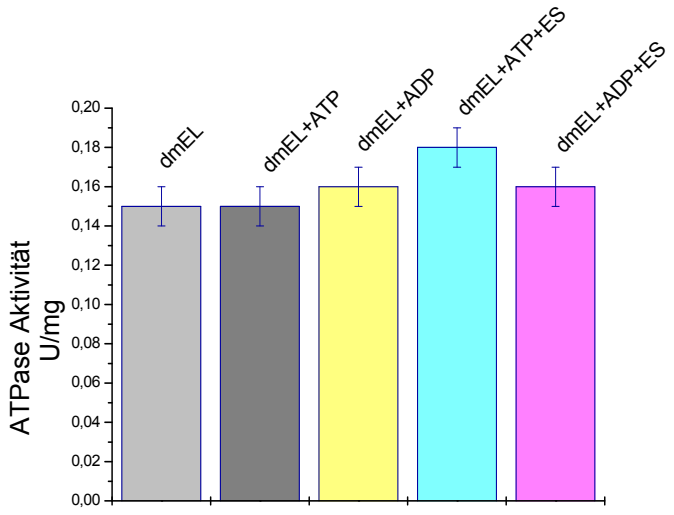
Abbildung 17a zeigt deutlich, daß die ATPase-Aktivität des dmEL nach Vorinkubation mit Nukleotid oder mit Nukleotid in Anwesenheit von ES eine leichte Steigerung im Vergleich mit der des dmEL allein zeigt.
Um den Effekt der Temperatur auf der ATP-Hydrolyse-Aktivität besser zu verstehen, wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen, aber bei 30 °C durchgeführt (Abb. 17b).
Aus Abbildung 17b sieht man, dass die Senkung der Temperatur auf 30 °C eine leichte Sen-kung der ATPase-Aktivität nach Vorinkubation mit:

1) 2 mM MgATP oder 2 mM MgADP.
2) 2 mM MgADP in Anwesenheit von 24 µM ES.

verursacht hat. Im Gegensatz dazu bleibt die ATPase-Aktivität im Falle des dmEL alleine und nach Vorinkubation mit 2 mM MgATP in Anwesenheit von 24 µM ES im selben Bereich.



a



b

Abb. 17: ATPase-Aktivität des dmEL [12 µM] nach Vorinkubation allein und in Anwesen-heit von:

I) 2 mM MgATP. II) 2 mM MgADP. III) 2 mM MgATP + 24 µM ES. IV) 2 mM MgADP + 24 µM ES.

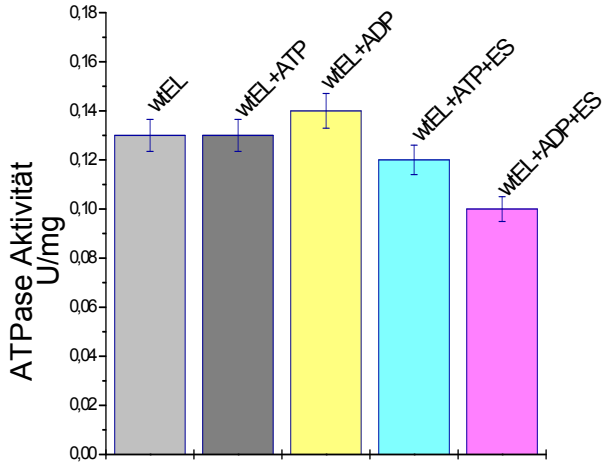
a: Die Messung aller Proben wurde bei 37 °C durchgeführt. **b**: Die Messung aller Proben wurde bei 30 °C durchgeführt.

* Zuerst wurde dmEL mit Nukleotid oder Nukleotid und ES bei 30 °C vorinkubiert.

In der Literatur wurde erwähnt, dass das wtEL im Gegenwart von ES eine geringere ATP-Hydrolyse zeigt (Viitanen *et al*., 1990; Langer *et al*., 1992; Chandrasekhar *et al*., 1986; Gray & Fersht, 1991; Jackson *et al*., 1993). Die experimentell beobachtete ATP-Hydrolyse des dmEL in Gegenwart von ES hat keine signifikante Inhibierung gezeigt. Deshalb stand die Frage, ob überhaupt das ES unter diesen Bedingungen an GroEL bindet. Um diese Frage zu beantworten wurde die ATPase-Aktivität des wtEL unter gleichen Bedingungen wie im Falle des dmEL durchgeführt.

3.2.1.1.2 Bestimmung der ATPase-Aktivität des wtEL

Die Abbildung 18a zeigt die ATPase-Aktivität des wtEL nach Vorinkubation mit:
I) 2 mM MgATP. II) 2 mM MgADP. III) 2 mM MgATP + 24 µM ES. IV) 2 mM MgADP + 24 µM ES im Vergleich mit der des wtEL allein bei 30 °C.
Während die ATPase-Aktivität des wtEL in Anwesenheit von MgADP leicht steigt, sinkt sie in Gegenwart von ES auf etwa 76 % des wtEL-Wertes. Hier wird eine Inhibierung der ATPase-Aktivität durch ES festgestellt (Viitanen *et al*., 1990; Langer *et al*., 1992; Chand-rasekhar *et al*., 1986; Gray & Fersht, 1991; Jackson *et al*., 1993). Bei Untersuchung der ATPase-Aktivität bei 37 °C (Abb. 18b) sieht man eine leicht gesteigerte ATPase-Aktivität in allen Fällen. Interessant ist, dass die ATPase-Aktivität des wtEL nach Vorinkubation mit MgADP in Anwesenheit von ES auch bei 37 °C auf 76 % des wtEL-Wertes sinkt. Diese experimentelle Beobachtung wurde bereits von Guhr (2000) berichtet.



a

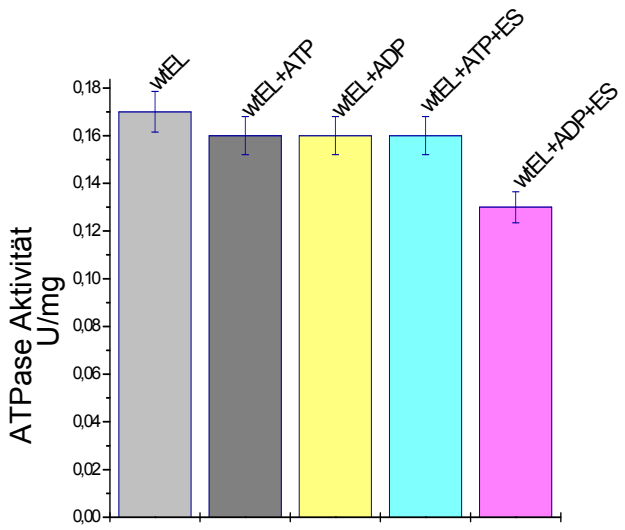


Abb. 18: ATPase-Aktivität des wtEL [12 µM] **b** * Vorinkubation allein und in Anwesenheit von:

I) 2 mM MgATP. 2) 2 mM MgADP. 3) 2 mM MgATP + 24 µM ES. 4) 2 mM MgADP + 24 µM ES.

a, Messtemperatur 30 °C. **b**, Messtemperatur 37 °C.

* Zuerst wurde dmEL mit Nukleotid oder Nukleotid und ES bei 30 °C vorinkubiert.

Die Untersuchungen zeigen, dass ES unter den verwendeten Bedingungen an wtEL bindet. Aus den Untersuchungen geht nicht her vor, ob im Falle des dmEL keine ES-Bindung stattgefunden hat, oder ob die Mutationen in Positionen 138 und 519 eine direkte Auswirkung auf die Hydrolyseaktivität des ELS-Komplexes hatte.

3.2.1.2 Untersuchung der Chaperonin GroEL-unterstützten Rückfaltung von LDH *in vitro*

Die charakteristische Eigenschaft des GroEL ist die Fähigkeit, anderen Proteine bei der Faltung behilflich zu sein. Die in dieser Arbeit untersuchten Modifikationen an Mutanten sollten auf diese Fähigkeit untersucht werden. *In vivo* können verschiedenen Proteine bzw. neu synthetisierte Polypeptide ihre native Struktur nicht garantiert erreichen, deshalb haben mole-kularen Chaperone (z.B. GroEL) sowohl bei physiologischen als auch unter Stressbedingun-gen eine wichtige Rolle, nämlich die Aggregation dieser Proteinen zu verhindern. Das GroEL kann den nicht gefalteten Proteine helfen, ihre native Struktur erfolgreich zu erreichen oder im Falle der neu synthetisierten Polypeptide, eine unproduktive Aggregation verhindern. Nach Schmidt *et al*., (1994) wird die Rückfaltung eines Substrates wie z.B. der Lactat-dehydrogenase (LDH) als "permissive" bezeichnet, wenn das *in vitro* denaturierte Substrat seine native Struktur ganz oder ein Anteil davon auch in Abwesenheit vom GroELS-System erreicht. Im Gegensatz dazu wird die Rückfaltung eines denaturierten Substrates *in vitro* wie z.B. der Malatdehydrogenase als "non-permissive" bezeichnet, wenn dies seine native Struktur in Abwesenheit des GroELS-Systems nicht erreichen kann.
Um das Verhältnis des GroEL in Ab- und Anwesenheit von GroES bzw. verschiedenen Adeninnukleotiden zu untersuchen, wurde die "permissive" Rückfaltung *in vitro* untersucht. Als Substratprotein wurde die Lactatdehydrogenase (LDH) aus Schweinemuskel (Boehringer Mannheim) verwendet.

3.2.1.2.1 Bestimmung der dmEL-unterstützten Rückfaltung von LDH

Die Rückfaltungsaktivität des GroEL *in vitro* wurde nach einem Assay von Riether (1996) und Guhr (1996) untersucht. Dieser Faltungsassay gründet sich auf einer Methode nach Zettlmeisel und Jaenicke (1979). Als Modellsubstrat für die Untersuchung wurde Lactatdehydrogenase (LDH-M_4) verwendet.

Das Prinzip dieses Assays gründet sich auf den folgenden zwei Reaktionen:

1. $$\text{LDH}_{\text{denaturiert}} \xrightarrow{\text{EL + A}} \text{LDH}_{\text{rückgefaltet}}$$

2. $$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Lactat} + \text{NAD}^{+}$$

Wobei A = Nukleotid oder Nukleotid+ES

$LDH\text{-}M_4$ ist ein Protein, das unter "permissive" Bedingungen etwa 23 % seiner Ausgangs-Aktivität zurückgewinnen kann. Das deutet darauf hin, dass 23 % des Proteins zu aktiven Protein rückgefaltet wurden. Wenn diese Rückfaltung vom Chaperonin-System unterstützt wird, steigt die Ausbeute der rückgefalteten LDH deutlich auf 65 % im Falle des wtEL und 42 % im Falle des dmEL an. Die Menge an rückgefalteter LDH selbst kann nicht direkt bestimmt werden, deshalb wurde die Aktivität der rückgefalteten LDH photometrisch verfolgt, d.h. die Reaktion (2) wurde als Maß für die Rückfaltung betrachtet. Die NADH-Abnahme wurde bei 334 nm photometrisch verfolgt. Diese NADH-Abnahme ist direkt proportional zu der Menge an rückgefalteter LDH in der Lösung. Als 100 %ige Aktivität wird der NADH-Umsatz der gleichen Menge nativer LDH betrachtet. Die genaue Vorschrift der Durchführung findet sich im experimentellen Teil unter 5.4 dieser Arbeit. Die einzelnen Daten aller Rückfaltungsversuche setzen sich aus mindestens zwei Versuchen zusammen und wurden gemittelt. Die Schwankungen der Messwerte betrugen etwa (± 3 bis 5 %). Zuerst wurde die LDH in 6 M Guanidiniumhydrochloridlösung (Gdn-HCl, pH 2,3/H_3PO_4) denaturiert und für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die genaue Durchführung der Rückfaltung befindet sich in experimen-tellen Teil unter 5.4 dieser Arbeit. In der Abbildung 19 wird die Chaperonin-unterstützte Rückfaltung und auch die nicht Chaperonin-abhängige "spontanen" rückgefaltete LDH in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Ziel jedes Versuches war die Bestimmung der höchsten Rückfaltungsaktivität des dmEL allein und auch in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. von Nukleotiden und ES.

Das Verhältnis des ES zu EL war 2 : 1, die Konzentration von Nukleotid 2 mM. Die Tem-peratur wurde während allen Untersuchungen auf 25 °C festgehalten.

In allen Zeitverlaufskurven ist zu beobachten, dass die LDH-Aktivität ihr Maximum nach ca. 3-4 Stunden erreicht hat. Die Rückfaltung von LDH ist so weit wie möglich abgelaufen.

Eine andere Beobachtung ist auch, dass das dmEL allein, in Abwesenheit von Nukleotiden, nicht zu einer Rückfaltung von LDH führen kann. Die Abbildung 19 deutet darauf hin, dass während die dmEL-unterstützte Rückfaltung von LDH in Anwesenheit von ADP oder ATP geringer als die nicht Chaperonin-abhängige "spontane" Rückfaltung von LDH ist, steigt sie in Anwesenheit von ATP und ES auf 42 %. Das bedeutet, dass ES in Anwesenheit von ATP die Freisetzung gefalteter LDH aus dem Hohlraum des GroEL verbessert, und das bedeutet eine direkte Interaktion zwischen ES und EL. Im Gegensatz dazu wird das Substratprotein in Anwesenheit von Nukleotid (ADP oder ATP) an GroEL gebunden aber schlecht freigesetzt.

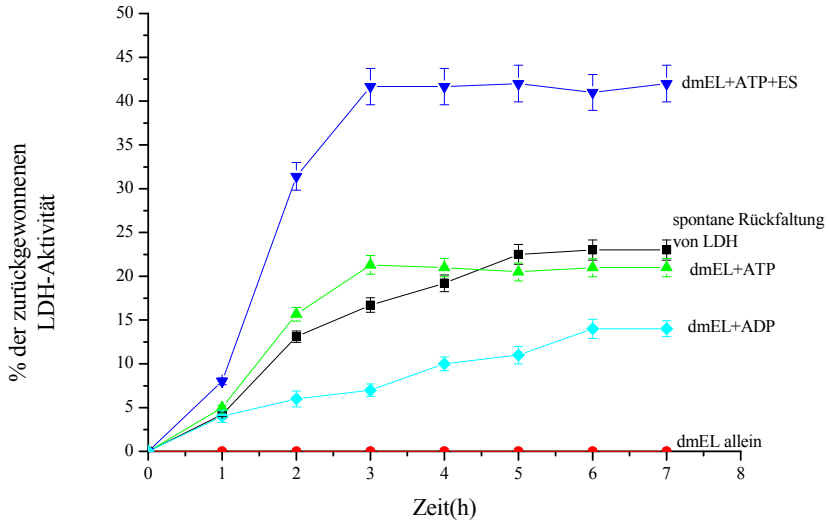


Abb. 19: Zeitverlaufskurven der %igen durch dmEL zurückgefalteten LDH. Als 100%iger Vergleichswert diente dabei die LDH-Aktivität nativer LDH, die vorher nicht mit Gdn-HCl denaturiert wurde. Die Bestimmung des 100% Wertes (0,28 µM LDH) wurde durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ und die Messung der Extinktionsabnahme bei ε_{334} in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ANP, pH 7,5/NaOH bei 25 °C durchgeführt. Die Denaturierung von LDH erfolgte in 6 M Gdn-HCl (pH 2,3/H_3PO_4), die Rückfaltung in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ANP, 0,25 µM dmEL, 0,50 µM ES, pH 7,5/NaOH (Guhr, 1996).

3.2.1.2.2 Bestimmung der wtEL-unterstützten Rückfaltung von LDH

In Abbildung 20 werden die Zeitverlaufskurven der durch wtEL unterstützten Rückfaltung von LDH dargestellt. Hier sieht man einen deutlich unterschiedlichen Verlauf in Anwesenheit von ES, wobei der Anteil rückgefalteter LDH deutlich höher ist als der im Falle des dmEL in Anwesenheit von ES.

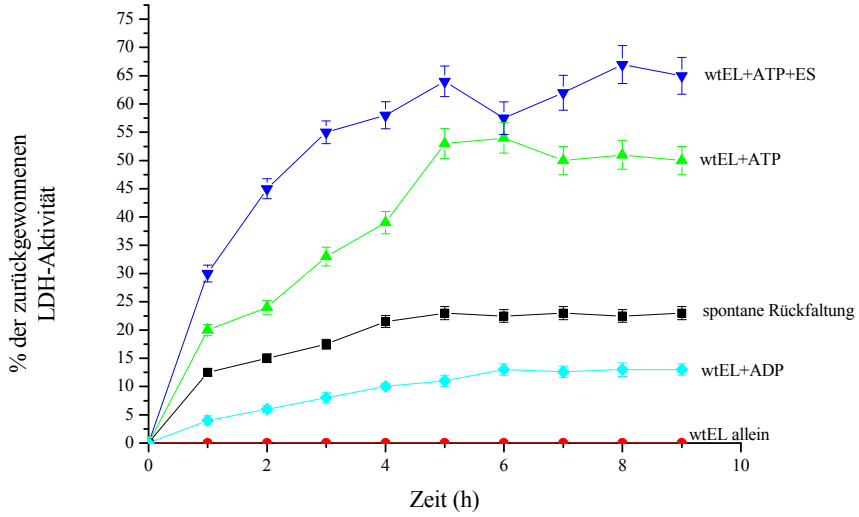


Abb.20: Zeitverlaufskurven LDH-Rückfaltung durch wtEL. Die genauen Bedingungen für diese Versuche sind gleich wie unter Abbildung 19 beschrieben.

Die Untersuchungen zeigen, dass wtEL in Anwesenheit von ATP eine höhere Rückfaltungsaktivität zeigt, als dmEL in Anwesenheit von ES und ATP. Deutlich ist aber, dass die Mutation C138S/C519S einen Effekt auf die für Faltung nötige Konformationsänderungen ausübt.

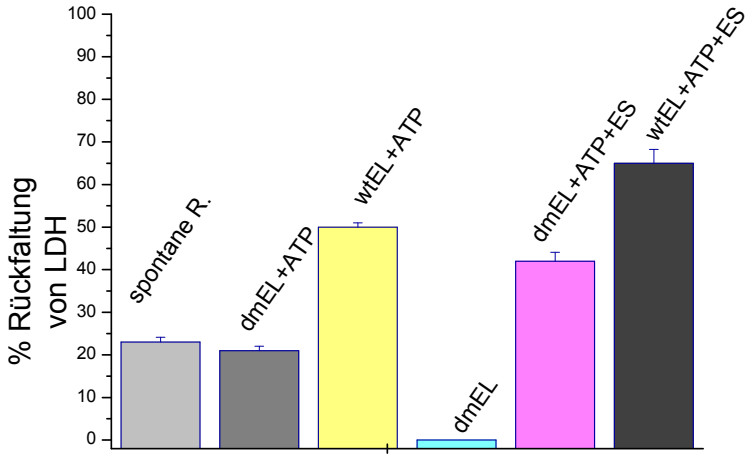


Abb. 21: Vergleich zwischen den dmEL bzw. wtEL bezüglich der % Rückfaltung von LDH in Anwesenheit von ATP und ATP + ES. In der Abbildung wird auch die spontane Rückfaltung von denaturierter LDH dargestellt.

Trotz des Unterschieds zwischen dmEL und wtEL in Bezug auf die Inhibierung der ATP-Hydrolyse nach Zugabe von ES, wobei die Inhibierung nur bei wtEL deutlich war, ist aus Abbildung 21 wohl klar, dass dmEL weniger Ausbeute an Teil gefalteten LDH in Anwesen-heit von ES und ATP zeigt, als wtEL in Anwesenheit von ATP. Möglicherweise hat die Doppelmutation C138S/C519S einen Effekt auf die für Substratfreisetzung nötige Kon-formationsänderungen ausgeübt.

3.2.1.3 Bindungsverhalten von C8-SL-ATP und Bestimmung der maximalen Nukleotidbindungsstellen bei GroEL

Zur besseren Charakterisierung von dmEL wurden Bindungsstudien mit dem spinmarkierten Adeninnukleotid C8-SL-ATP an dmEL durchgeführt. Zuerst wurde eine Eichgerade wie im experimentellen Teil unter 5.8.1 dieser Arbeit beschrieben, hergestellt und danach wurde die Titration in gleicher Weise in Anwesenheit von EL allein und auch in Anwesenheit von ES durchgeführt.

Zwischen der Konzentration des in Lösung frei beweglichen SL-ATP und der Amplitude des Hochfeldsignals besteht ein linear Zusammenhang, so dass direkt das molare Verhältnis von an GroEL gebundenen SL-ATP zu eingesetzten EL bestimmt werden kann. Während allen Untersuchungen betrug die dmEL-Konzentration 12 µM.

3.2.1.3.1 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL allein

Die genaue Beschreibung der Durchführung des Versuches findet sich im experimentellen Teil unter 5.8.2 dieser Arbeit. In Abbildung 22 wird die Abhängigkeit des gebundenen C-8-SL-ATP von der Konzentration an freien C-8-SL-ATP im Falle des dmEL dargestellt. Von der Abbildung 22 ist deutlich zu sehen, dass es sich um eine sigmoidale Bindungskurve handelt. Die Abbildung 22 deutet darauf hin, dass etwa 15 Bindungsstellen des 14-mer dmEL besetzt werden und das bedeutet, dass alle Bindungsstellen für das modifizierte C-8-SL-ATP zugänglich sind. Diese Zahl der Bindungsstellen liegt ganz nah zu der Zahl der Bindungs-stellen, die schon von Erbse (1996), Neuhofen (1997), Guhr (2000) bei wtEL gefunden wurden. Es ist also offensichtlich, dass die Doppelmutation an den Stellen C138S bzw. C519S von GroEL zwar eine negative Kooperativität bezüglich der Bindung von ATP aber keinen Effekt auf die maximalen Zahl von zugänglichen Nukleotidbindungsstellen verursacht hat.

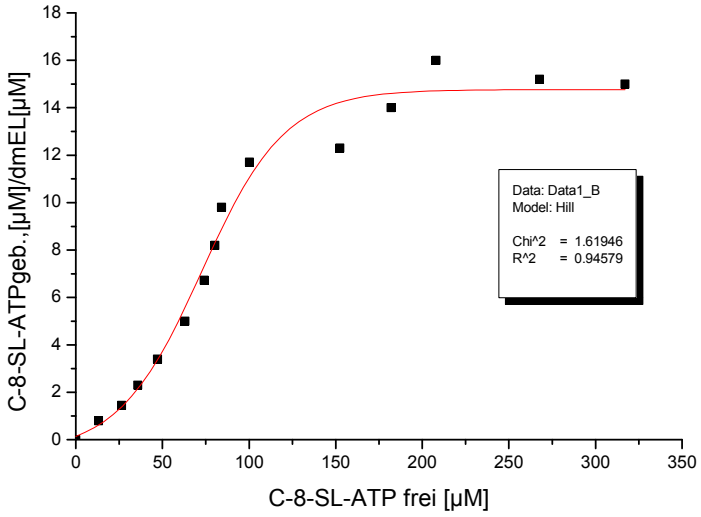


Abb. 22: Bindungskurve des C-8-SL-ATP an die Nukleotidbindungsstellen im dmEL in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 20 C°. Die dmEL-Konzentration betrug 12 µM, die C8-SL-ATP-Konzentration zwischen 10,5 und 510 µM.

3.2.1.3.2 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL in Anwesenheit von ES

Die genaue Beschreibung des Versuches findet sich im experimentellen Teil unter 5.8.3 dieser Arbeit. Nach der Bestimmung der maximalen Nukleotidbindungsstellen bei dmEL war von Interesse, diese Bestimmung in Anwesenheit von ES durchzuführen, um eine deutliche Erkenntnisse des Effektes von ES auf die Nukleotidbindung an GroEL zu erhalten. Abbildung 23 zeigt die Abhängigkeit des gebundenem C-8-SL-ATP von der Konzentration an freien C-8-SL-ATP im Falle des dmEL in Anwesenheit von ES. Im Gegensatz zu der sigmoidalen Bindungskurve des dmEL in Abwesenheit von ES, ist sie im Falle der Anwesenheit von ES nicht sigmoidal. Die maximale zugängliche Anzahl der Nukleotidbindungsstellen bleibt im selben Bereich wie im Falle des dmEL in Abwesenheit von ES. Wie aus den Bindungskurven von Abbildungen 22 und 23 hervorgeht, übt ES einen Effekt auf dmEL aus, so dass die Bindungskurve des dmEL nicht mehr sigmoidal ist. Das kann ein Hinweis sein, dass ES an dmEL bindet.

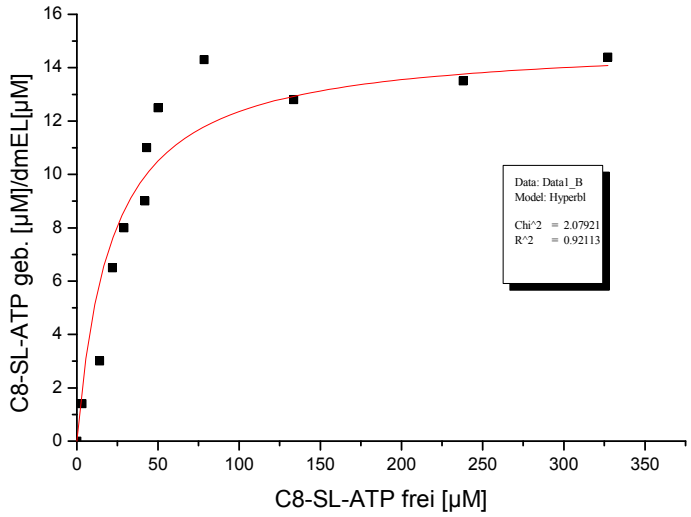


Abb. 23: Bindungskurve des C-8-SL-ATP an die Nukleotidbindungsstellen im dmEL in Anwesen-heit von ES in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 20 C°. Die dmEL-Konzentration betrug 12 µM, die C8-SL-ATP-Konzentration zwischen 10,5 und 510 µM.

3.2.1.3.3 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei wtEL

Dieser Versuch wurde wie im experimentellen Teil unter 5.8.6 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Die Bindungskurve von C8-SL-ATP an wtEL (Abb. 24) unterscheidet sich von der des dmEL (Abb. 22) in Bezug auf die Kooperativität, wobei die Bindungskurve des wtEL kein sigmoidales Verhalten im Vergleich zur Bindungskurve des dmEL allein zeigt. In Abbildung 24 wird deutlich, dass alle Bindungsstellen an wtEL für den SL-ATP zugänglich sind.

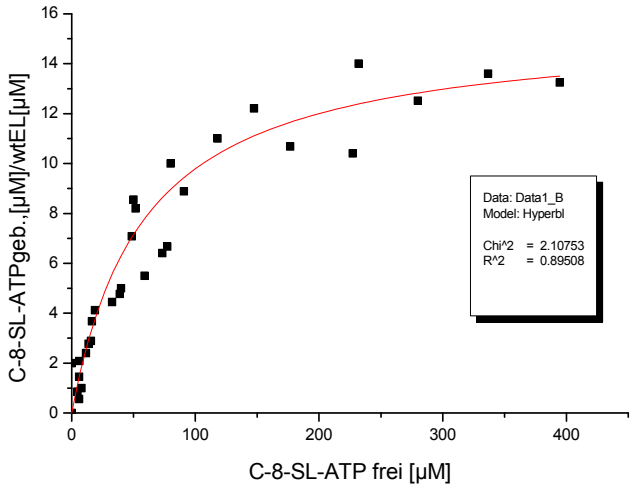


Abb.24: Bindungskurve des C-8-SL-ATP an die Nukleotidbindungsstellen im wtEL in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 20 C°. Die wtEL-Konzentration betrug 12 µM, die C8-SL-ATP-Konzentration zwischen 10,5 und 510 µM.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die biochemische Charakterisierung des dmEL und die entsprechenden experimentell beobachteten Ergebnisse bezüglich der ATP-Hydrolyse, der Rückfaltungsaktivität, und der Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL und deren Vergleich zum wtEL, auf ein unterschiedliches Verhalten des Mutanten deuten. Dies ist am deutlichsten am Nukleotidbindungsverhalten, aber auch bei der Rückfaltungseffektivität und der ATPase-Aktivität zu bemerken. Allerdings zeigen die Experimente, dass ES am dmEL bindet.

3.2.2 Chemische Modifizierung des Cys 458 mit verschiedenen Spin-Labeln

Zur Verwendung der biophysikalischen Methode ESR-Spektroskopie, um möglichen Strukturveränderungen in der Umgebung von C458 bei Nukleotid- bzw. Substratbindung zu untersuchen, wurde das C458 mit drei verschiedenen Spin-Labeln (IAAT, MAL, und IOPI) modifiziert. Die chemische Modifizierung des Cys458 wurde wie im experimentellen Teil unter 5.5 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Es wurden die Spinlabel IAAT, MAL, und IOPI verwendet. Die mit Spin-Labeln modifizierten Mutanten dmEL-IAAT, dmEL-MAL, und dmEL-IOPI wurden biochemisch charakterisiert und mit dem nicht modifizierten Doppelmutant dmEL verglichen.

3.2.2.1 Charakterisierung des dmEL-IAAT

Zur Charakterisierung gehörten die Bestimmungen der:

1. ATPase-Aktivität in Ab- und Anwesenheit von GroES.
2. Rückfaltung von denaturierter LDH in Ab- und Anwesenheit von GroES *in vitro*.
3. ESR-Untersuchungen.
1. zugänglichen Nukleotidbindungsstellen bei dmEL-IAAT in Ab- und Anwesenheit von ES.

3.2.2.1.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT

Die genaue Beschreibung der Untersuchungen findet sich im experimentellen Teil unter 5.5.1 dieser Arbeit.

Die Abbildung 25a vergleicht die ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT-SL (12 µM) nach Vorinkubation allein und mit:

I) MgATP, II) MgADP, III) MgATP + ES, IV) MgADP + ES, mit der des dmEL bei 30°C. Es wird ersichtlich, dass trotz der chemischen Modifizierung des dmEL mit IAAT-SL seine ATPase-Aktivität relativ konstant bleibt. Die Untersuchung wurde unter gleichen Bedingungen auch bei 37°C durchgeführt (Abb. 25b). Man sieht hier, dass ein Effekt der ES-Bindung an dmEL-IAAT nur schwach erkennbar ist.

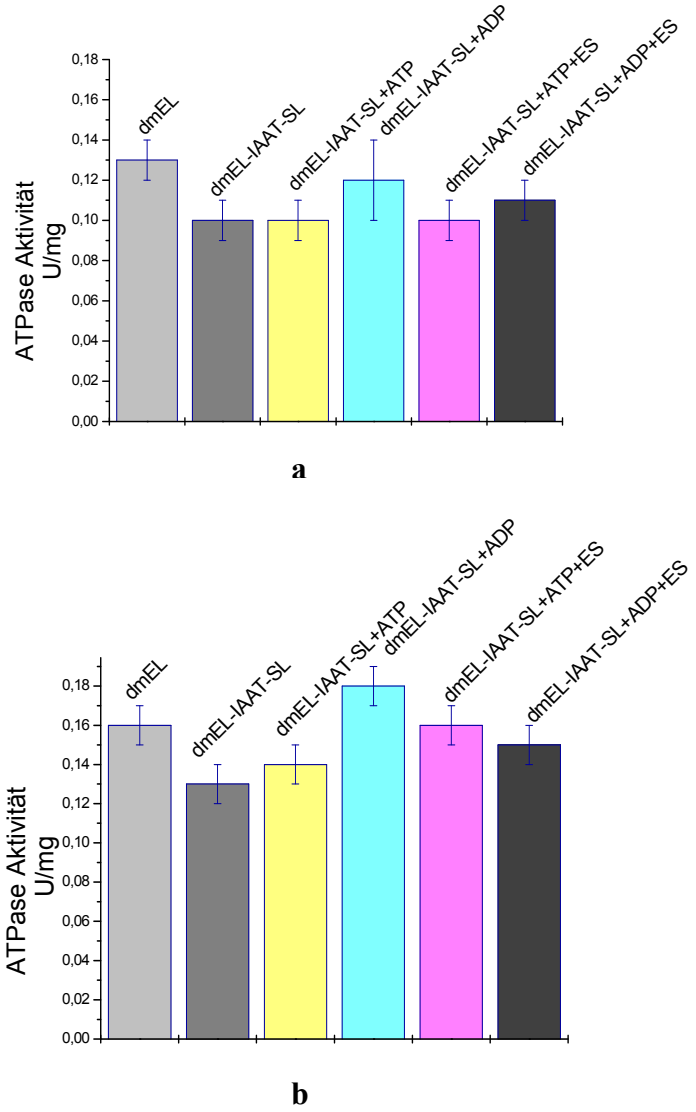


Abb.25: ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT-SL [12 µM] nach Vorinkubation allein und mit: I) 2 mM MgATP. II) 2 mM MgADP. III) 2 mM MgATP + 24 µM ES . IV) 2 mM MgADP + 24 µM ES. **a,** bei 30 °C. **b,** bei 37 °C.

* Zuerst wurde dmEL-IAAT-SL mit Nukleotid oder Nukleotid und ES bei 30 °C vorinkubiert.

Wie aus der Abbildung 25 hervorgeht, hat die Vorinkubation des dmEL-IAAT mit MgADP eine Steigerung der ATP-Hydrolyse Aktivität verursacht, die aber nach Zugabe von GroES an dmEL-IAAT leicht gesunken ist. Diese leichte Inhibierung der ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von GroES könnte deuten, dass ES möglicherweise an das modifizierte dmEL bindet.

3.2.2.1.2 Bestimmung der dmEL-IAAT-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro*

Diese Untersuchungen wurden wie im experimentellen Teil unter 5.4 dieser Arbeit beschrie-ben, durchgeführt.

Die Abb. 26 zeigt die Zeitverlaufskurven der durch dmEL-IAAT (0,25 µM) rückgefalteten LDH (0,28 µM) in Anwesenheit von: I) 2 mM MgATP, II) 2 mM MgATP und 0,5 µM ES.

In der Abbildung 26 ist auch die nicht Chaperonin-abhängige "spontane" Rückfaltung von LDH dargestellt.

Aus der Abbildung 26 ist erkenntlich, dass die zurückgewonnene LDH-Aktivität sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von ES und dem IAAT-modifizierten EL relativ weniger als die nicht Chaperonin-abhängige "spontane" Rückfaltung von LDH bleibt. Die Untersuchungen zeigen, dass die Anwesenheit von ES während der Chaperonin-unterstützten Rückfaltung von LDH die Ausbeute an Teil zurückgefalteter LDH im Vergleich zum dem Fall in Abwesenheit von ES um 48 % erhöht hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der dmEL-IAAT zwar LDH bindet, aber die Rückfaltung stark beeinträchtigt ist. Allerdings scheint die Wechselwirkung zwischen dmEL und ES möglich zu sein.

In der Abbildung 27 wird das dmEL-IAAT zum Vergleich mit nicht spingelabelten dmEL bezüglich der Rückfaltungsaktivität in Ab- und Anwesenheit von ES dargestellt. Wie es aus der Abbildung klar scheint, hat der dmEL nach Modifikation mit IAAT einen großen Teil seiner Rückfaltungsaktivität verloren. Möglicherweise hat die Modifizierung des dmEL mit IAAT-SL die Substratfreisetzung aus dem Hohlraum des dmEL blockiert, so dass weniger zurückgefaltete LDH in der Lösung freigesetzt wurde.

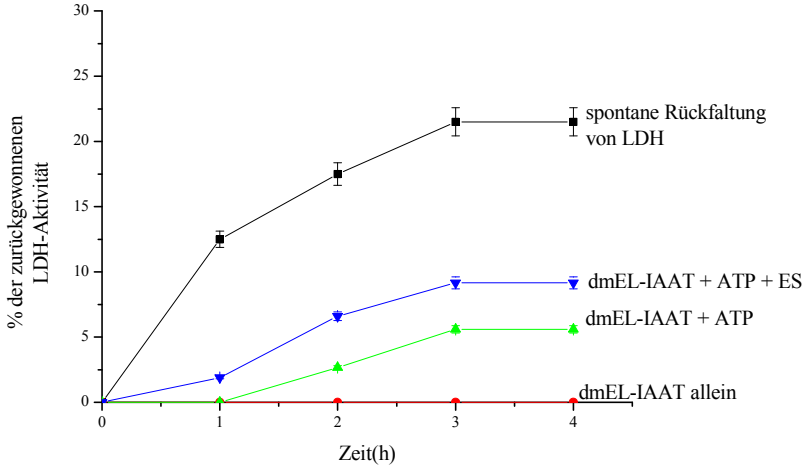


Abb.26: Zeitverlaufskurven der durch dmEL-IAAT zurückgefalteter LDH. Als 100%iger Vergleichswert diente dabei die LDH-Aktivität nativer LDH, die vorher nicht mit Gdn-HCl denaturiert wurde. Die Bestimmung des 100% Wertes (0,28 µM LDH) wurde durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ und die Messung der Extinktionsabnahme bei ε_{334} in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ANP, pH 7,5/NaOH bei 25 °C durchgeführt. Die Denaturierung von LDH erfolgte in 6 M Gdn-HCl (pH 2,3/H_3PO_4), die Rückfaltung in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 0,25 µM dmEL, 0,50 µM ES, pH 7,5/NaOH (Guhr, 1996).

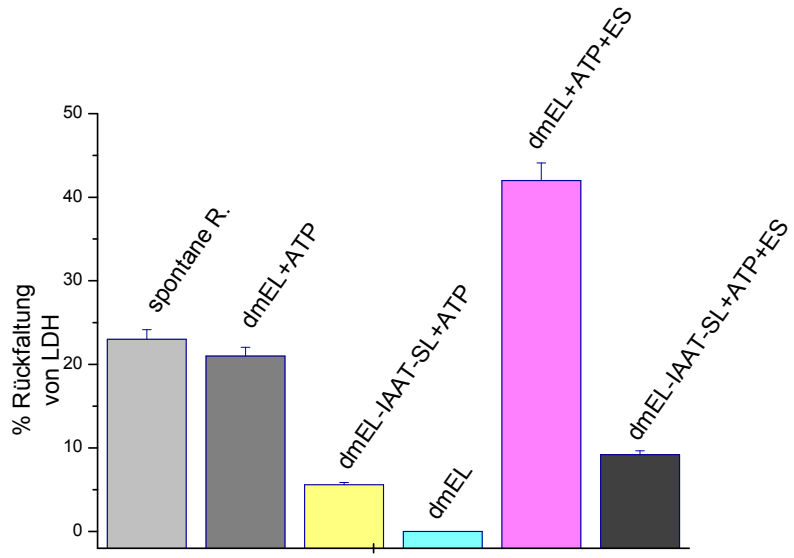


Abb. 27: Vergleich zwischen dem dmEL-IAAT und nicht spingelabelten dmEL bezüglich der Rückfaltung denaturierter LDH *in vitro*.

3.2.2.1.3 ESR-spektroskopische Untersuchungen am Chaperonin GroEL

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Bindung von ATP an die äquatoriale Domäne des GroEL Konformationsänderungen in seiner Struktur verursacht (z.B Saibil *et al*., 1996). Diese konformellen Änderungen sind eine Voraussetzung für die Substratbindung an die apikale Domäne des GroEL. Carlsson *et al*. 2000 konnten Wildtyp GroEL mit N-(1-oxyl-2,2,5,5-tetra-methyl-3-pyrrolidinyl)iodoacetamide (IPSL) in Anwesenheit eines Substratpro-teins spinlabeln. In ihren Untersuchungen wurden alle drei Cysteingruppen des Wildtyps GroEL C138, C458, C519 mit Spin-Label IPSL modifiziert. ESR-Spektren von IPSL-GroEL allein und auch in Anwesenheit von Substratprotein bei 20 °C zeigten für das gelabelte GroEL in Anwesenheit von Substratprotein größere Mobilität als beim IPSL-GroEL allein. Mit ihren Untersuchungen wollten Carlsson *et al*. mögliche unterschiedliche Mobilität im Bereich der äquatorialen/intermediären Domäne in Anwesenheit von Substratprotein im Vergleich zum IPSL-GroEL allein zeigen. Die erhaltenen ESR-Spektren deuten darauf hin, dass die Cysteinreste im Bereich der äquatorialen/intermediären Domäne mehr zugänglich für den IPSL in Anwesenheit von Substratprotein geworden sind.
Trotz diesen Hinweisen auf Mobilität im Bereich der äquatorialen/intermediären Domäne haben Carlsson *et al*. in ihren Untersuchungen nicht nachweisen können, welche der modifizierten Cyteinreste für die beobachtete Mobilitätserhöhung verantwortlich waren.

3.2.2.1.3.1 Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-IAAT in Abwesenheit von Substratprotein

Alle Messproben (Tabelle 2 im experimentellen Teil unter 5.6.1.1 dieser Arbeit) wurden kurz vor jeder ESR-Messung angesetzt. Eine genaue Beschreibung der Durchführung findet sich im experimentellen Teil unter 5.6.1.1 dieser Arbeit. Die gewünschte Menge des dmEL-IAAT wurde von -80 °C auf Eis überführt. Nach Auftauen der Probe wurden 20 µl dmEL-IAAT in einer Wilmad®–Quarzkapillare bei 25 °C im ESR vermessen. In weiteren ESR-Messungen wurden jeweils unterschiedliche Nukleotide im An- und Abwesenheit von ES zugesetzt. Der kovalent gebundene IAAT an dmEL liefert das ESR-Spektrum in Abbildung 28.

Die Linienform des Spektrums ist typisch für immobilisierten Spinlabel. Die $2A_{zz}$-Aufspaltung beträgt 65 G.

Auch nach Zugabe von: I) MgATP. II) MgADP (Spektren in Abb. 29) waren keine Unterschiede sichtbar in den ESR-Spektren. Die Zugabe von I) ES und MgATP, II) ES und MgADP (Spektren in Abb. 30) deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von ES einen Effekt auf ESR-Spektren hat. Hier soll erwähnt werden, dass die untersuchten Messproben für die ESR-Spektren in Abbildung 30 unabhängig waren, d.h. für jedes ESR-Spektrum wurde eine Probe von dmEL-IAAT (gleiche Konzentration) verwendet.

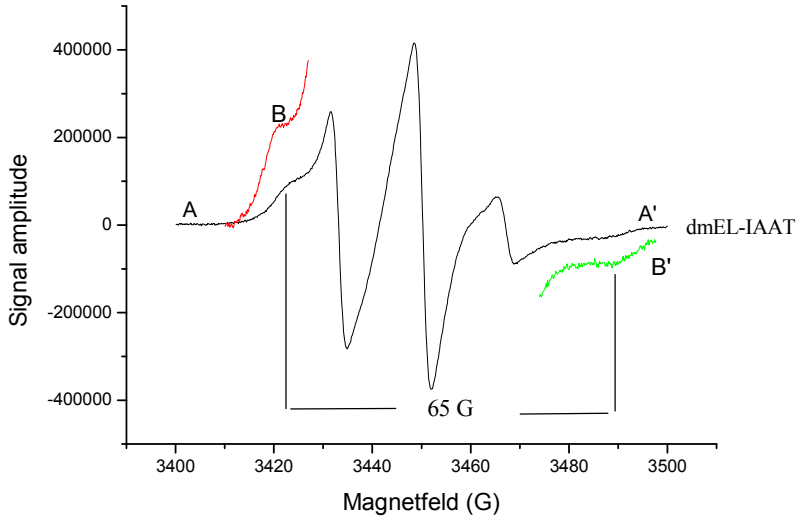


Abb. 28: ESR-Spektrum von 12 µM dmEL mit dem kovalent gebundenen IAAT-SL in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C. A, A´ Tief- und Hochfeldbereiche bei Signalverstärkung von 4x 10^4, B, B´: Tief- und Hochfeldbereiche bei höherer Signalverstärkung (6,3 x 10^5).

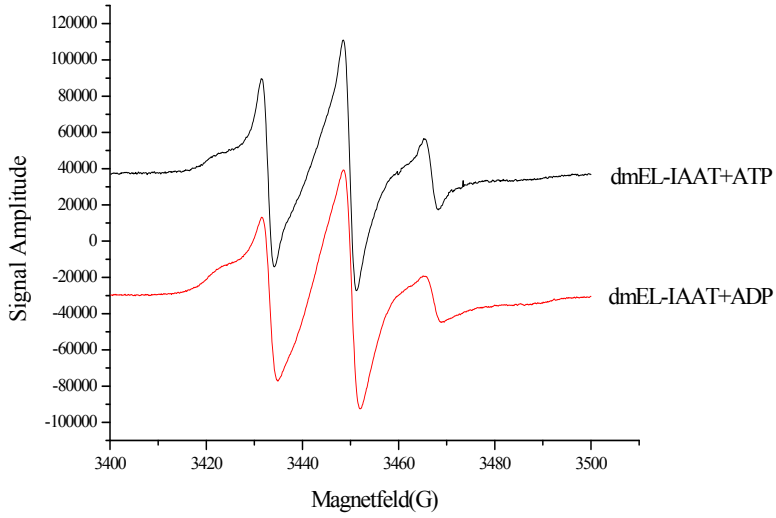


Abb. 29: ESR-Spektren von 12 µM dmEL mit kovalent gebundenen IAAT-SL in Anwesen-heit von :1) 2 mM MgATP. 2) 2 mM MgADP, in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

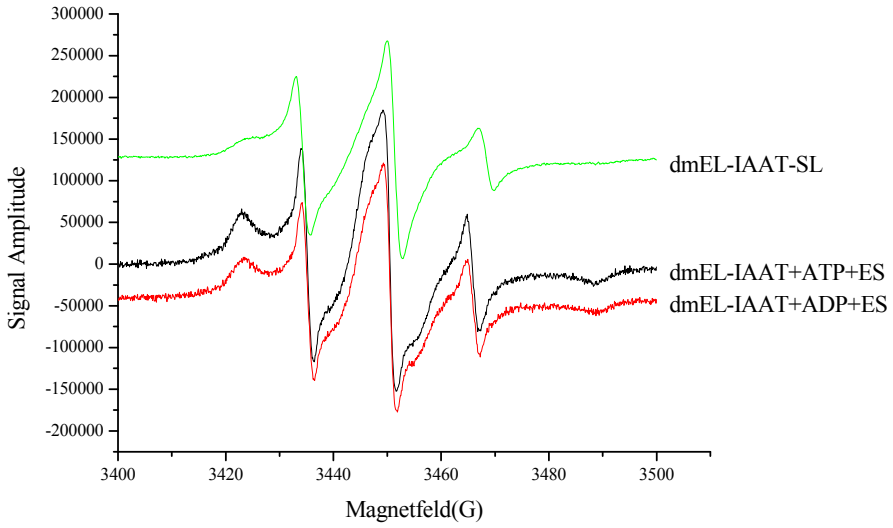


Abb.30: ESR-Spektren von dmEL mit kovalent gebundenen 12 µM IAAT-SL in Anwesen-heit von: 1) 24 µM ES + 2 mM MgATP, 2) 24 µM ES + 2 mM MgADP, in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Zugabe von ES an dmEL-IAAT in Anwesenheit Nuk-leotid einen Effekt auf das ESR-Spektrum ausübt. Das heißt: eine ES-Bindung an dmEL-IAAT ist möglich.

3.2.2.1.3.2 Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Struktur des dmEL-IAAT während der Rückfaltung von denaturiertem Substratprotein (LDH)

Die bisherige ESR-Messungen wurden in Abwesenheit von Substratprotein aufgenommen. Von den dargestellten ESR-Spektren wurde nur im Falle der Zugabe von ES (Abb. 30) Hinweis auf Konformationsänderung beobachtet. Weissman *et al*., (1996) haben berichtet, dass die Fluoreszenz-Spektren von GroEL in Komplex mit GroES in Anwesenheit von Substratprotein deutliche strukturelle Veränderung im Bereich der apikalen Domäne des *cis*-Rings von GroEL durchlaufen und dass diese strukturelle Veränderung von ATP-Bindung beeinflusst wird.
Daher war auch von Interesse, ESR-Untersuchungen in Anwesenheit von z. B. denaturierter LDH als Substratprotein durchzuführen, um mögliche Strukturveränderungen bei der Substratbindung an die apikale Domäne des GroEL nachzuweisen.
Diese Untersuchung wurde wie im experimentellen Teil unter 5.6.1.2.2 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Da der NaH_2PO_4-Puffer DTT enthielt, war es von Interesse sicherzustellen, dass der DTT keinen Einfluss auf das Spektrum hat.
Abbildung 31 zeigt das Spektrum von dmEL-IAAT in Gegenwart von denaturierter LDH. In die gleiche Messprobe wurden 2 mM MgATP dazugegeben und erneut gemessen. Wie aus der Abbildung 31 hervorgeht, liefert die Zugabe von 2 mM MgATP an dmEL-IAAT in Gegenwart von denaturierter LDH keinen Unterschied in dem ESR-Spektrum.

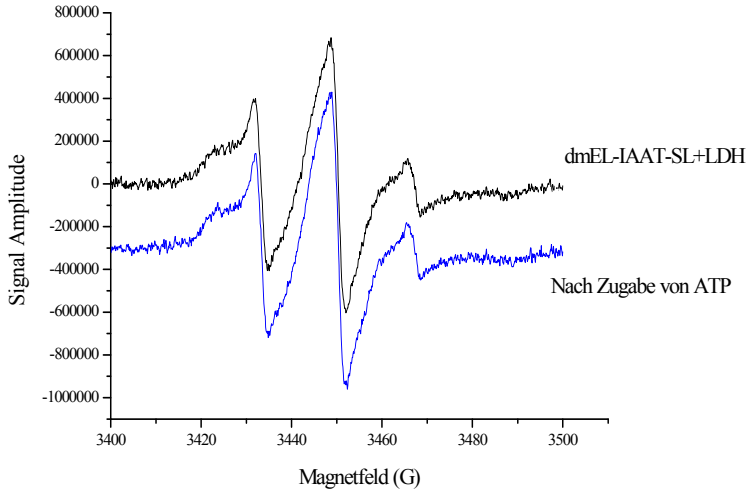


Abb. 31: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IAAT in Anwesenheit von:
1) 7 µM LDH. 2) 7 µM LDH und nach Zugabe von 2 mM MgATP, in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 (NaOH) bei 25 °C.

In Abbildung 32 werden die Spektren von dmEL-IAAT in Anwesenheit von:

1. 50 mM MgATP und 7 µM LDH.
2. 12,5 µM ES + 50 mM MgATP + 7 µM LDH.

bei 25 °C gezeigt. Die Abbildung 32 zeigt deutlich, dass auch die Zugabe von ES an dmEL-IAAT in Anwesenheit von LDH keinen Unterschied auf das ESR-Spektrum hat. Im Vergleich zu der Abbildung 30, wobei einen Effekt von ES gesehen wurde, hat ES in diesem Fall keinen Effekt auf das ESR-Spektrum gezeigt. Das könnte an der Anwesenheit von Substratprotein oder auch DTT liegen. Das könnte bedeuten, dass das Substratprotein die ES-Bindung an dmEL-IAAT gestört hat, oder dass die Übertragung des Effektes der ES-Bindung auf das ESR-Spektrum verdrängt wurde.

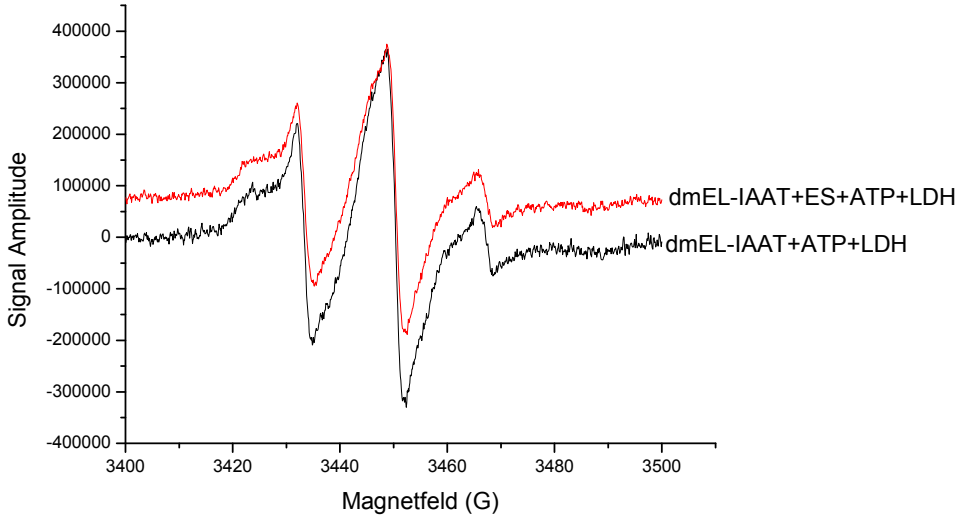


Abb.32: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IAAT-SL in Anwesenheit von:
1) 50 mM MgATP + 7 µM LDH. 2) 12,5 µM ES + 50 mM MgATP + 7 µM LDH.
in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 (NaOH) bei 25 °C.

Die Abbildung 33 zeigt das Spektrum von dmEL-IAAT in Anwesenheit von:
1) 50 mM MgADP + 7 µM LDH.
2) 12,5 µM ES + 7 µM LDH + 50 mM MgADP, und 3) nach Zugabe von 2 mM MgATP.
Im Gegensatz zu Abbildung 30, wobei ES einen Effekt auf dem ESR-Spektrum hat, sind die drei ESR-Spektren (Abb. 33) sehr ähnlich und das deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von ES während der Rückfaltung von LDH zu keinen Effekt auf dem ESR-Spektrum geführt hat. Diese Bemerkung stimmt mit den erhaltenen Ergebnissen während der Rückfaltungs-Untersuchung im Falle des dmEL-IAAT überein, wobei keine wichtige Erhöhung der Ausbeute an Teil gefalteter LDH nach der Zugabe von ES bemerkt wurde. Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedliche Bedingungen zwischen den zwei Experimenten. Während die Messproben für die ESR-Spektren aus der Abbildung 30 möglichst schnell angesetzt und gemessen wurden (ca. 1 Minute), wurde für die Vorbereitung der Messproben für die ESR-Spektren in der Abbildung 32 mehr zeit gebraucht, um die Messproben von 1 ml auf 40 µl einzuengen. Außerdem besteht auch die Möglichkeit, dass die Anwesenheit von Substratprotein den Effekt der ES-Bindung an dmEL-IAAT verdrängt hat, und deshalb wurde keinen Effekt auf das ESR-Spektrum bemerkt.

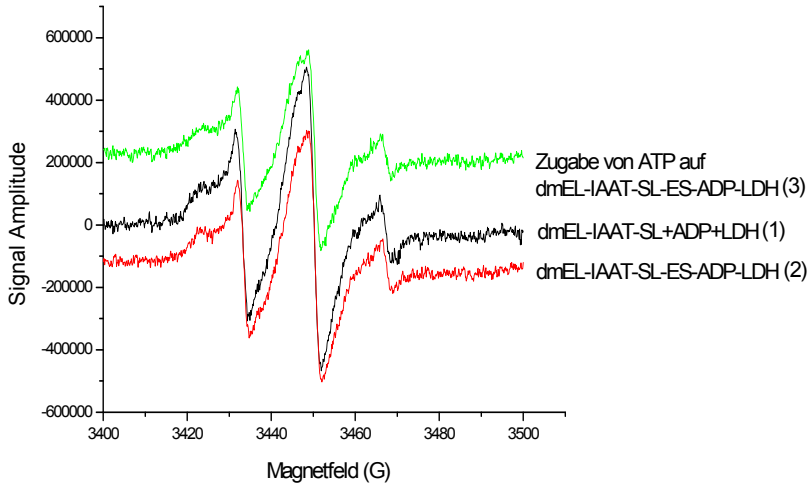


Abb. 33: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IAAT in Anwesenheit von:

1) 50 mM MgADP + 7 µM LDH.
2) 12,5 µM ES + 50 mM MgADP + 7 µM LDH, und 3) nach Zugabe von 2 mM MgATP.

in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 (NaOH) bei 25 °C.

Die Zugabe von MgATP nach der Aufnahme des Spektrums von dmEL-IAAT in Anwesen-heit von ES, LDH, und ADP hat keinen Effekt auf das ESR-Spektrum gezeigt. Um den Effekt von ES und Substratprotein auf die Konformation des dmEL-IAAT-Struktur in Anwesenheit von Nukleotid zu untersuchen, wurde ESR-Spektrum von dmEL-IAAT in Anwesenheit von ES und LDH aufgenommen, und danach wurde ein das Spektrum von dmEL-IAAT in Gegenwart von ES und MgATP aber in Abwesenheit von LDH aufgenommen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den ESR-Spektren bemerkt.

Das gleiche Experiment in Gegenwart von ES und MgADP aber in Abwesenheit von LDH hat ähnlichen ESR-Spektren gezeigt.

Da in allen ESR-Untersuchungen während der Chaperonin-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen ESR-Spektren beobachten wurden, war wichtig, den Effekt von GdnHCl (Denaturierungreagenz, experi-mentellen Teil unter 5. 4 dieser Arbeit) auf das dmEL bzw. auf dmEL/ES während der Inkubation zu ermitteln.

Da bei den Experimenten mit denaturiertem Substratprotein GdnHCl als Denaturierungsreagenz verwendet wurde, wurde Kontrolle durchgeführt, um den Effekt des GdnHCl auf die GroEL-Struktur zu ermitteln. Dabei wurden 6,25 µM dmEL-IAAT-SL mit 55 mM GdnHCl (gleiche Konzentration wie bei der Rückfaltungs-Untersuchung) für 10 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und das ESR-Spektrum aufgenommen (Abb. 34). Ebenso wurde das Spektrum von dmEL-IAAT-SL in Anwesenheit von ES nach Vorinkubation mit 55 mM GdnHCl aufgenommen (Abb. 34). Die Experimente zeigen, dass GdnHCl keinen Effekt unter diese Bedingung auf Struktur des Proteins hat.

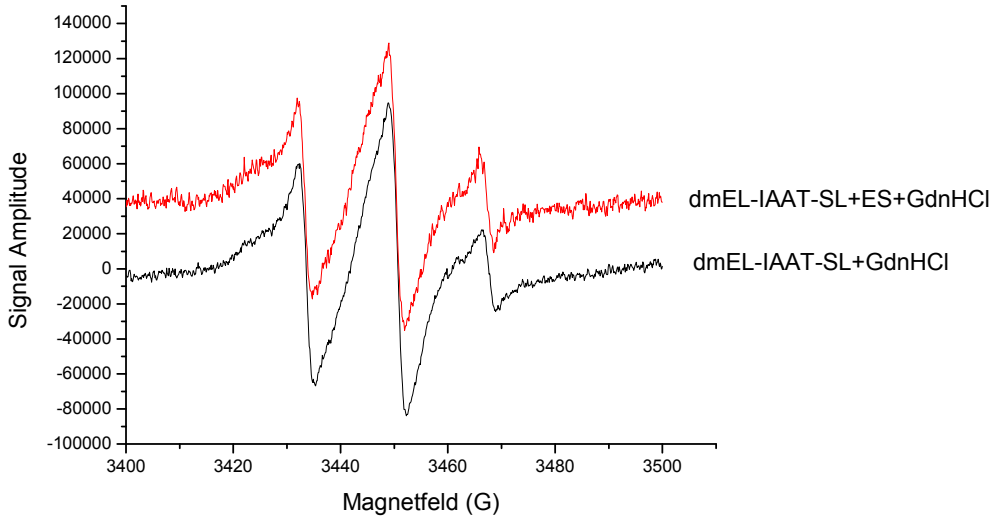


Abb. 34: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IAAT nach Inkubation mit 55 mM GndHCl bzw. nach Inkubation mit 55 mM GndHCl in Anwesenheit von 12,5 µM ES. Die Inkubationszeit war 10 Minuten bei Raumtemperatur. Der Puffer enthielt 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 (NaOH) bei 25 °C.

3.2.2.1.4 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL-IAAT

Die Vorschrift der Durchführung dieses Versuches findet sich im experimentellen Teil unter 5.8.4 dieser Arbeit. Für diese Untersuchung wurde der dmEL-IAAT-SL und C8-SL-ATP verwendet.

Da die Amplitude des Hochfeldsignals des freien IAAT-SL die Bestimmung von freiem C8-SL-ATP verfälscht, musste vorher zuerst eine Probe von dmEL-IAAT-SL ESR-gemessen werden, um die Amplitude des Hochfeldsignals des freien IAAT-SL zu bestimmen und in weiterem Schritt diese Amplitude von der Amplitude des Hochfeldsignals des freien C8-SL-ATP in Anwesenheit von dmEL-IAAT-SL zu differenzieren. Die Bindungskurve in Abbildung 35 deutet darauf hin, dass die maximale Zahl der zugänglichen Nukleotidbindungsstellen auch nach der chemischen Modifizierung des dmEL mit IAAT-SL im selben Bereich wie im Falle des nicht gelabelten dmEL bleibt (3.2.1.3.1).

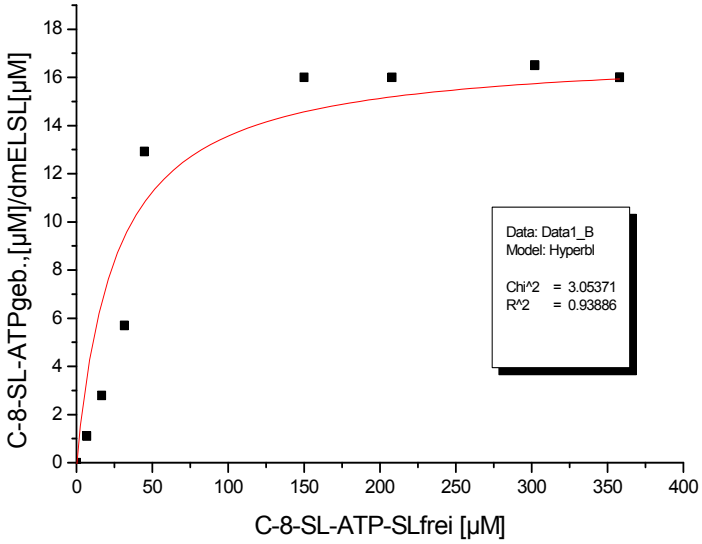


Abb. 35: Bindungskurve des C-8-SL- ATP an die Nukleotidbindungsstellen im dmEL-IAAT in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 20 C°. Die dmEL-IAAT-Konzentration betrug 12 µM, die C8-SL-ATP-Konzentration zwischen 10,5 und 550 µM.

3.2.2.1.5 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL-IAAT in Anwesenheit von ES

Dieser Versuch wurde genau wie im experimentellen Teil unter 5.8.5 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Abbildung 36 zeigt die Bindungskurve von C-8-SL-ATP an dmEL-IAAT in Anwesenheit von ES. Die maximale Anzahl besetzter Bindungsstellen ist entsprechend dem Fall mit spingelabeltem dmEL in Abwesenheit von ES. Das Experiment zeigt, dass die ES-Bindung an spingelabeltem dmEL die Nukleotidbindung nicht blockiert hat.

Dieses Verhalten von ES stimmt mit den experimentell erhaltenen Ergebnisse bei der ATPase-Aktivitäts-Untersuchung am dmEL-IAAT nach Zugabe von ES überein, welche nur leichte Inhibierung der ATP-Hydrolyse gezeigt haben.

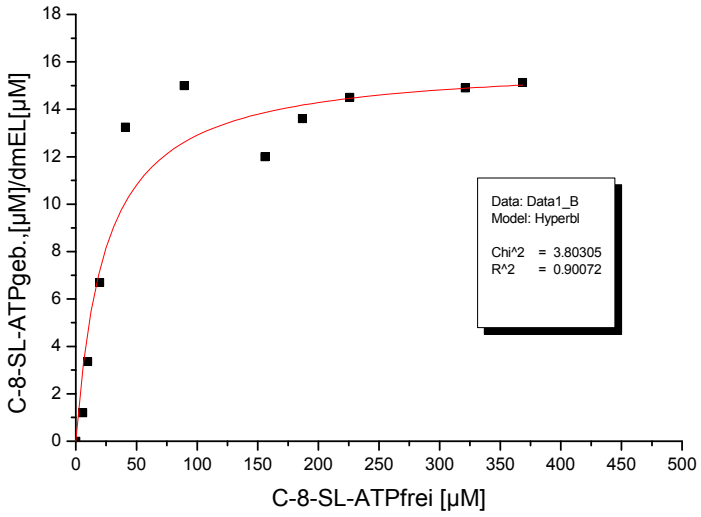


Abb.36: Bindungskurve des C-8-SL- ATP an die Nukleotidbindungsstellen im dmEL-IAAT in Anwesenheit von 24 µM ES in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl). Die dmEL-IAAT-Konzentration betrug 12 µM, die C8-SL-ATP-Konzentration zwischen 20 und 510 µM bei 20°C.

Zusammenfassend kann erwähnt werden, dass die verschiedenen Untersuchungen am modifizierten mit IAAT-SL dmEL die folgenden Schlüsse zulassen:

1) Die ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT sinkt auf 77 % des nicht spingelabelten dmEL-Wertes.
2) Die Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro* zeigt, dass der dmEL-IAAT relativ geringere Rückfaltungsaktivität im Vergleich zum nicht spingelabelten dmEL hat.
3) Die verschiedenen ESR-Untersuchungen am dmEL-IAAT in Anwesenheit von Substratprotein konnten keine strukturellen Veränderungen im Bereich der modifizierter mit IAAT-SL C458 nachweisen.
4) Die ESR-Spektren in Abwesenheit von LDH haben nur in einem Fall, nämlich in Anwesenheit von ES und MgATP einen guten Effekt auf die ESR-Spektren gezeigt, d. h. die Bindung von ES an GroEL beeinflusst Konformationsänderung im Bereich des C458.

5) Die Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen bei dmEL-IAAT in Ab- und Anwesenheit von ES zeigt keine Inhibierung der für C8-SL-ATP zugänglichen Nukleotidbindungsstellen. Das stimmt mit der experimentell beobachteten stabilen ATPase-Aktivität bei der ATP-Hydrolyse-Untersuchung im Falle des dmEL-IAAT in Gegenwart von ES überein. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ES wieder abdissoziiert und des-halb sind alle Nukleotidbindungsstellen zugänglich.

3.2.2.2 Charakterisierung des dmEL-MAL-SL

Da der IAAT nicht ausreichende Informationen über die Konformationsänderungen im Bereich des C458 geliefert hat, sollte der MAL-SL, der starrer als IAAT-SL ist, verwendet werden.
Wie schon zur Charakterisierung des dmEL-IAAT-SL, wurden zur Charakterisierung des dmEL-MAL-SL die folgenden Untersuchungen durchgeführt:
Die ATPase-Aktivität wurde in Ab- und Anwesenheit von GroES untersucht. Die Rückfaltung von denaturierter LDH wurde in Ab- und Anwesenheit von GroES *in vitro* bestimmt. Zum Schluss wurden die ESR-Untersuchungen am dmEL-MAL-SL durchgeführt.

3.2.2.2.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-MAL-SL

Die Vorschrift der Durchführung dieser Untersuchung findet sich im experimentellen Teil unter 5.5.1 dieser Arbeit. Die Abbildung 37 vergleicht die ATPase-Aktivität des dmEL-MAL-SL allein und nach Vorinkubation mit:
1) 2 mM MgATP, 2) 2 mM MgADP, 3) 2 mM MgATP + 24 µM ES, 4) 2 mM MgADP + 24 µM ES, mit der des dmEL bei 30°C. Die Abbildung 37 deutet darauf hin, daß die ATPase-Aktivität nach der Modifizierung mit MAL auf ca. 50 % der des dmEL sinkt.
Eine mögliche Erklärung ist eine Störung der Struktur der Nukleotidbindungsstellen und dadurch gestörte Konformationsübertragung. Der Maleimid ist relativ starr und groß im Vergleich zu IAAT. Das kann bedeuten, dass durch die Modifizierung das ganze Proteinsystem auseinander fällt.

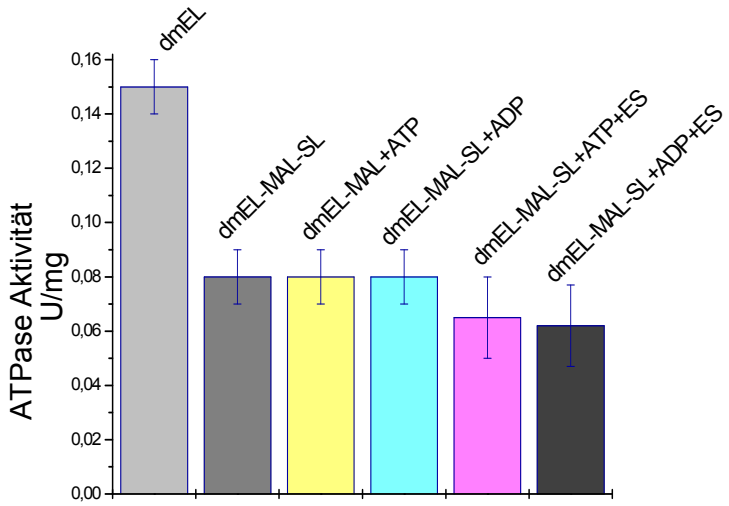


Abb. 37: ATPase-Aktivität des dmEL-MAL-SL (12 µM) allein und nach Vorinkubation mit:
1) 2 mM MgATP. 2) 2 mM MgADP. 3) 2 mM MgATP + 24 µM ES. 4) 2 mM MgADP + 24 µM ES bei 30°C.
* Zuerst wurde dmEL-MAL-SL mit Nukleotid oder Nukleotid und ES bei 30 °C vorinkubiert

3.2.2.2.2 Bestimmung der dmEL-MAL-SL-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro*

Die Durchführung der Rückfaltungs-Untersuchung findet sich im experimentellen Teil unter 5.4 dieser Arbeit. Die Abbildung 38 zeigt die durch dmEL-MAL-SL zurückgewonnene LDH-Aktivität in Anwesenheit von:
1) MgATP, 2) MgATP und ES, im Vergleich zur nicht Chaperonin-abhängigen "spontanen" Rückfaltung von denaturierter LDH bei 25 °C.

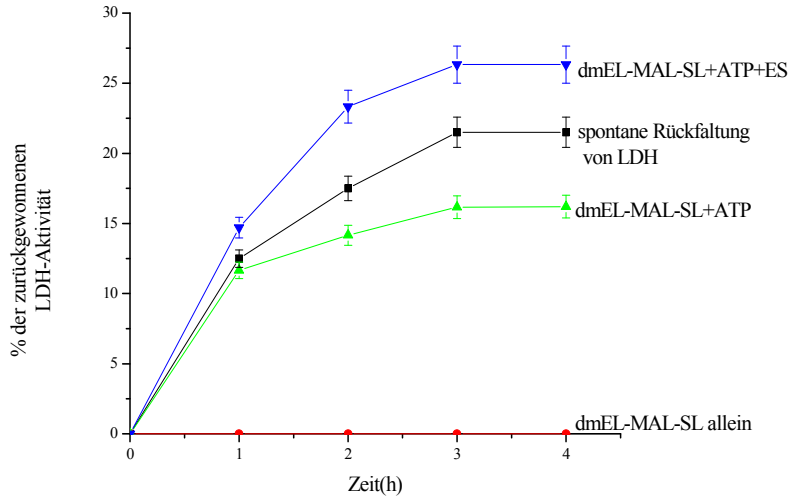


Abb. 38: Zeitverlaufskurven der durch dmEL-MAL-SL zurückgefalteter LDH in Ab- und Anwesen-heit von ES. Als 100%iger Vergleichswert diente dabei die LDH-Aktivität nativer LDH, die vorher nicht mit Gdn-HCl denaturiert wurde. Die Bestimmung des 100% Wertes (0,28 µM LDH) wurde durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ und die Messung der Extinktionsabnahme bei ε_{334} in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ANP, pH 7,5/NaOH bei 25 °C durchgeführt. Die Denaturierung von LDH erfolgte in 6 M Gdn-HCl (pH 2,3/H_3PO_4), die Rückfaltung in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 0,25 µM dmEL, 0,50 µM ES, pH 7,5/NaOH (Guhr, 1996).

Wie aus der Abbildung 38 hervorgeht, hat der dmEL-MAL-SL in Anwesenheit von ATP geringere Rückfaltungsaktivität als die spontan zurückgefaltete LDH. Nach der Zugabe von ES ist die Ausbeute an Teil gefalteter LDH leicht gesteigert. Diese gesteigerte Ausbeute deutet darauf hin, dass ES an dmEL-MAL bindet.

Zum Vergleich wurden die dmEL-MAL- und die dmEL-unterstützte Rückfaltung von LDH in Ab- und Anwesenheit von ES dargestellt (Abb. 39). Die Abb. 39 deutet darauf hin, dass die Modifizierung mit Maleimid zu geringeren Rückfaltungsaktivität des dmEL geführt hat. Es scheint aber deutlich, dass GroES an dmEL-MAL bindet. Allerdings deutet die Erhöhung der Faltungsausbeute in Gegenwart von ES auf eine direkte Interaktion zwischen ES und EL hin. Auch deuten die Faltungsexperimente darauf, dass durch die Modifikation mit MAL-SL keine totale Dissoziation der Untereinheiten stattgefunden hat.

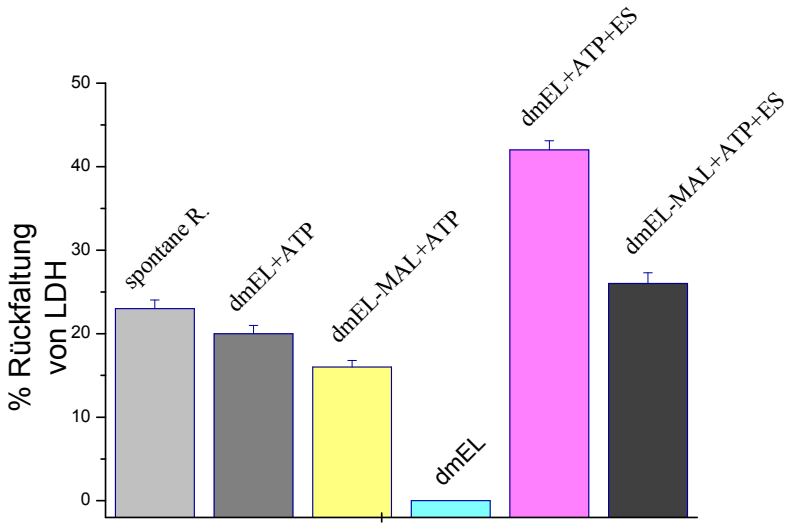


Abb. 39: Vergleich zwischen dem dmEL-MAL und nicht spingelabelten dmEL bezüglich der Rückfaltung von LDH *in vitro*.

3.2.2.2.3 Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-MAL in Abwesenheit von denaturierter LDH

Nach der Modifizierung der verbliebenen Cysteingruppe C458 des dmEL mit MAL-SL wie unter 5.5 im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben, wurde die Bindung von MAL-SL an dmEL geprüft, ob er kovalent gebunden ist. Dabei wurde eine Messprobe ESR-gemessen und in weiterem Schritt mit Hilfe einer Centricon 30 bei 4 °C mit ESR-Puffer gewaschen, aufkonzentriert, und erneut zum ESR-messen gebracht (Abb. 40). Das ESR-Spektrum des dmEL-MAL deutet darauf hin, dass der Maleimid kovalent an dmEL bindet. Es wurde auch ermittelt, ob die Zugabe von Nukleotid an dmEL-MAL die Bindung von MAL beeinflusst. Deshalb wurde eine Probe des dmEL-MAL-SL nach Zugabe von 2 mM MgADP ESR-spektroskopisch untersucht, in ESR-Puffer bei Centricon 30 bei 4 °C drei mal mit ESR-Puffer gewaschen, aufkonzentriert, und erneut ESR-spektroskopisch untersucht (Abb. 40).
Wie aus Abb. 40 zu sehen ist, waren die zwei Spektren (sowohl vor als auch nach Aufarbeitung der Messprobe in Centricon 30) sehr ähnlich.

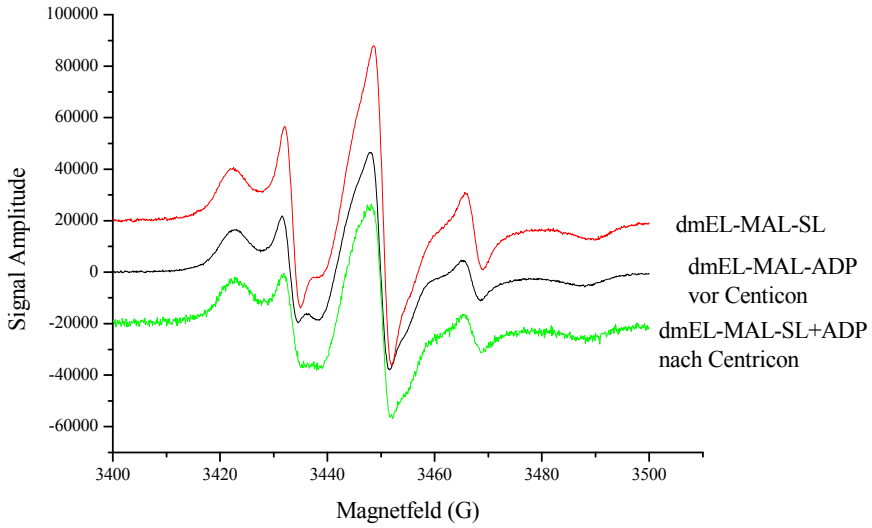


Abb. 40: ESR-Spektren von 12 µM dmEL-MAL-SL mit 2 mM MgADP vor und nach Aufarbeitung mit ESR-Puffer (50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5/HCl) bei Centricon 30 und 25 °C.

In der Abbildung 41 werden die Spektren von dmEL-MAL allein und in Anwesenheit von:
1) MgATP, 2) MgATP + ES, gezeigt. Es ist kein Unterschied zwischen den drei Spektren zu sehen, sowohl vor als auch nach der Zugabe von Nukleotiden in Ab- und Anwesenheit von ES. Anscheinend wurde die Konformationsübertragung nach Modifizierung mit MAL-SL gestört, und deshalb ist unmöglich den Effekt nach der Zugabe von Nukleotid und ES zu bemerken.
Die Abbildung 42 zeigt die Spektren von dmEL-MAL-SL in Anwesenheit von:
1) MgADP, 2) MgADP und ES. Auch hier hat die Zugabe von ADP oder ADP in Anwesenheit von ES keinen Effekt auf den ESR-Spektren gezeigt.

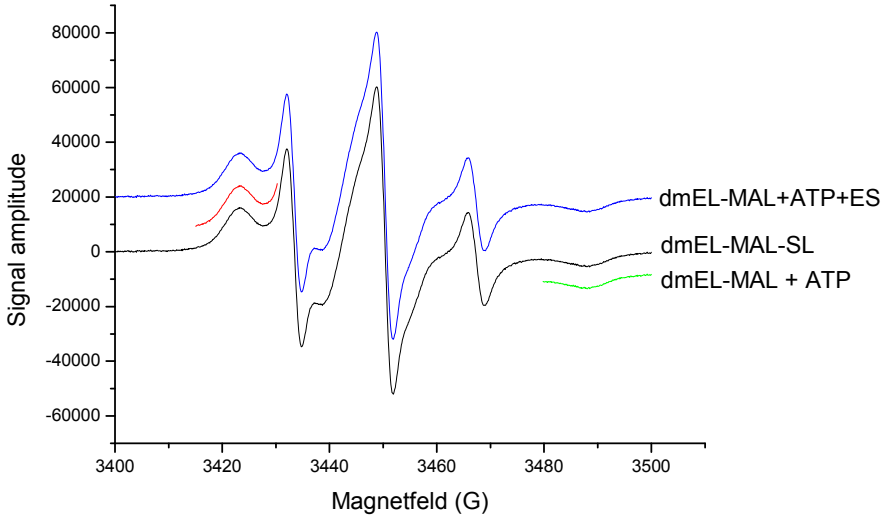


Abb. 41: ESR-Spektren von 12 µM dmEL-MAL-SL allein und in Anwesenheit von:
1) 2 mM MgATP, 2) 2 mM MgATP und 24 µM ES, in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

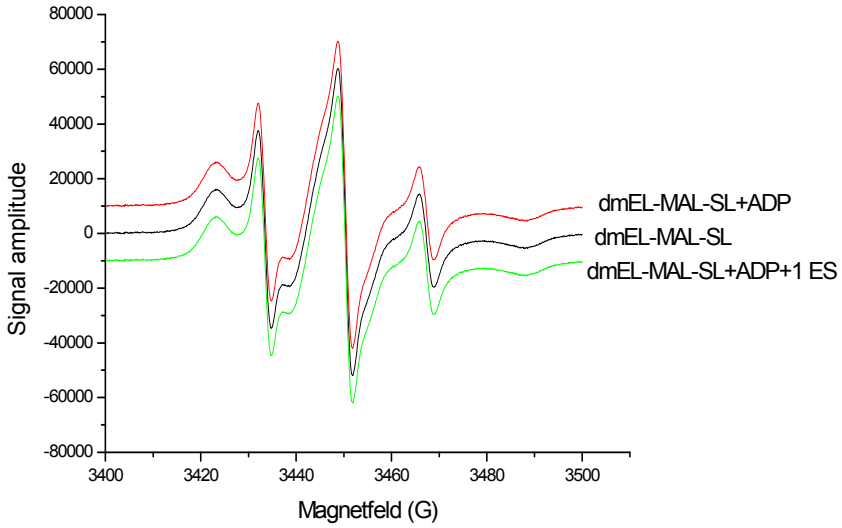


Abb. 42: ESR-Spektren von 12 µM dmEL-MAL-SL allein und in Anwesenheit von:

1) 2 mM MgADP, 2) 2 mM ADP und 12 µM ES, in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

Die Spektren des dmEL in Anwesenheit von:

1) ES und MgATP, oder 2) ES und MgADP, in Abbildung 43 zeigen eine leichte Erhöhung der Mobilität des kovalent gebundenen MAL-SL an dmEL, was durch eine Konformationsänderung während der Ausbildung des EL/ES-Komplexes verursacht werden könnte.

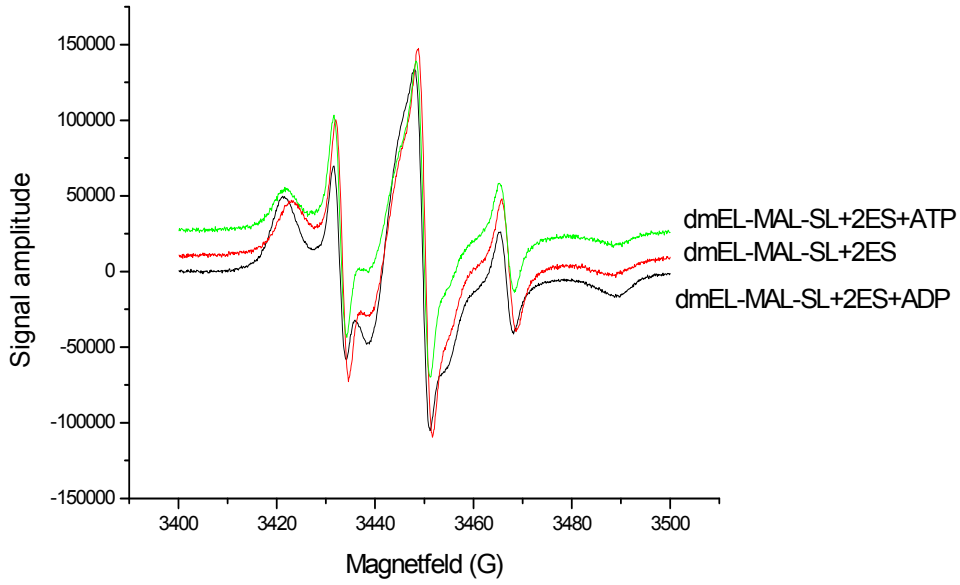


Abb. 43: ESR-Spektren von 12 µM dmEL-MAL-SL in Anwesenheit von:

1) 24 µM ES, 2) 24 µM ES und 2 mM MgATP, 3) 24 µM ES und 2 mM MgADP, in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

Die entsprechende ESR-Spektren des dmEL-MAL in Gegenwart von 1) MgATP, 2) MgADP, 3) MgAMP, oder 4) MgAMPPNP haben keinen Unterschied gezeigt.

Zusammenfassend kann erwähnt werden, dass die verschiedenen Untersuchungen am modifizierten mit MAL-SL dmEL die folgenden Schlüsse zulassen:

1. Die ATPase-Aktivität des dmEL-MAL sinkt stark auf 50 % des nicht spingelabellten dmEL-Wertes.
2. Die Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro* zeigt, dass der dmEL-MAL geringere Rückfaltungsaktivität als der nicht spingelabelten dmEL hat, allerdings zeigen die Experimente eine direkte Interaktion zwischen ES und dmEL-MAL.

3. Die verschiedenen ESR-Untersuchungen am dmEL-MAL haben sowohl in Anwesenheit von Nukleotiden als auch in Anwesenheit von Nukleotiden und ES keine signifikanten Hinweise auf strukturellen Veränderungen im Bereich der modifizierter mit MAL-SL C458 bewiesen.

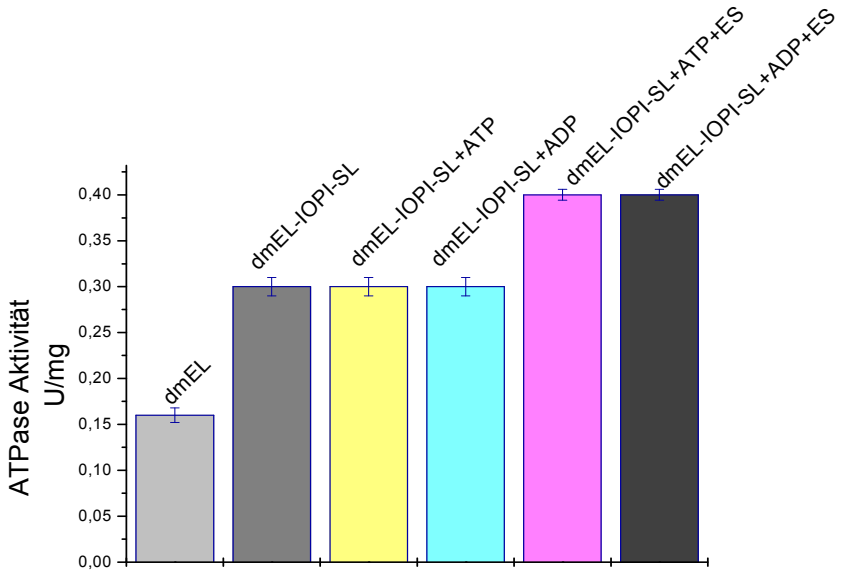
3.2.2.3 Charakterisierung des dmEL-IOPI-SL

Da die Experimente mit IAAT- und MAL-SL nicht ausreichende Informationen über die Konformationsänderungen im Bereich des C458 geliefert haben, sollte der IOPI-SL wegen seiner rigideren Bindung als IAAT-SL verwendet werden. Für die Charakterisierung des dmEL-IOPI wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:
1) Die ATPase-Aktivität in Ab- und Anwesenheit von GroES.
2) Die Rückfaltung von denaturierter LDH in Ab- und Anwesenheit von GroES *in vitro*.
Und schließlich die ESR-Untersuchungen in Ab- und Anwesenheit von Substratprotein.

3.2.2.3.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI

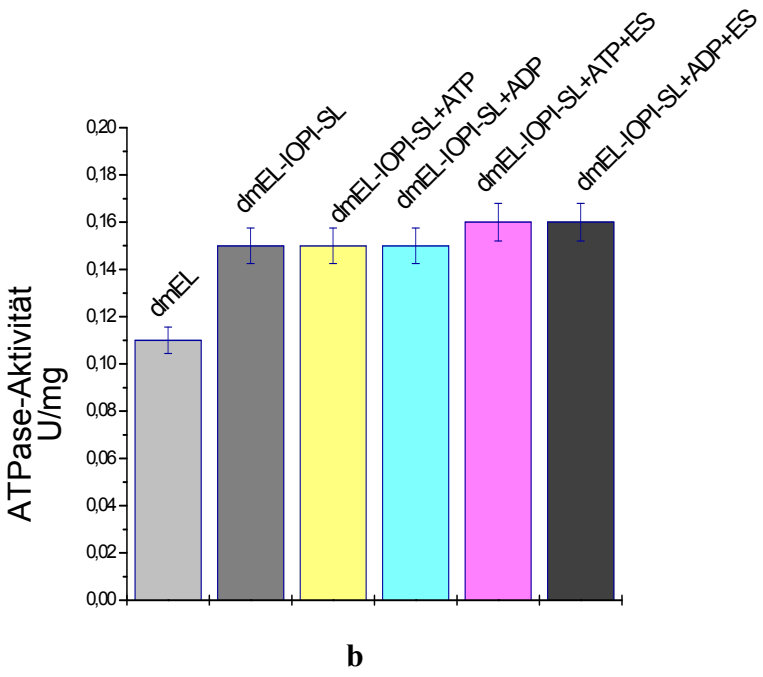
Die ATPase-Aktivität wurde genau wie im experimentellen Teil unter 5.5.1 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt.
Die Abbildung 44a vergleicht die ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI allein und nach Vorinkubation mit:
1) MgATP, 2) MgADP, 3) MgATP + ES, 4) MgADP + ES, mit der des dmEL bei 37 °C, und die Abbildung 44b zeigt die gleichen Untersuchungen wie Abbildung 44a aber bei 30 °C. In Abbildung 44a sieht man, dass die Modifizierung des dmEL mit IOPI-SL einen sehr deut-lichen Effekt auf die ATPase-Aktivität hat, so dass die ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI bei 37 °C in allen Fällen und besonders nach Vorinkubation mit Nukleotid in Anwesenheit von ES um 100% der ATPase-Aktivität des dmEL steigert.
Die Durchführung des ATPase-Aktivität-Assays unter gleichen Bedingungen aber bei 30 °C (Abb. 44b) zeigt eine Aktivität, die im selben Bereich des dmEL-Wertes liegt. Diese gesteigerte ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI-SL bei 37 °C kann nur an der Erhöhung der

Temperatur und in Zusammenhang mit IOPI liegen. Eine mögliche Erklärung für diese außergewöhnliche gesteigerte ATPase-Aktivität bei 37 °C ist eine Verfälschung der Bestimmung von hydrolysierten Menge ATP unter diesen Bedingungen.



a

Abb. 44a: ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI-SL (12 µM) allein und nach Vorinkubation mit: 1) 2 mM MgATP, 2) 2 mM MgADP, 3) 2 mM MgATP + 24 µM ES, 4) 2 mM MgADP + 24 µM ES bei 37 °C.



b

Abb. 44b: ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI-SL (12 µM) allein und nach Vorinkubation mit: 1) 2 mM MgATP, 2) 2 mM MgADP, 3) 2 mM MgATP + 24 µM ES, 4) 2 mM MgADP + 24 µM ES bei 30 °C.

Interessant ist die ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI bei 30 °C, welche nur leicht über der des dmEL steigert. Anscheinend hat der IOPI keine Störung für die ATP-Bindung bei 30 °C verursacht.

3.2.2.3.2 Bestimmung der dmEL-IOPI-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro*

Die Untersuchung wurde wie im experimentellen Teil unter 5.4 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Die Abb. 45 zeigt die Zeitverlaufskurven der durch dmEL-IOPI rückgefalteter LDH in Anwesenheit von: 1) MgATP, 2) MgATP und ES, im Vergleich zum dmEL-IOPI allein und der nicht Chaperonin-abhängigen "spontanen" zurückgefalteter LDH bei 25 °C.

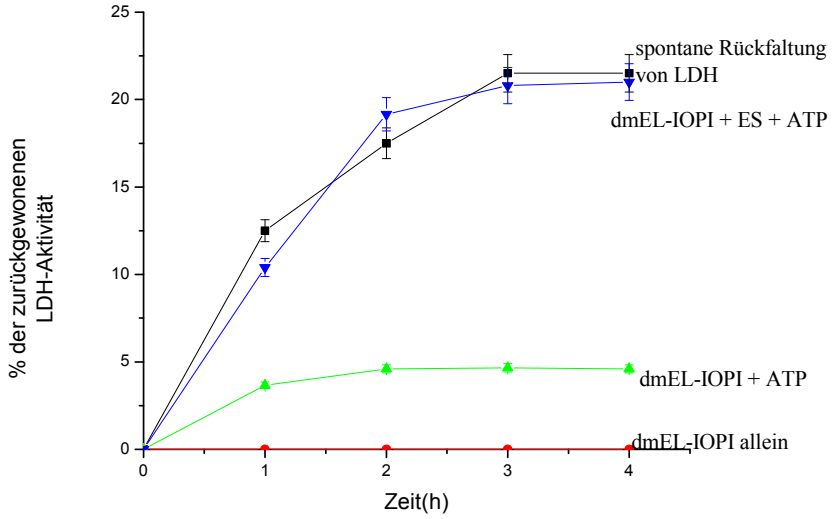


Abb.45: Zeitverlaufskurven der durch dmEL-IOPI-SL zurückgefalteter LDH in Ab- und Anwesenheit von ES. Als 100%iger Vergleichswert diente dabei die LDH-Aktivität nativer LDH, die vorher nicht mit Gdn-HCl denaturiert wurde. Die Bestimmung des 100% Wertes (0,28 µM LDH) wurde durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ und die Messung der Extinktionsabnahme bei ε_{334} in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ANP, pH 7,5/NaOH bei 25 °C durchgeführt. Die Denaturierung von LDH erfolgte in 6 M Gdn-HCl (pH 2,3/H_3PO_4), die Rückfaltung in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 0,25 µM dmEL, 0,50 µM ES, pH 7,5/NaOH (Guhr, 1996).

Aus der Abb. 45 scheint deutlich, dass der dmEL-IOPI in Anwesenheit von ATP sehr niedrige Rückfaltungsaktivität hat. Nach der Zugabe von ES zeigt dmEL-IOPI eine höhere Rückfaltungsaktivität im Vergleich zum dmEL-IOPI in Abwesenheit von ES. Das deutet darauf hin, dass ES doch an dmEL-IOPI bindet.

Die Abbildung 46 vergleicht die Rückfaltungsaktivität des dmEL-IOPI mit der des nicht gelabelten dmEL. Man sieht, dass die durch dmEL-IOPI zurückgefaltete LDH sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von ES relativ geringer ist als die durch den nicht gelabelten dmEL zurückgefaltete LDH. Möglicherweise hat der IOPI die Freisetzung von Substratprotein aus dem Hohlraum des GroEL blockiert. Betrachtet man sich die beobachtete ATP-Hydrolyse von IOPI-SL bei 30 °C und die relativ geringere Ausbeute an Teil zurückgefalteter LDH, so ist anzunehmen, dass die ATP-Hydrolyse und die Faltung abgekoppelt erfolgen.

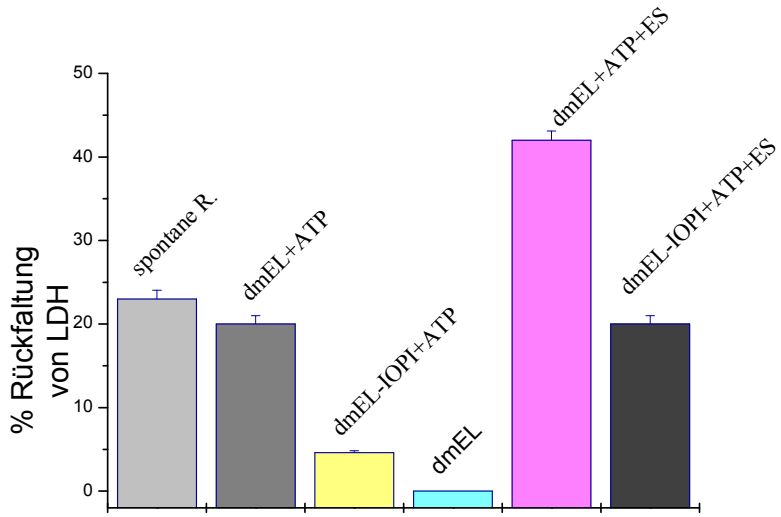


Abb. 46: Vergleich zwischen dmEL-IOPI und nicht spingelabelten dmEL bezüglich der Rückfaltung von denaturierter LDH.

3.2.2.3.3 Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-IOPI in Abwesenheit von Substratprotein LDH

Nachdem es keine signifikanten Unterschiede zwischen den ESR-Spektren bei Zugabe von verschiedenen Nukleotiden in Ab- und Anwesenheit von ES während den Untersuchungen an dmEL-IAAT bzw. dmEL-MAL bemerkt wurden, sollten ähnliche Untersuchungen mit Modifikation des dmEL mit IOPI-SL durchgeführt werden. Wegen seiner rigiden Bindung des Moleküls sollten keine Störungen während der Verwendung von IOPI-SL auftreten. Die Modifizierung der verbliebenen Cysteingruppe C458 mit IOPI wurde wie im experimentellen Teil unter 5.5 dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 47 wird das Spektrum von kovalent gebundenem IOPI-SL mit dmEL dargestellt. Die $2A_{zz}$-Aufspaltung des Signals beträgt 66 G.

In Abbildung 48 werden die Spektren von dmEL-IOPI-SL alleine und nach Zugabe von :

1) MgATP, 2) MgADP, 3) MgATP und ES, 4) MgADP und ES, dargestellt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den ESR-Spektren sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von ES beobachtet. Möglicherweise wurde die Konformationsübertragung nach der Modifikation mit IOPI-SL gestört.

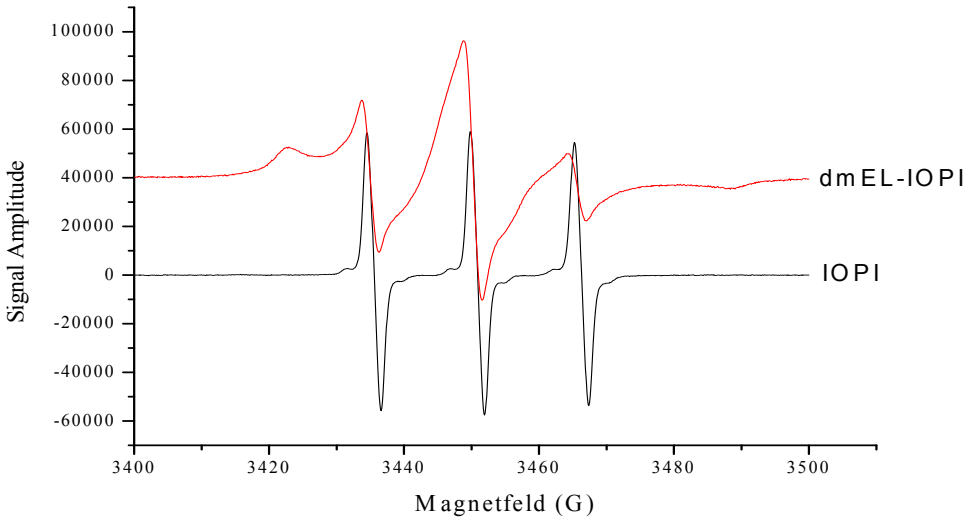


Abb. 47: ESR-Spektrum von 12 µM dmEL-IOPI-SL in Vergleich mit dem des freien IOPI-SL in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

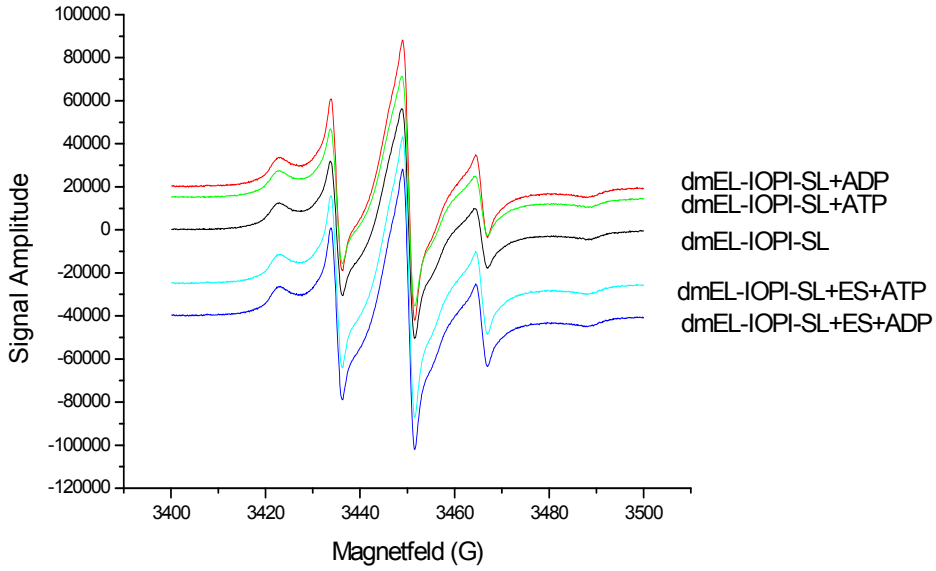


Abb. 48: ESR-Spektren von 12 µM dmEL-IOPI-SL allein und in Anwesenheit von:
1) 2 mM MgATP, 2) 2 mM MgADP, 3) 2 mM MgATP und 24 µM ES, 4) 2 mM MgADP und 24 µM ES, in 50 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5 (HCl) bei 25 °C.

3.2.2.3.4 Effekt von verschiedenen Nukleotiden bzw. ES auf die Konformation des dmEL-IOPI in Anwesenheit von denaturierter Substratprotein LDH *in vitro*

Die letzte Aufgabe dieser Arbeit war die Durchführung von Rückfaltungs-Assays mit denaturierter LDH und Verwendung von dmEL-IOPI in Anwesenheit von verschiedenen Nukleo-tiden und ES und die Aufnahme der entsprechenden ESR-Spektren, um möglichen struktu-rellen Veränderungen im Bereich der modifizierter mit IOPI-SL C458 nachzuweisen.
Es ist wichtig hier zu erwähnen, dass die Aufnahme von ESR-Spektren in zwei verschiedenen Zeitpunkte des Rückfaltungsprozesses durchgeführt wurden und zwar mit Ansatz zweier unabhängigen Rückfaltungs-Assays, wobei bei dem ersten die ESR-Spektren erst nach Beendigung des Rückfaltungsprozesses (also nachdem die zurückgewonnene LDH-Aktivität ihr Maximum erreicht hat), aufgenommen wurden (siehe auch experimentellen Teil unter 5.6.1.2.1 dieser Arbeit).
Bei dem zweiten Rückfaltungs-Assay wurden die ESR-Spektren bevor die zurückgewonnene LDH-Aktivität ihr halbmaximum erreicht hat (siehe auch experimentellen Teil unter 5.6.1.2.1 dieser Arbeit).

3.2.2.3.4.1 ESR-Spektren des dmEL-IOPI-SL nach Beendigung der Chaperonin-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH

die Abbildung 49 zeigt die ESR-Spektren von dmEL-IOPI-SL in Anwesenheit von:

1. 2 mM MgATP und 0,28 µM LDH (Spektrum A für verdünnte Probe und Spektrum B nach Aufkonzentrierung der selben Probe).
2. 2 mM MgATP und 0,5 µM ES in Anwesenheit von 0,28 µM LDH (Spektrum C für verdünnte Probe und Spektrum D nach Aufkonzentrierung der selben Probe).

nach Beendigung der Rückfaltung von LDH (Spektren A und C in Abb. 49) und nach Aufkonzentrierung der Messproben mit Hilfe einer Centricon 30 bei 4 °C (Spektren B und D in Abb. 49).

Aus der Abbildung 49 wurden keine Unterschiede zwischen den ESR-Spektren A und C oder B und D im Vergleich bemerkt.

Trotz der beobachteten gesteigerten Ausbeute an Teil zurückgefalteter LDH in Anwesenheit von ES (Abb. 45 und 46) wurden keine Hinweise auf strukturellen Veränderungen aus den erhaltenen ESR-Spektren (Abb. 49) bemerkt.

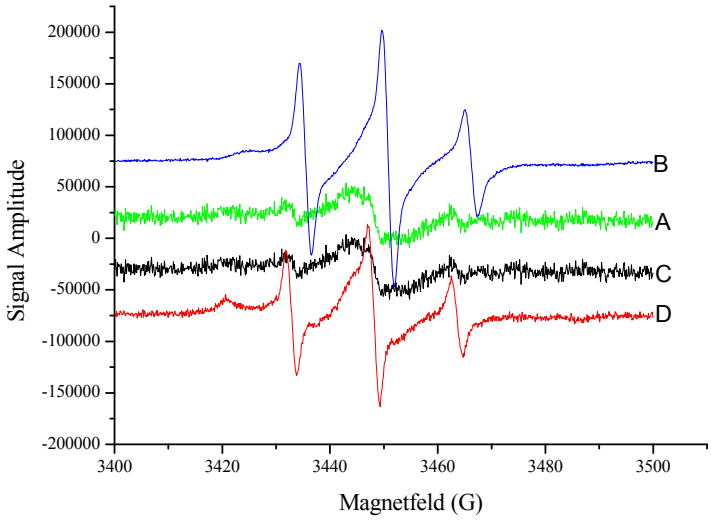


Abb. 49: ESR-Spektren von dmEL-IOPI-SL in Anwesenheit von:

1) 2 mM MgATP und 0,28 µM LDH (Spektrum A für verdünnte Probe und Spektrum B für konzentrierte Probe).

2) 2 mM MgATP und 0,5 µM ES in Anwesenheit von 0,28 µM LDH (Spektrum C für verdünnte Probe und Spektrum D für konzentrierte Probe).

Der Puffer enthielt: 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP, pH 7,5/NaOH . Die Messtemperatur war 25 °C.

A: 0,25 µM dmEL-IOPI-SL+ 2 mM ATP + 0,28 µM LDH (verdünnte Probe).

B: 4,4 µM dmEL-IOPI-SL + 35 mM ATP + 4,9 µM LDH (konzentrierte Probe).

C: 0,25 µM dmEL-IOPI-SL + 0,5 µM ES + 2 mM ATP + 0,28 µM LDH (verdünnte Probe).

D: 4,4 µM dmEL-IOPI-SL + 8,8 µM ES + 35 mM ATP + 4,9 µM LDH (konzentrierte Probe).

3.2.2.3.4.2 ESR-Spektren des dmEL-IOPI-SL während der Chaperonin-unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH

Zuerst wurde der Effekt der Zugabe von 7 µM LDH an dmEL-IOPI in Abwesenheit von Nukleotid oder ES untersucht (Abb. 50). Da wurde keinen Unterschied zwischen den beiden ESR-Spektren gefunden und d.h. LDH bindet nicht an dmEL in Abwesenheit von Nukleotid oder Nukleotid und ES. Es kann auch bedeuten, dass die Bindung von LDH an dmEL-IOPI keinen Effekt auf das ESR-Spektrum ausübt.

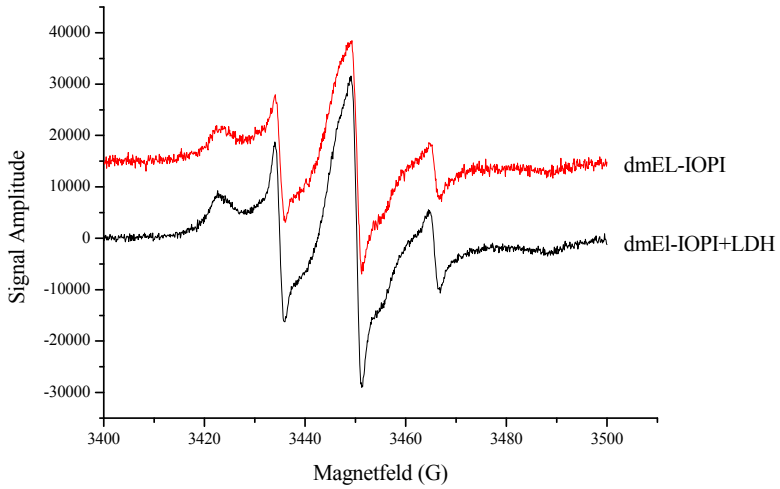


Abb. 50: ESR-Spektrum von 6,25 µM dmEL-IOPI in Anwesenheit von 7 µM LDH ohne weiteren Zusatz im Vergleich zu dem des dmEL-IOPI allein 6,25 µM in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5/NaOH bei 25 °C.

Die Zugabe von LDH an dmEL-IOPI in Anwesenheit von MgADP liefert aber keine signifikante Veränderung auf das ESR-Spektren des dmEL-IOPI (Abb. 51).

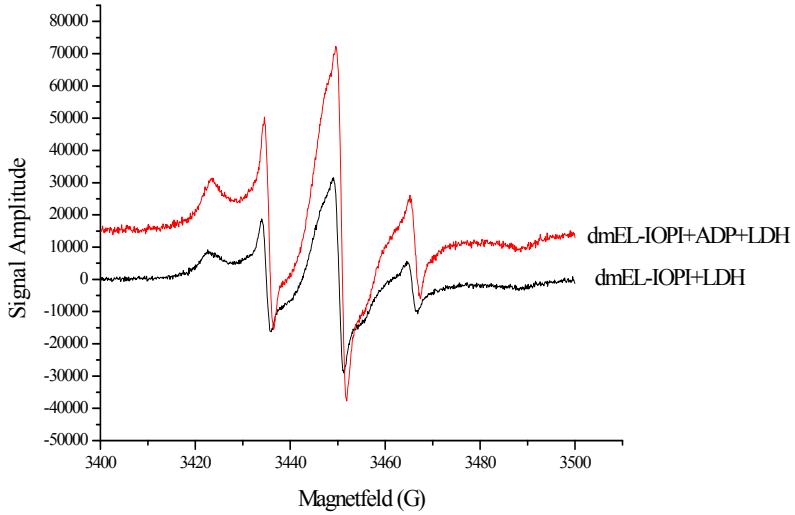


Abb. 51: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IOPI in Anwesenheit von:
1. 50 mM MgADP und 7 µM LDH. 2. 7 µM LDH, in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$,10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5/NaOH bei 25 °C.

In Abbildung 52 werden die ESR-Spektren von dmEL-IOPI in Anwesenheit von:
1) ES und LDH, 2) ES und MgADP in Anwesenheit von LDH, 3) ES und MgADP in Anwesenheit von LDH und Zugabe von MgATP, dargestellt.
Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den Effekt des ES auf die Konformation des dmEL-IOPI in Anwesenheit von Nukleotid und Substratprotein (LDH) zu untersuchen. Die ESR-Spektren aus Abbildung 52 zeigen keinen Unterschied. Eine mögliche Erklärung ist eine gestörte Konformationsübertragung oder keine Konformationsänderung im Bereich des C458.
Die Abbildung 53 zeigt die ESR-Spektren von dmEL-IOPI in Anwesenheit von:

1. ES und MgATP in Gegenwart von LDH.
2. MgATP und LDH.

Die Zugabe von ES hat keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden ESR-Spektren gezeigt.

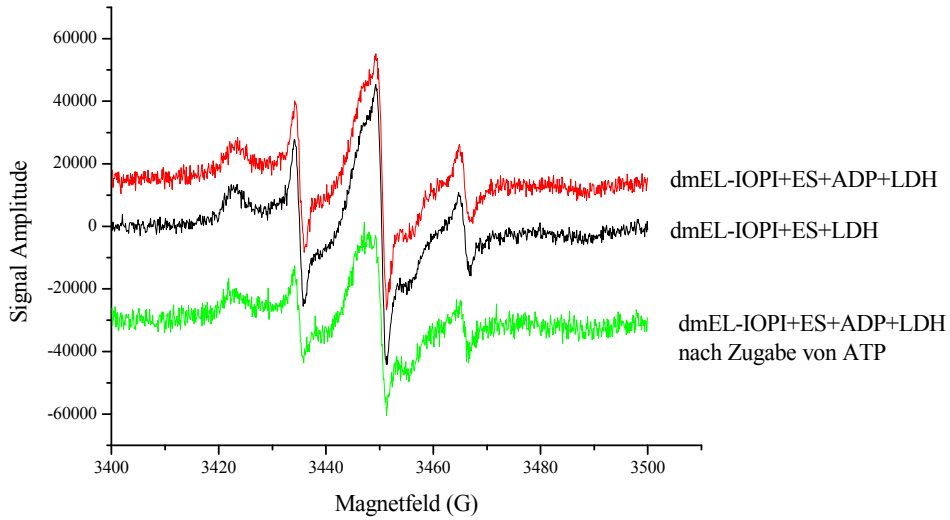


Abb. 52: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IOPI in Anwesenheit von:

1. 12,5 µM ES und 7 µM LDH.
2. 12,5 µM ES und 50 mM MgADP in Anwesenheit von 7 µM LDH.
3. 12,5 µM ES und 50 mM MgADP ind Anwesenheit von 7 µM LDH und Zugabe von 2 mM MgATP.

in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5/NaOH bei 25 °C.

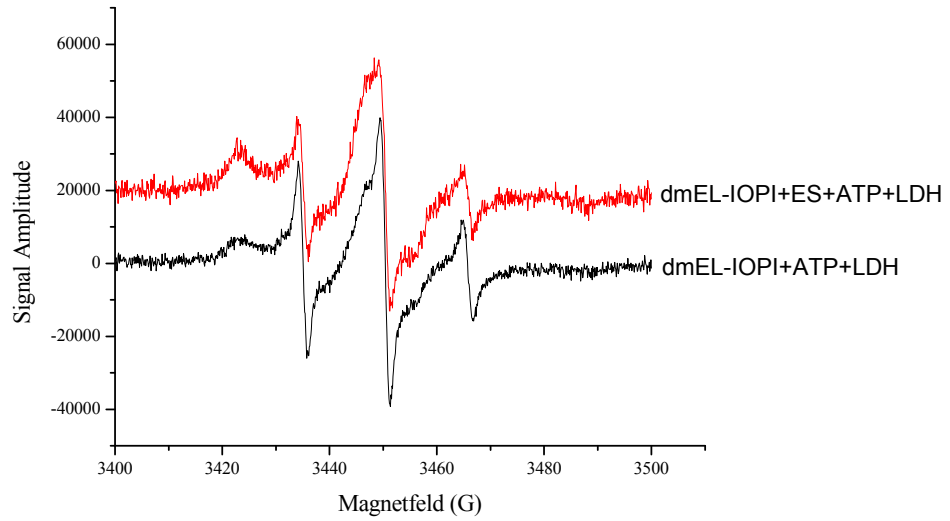


Abb. 53: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IOPI in Anwesenheit von:

1. 50 mM MgATP und 7 µM LDH.
2. 12,5 µM ES und 50 mM MgATP in Anwesenheit von 7 µM LDH.

in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5/NaOH bei 25 °C.

In der Literatur wurde erwähnt, dass GroEL im Komplex mit AMPPNP einem nicht hydrolysierbaren Analog des ATP in Anwesenheit von GroES und Substratprotein im *cis*-Ring des GroEL bezogen auf GroES eine Struktur, die zwischen der Struktur des Komplexes GroEL/ADP und des Komplexes GroEL/ATP liegt, bildet. Während der obere Ring der GroEL/AMPPNP-Struktur ähnlich mit dem GroEL/ADP-Komplex ist, scheint der untere Ring der Struktur ähnlich mit GroEL/ATP-Komplex zu sein (Saibil *et al*., 1996).

Die Abbildung 54 zeigt die ESR-Spektren von dmEL-IOPI in Anwesenheit von:

1) MgAMPPNP und LDH.

2) ES, MgAMPPNP, und LDH.

sowie nach der Zugabe von 2 mM MgATP.

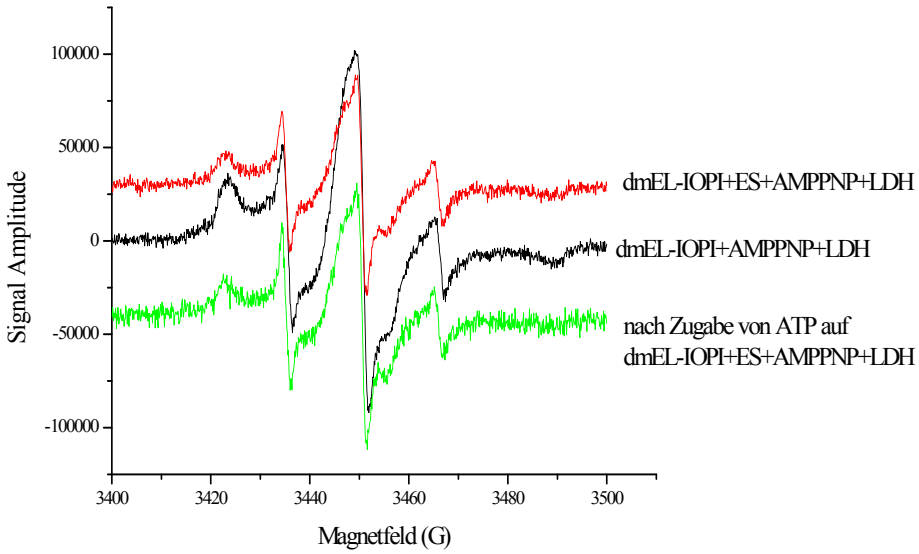


Abb. 54: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IOPI in Anwesenheit von:

1. 50 mM MgAMPPNP und 7 µM LDH.
2. 12,5 µM ES, 50 mM MgAMPPNP, 7 µM LDH und nach Zugabe von 2 mM MgATP.

in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5/NaOH bei 25 °C.

Die ESR-Spektren aus der Abbildung 54 deuten darauf hin, dass sowohl die Zugabe von ES als auch von ATP an dmEL-IOPI in Anwesenheit von AMPPNP keinen Unterschied zwischen den ESR-Spektren verursacht hat.

Eine zusätzliche Kontrolle zur Konformationsänderung während der ATP-Bindung an dmEL wurde mit Hilfe ATP-γ-S, ebenfalls ein nicht hydrolysierbares Analogen des ATP, durchgeführt (Abb. 55). Dabei wurden auch keine Unterschiede in ESR-Spektren beobachtet.

Aus den Abbildungen 54 und 55 wird sichergestellt, dass die ESR-Spektren mit AMPPNP sehr ähnlich zu den mit ATP-γ-S sind. Der Vergleich dieser ESR-Spektren aus Abbildungen 54 und 55 mit den Spektren aus Abbildung 53 zeigt keinen Unterschied, der durch mögliche Hydrolyse des ATP nach der Bindung an dmEL verursacht werden könnte.

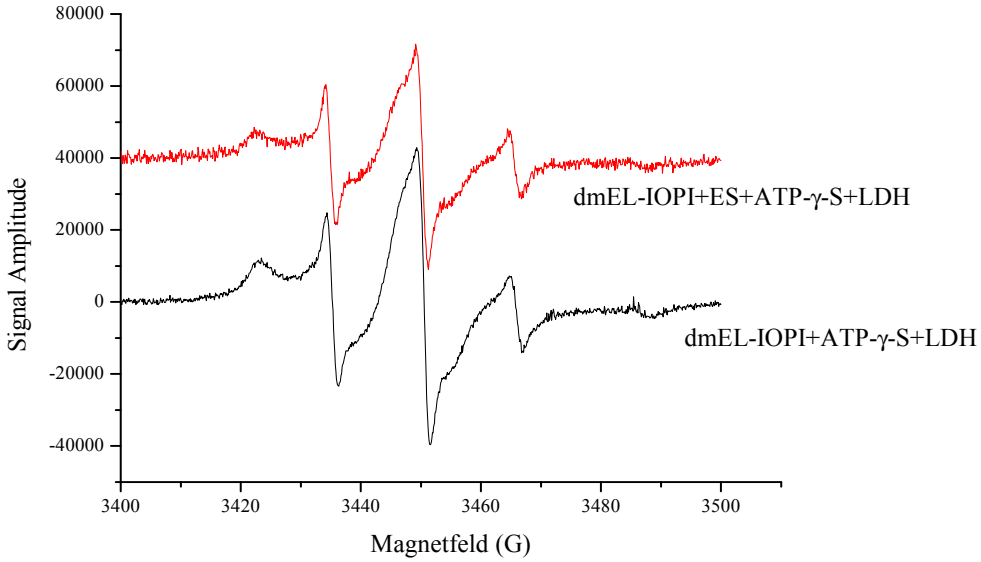


Abb. 55: ESR-Spektren von 6,25 µM dmEL-IOPI in Anwesenheit von:
1) 50 mM MgATP-γ-S, 7 µM LDH. 2) 12,5 µM ES, 50 mM MgATP-γ-S, 7 µM LDH, in 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5/NaOH bei 25 °C.

Die Daten aus der ESR-Spektren in Abbildungen 53, 54, und 55 deuten darauf hin, dass es keine Hinweise auf strukturellen Veränderungen während der ATP-Bindung an die äquatorialen Domäne des dmEL-IOPI gibt. Wie aus allen ESR-Untersuchungen am dmEL-IOPI während der Rückfaltung von LDH hervorgeht, wurden keine Hinweise auf strukturellen Veränderungen innerhalb des modifizierten mit IOPI-SL dmEL in Anwesenheit von LDH als Substratprotein gefunden.
Zusammenfassend kann erwähnt werden, dass die verschiedenen Untersuchungen am modifizierten mit IOPI dmEL die folgenden Schlüsse zulassen:

1. Die ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI steigert leicht bei 30 °C im Vergleich zum nicht spingelabellten dmEL aber sie steigert außergewöhnlich bei 37 °C.

2. Die Rückfaltung von denaturierter LDH *in vitro* deutet darauf hin, dass der dmEL-IOPI relativ geringere Rückfaltungsaktivität im Vergleich zum nicht spingelabelten dmEL hat.
3. Die verschiedenen ESR-Untersuchungen am dmEL-IOPI sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Substratproetin haben keine Hinweise auf strukturellen Veränderungen im Bereich der modifizierten mit IOPI C458 nachgewiesen.

4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegender Arbeit war es, nähere Informationen über den Zusammenhang zwischen den Konformationsänderungen des Chaperonin-GroEL/ES-Systems und den einzelnen Schritten im Faltungsprozess zu erhalten. Dabei wurde die ESR-Spektroskopie als konformationssensitive Methode eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Doppelmutant GroEL C138S/C519S, der nur noch in Position 458 jeder Untereinheit ein einzelnes Cystein enthält, mit drei verschiedenen thiolspezifischen Spin-Labeln, nämlich 4-(3-Iodo-acetamido)-2,2,6,6- tetramethyl-piperidin-1-oxyl (IAAT), 4-Maleimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl (MAL) und 4-(3–Iodo-2–oxopropyliden-1)–2,2,3,5,5– pentamethyl-[d_{15}]– imidazolidin-1-oxyl (IOPI) modifiziert und untersucht.

Um genaue Aussagen für die nun modifizierten Mutanten dmEL-IAAT, dmEL-MAL und dmEL-IOPI zu machen, wurden diese biochemisch charakterisiert und mit dem nicht spin-gelabeltem Doppelmutant GroEL (dmEL) und dem Wildtyp GroEL (wtEL) verglichen.

Die biochemische Charakterisierung des nicht spingelabeltem dmEL und der modifizierten Mutanten erfolgte durch die Bestimmung von ATPase-Aktivität und Rückfaltungsaktivität.

Zusätzlich wurde die Umgebung der kovalent eingebrachten Spin-Labeln (IAAT, MAL, IOPI) in Gegenwart und Abwesenheit von GroES und Substratproteins untersucht.

Die verschiedenen Untersuchungen am dmEL und die entsprechenden experimentell erhalte-nen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ATPase-Aktivität des nicht spingelabelten dmEL leicht höher als die des wtEL ist, allerdings hat die Vorinkubation des dmEL mit ES in Anwesenheit von Nukleotiden keine Inhibierung der ATP-Hydrolyse im Falle des dmEL verursacht. Im Gegensatz dazu wurde im Falle des wtEL eine Inhibierung von etwa 25 % der ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von ES im Vergleich zum wtEL-Wert in Abwesenheit von ES und Nukleotiden (wie auch in der Literatur [Viitanen *et al*., 1990; Langer *et al*., 1992; Chandrasekhar *et al*., 1986; Gray & Fersht, 1991; Jackson *et al*., 1993] beschrieben) bemerkt.

Bei der Untersuchung der durch Chaperonin-GroEL unterstützten Rückfaltung von denaturierter LDH wurde eine deutliche Erhöhung der Ausbeute an zurückgefalteter LDH im vergleich zu der “spontanen“ nicht Chaperonin-abhängigen Rückfaltung von LDH bemerkt. Die “spontane“ nicht Chaperonin-abhängige Rückfaltung von LDH bei 25 °C zeigt eine Ausbeute an aktiven LDH von 23 %. In Gegenwart von dmEL und ATP wurden etwa 20 % der denaturierten LDH rückgefaltet. Die Zugabe von ES an dmEL in Anwesenheit von ATP hat die Ausbeute an Teil rückgefalteter LDH auf 42 % erhöht. Dies deutet auf eine direkte Interaktion zwischen GroES und GroEL hin.

Die Experimente am wtEL unter gleichen Bedingungen wie beim dmEL haben eine deutliche Erhöhung der Ausbeute an rückgefalteter LDH in Anwesenheit von wtEL und ATP auf 52 % gezeigt (wie auch schon bei [Guhr, 2000] beschrieben). Die Anwesenheit von ES hat die Ausbeute auf 65 % erhöht. Betrachtet man sich in diesem Zusammenhang den Unterschied zwischen den Ausbeuten an rückgefalteter LDH durch dmEL und wtEL, so ist anzunehmen, dass die gerin-gere Rückfaltungsaktivität des dmEL an der eingeführten Doppelmutation C138S/C519S liegt. Es liegt nahe, dass eine für die Rückfaltung eines Substratproteins benötigte Konformationsübertragung von der Doppelmutation beeinflusst wird.
Das GroEL:GroES-Verhältnis war bei allen verschiedenen Untersuchungen 1:2.
In unserem Arbeitskreis wurde schon bereits von P. Guhr (2000) gezeigt, dass unterschiedliche GroEL:GroES-Verhältnisse von entweder 1:1 oder 1:2 weder bei LDH noch bei MDH-Rückfaltung einen Einfluss auf die Ausbeute rückgefalteten Substratprotein hat. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nur die asymmetrischen GroEL/GroES-Komplexe “bullet“ als aktive Komponenten auftraten.
Die Bestimmung von zugänglichen Nukleotidbindungsstellen am GroEL wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und C8-SL-ATP durchgeführt. Sowohl bei dmEL als auch bei wtEL konnten alle Nukleotidbindungsstellen besetzt werden. Im Gegensatz zum wtEL zeigt der dmEL eine sigmoidale Bindungskurve. Die Bestimmung von Nukleotidbindungstellen in Anwesenheit von ES zeigte kein sigmoidales Verhalten. Die Bildung des GroEL/ES-Komplexes in Gegenwart von C8-SL-ATP konnte von P. Guhr (2000) nicht erfolgreich nachgewiesen werden, da Versuche zum Nachweis des Komplexes mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese scheiterten.
Die chemische Modifizierung des dmEL mit IAAT-SL und die durchgeführten Untersuchun-gen zur biochemischen Charakterisierung des dmEL-IAAT-SL und deren Vergleich mit dem nicht spingelabelten dmEL haben die folgenden Schlüsse gelassen:
Der IAAT-SL beeinflusst die ATPase-Aktivität des dmEL relativ wenig im Vergleich zum dmEL-Wert. Ebenso wurde die Nukleotidbindung an dmEL-IAAT-SL relativ wenig beeinflusst, allerdings zeigt die Nukleotidbindungskurve des dmEL-IAAT-SL kein sigmoidales Verhalten im Gegensatz zum dmEL. Auch bei der Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen in Anwesenheit von ES wurden alle Nukleotidbindungsstellen besetzt.

Die experimentell beobachtete Rückfaltungsaktivität des dmEL nach Modifizierung mit IAAT-SL wurde stark beeinflusst. Während etwa 20 % der denaturierter LDH durch dmEL in Anwesenheit von ATP rückgefaltet wurden, wurden nur etwa 5 % der denaturierten LDH durch

dmEL-IAAT in Anwesenheit von ATP rückgefaltet. Allerdings hat die Anwesenheit von ES die Ausbeute an Teil rückgefalteter LDH im Falle des dmEL-IAAT-SL in Anwesenheit von ATP auf 8 % erhöht. Die beobachtete normale ATPase-Aktivität und die niedrige Rückfaltungsaktivität des dmEL-IAAT-SL deuten darauf hin, dass diese von einander abgekoppelt erfolgen.

Die ESR-Untersuchungen am dmEL-IAAT-SL haben in Anwesenheit von verschiedenen Nukleotiden, GroES, und Substratprotein keine Konformationsänderungen in der Umgebung des modifizierten mit IAAT-SL C458 nachgewiesen. Es wurde nur in einem Fall in Abwesenheit von Substratprotein aber in Gegenwart von ATP und ES ein Effekt der ES-Bindung auf die ESR-Spektren gezeigt. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von ES die Übertragung von strukturellen Änderung im Bereich des C458 beeinflusst hat.

Im Gegensatz zum IAAT-SL hat der MAL-SL die ATPase-Aktivität des dmEL relativ stark beeinflusst, so dass die ATPase-Aktivität des dmEL-MAL nur 50 % der des dmEL-Wertes erreicht hat. Es besteht die Möglichkeit, dass durch eine Störung der Struktur der Nukleotid-bindungsstellen eine gestörte Konformationsübertragung verursacht wurde, so dass die ATPase-Aktivität zu tief abgefallen ist.

Die Rückfaltungs-Untersuchungen am dmEL-MAL haben gezeigt, dass etwa 15 % der denaturierten LDH in Anwesenheit von dmEL-MAL und ATP seiner Ausgangs-Aktivität zurückgewinnt. Dieser Anteil an rückgefalteter LDH steigt auf etwa 25 % in Anwesenheit von dmEL-MAL, ATP und ES. Diese Erhöhung der Ausbeute deutet auf eine direkte Interaktion zwischen GroES und GroEL hin.

Die ESR-Untersuchungen an dmEL-MAL haben keine strukturellen Veränderungen im Bereich des mit MAL-SL modifizierten C458 des Proteins nachgewiesen.

Der IOPI-SL hat bei der ATPase-Aktivität-Unteruschungen ein unterschiedliches Verhältnis im Vergleich zu IAAT-SL bzw. MAL-SL gezeigt. Bei Bestimmung der ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI bei 30 °C wurde eine ATPase-Aktivität im selben Bereich wie beim dmEL gefunden. Bei 37 °C hat der dmEL-IOPI eine außergewöhnliche hohe ATPase-Aktivität mit fast 100 %iger Steigerung der des dmEL-Wertes gezeigt. Auch die ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI nach Vorinkubation mit ATP oder ADP und in Anwesenheit von ES ist um etwa 166 % der des dmEL-Wertes gesteigert, anstatt abzufallen.

Es konnten jedoch nur 4,8 % denaturierter LDH durch dmEL-IOPI in Anwesenheit von ATP rückfalten. Die Zugabe von ES hat diesen Anteil auf 21 % erhöht, jedoch liegt der Wert unterhalb der spontanen Rückfaltung (22 %). Wie in allen Fällen, wurde auch im Falle des dmEL-IOPI gezeigt, dass eine direkte Interaktion zwischen GroES und GroEL besteht. Auch die

ATPase läuft zu schnell ab und kann den Faltungsprozess von Substratprotein nicht unterstützen.

Wenn man das Verhalten der drei modifizierten Mutanten in Bezug auf die ATPase-Aktivität und Rückfaltung betrachtet, deuten die Ergebnisse darauf, dass die ATPase-Aktivität und die Rückfaltungsaktivität von einander abgekoppelt erfolgen.

Auch im Falle des dmEL-IOPI haben die ESR-Spektren keine strukturellen Änderungen im Bereich des C458 nachgewiesen.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Untersuchung des Chaperonins GroEL wären die folgenden Doppelmutationen einzuführen: C138S/C458S bzw. C458S/C519S und die gleichen Untersuchungen der vorliegender Arbeit durchzuführen.

Anderer Vorschlag wäre die chemische Modifizierung des Substratproteins oder auch des Co-Chaperonin-GroES innerhalb des “mobile loop“ nach einer entsprechenden Cysteinmutation und mit Hilfe der ESR-Spektroskopie könnten noch genauen Aussagen über den Funktionsmechanismus gemacht werden.

Einführung von Cysteinmutation innerhalb der apikalen Domäne des GroEL und mit Hilfe der ESR-Spektroskopie könnte auch ermöglichen, nähere Informationen über die GroES- bzw. Substratproteinbindung zu gewinnen.

5 Experimentelle Methoden

5.1 Isolierung und Reinigung von *E. coli* GroEL

Die Aufzucht der Bakterien erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in 2 l Flüssigkulturen:
1) 2 x YT-Medium für dmEL. 2) 10 x SOC-Medium für wtEL.

5.1.1 Präparation

5.1.1.1 Medien & Agarplatten für TG2

2 x YT-Medium:

900	ml	H_2O_{dd}	pH 7.0 (NaOH)
16	g	bacto-Trypton	
10	g	bacto-Hefeextrakt	
5	g	NaCl	

H_2O_{dd} ad 1l

Medium für Platten:

500	ml	2 x YT-Medium
7.5	g	Agar

Autoklavieren, im handwarmen Zustand Zugabe von 0.5ml Ampicilin (50 mg/ml H_2O_{dd}).

Übernachtkulturen (ÜNK):

20 ml 2 x YT-Medium in 100ml Erlenmeyerkolben überführen.

Nach Autoklavieren erfolgte Zugabe von 20 µl Ampicilinlösung (50mg/ml H_2O_{dd})

Hauptkulturen:

500 ml 2 x YT-Medium in 2 l Erlenmeyerkolben überführen.

Autoklavieren, Zugabe von 0.5 ml Ampicilinlösung (50 mg/ml H_2O_{dd}).

5.1.1.2 Medien & Agarplatten für DH5α

10 x SOC-Medium:

20% (w/v) Bacto-Trypton	pH 7.5 (NaOH)
5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt	
0.1 M NaCl	1 M $MgSO_4$ (12 g in 100 ml H_2O)
25 mM KCl	1.36 M Glucose (26.96 g in 100 ml H_2O)
H_2O_{dd} ad 250 ml	

Medium für Platten:

450 ml H_2O_{dd}
50 ml 10 x SOC
10 g Agar

Autoklavieren, 1 bis 1,5 Std., bei RT stehen lassen, Zugabe von 10ml 1 M $MgSO_4$, so daß die Konzentration des $MgSO_4$ 20 mM beträgt, Zugabe von 7.4 ml 1.36 M Glucose, so daß die Endkonzentration der Glucose 20 mM beträgt, Zugabe von 1 ml Chloramphenicol (15 mg/ml in 95% EtOH, entspricht 30 µg/ml Endkonzentration).

Übernachtkultur:

18 ml H_2O_{dd}
2 ml 10 x SOC

Autoklavieren, Zugabe von 0.4 ml 1 M $MgSO_4$
Zugabe von 0.04 ml Chloramphenicollösung (15 mg/ml).

Hauptkulturen:

450 ml H_2O_{dd}
50 ml 10 x SOC

Autoklavieren, Zugabe von 10ml 1 M $MgSO_4$
Zugabe von 1ml Chloramphenicollösung (15 mg/ml).

Autoklavieren:

Um eine Infektion der *E.coli* durch andere Zellen zu vermeiden, mußten alle Medien und Lösungen autoklaviert oder manchmal sterilfiltriert werden (Filter mit einer Porengröße von 0.45µm, PRO-X^{TM} Filter unit, 0,45 µM, Lida Manufacturing Corp.).
Zudem mußten alle Gefäße, Glaspipetten, und jegliche Gegenstände, die mit den Zellen in Berührung gekommen sind, autoklaviert werden, um die Umwelt vor einer Infektion zu schützen.

Autoklavtechnik :

Alle Medien wurden in einem Dampfkochtopf (Firma Sitram) bei 121 °C und 1.5 bar für 20 Minuten autoklaviert.

5.1.2 Antibiotika

Ampicilin:

Es wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml H_2O_{dd} angesetzt und vor Gebrauch durch einen Minifilter 0.45 µm (PRO-X^{TM} Filter unit, 0,45 µM, Lida Manufacturing Corp.) sterilfiltriert.

Chloramphenicol:

Es wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 15 mg/ml EtOH 95% angesetzt.

5.1.3 Platten gießen

Nach dem Autoklavieren wurde das Plattenmedium bei RT stehen gelassen, bis es nach ca. 1 Stunde handwarm war. Danach wurde 0.5 ml Ampicilin (50 mg/ml) im Falle des dmEL, oder 0.04 ml Chloramphenicol (15 mg/ml) und 0.4 ml 1 M $MgSO_4$ im Falle des wtEL addiert.

Vorgehen:

- Impfdraht aus Platin über Bunsenbrenner Flamme ausheizen.
- Im Agar kurz abkühlen.
- In Bakterien Lösung tauchen und das erste Feld auf Agar auftragen.
- Erneut Impfdraht ausheizen.

- Im Agar kurz abkühlen und keine neue Zellen aufnehmen sondern Verdünnung der schon aufgetragenen Zellen in verschiedene Richtungen durchziehen.

5.1.4 Zellenwachstumsbedingungen

1. Beimpfte Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C für 23 h inkubiert.
2. Die Flüssigkulturen wurden unter aeroben Bedingungen in einem Wasserbadschüttler HAT der Firma Infos bei 37 °C und 277 rpm/min für die Übernachtkulturen für 12 Std. inkubiert. Im falle der Hauptkulturen wurde Inkubation bei 210 rpm/min für 8~9 Std., durchgeführt. Dabei wurde das Wachstum stündlich bei OD_{600} nm kontrolliert.

5.1.5 Glycerinkulturen

- Eine Lösung aus 80% Glycerin wurde angesetzt.
- Eppendorfgefäße mit Schraubverschluss wurden mit 750 µl 80% Glycerin aufgefüllt.
- Autoklavieren bei 121°C, 1.5-1.8 bar für 30 Minuten.
- 750 µl einer ÜNK wurden zu jedem Eppendorfgefäß mit autoklaviertem Glycerin addiert.
- Vorsichtig gemischt und bei –80 °C gelagert.

5.1.6 Aufzucht der Zellen

Zuerst wurden die mit Agar und Wachstumsmedium gegossenen Platten mit Glycerin-Kultur beimpft. Beimpfte Platten wurden bei 37 °C inkubiert. Nach 23 Stunden Inkubation konnten einzelne Kolonien entfernt werden. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurden einzelne Kolonien gepickt und in einen mit ÜNK-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben überführt. Die Inkubation wurde in einem Wasserbadschüttler bei 37 °C und 277 rpm für 12 Stunden durchgeführt.
Zur Kontrolle des Wachstums war eine Messung der optischen Dichte (OD) des Wachstumsmediums bei 600 nm notwendig. Da die Streuung der Zellsuspension nur bis zu etwa OD 0.5 linear proportional zu der Zellzahl ist, war die Verdünnung der Meßprobe mit Wasser (Zellsuspension : Wasser, 1:9) notwendig. Die Proben wurden gegen Luft vermessen.

ÜNK zeigten meistens eine maximale OD von 4.5. Danach erfolgte die Überführung der ÜNK-Kulturen in die 2 l Kolben mit Wachstumsmedium. Die weitere Inkubation wurde wie bei der ÜNK durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Geschwindigkeit des Schüttlers auf 210 rpm gesenkt wurde und das Zellwachstum durch stündliche Messung der OD kontrolliert wurde. Nach Erreichem der stationären Wachstumsphase (nach 8~9 Std. bei OD_{600} nm von 4.5~5) erfolgte die Zentrifugation der Bakterien bei 8000 rpm im Rotor JA 10 (Beckman) bei 22 °C für 15 Min. Nach Entfernen des Überstandes konnten die Zellen bei –80 °C gelagert werden.

5.1.7 Isolierung des Proteins GroEL

Die Isolierungen des dm- und des wt-GroEL erfolgten weitgehend nach der Vorschrift von Hendrix (1979) und Chandrasekhar *et al*., (1986), die mit einigen Modifikation bei 4 °C durchgeführt wurde.

Puffer:

A. Lysispuffer:

50	mM	Tris-HCl	pH 8.0 (HCl)
1	mM	EDTA	
600	µg/ml	Lysozym	
100	mM	Ammoniumsulfat	
3	mM	DTT	
50	mM	Spermidin	
10%	(w/v)	Sucrose	
10%	(v/v)	Glycerin	

B. Elutionspuffer:

50	mM	Tris-HCl	pH 7.5 (HCl)
1	mM	DTT	
25	mM	KCl	
10%	(v/v)	Glycerin	
5	mM	$MgCl_2$	
1	mM	EDTA	

C. Lagerungspuffer:

50	mM	Tris-HCl	pH 7.5 (HCl)
1	mM	DTT	
25	mM	KCl	
10%	(v/v)	Glycerin	
5	mM	$MgCl_2$	
1	mM	EDTA	

Durchführung:

Die bei –80 °C gelagerten *E .coli*-Zellen wurden bei 4 °C im Kühlraum aufgetaut und in 100 ml frisch angesetztem Lysis-Puffer suspendiert. Diese Suspension wurde für 50 Minuten bei 4 °C gerührt, und danach bei 37 °C im Wasserbad für weitere 15 Minuten. Nach Zugabe von 40 µl RNAse A (20 mg/ml) und einer Spatelspitze DNAse I wurde die Suspension weitere 5 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Um feste Bestandteile abzutrennen, wurde das Lysat bei 4 °C und 8000 rpm in einem JA 20 Rotor (Beckman) für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Becherglas überführt. Das Pellet wurde erneut mit etwa 12 ml Lysis-Puffer gewaschen und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Verwerfung des Pellets wurden die Überstände, welche die wasserlöslichen Proteine der *E. coli* enthielten, vereinigt. Um die feinen Schwebeteilchen von dem Überstand zu entfernen, wurde dieser bei 4 °C und 42000 rpm (Rotor Ti 70, Beckman) für 50 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig vom Pellet entfernt und in ein Becherglas überführt. Das Pellet wurde mit 10 ml Elutionspuffer gewaschen und erneut für 20 Minuten ultrazentrifugiert. Die vereinigten Überstände (Rohprotein) wurden mittels einer Membran PM 30 (Amicon) bei 4 °C und 1 bar auf 20 ml eingeengt. Diese Proteinlösung wurde mit 250 ml Elutionspuffer versetzt und erneut in einer Amicon Ultrafiltrationskammer mit Hilfe von PM 30 Membran auf ca. 30 ml eingeengt. Die eingeengte Rohproteinlösung (ca.~30ml) wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein passendes Gefäß überführt und bei –80 °C bis zur Verwendung gelagert. Ein Teil des Proteingemisches wurde zur Reinigung des GroEL/GroES verwendet, während der Rest der Lösung bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert wurde. Tabelle 2 zeigt die Ausbeute an Zellen bzw. Rohprotein.

Tabelle 2:

	***E. coli*-Zellen**	
	DH5α	**TG2**
erhaltene Zellen	12 g	7 g
Rohprotein	600 mg	400 mg

5.1.8 Reinigung des Proteins GroEL/ES

Nach dem Auftauen des bei –80 °C gelagerten Proteingemisches wurden 10 ml der Lösung bei 4 °C und 42000 rpm für 20 Minuten ultrazentrifugiert, um denaturiertes Protein zu entfernen, welches sich eventuell während des Einfrierens bzw. des Auftauens gebildet haben könnte. Danach erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (1977). Die klare, leicht gelbliche Proteinlösung wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette auf eine Sephacryl / S - 300-HR-Säule (2,8 x 90 cm, V = 425 ml, Flußrate = 30 ml/h), die mit Elutionspuffer(B) equilibriert war, aufgetragen. Die Detektion der Fraktionen erfolgte mittels eines Durchflußphotometers (Uvicord, Firma LKB) bei einer Wellenlänge von 278 nm und einem Absorption-Range von 0.5. Mit einem Schreiber (Servogor 120 der Firma Goerz Metrawatt) wurde das Elutions-diagramm aufgenommen. Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe von Bradford-Test (Bradford, M.M., 1976) aller Fraktionen und ein SDS-Gel ergab eine zusätzliche Bestätigung des Elutionsdiagrammes. GroEL, das größte Protein im Gemisch, eluierte nach ca. 200 ml als erste Fraktion, während GroES erst nach ca. 400 ml als letzte Fraktion eluierte. Fraktionen, die reines GroEL enthielten, wurden vereinigt und die nicht reinen Fraktionen wurden zu einer zweiten Reinigung auf Sephacryl/S-300-HR-Säule aufgetragen.

5.1. 9 Aufkonzentrierung & Lagerung der GroEL- bzw. GroES-Lösungen

Die verdünnte reine Fraktion des GroEL wurde bei 4 °C mittels einer PM 30 in einer Ultrafiltrationskammer 8400 (Amicon) bei 1.5 bar auf 15 ml eingeengt und mit (2 x 50 ml) Lagerungspuffer gewaschen, um eine KCl-Konzentration von 25 mM zu erreichen. Anschließend wurde die Proteinlösung auf 10 ml eingeengt. Um eine noch höhere Konzentration der Proteinlösung zu erreichen, wurde die Proteinlösung (10 ml) entweder in eine kleinere Ultrafiltrationskammer überführt oder mit Hilfe von Centricon 30 bei 4 °C, Rotor JA 20 (Beckman), 6000 rpm zentrifugiert. Die gesamte (1,5 ml) konzentrierte Proteinlösung (19 µg/µl) wurde in 200 µl Aliquoten bei –80 °C gelagert.
Mit dem gleichen Verfahren wurde auch die GroES–Proteinlösung bearbeitet, mit dem Unterschied, daß statt einer PM 30 eine PM 10 oder YM 3 Membran notwendig war, und daß statt einer Centricon 30 eine Centricon 10 verwendet wurde. Die gesamte (1 ml) konzentrierte GroES-Lösung (ca. 10 µg/µl) wurde in 50µl Aliquoten bei –80 °C gelagert.

5.2 Bestimmung von Sulfhydryl Gruppen (-SH) in GroEL

Benötigte Lösungspuffer

1. Lagerungspuffer ohne DTT:

50	mM	Tris-HCl	pH 7.5 (HCl)
25	mM	KCl	
10%	(v/v)	Glycerin	
5	mM	$MgCl_2$	
1	mM	EDTA	

2. Dithiopyridinlösung (DTP):

Es wurde daraufgeachtet, daß die Lösung kurz vor dem Gebrauch angesetzt wurde.
Herstellung einer Lösung von 1.1 mg/ml DTP in H_2O_{dd}.
Es wurden 4 mg DTP eingewogen, in 3.6 ml H_2O_{dd} gelöst und auf Eis gerührt.

3. Mercaptoethylamin Lösung (MEA):

Stammlösung aus 11.3 mg/ml MEA in H_2O_{dd}.
4 mg MEA wurden eingewogen und in 354 µl H_2O_{dd} gelöst, davon wurden 10 µl entnommen und zur 2 ml EDTA-Lösung (50 µM, pH 6.0) gegeben.

4. EDTA-Lösung (50 µM) in H_2O_{dd} pH 6.0:

Es wurde das Na_2-Salz verwendet.
372.24 mg EDTA wurden in 10 ml H_2O_{dd} gelöst [100 mM], und der pH-Wert auf 6.0 (NaOH) eingestellt. 5 µl der oberen Lösung wurden in 10 ml H_2O_{dd} verdünnt, um eine Lösung von 50 µM zu erhalten.

Jede Untereinheit des wtEL enthält 3 natürliche Cysteinreste, welche im Falle des dmEL nach der Mutation von 2 der Cysteine zu Serinen, auf einen Cysteinrest reduziert worden sind. Deshalb war es wichtig die SH-Gruppen nach der Reinigung des dmEL und auch später nach der chemischen Modifizierung dieser verbliebenen SH-Gruppen mit verschiedenen Spinlabel-Radikalen zu ermitteln. Die Sulfhydrylgruppen (-SH) wurden nach Grassetti bestimmt (Grassetti *et al*., 1965). Das Prinzip dieser Methode ist die Reaktion von 4,4´- Dithiodipyridin mit Thiolen, welche das Produkt 4-Thiopyridon ergibt. Das entstandene 4-Thiopyridon kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (19800 M^{-1} cm^{-1}) bei 324 nm in direktem Vergleich zur Nullprobe (ohne Protein) bestimmt werden.

Durchführung

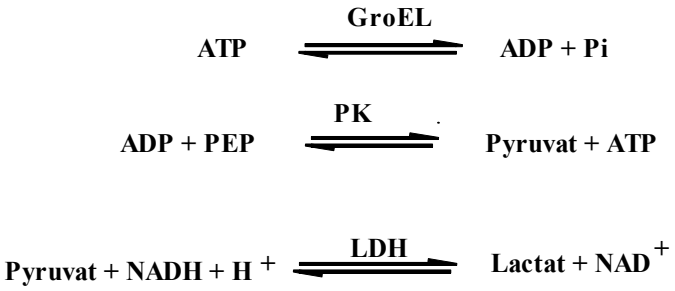
Da das GroEL in DTT-haltigem Lagerungspuffer gelagert wurde, war eine Entfernung des DTT von der Proteinlösung notwendig, damit DTT die NO•-Gruppe des Spin-label-Radikales nicht reduzieren konnte und die SH-Bestimmung nicht verfälscht wird.

1. DTT-Abtrennung:

Das DTT wurde nach Penefsky (1977) entfernt. Es wurden 100 µl Proteinlösung auf eine 1 ml Gelzentrifugations-Säule, die mit Sephadex G-50 gefüllt und mit ESR-Puffer (8 x Gel-Volumen) equilibriert war, aufgetragen. Die Säule wurde in einer Tisch-Zentrifuge bei 3200 rpm bei Raumtemperatur für 45 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluß der Säule enthielt das DTT-freie GroEL. Zur besseren DTT-Abtrennung wurde der Durchfluss noch mal auf zweite Gelzentrifugations-Säule aufgetragen und wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Die anschließende Konzentrations-Bestimmung des von DTT befreiten GroEL erfolgte mittels eines Bradfords-Tests (Bradford,1976). Für Grassetti (Grassetti *et al*., 1976) sollte die Proteinkonzentration zwischen 7 µM und 14 µM liegen, daher war eine weitere Aufkonzentrierung der Proteinlösung mit Centricon 30 nötig.

5.3 Bestimmung der ATP-Hydrolyse Aktivität des GroEL

Die ATPase-Aktivität des GroEL wurde nach Vogel und Steinhardt (Vogel, G. und Steinhardt, R. 1976) bestimmt. Der sogenannte „Coupled Enzyme Assay“ (CEA) beruht auf einem ATP regenerierenden System, bei dem die Hydrolyse von ATP durch GroEL mit der Oxidation von NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form) gekoppelt ist, die bei 334 nm als Abnahme der Extinktion verfolgt werden kann.



Benötigte Reagenzien

ESR-Puffer:

50	mM	Tris-HCl	pH 7.5 (HCl)
7	mM	$MgCl_2$	
10	mM	KCl	

ATPase-Cocktail:

0.28	mM	NADH	pH 7.5 (HCl)
1	mM	PEP	
2	mM	ATP	
40	ml	ESR-Puffer	

Zugabe von:

0.01 mg/ml Pyruvatkinase (Glycerinlösung, Fa. Boehringer)

0.014 mg/ml Lactatdehydrogenase (Glycerinlösung, Fa. Boehringer)

Aliquote von 1 ml des ATPase-Cocktail wurden in Plastikbrand ® Einmalküvetten pipettiert und bei –20 °C oder – 40 °C bis zur Verwendung gelagert.

Durchführung des Coupled Enzyme Assay (CEA)

ATPase-Cocktail-Küvetten wurden von -40 °C zu RT gebracht, bis der ATPase-Cocktail auftaute. Nach guter Durchmischung erfolgte eine Temperierung bei 30 °C im Photometer für 20 Minuten. Für die Untersuchungen der Hydrolyse-Aktivität des GroEL mit GroES und ATP bzw. GroES & ADP wurden zuerst entsprechende Proben:

1. EL/ES mit ATP oder ADP vorbereitet und bei 30 °C ca. 10 Minuten vorinkubiert.
2. Aliquote davon zu ATPase Cocktail addiert.

Die Konzentration an ATP oder ADP in der Probe war jeweils 2 mM und das Verhältnis des EL zu ES war 1:2. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für NADH bei 334 nm, 6180 $M^{-1}cm^{-1}$ konnte die Abnahme der NADH-Konzentration in UV-Spektrometer DU®-640 Beckmann gemessen werden, wodurch die ATPase-Aktivität direkt berechnet werden konnte, da die Abnahme der NADH-Konzentration in direkt proportionaler Relation zu der hydrolysierten Menge von ATP steht.

5.4 Rückfaltungsaktivität

Die Rückfaltungsaktivität des GroEL wurde mittels eines Modellsubstrats, der Lactatdehydrogenase (LDH) aus Schweinmuskel, untersucht. Der Assay wurde nach Zettlmeisel *et al*., (1979) mit Modifikation nach P. Guhr (1996) und Riether (1996) durchgeführt.

Benötigte Reagenzien

Denaturierungsreagenz:

6 M Guanidinium-Hydrochlorid (Gdn-HCl) | pH 2.3 (H_3PO_4)

Rückfaltungspuffer

Phosphatpuffer:

0.1 M NaH_2PO_4 pH 7.5 (NaOH)

Stammlösungen:

0.1	M	EDTA
0.1	M	DTT
1	M	KCl
1	M	$MgCl_2$
0.2	M	ATP oder ADP

Rückfaltungslösung:

X µl	Phosphatpuffer	
10 µl	DTT	Stammlösung
10 µl	EDTA	Stammlösung
10 µl	ATP oder ADP	Stammlösung
10 µl	KCl	Stammlösung
10 µl	$MgCl_2$	Stammlösung
X µl	GroEL-Lösung	(Endkonzentration 0.25 µM)
X µl	GroES-Lösung	(Endkonzentration 0.25 µM)
990 µl		

Aktivitätsassay für LDH-Aktivität:

0.1	M	NaH_2PO_4	pH 7.5 (NaOH)
0.74	mM	Pyruvat	
0.2	mM	NADH	

Lösung für Küvetten:

19.4	ml	Phosphatpuffer
200	µl	NADH-Stammlösung
200	µl	Pyruvat-Stammlösung

(je 1 ml pro Küvette).

Denaturierung

Von einer LDH-M4-Stammlösung (10 mg/ml in Glycerin) wurden 10 µl durch Zugabe von 90 µl Denaturierungsreagenz denaturiert, so daß die Konzentration von LDH bezüglich der Untereinheiten des GroEL 28 µM betrug.

Rückfaltung und Reassoziation

Um die Rückfaltung und Reassoziation der entfalteten und dissoziierten Monomere der LDH einzuleiten, wurden 10 µl der Denaturierungslösung in 990 µl Rückfaltungspuffer pipettiert und sehr schnell bei gleichzeitigem Vortexen verdünnt. Die Endkonzentration an LDH-Monomeren betrug 0.28 µM, die GroEL-Endkonzentration 0.25µM und GroES-End-konzentration 0.25 µM. Während des Versuches der nicht Chaperon-abhängigen Rückfaltung von LDH wurde das Rückfaltungsreagenz ohne Zugabe von GroEL verwendet.

Durchführung des Rückfaltungsaktivitätstest

Zur Bestimmung des Anteils an reaktivierter LDH wurde deren Aktivität im Vergleich zu nativer LDH vermessen. Um die Aktivität zu messen, wurden je 10 µl der Rückfaltungslösung zu bestimmten Zeitpunkten in je 1 ml des Aktivitätsassays pipettiert, der bereits in Plastikküvetten gefüllt war. Der NADH-Verbrauch konnte unmittelbar nach Zugabe der Rückfaltungslösung und umrühren mit Hilfe eines UV-Spektrometers DU®640 der Beckman gemessen werden. Der Verbrauch an NADH wurde bei 334 nm und 25 °C über einen Zeitraum von 20 Min detektiert, bis die Extinktion konstant verblieb.

Diese Untersuchung wurde für die wtEL bzw. dmEL in Anwesenheit von verschiedenen Nukleotiden und ES bei 25 °C durchgeführt.

5.5 Chemische Modifizierung des Cysteinrest C458 des dmEL mit verschiedenen SL-Radikalen

Benötigte Puffer

50	mM	Tris-HCl	pH 7.5(HCl)
7	mM	$MgCl_2$	
10	mM	KCl	

Da der Cysteinrest C458 des dmEL durch 1,4- Dithiothritol (DTT) geschützt ist, mußte das Protein vor der Modifizierung von DTT befreit werden, damit die SH-Gruppen zugänglich für den Spin Label werden. Diese Befreiung des Proteines von DTT wurde durch eine Umpufferung der Proteinlösung in ESR-Puffer, der kein DTT enthält, erreicht. Die Umpufferung erfolgte nach Penefsky, H.S. (1977) oder auf einer Sephadex G-50 Gelfiltra-tionssäule (2,5 x 16 cm, Flußrate 1 ml/min), wobei die Elution bei 278 nm verfolgt wurde. Nach ca. 10 ml (Ausschußvolumen der Säule) begann die Elution des GroEL. Die nun von DTT befreite Fraktion des EL wurde in Centricon 30 bei 4 C° und 6000 rpm auf 500 µl aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde viermal mit ESR-Puffer gewaschen und erneut aufkonzentriert. Danach erfolgte die Proteinbestimmung mit Bradfordreagenz. Für die Modi-fizierung mittels SL-Radikalen wurde ein 10-facher Überschuß an SL-Reagenz (200 mM Stammlösung) mit dem Protein (pH 7.2) bei RT für ca. 2 Std. inkubiert. Anschließend wurde der dmEL-SL auf eine Sephadex-G 50 Säule aufgetragen, um den freien SL von der Lösung abzutrennen. Die verdünnte Fraktionen des dmEL-SL wurde vereinigt und mittels Centricons 30 bei 4 °C und 6000 rpm aufkonzentriert, dreimal mit ESR-Puffer gewaschen und anschließend auf 20 bis 50 µM aufkonzentriert. Anschließend wurde ein Bradford-Test (1976) und eine SH-Gruppen-Bestimmung durchgeführt. Aliquote von Protein-SL wurden bis zur nächsten Verwendung bei –80°C gelagert.

Die chemische Modifizierung der verbliebenen Cysteingruppe C458 mit 4-Maleimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl (MAL-SL), 4-(3-Iodo-acetamido)-2,2,6,6- tetramethyl-piperidin-1-oxyl (IAAT-SL), 4-(3– Iodo-2– oxopropyliden-1)–2,2,3,5,5– pentamethyl-[d_{15}]– imidazolidin-1-oxyl (IOPI-SL) wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt (gleiche Inkubationszeit, Temperatur, und Überschuß an Spin Label).

5.5.1 ATPase-Aktivität des mit verschiedenen SL-Radikalen modifizierten dmEL

Die ATPase-Aktivität der verschiedenen modifizierten dmEL wurde wie unter experimentelle Methoden 5.3 beschrieben, bestimmt.

5.6 ESR-spektroskopische Untersuchungen

5.6.1 ESR-Untersuchungen am dmEL-SL

5.6.1.1 Effekte von verschiedenen Nukleotiden und ES auf die Struktur des dmEL-SL

Die gewünschte Menge des mit SL modifizierten dmEL wurde von -80 °C auf Eis überführt. Nach Auftauen der Probe wurden 20 µl dmEL-SL in einer Wilmad®–Quarzkapillare bei 25 °C im ESR vermessen. Ebenso wurden andere ESR-Messungen in Gegenwart verschiedener Nukleotide und GroES durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die verschiedene Versuche, die zu die-sem Zwecken durchgeführt wurden.
Die ESR-Gerätseinstellungen in allen Untersuchungen sind wie in Tabelle 9 beschrieben.

Tabelle 3:

SL-Radikal	Versuch		Temperatur während der Messung (K°)
	* [dmEL-SL] = 12 µM ** **[ES] = 1 oder 2 x [dmEL-SL]**		
IAAT	1	dmEL-IAAT	298
	2	dmEL-IAAT + 2 mM ATP	-//-
	3	dmEL-IAAT + 2 ES + 2 mM ATP	-//-
	4	dmEL-IAAT + 2 mM ADP	-//-
	5	dmEL-IAAT + 2 ES + 2 mM ADP	-//-
MAL	1	dmEL-MAL	-//-
	2	dmELMAL + 2 mM ATP	-//-
	3	dmEL-MAL + 2 mM ATP + 2 ES	-//-
	4	dmEL-MAL + 2 mM ADP	-//-
	5	dmEL-MAL + 2 mM ADP + 1 ES	-//-
	6	dmEL-MAL + 2 ES + 2 mM ATP	-//-
	7	dmEL-MAL + 2 ES + 2 mM ADP	-//-
	8	dmEL-MAL + 2 mM AMP	-//-
	9	dmEL-MAL + 2 ES	-//-
	10	dmEL-MAL + 2 mM AMPPNP	-//-
	11	dmEL-MAL + 2 ES + 2 mM ATP, Inkubation bei RT 20 Min.	-//-
	12	dmEL-MAL + 2 ES + 2 mM ADP, Inkubation bei RT 20 Min.	-//-
IOPI	1	dmEL-IOPI	-//-
	2	dmEL-IOPI + 2 mM ATP	-//-
	3	dmEL-IOPI + 2 ES + 2 mM ATP	-//-
	4	dmEL-IOPI + 2 mM ADP	-//-
	5	dmEL-IOPI + 2 ES + 2 mM ADP	-//-

5.6.1.2 Untersuchung von Konformationsänderungen im dmEL-SL während der Rückfaltung von LDH

Für diese Untersuchungen wurde der mit IOPI- oder IAAT-SL modifizierte dmEL verwendet.

5.6.1.2.1 dmEL-IOPI-SL

Nach der Beendigung der Rückfaltung von LDH

Nach Untersuchung der Rückfaltungsaktivität des dmEL-IOPI-SL wurden 20µl der unter-suchten Probe (1 ml), die 0,25 µM dmEL enthielt (Versuche 1 und 3 **I**, Tabelle 4) ESR-spektroskopisch bei 25 °C vermessen. Danach wurde der Rest der verbliebenen untersuchten Probe (700 µl) mit Hilfe einer Centricon 30 bei 4 °C auf 40 µl eingeengt (Versuche 2 und 4 **I**, Tabelle 4) und erneut ESR-spektroskopisch vermessen.

Während der Rückfaltung von LDH

Zuerst wurden die verschiedenen Proben (1-12 **II**, Tabelle 4) wie unter experimentelle Methoden 5.4 beschrieben, in einzelnen Eppendorfgefässe vorbereitet und danach wurde die Konzentration jeder Probe an dmEL-SL von 0,25 µM auf 6.25 µM mit Hilfe einer Centricon 30 bei 4 °C erhöht und zum ESR-Untersuchung gebracht.

Tabelle 4:

ESR-Messung		Versuch	
Nach der Beendigung der Rückfaltung	**I**	1	0,25 µM dmEL-IOPI + 0,28 µM LDH + 2 mM ATP
		2	4,4 µM dmEL-IOPI + 4,9 µM LDH + 35 mM ATP
		3	0,25 µM dmEL-IOPI + 0,50 µM ES + 0,28 µM LDH + 2 mM ATP
		4	4,4 µM dmEL-IOPI + 8,8 µM ES + 4,9 µM LDH+ 35 mM ATP
Während der Rückfaltung	**II**	1	6,25 µM dmEL-IOPI + 7 µM LDH
		2	6,25 µM dmEL-IOPI + 7 µM LDH+ 50 mM ADP
		3	6,25 µM dmEL-IOPI ohne LDH
		4	6,25 µM dmEL-IOPI + 12,5 µM ES + 7 µM LDH
		5	6,25 µM dmEL-IOPI + 12,5 µM ES + 50 mM ADP + 7 µM LDH
		6	6,25 µM dmEL-IOPI + 12,5 µM ES + 50 mM ADP + 7 µM LDH→ ESR-Messung → Zugabe von 2 mM ATP → ESR-Messung
		7	6,25 µM dmEL-IOPI + 2 mM ATP + 7 µM LDH
		8	6,25 µM dmEL-IOPI + 12,5 µM ES + 50 mM ATP + 7 µM LDH
		9	6,25 µM dmEL-IOPI + 50 mM AMPPNP + 7 µM LDH
		10	6,25 µM dmEL-IOPI + 12,5 µM ES + 50 mM AMPPNP + 7µM LDH → ESR-Messung → Zugabe von 2 mM ATP→ ESR-Messung
		11	6,25 µM dmEL-IOPI + 50 mM ATP-γ-S + 7 µM LDH
		12	6,25 µM dmEL-IOPI + 12,5 µM ES + 50 mM ATP-γ-S + 7 µM LDH

5.6.1.2.2 dmEL-IAAT-SL

Die Versuche wurden genau wie die des dmEL-IOPI-SL (während der Rückfaltung) durchgeführt. Tabelle 5 zeigt die entsprechenden durchgeführten Versuche.

Tabelle 5:

ESR-Messung	Versuch	
Während der Rückfaltung	1	6,25 µM dmEL-IAAT + 7 µM LDH
	2	6,25 µM dmEL-IAAT + 7µM LDH → ESR-Messung → Zugabe von 2 mM ATP → ESR-Messung
	3	6,25 µM dmEL-IAAT + 50 mM ATP + 7 µM LDH
	4	6,25 µM dmEL-IAAT + 12,5 µM ES + 50 mM ATP + 7µM LDH
	5	6,25 µM dmEL-IAAT + 50 mM ADP + 7 µM LDH
	6	6,25 µM dmEL-IAAT + 12,5 µM ES + 50 mM ADP + 7 µM LDH
	7	6,25 µM dmEL-IAAT + 12,5 µM ES + 50 mM ADP + 7 µM LDH → ESR-Messung →Zugabe von 2 mM ATP
	8	6,25 µM dmEL-IAAT + 12,5 µM ES + 7 µM LDH
	9	6,25 µM dmEL-IAAT + 12,5 µM ES + 7 µM LDH →ESR-Messung → Zugabe von 2 mM ATP
	10	6,25 µM dmEL-IAAT +12,5 µM ES + 50 mM ATP ohne LDH
	11	6,25 µM dmEL-IAAT + 12,5 µM ES + 50 mM ADP ohne LDH

5.7 Effekt von GdnHCl an dmEL bzw. dmEL in Anwesenheit von ES

Um einen möglicherweise negativen Effekt des GdnHCl auf die Struktur des dmEL bzw. ES auszuschließen, wurde eine Probe von 6,25 µM dmEL-IAAT nach Inkubation mit 55 mM Gdn-HCl (gleich mit der Gdn-HCl-Konzentration während der Rückfalung) bei RT für ca. 10 Min. ESR-spektroskopisch untersucht. Der Versuch wurde auch in Anwesenheit von ES durchgeführt.

5.8 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im GroEL

Zur Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen des GroEL wurde ein ATP-Derivat, der in 8-Position einen SL trug, C8-SL-ATP, verwendet. Zuerst wurde eine Eichgerade von 10,5 µM bis 555 µM an C8-SL-ATP erstellt und danach erfolgte Titration des dmEL unter gleichen Bedingungen wie bei der Eichgerade allein bzw. in Gegenwart von GroES mit C-8-SL-ATP. Die Titration wurde danach mit dmEL-IAAT allein als auch in Gegenwart von GroES durchgeführt. In allen Titrationen wurde die GroEL-Endkonzentration auf 12 µM gehalten.

5.8.1 Erstellung der Eichgerade

Ein genaues Protokoll der Durchführung der Titrationen mit C-8-SL-ATP zeigt die Tabelle 6. Dabei wurde betrachtet, dass das Volumen jeder Probe auf 30 µl bleibt, so dass während der Titration in Anwesenheit von GroEL dessen Konzentration konstant bleibt.

Tabelle 6:

Konzentration an C-8-SL-ATP [µM]	ESR-Puffer µl	C-8-SL-ATP µl	H_2O_d µl
10.5	15	1.4 µl 0.225 mM	13.60
20.3	15	2.7 µl 0.225 mM	12.30
30.0	15	4.0 µl 0.225 mM	11.00
50.3	15	6.7 µl 0.225 mM	8.30
100.5	15	13.4 µl 0.225 mM	1.60
195	15	1.3 µl 4.5 mM	13.70
300	15	2.0 µl 4.5 mM	13.00
510	15	3.4 µl 4.5 mM	11.60
555	15	3.70 µl 4.5 mM	11.30

5.8.2. Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wurden zu verschiedenen Eppendorfgefäßen die entspre-chenden Mengen ESR-Puffer gegeben und danach erfolgte die Zugabe von C8-SL-ATP bzw. die berechneten Menge H_2O. Danach wurden die Proben gut gemischt. Die Zugabe von EL zu den Proben erfolgte kurz vor jeder ESR-Messung.

5.8.3 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL in Anwesenheit von ES

Hier wurden die entsprechenden Proben wie die Tabelle 8 zeigt, durchgeführt.

5.8.4 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL-SL

Dieser Versuch wurde genauso, wie unter experimentelle Methoden 5.8.2 beschrieben, durchgeführt (Tabelle 7).

5.8.5 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im dmEL-SL in Anwesenheit von ES

Die Durchführung ist gleich wie unter experimentelle Methoden 5.8.3 (Tabelle 8).

5.8.6 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen im wtEL

Die Durchführung ist genau wie unter experimentelle Methoden 5.8.2 (Tabelle 7).

Tabelle 7:

Konzentration an C-8-SL-ATP [µM]	**ESR-Puffer µl**	**C-8-SL-ATP µl**	**EL 60 µM µl**	**H_2O_d µl**
10.5	15	1.40 µl 0.225 mM	6	7.60
20.3	15	2.7 µl 0.225 mM	6	6.30
30.0	15	4.0 µl 0.225 mM	6	5.0
50.3	15	6.70 µl 0.225 mM	6	2.30
100.5	15	1.4 µl 2.25 mM	6	7.60
195	15	1.30 µl 4.5 mM	6	7.70
300	15	2.0 µl 4.5 mM	6	7.00
405	15	2.7 µl 4.5 mM	6	6.30
510	15	3.40 µl 4.5 mM	6	5.60

Tabelle 8:

C-8-SL-ATP [µM]	ESR-Puffer µl	C-8-SL-ATP µl	dmEL 54 µM µl	ES 289 µM µl	H_2O_d µl
20.3	15	2.70 µl 0.225 mM	6.70	2.50	3.10
50	15	3.0 µl 0.50 mM	6.70	2.50	2.80
105	15	1.40 µl 2.25 mM	6.70	2.50	4.40
128	15	1.70 µl 2.25 mM	6.70	2.50	4.10
150	15	2.0 µl 2.25 mM	6.70	2.50	3.80
180	15	2.40 µl 2.25 mM	6.70	2.50	3.40
210	15	1.40 µl 4.5 mM	6.70	2.50	4.40
255	15	1.70 µl 4.5 mM	6.70	2.50	4.10
300	15	2.00µl 4.5 mM	6.70	2.50	3.80
390	15	2.60 µl 4.5 mM	6.70	2.50	3.20
510	15	3.40 µl 4.5 mM	6.70	2.50	2.40

5.9 Allgemeine Arbeitsmethode

5.9.1 Ultraviolettspektroskopie

Alle UV-Spektren wurden mittels eines Spektrometer DU®640 der Firma Beckman aufgenommen. Dazu wurden 2 Arten von Küvetten verwendet, die aus Quarzglas hergestellten, der Firma Hellma, wurden in einem Absorptionsbereich unterhalb 350 nm und die aus Polysterol hergestellten Küvetten der Firma Brand, wurden in einem Absorptionsbereich oberhalb 350 nm (z.B. Proteinbestimmung bei 595 nm) verwendet.

5.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Reagenzien

Bradford-Reagenz:

0.2 g Coomassie Brillant Blue G-250
100 ml 50 % iges Ethanol (v/v)
200 ml 85 % ige Ortho-Phosphoräure
auf 500 ml H_2O_d

Nach einer Modifizierung von Holtzhauer (1988).
Vor Gebrauch wurde 1 Volumen Bradford-Reagenz mit 4-Teilen H_2O_d gemischt und filtriert.
Standard Lösung: 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)

Eichgerade:

In einzelne Reagenzgläser wurden jeweils 2, 5, 7, und 10 µl BSA in dreifacher Ausführung pipettiert, mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und auf dem Whirlmix gut durchmischt. Als Nullwert wurde 1 ml Bradford-Reagenz, ohne Zugabe von Protein verwendet. Danach folgte die Messung der Extinktion bei 595 nm in Plastibrand®–Einmalküvetten. Die Stoffmenge an BSA in µg wurde gegen die Extinktion aufgetragen.

5.9.3 Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung

5µl (35µg) der zu bestimmenden Proteinlösung wurde in einem Eppendorffgefäß mit 30 µl H_2O verdünnt und von der verdünnte Lösung wurden 5 µl in einem Reagenzglas mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, gut durchmischt und analog zur Vorschrift der Eichgerade verme-ssen. Wenn die vermessene Extinktionswerte außerhalb des Bereiches der Eichgerade lagen, mußte eine erneut Verdünnung der Proteinstammlösung durchgeführt werden.

5.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

SDS-Gelelektrophorese wurde nach Modifikation von Smith (1984) durchgeführt.

5.9.5 Gelzentrifugation

Penefsky Säule (Penefsky, 1977):

Zur Abtrennung des DTT vom Protein wurden Gelzentrifugationssäulen nach Penefsky (1977) verwendet. Dazu wurden dreidimensional vernetztes Dextrangel Sephadex® G-50 der Firma Pharmacia in H_2O_d gequollen und anschließend in Einwegspritzen (ø = 5 mm) gefüllt. Die mit Gel gefüllten Säulen wurden mit mindestens 3 ml des Zielpuffers equilibriert und 50 Sekunden bei 3200 rpm in einer Hettich Tischzentrifuge (Ausschwingrotor) zentrifugiert, auf dem trockenem Gelbett dieser Säulen wurde Proteinproben bis 100 µl aufgetragen und erneut für 45 Sec. bei 3200 rpm zentrifugiert. Das Eluat der Säule enthielt das umgepufferte Protein.

5.9.6 Säulenchromatographie

Zur chromatographischen Aufarbeitung von Proteinen wurden verschiedene Gelmaterial verwendet.

Sephacryl S-300-HR Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Zur Reinigung von GroEL & GroES
Sephadex®G-50 fine Pharmacia Biotech
Zur Abtrennung des DTT von GroEL und freie SL von SL-GroEL

Nach Auftragung des Substanzgemisches auf das Gelbett wurde die Säule mit drei Gelvolumina des entsprechenden Puffersystems eluiert und die Absorption der Substanzen bei 278 nm (Protein) mittels eines Durchflußphotometers (2138 Uvicord S, LKB Bromma) detektiert. Das Elutionsdiagramm wurde mit einem XY-Schreiber Servogor 120 der Firma Groerz aufgenommen. Als Fraktionssammler diente ein Multirac 2111 der Firma Bromma (LKB).

5.9.7 Bestimmung der Nukleotidkonzentration

Die Konzentrationen der verwendeten Nukleotide wurden UV-spektroskopisch bestimmt. Die folgenden molaren Extinktionskoeffizienten wurden verwendet:

AMP, ADP, ATP	$\varepsilon_{259} = 15400\ M^{-1}cm^{-1}$	(Bergmeyer, 1974)
C-8-SL-ATP	$\varepsilon_{278} = 18400\ M^{-1}cm^{-1}$	(Glöggler, 1981)
NADH	$\varepsilon_{334} = 6180\ M^{-1}cm^{-1}$	(Bergmeyer, 1974)
	$\varepsilon_{340} = 6300\ M^{-1}cm^{-1}$	(Bergmeyer, 1974)

5.9.8 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Alle ESR-Untersuchungen wurden an eines Bruker X–Band Spektrometers ESR 300 E oder 580 E durchgeführt. Als Resonanzcavity wurde eine dielektrische Cavity TE 011 (ER 4118) verwendet. Die Proben wurden in Quarzkapillaren (0.9 x 100 mm) der Firma Spintec vermessen. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9.7 GHz. Die Meßtemperatur wurde von 25 °C über die Temperatureinheit ER 4111 VT der Firma Bruker eingestellt.

Tabelle 9: ESR-Geräteinstellungen:

Meßparameter	
Mikrowellenfrequenz	9.7 GHz
Modulationsfrequenz	100 KHz
Modulationsamplitude	1.0 G
Mikrowellenleistung	12.5 mW
Aufnahme Bereich des Spektrums	3400-3500 G
Signalverstärkung	unterschiedlich
Zahl der Scan	2
Mittelfeld	3450 G
Scanbereich	100 G
Temperatur	298 °K

5.10 Materialien

Medien-und Pufferbestandteile:

	FIRMA	**LOT**
Agar-Agar	ICN Biomedicals	84518
Bacto-Trypton	DIFCO	0140000
Bacto-Trypton-pepton (Pancreatic Digest of casein)	DIFCO	CH-B 135850XA
DTT (> 99 %)	Sigma	77H1783
EDTA p.a.	Sigma	36H0051
Glycerin (99.5%)	Caldic	7064
Gdn-HCl (> 99,5 %)	Sigma	57H5714
Hefeextrakt	DIFCO	84405
KCl p.a.	Merck	TA657136 948
$MgCl_2$ x $6H_2O$ p.a.	Merck	TA696633 50
NaCl p.a.	Roth	3957.1
NaOH p.a.	Riedel-de Haen	2058A
NaH_2PO_4 x $4H_2O$ p.a.	Merck	A125746 916
$(NH_4)_2SO_4$ p.a.	Merck	A991417 808
Spermidin (> 98 %)	Sigma	97H2601
Sucrose	Serva	07052
Tris (99.9 %)	Roth	4855.2
$(NH_4)_2S_2O_8$ (> 98 %)	Roth	7727

Gelmaterialien

Sephacryl S-300-HR	Sigma	18H0595
Sephadex® G-50	Pharmacia	276842
Sephadex® G-10 fine	Pharmacia	236747

Nukleotide:

AMP (> 99 %)	Fluka	Anal.Nr: 350833/1 32997
ADP (> 99 %)	Boehringer Mannheim	Lot:85261630-01
ATP (> 97 %)	Boehringer Mannheim	Lot:84016028-31
ATP-γ-S (> 90 %)	Sigma	Lot:98H1362
AMPPNP (88 %)	Boehringer Mannheim	Lot:14199020 -76
NADH (98 %)	Boehringer Mannheim	Lot:14266320-62

Enzyme:

BSA (> 95 %) (Fraktion V)	Boehringer Mannheim	Lot:13805322-16
Cytochrom C (80 %)	Boehringer Mannheim	Lot:84111520
Chymotrypsin A	Serva	Lot:00476
DNase I	Bio Chemika	Lot:387302/1 24898
Lactatdehydrogenase (99,9 % aus schwein-muskel, Lösug in Glycerin)	Boehringer Mannheim	Lot:13117430 -74
Lysozum	Boehringer Mannheim	Lot:84093125-05
Ovalbumin (98 %)	Sigma	
Pyruvatkinase (99,99 %) (aus Kanninchenmuskel)	Boehringer Mannheim	Lot:4040921 -66
RNase A (aus Rinderpancreas)	Boehringer Mannheim	Lot:85109926 -75

Weitere Chemikalien:

Bromphenolblau	Serva	Lot:15375
Ampicilin (99 %)	Roth	Art Nr.: K0291

Chloramphenicol (>98 %)	Sigma	106H0971
Coomasie brillant Blue		
-G250	Serva	Lot:35050
-R250	Sigma	Lot:106H5009
DTP	Sigma	Lot:95H3725
Glycin p.a.	Serva	Lot:00801
2-Mercaptoethanol p.a.	Sigma	Lot:56H1289
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Riedel-de Haen	Lot: 80140
PEP (%97 %)	Boehringer Mannheim	Lot:84174037-59
Pyruvat	Boehringer Mannheim	Lot:83451025-89
SDS (> 99 %)	Fluka	Lot:332534/1 1193
TEMED (> 99 %)	Fluka	Lot:47430/1

Geräte:

Autoklav:	RTX 182	Ebro
	Dampfkochtopf	
Durchflußphotometer:	2138 Uvicord S	LKB Bromma
Fraktionssammler:	Multirac 2111	LKB Bromma
Geltrockner:	2003 Slab Gel Dryer Unit	LKB Bromma
Inkubatoren:	Wasserbadschüttler HT BTR 112	Infos
	Luftschüttler Innova 4000	New Brunswick
Photometer:	Modell 1101 M	Eppendorf
Schreiber:	Servogor 120	Groerz Metrawatt
UV-Spectrometer:	DU®-640	Beckman
	DU®-8	Beckman
Zentrifugen:		
Rotoren:	JA 10 , JA 20	Beckman
Tischzentrifuge 5451 c		Eppendorf
Tischzentrifuge Universal		Hettich

Ultrazentrifuge:

TGA–50 -Rotor:TFT 50.38	Kontron
Optima™ ,LE –80 K -Rotor:Ti 70	Beckman

Zubehör:

Centricon-Konzentratoren:	(- 10,- 30)	Amicon GmbH Witten
Flachküvetten: aus Quarzglas		Medizinische Glastechnik Werkstatt E. Harms
Plastibrand®. ,Einmalküvetten:	1,5 ml Halbmikro,Polysterol	Brand
Präzisions-Küvetten:	Quarzglas Suprasil®	Hellma
Quarzkapillare:	Quarzglas Suprasil® $Ø_{innen}$ = 0.9 mm L = 10 cm	Spintec
Sterilfilter PRO-X™	0.45 mm	Lida Manufacturing Corporation
Ultrafiltrationszellen:	Serie 8400 Ø.= 76 mm, V_{max} = 400 ml Serie 8050 Ø.= 43 mm, V_{max} = 50 ml	Amicon
Membranen für Ultrafiltration:	PM 10, ø = 76 mm PM 30, ø = 43 mm YM 3, ø = 43 mm	Amicon

6 Literatur

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, G. H. and Hubbell, W. L. (1990) Science **248**, 1088-1092

Anfinsen, C. B. (1973) Science **181**, 223-230.

Becker, J., and Craig, E.A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Bio--chem*. **219**, 11-23.

Beissinger, M., Buchner, J., (1998) *Biol. Chem*., **Vol. 379**, pp. 245-259, March 1998.

Bockkareva, E.S., Lissin, N.M., Flynn, G.C., Rothman, J.E., Girshovich, A.S. (1992). Positive cooperativity in the functioning of molecular chaperone GroEL. *J. Biol. Chem*. **267**, 6796-6800.

Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem*. **72**, 248-254.

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Si--gler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GrpEL at 2.8 Å. *Natu--re*. **371**, 578-586.

Buchberger, A., Schröder, H., Hesterkamp, T., Schönfeld, H.J., Bukau, B. (1996) . Substrate shuttling between the Dnak and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol*. **26**, 328-333.

Burgard, S., Nett, J. H., Sauer, H. E., Kagawa, Y., Schäfer, H. –J., Wise, G. J., Vogel, P. D. and Trommer, W. E., (1994) *J. Biol. Chem* **269**, 1-5.

Chandrasekhar, G. N.; K.; Woolford, C.; Hendrix, R. and Georgeopoulos, C. (1986) *J. Biol. Chem*. **261**,12414-12419.

Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A. R., and Saibil, H.R. (1994). Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* **371**, 261-264.

Cheng, M. Y. *et al*. *Nature* **337**, 620-625 (1989).

Collier, D. N. (1993). SecB: A molecular chaperone of *Escherichia coli* protein secretion pathway. *Adv. Prot. Chem*. **44**, 151-193.

Ehrnsperger, M., Buchner, J., and Gaestel, M. (1997a). Structure and function of small heat-shock proteins. In: Molecular Chaperones in the life Cycle of proteins. A. L. Fink and Y. Goto, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 533-575.

Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., and Buchner, J. (1997b). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reac--tivation. *EMBO J*. **16***,* 221-229.

Ellis, R. J. und Hartl, F. U. (1996) *FASEB J*. **10**, 20-26.

Engel, A., Hayer-Hartl, M. K., Goldie, K. N, Pfeifer, G., Hegerl, R., Müller, S., da Silva, A. C. R., Baumeister, W., and Hartl, F.-U. (1995). Functional significance of symmetrical versus asymmetrical GroEL-GroES chaperonin complexes. *Science* **269**, 832-836.

Erbse, A. H. (1995) *Dissertation*, Universität Kaiserslautern.

Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W. A., and Hartl, F.-U. (1997). *In vivo* observation of Polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90**, 491-500.

Fayet, O., Louarn, J. –M. und Georgopoulos, C. (1986) *Mol. Gen. Genet*. **202**, 435-445.

Feix, J. B., Klebba, PE., Rutz, J M., Liu, J (1994) *Biochemistry* 1994 Nov 15; **33** (45): 13274-13283.

Feix, J. B., & Klug, C.S. (1998) in Biological Magnetic Resonance, Spin Labeling, The Next Millenium Vol. **14** (Berliner, L. J., ed.) Plenum Press, New York, 251-279.

Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. , and Horwich, A. L. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **371**, 614-619.

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

Fisher, M. L.; (1992) *Biochemistry* **31**, 3955-3963.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., and Hart, F. U. (1994). Folding of nascent Poly--peptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**, 111-117.

Gervasoni, P., Staudemann, W., James, P., Gehring, P., and Plückthun, A. (1996). β-lactama--se binds to GroEL in a conformation highly protected against hydrogen /deuterium exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA **93***,* 12189-12194.

Glöggler, K. G; Fritzsche T. M.; Huth, H. und Trommer, W. E. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. **362**, 1561-1565.

Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A., and Lorimer, G. H. (1989). Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins an MgATP. *Nature* **342**, 884-889.

Goloubinoff, P.; Gatenby, A. A. und Lorimer, G. H. (1989) *Nature* **337**, 44-47.

Grassetti, D. R. and Murray, J. F. (1976) *Arch. Biochem. Biophys*. **119**, 41-49.

Gray, T.E., and Fersht, A.R. (1991). Co-operativity in ATP hydrolysis by GroEL is increased by GroES. *FEBS Lett*. **292**, 254-258.

Guhr, P. (2000), *Dissertation*, Universität Kaiserslautern.

Hamilton, C. L., McConell, H. M. (1968) in Rich, A., Davidson, N. (eds) *Structural Chemistry and Molecular Biology, Freeman, San Francisco* S. 115.

Hartl, F. U. (1996) *Nature* **381**, 571-580.

Hartl, U. (1998) *Biol. Chem*., Vol **379**, p. 235, March 1998.

Hayer-Hartl, M. K.; Martin, J. und Hartl, F. U. (1995) *Science* **269**, 836-841.

Hendix, R. W. (1979) *J. Mol. Biol*. **129**, 375-392.

Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **89**, 10449-10453.

Horwich, A. L., Low, K. B., Hirshfield, I. N. & Furtak, K. *Cell* **74**, 909-917 (1993).

Hoshino, M., Kawata, Y., and Goto, Y. (1996). Interaction of GroEL with conformational sta--tes of horse cytochrome c. *J. Mol. Biol*. **262**, 575-587.

Jackson, G. S., Staniforth, R. A., Halsall, D. J., Atkinson, T., Holbrook, J. J., Clarke, A. R., & Burston, S. G. (1993) *Biochemistry* **32**, 2554-2563.

Jaenicke, R., and Creighton, T.E. (1993). Junior Chaperones. *Curr. Biol*. **3**, 234-235.

Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem*. **268**, 1517-1520.

Kersten, M. (1999), *Dissertation*, Universität Kaiserslautern.

Kiefhaber, T., Rudolph, R ., Kohler, H. –H ., and Buchner, J. (1991). Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology* **9**, 825-829.

Landry, S.J., Zeistraryalls, Fayet, O., Georgopoulos, C, and Gierasch, L. M. (1993). Characte--risation of a functionally important mobile domain of GroES. *Nature* **364**, 255-258.

Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., Hartl, F.-U. (1992a). Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J.* **11**, 4757-4765.

Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H.R., and Vierling, E. (1997). A small heat shock Protein-stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. EMBO J. **16**, 659-671.

Lilie, H., and Buchner, J. (1995). Interaction of GroEL with a highly structured folding Inter--mediate: Iterative binding cycles do not involve unfolding. *J. Biol. Chem*. **92**, 8100-8104.

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

Liorca, O., Marco, S., Carrascosa, J. L ., and Valpuesta, J. M. (1994). Symmetric GroEL-GroES-complexes can contain substrate simultaneously in both GroEL rings. *FEBS Lett*. **345**, 181-186

Lorimer, G.H. (1996). A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in pro--tein folding *in vivo*. *FASEB J*. **10**, 5-9.

Lösel, M. R., Weise, G. J., and Vogel, P. D. (1997) *Biochemistry* **36**, 1188-1193.

Lundblad, R. L . (1991) in Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd edition, CRC *Press Inc*., Boca Raton, Florida.

Marsh, D. (1981) in: Grell, E. (ed) *Membrane Spectroscopy, Springer, Berlin 1981.*

Martin, J.; Mayhew, M.; Langer, T. und Hartl, F. –U. (1993) *Nature* **366***,* 228-233.

Neuhofen, S. (1997) *Dissertaion*, Universität Kaiserslautern.

Nordio, P. L. (1976) in: Berliner, L. J. (ed) *Spin Labeling* – Theory and Applications, *Academic Press*, *New York*, 1976.

Ohnishi, S., McConnel, H.M. (1965), *J. Am Chem. Soc*., **87**, 2293-2307.

Penefsky, H. S. (1977) *J. Biol. Chem*. **252**, 2897-2899.

Riether, K. –B. (1996) Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

Roseman, A., Chen, S., White, H., Braig, K., and Saibil, H . (1996). The chaperonin ATPase cycle: Mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**, 241-251.

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

Saibil et al., (1996) *Cell* **87**, 241-251, 1996.

Schmidt, M., Buchner, J., Todd, M. J., Lorimer, G.H., and Viitanen, P.V. (1994a). On the role of GroES in the chaperonin-assisted folding reaction. Three case studies. *J. Biol. Chem*. **269***,*10304-10311.

Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G., and Buchner, J.(1994b). Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the functional cycle. *Science* **265**, 656-659.

Sparrer, H., Lilie, H., and Buchner, J. (1996). Dynamics of the GroEL-protein complex: Effe--cts of nucleotides and folding mutants. *J. Mol. Biol*. **258**,74-87.

Sparrer, H., Rutkat, K., and Buchner, J. (1997). Catalysis of protein folding by symmetric chaperone complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA **94**, 1096-1100.

Süßmuth, R.; Eberspächer, J. und Haag, R.; Springer, W. (1987) Biochemisch-Mikrobiologisches Praktikum, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart.

Todd, M. J., Viitanen, P. V., and Lorimer, G. H. (1994). Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* **265**, 659-666.

Todd, M. J., Lorimer, G.H., and Thirumalai, D. (1996). Chaperonin-facilitated protein fold--ing: Optimization of rate and yield by an iterative annealing mechanism. *Proc. Natl*.
Adac. Sci. USA **93**, 4030-3035.

Trommer, W.E (1987) in Pyridines Nucleotide Coenzymes: *Chemical, Biochemical and Me--dical Aspects* (Dolphin, D., Poulson, R. & Abramovic, O., eds .) **2 A**, 613-640, Wiley New York.

Viitanen, P. V., Lubben, T. H., Reed, J., Goloubinoff , P., O'Keefe , D. P., & Lorimer , G. H. (1990) *Biochemistry* **29**, 5665-5671.

Vogel, P. D., Nett, J. H ., Sauer, H. E., Schmadel, K., Cross, R.L. and Trommer, W.E. (1992), *J.Biol. Chem* **267**, 11982-11986.

Wilder, R. T., Venkatamuru, S. D., Dalton, L. R., Birktoft, J. J., Trommer, W. E. and Park, J. H. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* **997**, 65-77.

Weissman, J. S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J. M., and Horwich, A. L. (1996). *Cell* **84**, 481-490

Xu, Z., Horwich, A. L ., and Sigler, P. B . (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-$(ADP)_7$ chaperonin complex. *Nature* **388**, 741-750.

Yifrach, O., and Horovitz, A. (1994). Tow lines of allosteric communication in the oligomeric chaperonin GroEL are revealed by the single mutation Arg 196 → Ala. *J. Mol. Biol*. **243**, 397- 401.

Zahn, R., Spitzfaden, C., Ottiger, M., Wüthrick, K., and Plückthun, A. (1994). Destabilization of the complete protein secondary structure on binding to the chaperone GroEL. *Nature* **368**, 261-265.

Zheng, X., Rosenberg, L. E., Kalousek, F . & Fenton, W. A. *J. Biol. Chem*. **268**, 7489 – 7493 (1993).

7 Anhang

7.1 Rohdaten

Tabelle 10: Rohdaten zu Abb. 13

Wachstumskurve von TG2/pOA mit Mutation C138S/C519S in 2 x YT-Flüssigmedium.

Inkubationszeit [h]	**OD bei 600nm**
0	0,2512
1	0,3116
2	0,5973
3	0,9863
4	1,397
5	2,6
6	3,514
7	3,95
8	4,254
9	4,32

Tabelle 11: Rohdaten zu Abb. 14

Wachstumskurve von DH5α/pGroESL in 10 x SOC-Flüssigmedium

Inkubationszeit [h]	**OD bei 600nm**
0	0,2521
1	0,2905
2	**0,5718**
3	0,9911
4	1,4
5	2.881
6	3,882
7	4,02
8	4,1
9	4,2

Tabelle 12: Rohdaten zu Abb. 17a

ATPase-Aktivität des dmEL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 37 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL allein	0,15 ± 0,01
dmEL + ATP	0,16 ± 0,02
dmEL + ADP	0,17 ± 0,01
dmEL + ATP + ES	0,17 ± 0,01
dmEL + ADP + ES	0,19 ± 0,01

Tabelle 13: Rohdaten zu Abb. 17b

ATPase-Aktivität des dmEL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 30 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL allein	0,15 ± 0,01
dmEL + ATP	0,15 ± 0,01
dmEL + ADP	0,16 ± 0,01
dmEL + ATP + ES	0,18 ± 0,01
dmEL + ADP + ES	0,16 ± 0,01

Tabelle 14: Rohdaten zu Abb. 18a

ATPase-Aktivität des wtEL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 30 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
wtEL allein	0,13 ± 0,006
wtEL + ATP	0,13 ± 0,006
wtEL + ADP	0,14 ± 0,007
wtEL + ATP + ES	0,12 ± 0,006
wtEL + ADP + ES	0,10 ± 0,005

Tabelle 15: Rohdaten zu Abb. 18b

ATPase-Aktivität des wtEL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 37 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
wtEL allein	0,17 ± 0,009
wtEL + ATP	0,17 ± 0,009
wtEL + ADP	0,16 ± 0,008
wtEL + ATP + ES	0,16 ± 0,008
wtEL + ADP + ES	0,13 ± 0,007

Tabelle 16: Rohdaten zu Abb. 19

% der zurückgefalteten LDH-Aktivität im Falle des nicht spingelabelten dmEL.

Zeit (h)	Spontane Rückfaltung	dmEL	dmEL + ADP	dmEL + ATP	dmEL + ATP + ES	% der zurückgewonnenen LDH-Aktivität
0	0	0	0	0	0	
1	4,2 ± 0,21	0	4 ± 0,7	5 ± 0,25	8 ± 0,4	
2	13,1 ± 0,66	0	6 ± 0,9	15,66 ± 0,78	31,4 ± 1,57	
3	16,7 ± 0,84	0	7 ± 0,7	21,3 ± 1,07	41,67 ± 2,08	
4	19,2 ± 0,96	0	10 ± 0,8	21 ± 1,05	41,67 ± 2,08	
5	22,5 ± 1,13	0	11 ± 1	20,5 ± 1,03	42 ± 2,1	
6	23 ± 1,15	0	14 ± 1,1	21 ± 1,05	41 ± 2,05	
7	23 ± 1,15	0	14 ± 0,9	21 ± 1,05	42 ± 2,1	

Tabelle 17: Rohdaten zu Abb. 20

% der zurückgefalteten LDH-Aktivität im Falle des wtEL.

Zeit (h)	Spontane Rückfaltung	wtEL	wtEL + ADP	wtEL + ATP	wtEL + ATP + ES	% der zurückgewonnenen LDH-Aktivität
0	0	0	0	0	0	
1	12,5 ± 0,63	0	4 ± 0,6	20 ± 1,01	30 ± 1,5	
2	15 ± 0,75	0	6 ± 0,8	24 ± 1,2	45 ± 1,8	
3	17,5 ± 0,88	0	8 ± 0,9	33 ± 1,65	55 ± 2,0	
4	21,5 ± 1,08	0	10 ± 0,5	39 ± 1,95	58,67 ± 2,4	
5	23 ± 1,15	0	11 ± 1	53 ± 2,65	64 ± 2,7	
6	22,5 ± 1,13	0	13 ± 1	54 ± 2,7	57,5 ± 2,9	
7	23 ± 1,15	0	12,6 ± 1	50 ± 2,5	62 ± 3,1	
8	22,5 ± 1,13	0	13 ± 1,2	51 ± 2,6	67 ± 3,4	
9	23 ± 1,15	0	13 ± 1	50 ± 2,5	65 ± 3,3	

Tabelle 18: Rohdaten zu Abb. 21

Vergleich zwischen dmEL und wtEL bezüglich der % Rückfaltung von LDH.

	% Rückfaltung von LDH
Spontane Rückfaltung von LDH	23 ± 1,15
dmEL	0
dmEL + ATP	21 ± 1,05
dmEL + ATP + ES	42 ± 2,1
wtEL + ATP	50 ± 1
wtEL + ATP + ES	65 ± 3,25

Tabelle 19: Rohdaten zu Abb. 22

Titration des dmEL mit C8-SL-ATP.

freies C8-SL-ATP [µM]	**geb., C8-SL-ATP [µM]/dmEL$_{14}$ [µM] (zugängliche Nukleotidbindungsstellen)**
0	0
13,2	0,8
26,43	1,45
35,7	2,3
47,2	3,4
63	5
74	6,73
80,2	8,2
84,1	9,8
100,2	11,7
152,4	12,3
182	14
208	16
267,6	15,2
317	15

Tabelle 20: Rohdaten zu Abb. 23

Titration des dmEL in Anwesenheit von ES mit C8-SL-ATP.

freies C8-SL-ATP [µM]	**geb., C8-SL-ATP [µM]/dmEL$_{14}$ [µM] (zugängliche Nukleotidbindungsstellen)**
0	0
3,2	1,4
14	3
22	6,5
29	8
42	9
43	11
50	12,5
78,4	14,3
133,6	12,8
238	13,5
327,2	14,4

Tabelle21: Rohdaten zu Abb. 24

Titration des wtEL mit C8-SL-ATP.

freies C8-SL-ATP [µM]	**geb., C8-SL-ATP [µM]/wtEL$_{14}$ [µM] (zugängliche Nukleotidbindungsstellen)**
0	0
6,04	0,56
4,72	0,85
8	1
11,65	2,4
15,52	2,89
16,35	3,68
13,65	2,77
18,81	4,12
32,65	4,44
40	5
59	5,5
48,58	7,08
51,6	8,2
77,26	6,67
49,91	8,55
73,39	6,41
80	10
90,75	8,89
118	11
147,47	12,21
176,76	10,68
232	14
279,91	12,52
336,8	13,6
394,66	13,25

Tabelle 22: Rohdaten zu Abb. 25a

ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT-SL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 30 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL	0,13 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL	0,1 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ATP	0,1 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ADP	0,12 ± 0,02
dmEL-IAAT-SL + ATP + ES	0,1 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ADP + ES	0,11 ± 0,01

Tabelle 23: Rohdaten zu Abb. 25b

ATPase-Aktivität des dmEL-IAAT-SL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 37 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL	0,16 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL	0,13 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ATP	0,14 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ADP	0,18 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ATP + ES	0,16 ± 0,01
dmEL-IAAT-SL + ADP + ES	0,15 ± 0,01

Tabelle 24: Rohdaten zu Abb. 26

% der zurückgewonnenen LDH-Aktivität im Falle des dmEL-IAAT-SL..

Zeit (h)	Spontane Rückfaltung	dmEL-IAAT	dmEL-IAAT + ATP	dmEL-IAAT + ATP + ES	% der zurückgewonnenen LDH-Aktivität
0	0	0	0	0	
1	12,5 ± 0,63	0	0	1,9 ± 0,1	
2	17,5 ± 0,87	0	2,67 ± 0,13	6,6 ± 0,33	
3	21,5 ± 1,08	0	5,6 ± 0,28	9,16 ± 0,46	
4	21,5 ± 1,08	0	5,6 ± 0,28	9,16 ± 0,46	

Tabelle 25: Rohdaten zu Abb. 27

Vergleich zwischen dmEL-IAAT-SL und dmEL bezüglich der % Rückfaltung von LDH.

	% Rückfaltung von LDH
Spontane Rückfaltung von LDH	23 ± 1,15
dmEL + ATP	21 ± 1,05
dmEL-IAAT-SL + ATP	5,6 ± 0,28
dmEL	0
dmEL+ ATP + ES	42 ± 2,1
dmEL-IAAT-SL + ATP + ES	9,2 ± 0,46

Tabelle 26: Rohdaten zu Abb. 35

Titration des dmEL-IAAT-SL mit C8-SL-ATP.

freies C8-SL-ATP [µM]	**geb., C8-SL-ATP [µM]/dmEL-SL$_{14}$ [µM] (zugängliche Nukleotidbindungsstellen)**
0	0
6,8	1,1
16,52	2,79
31,6	5,7
44,84	12,93
150	16
208	16
302	16,5
358	16

Tabelle 27: Rohdaten zu Abb. 36

Titration des dmEL-IAAT-SL in Anwesenheit von ES mit C8-SL-ATP.

freies C8-SL-ATP [µM]	**geb., C8-SL-ATP [µM]/dmEL-SL$_{14}$ [µM] (zugängliche Nukleotidbindungsstellen)**
0	0
5,6	1,2
9,7	3,36
19,72	6,69
41	13,25
89,4	15
156	12
186,8	13,6
226	14,5
321,2	14,9
368,44	15,13

Tabelle 28: Rohdaten zu Abb. 37

ATPase-Aktivität des dmEL-MAL-SL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 30 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL	0,15 ± 0,01
dmEL-MAL-SL	0,08 ± 0,01
dmEL-MAL-SL + ATP	0,08 ± 0,01
dmEL-MAL-SL + ADP	0,08 ± 0,01
dmEL-MAL-SL + ATP + ES	0,07 ± 0,02
dmEL-MAL-SL + ADP + ES	0,06 ± 0,02

Tabelle 29: Rohdateb zu Abb. 38

Zeitverlaufskurve der durch dmEL-MAL-SL zurückgefalteter LDH.

Zeit (h)	**Spontane Rückfaltung**	**dmEL-MAL**	**dmEL-MAL + ATP**	**dmEL-MAL + ATP + ES**	**% der zurückgewonnenen LDH-Aktivität**
0	0	0	0	0	
1	12,5 ± 0,63	0	11,66 ± 0,59	14,7 ± 0,74	
2	17,5 ± 0,87	0	14,16 ± 0,71	23,33 ± 1,17	
3	21,5 ± 1,08	0	16,16± 0,81	26,33 ± 1,32	
4	21,5 ± 1,08	0	16,20 ± 0,81	26,33 ± 1,32	

Tabelle 30: Rohdaten zu Abb. 39

Vergleich zwischen dmEL-MAL-SL und dmEL bezüglich der % Rückfaltung von LDH.

	% Rückfaltung von LDH
Spontane Rückfaltung von LDH	23 ± 1,05
dmEL + ATP	20 ± 1
dmEL-MAL-SL + ATP	16 ± 0,8
dmEL	0
dmEL+ ATP + ES	42 ± 1,1
dmEL-MAL-SL + ATP + ES	26 ± 1,3

Tabelle 31: Rohdaten zu Abb. 44a

ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI-SL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 37 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL	0,16 ± 0,008
dmEL-IOPI-SL	0,30 ± 0,01
dmEL-IOPI-SL + ATP	0,30 ± 0,01
dmEL-IOPI-SL + ADP	0,30 ± 0,01
dmEL-IOPI-SL + ATP + ES	0,40 ± 0,006
dmEL-IOPI-SL + ADP + ES	0,40 ± 0,006

Tabelle 32: Rohdaten zu Abb. 44b

ATPase-Aktivität des dmEL-IOPI-SL allein und in Anwesenheit von Nukleotiden bzw. ES bei 30 °C.

	ATPase-Aktivität U/mg
dmEL	0,11 ± 0,006
dmEL-IOPI-SL	0,15 ± 0,008
dmEL-IOPI-SL + ATP	0,15 ± 0,008
dmEL-IOPI-SL + ADP	0,15 ± 0,008
dmEL-IOPI-SL + ATP + ES	0,16 ± 0,008
dmEL-IOPI-SL + ADP + ES	0,16 ± 0,008

Tabelle 33: Rohdaten zu Abb. 45

Zeitverlaufskurve der durch dmEL-MAL-SL zurückgefalteter LDH.

Zeit (h)	Spontane Rückfaltung	dmEL-IOPI	dmEL-IOPI + ATP	dmEL-IOPI + ATP + ES	% der zurück-gewonnenen LDH-Aktivität
0	0	0	0	0	
1	12,5 ± 0,63	0	3,66 ± 0,18	10,4 ± 0,52	
2	17,5 ± 0,87	0	4,6 ± 0,23	19,16 ± 0,96	
3	21,5 ± 1,08	0	4,66± 0,24	20,8 ± 1,04	
4	21,5 ± 1,08	0	4,6 ± 0,23	21 ± 1,05	

Tabelle 34: Rohdaten zu Abb. 46

Vergleich zwischen dmEL-IOPI-SL und dmEL bezüglich der % Rückfaltung von LDH.

	% Rückfaltung von LDH
Spontane Rückfaltung von LDH	23 ± 1,05
dmEL + ATP	20 ± 1
dmEL-IOPI-SL + ATP	4,6 ± 0,23
dmEL	0
dmEL+ ATP + ES	42 ± 1,1
dmEL-IOPI-SL + ATP + ES	20 ± 1

Danke...

..an alle, die mich vom Anfang bis Ende dieser Arbeit auf verschieden Arten unterstützt ha-ben.

Frau Priv. Doz. Dr. Pia Vogel und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Trommer danke ich für die Freundlichkeit und die ausgezeichnete Unterstützung sowie für die Betreuung und die Hinweise während der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Herrn Dr. Reinhard Philipp für seine unvergessene Hilfe bei Problemen am ESR-Spektrometer, am Computer und für seine Freundlichkeit.

Herrn Dr. John Wise danke ich sehr für seine Hilfsbereitschaft und seine wissenschaftliche Kommentaren bzw. Hinweise.

Frau Dr. Petra Guhr danke ich besonders für ihre gute Zusammenarbeit und ihre interessante Gespräche im Labor.

Herrn Tassilo Hornung, Herrn Markus Klein, Herrn Markus Jehl, Frau Dr. Ulrike Kreilinger, Frau Minni Laurila, Frau Sabine Delannoy, Frau Colette Kananura, Frau Dr. Ulrike Schmidt, Frau Elke Litmianski, Herrn Olaf Becker, Herrn Martin Hossann, Herrn Dirk Mannweiler, Herrn Ralf Milosavljevic, Herrn Fabian Rozario, Frau Carolin Fluck gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit und interessante Gespräche.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Mutter und Geschwistern für alles.

Und ich vergesse nicht meinen Freunden und besonders Petra Benett, und Samuel Rhyne zu danken.

Ein ganz besonders Dankeschön an Julia-Evin Badrakhan für ihre Unterstützung auf ganz spezielle Weise.

Vielen Dank an alle!

Lebenslauf

Name:	Zaida
Vorname:	Tarek
Adresse:	Hawari Abou Medien-str. 19/52 Rimal, Gaza Gaza Strip, PA (Palestinian Authority)/ Israel TMZ_@excite.com
Geburtsdatum:	16.Nov.1969
Geburtsort:	Gaza-Stadt, Palästina (Israel)

Schulausbildung

Sep 1975-Mai 1981	Besuch der Grundschule, Gaza
Sep 1981-Jun. 1984	Besuch der Vorbereitungsschule, Gaza
Sep 1984-Aug 1987	Besuch der Untergeordneten Schule, Gaza

Studium

Sep 1988- Jan 1989	Besuch von Griechischkurs an der Universität Arestotellos , Thessaloniki- Griechenland
Sep 1989- März 1995	Studium der Chemie an der Universität Thessaloniki-Griechenland
Feb 1994- Sep 1994	Diplomarbeit im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie der Universität Thessaloniki (Arbeitskreis Prof. Kiriakidi. Thema: „Erzeugung von Xanthan aus Xanthomonas Compestris“
2 März 1995	Abschluss: Diplom
Juli 1995- Okt 1995	Besuch von Englisch Kurs an “British council“, Gaza

Aug 1995- Aug 1996	Arbeit bei der zentralen Blutsbank, Gaza
Sep 1996- Juli 1997	Besuch zu Deutscheskurs an der Universität Kaiserslautern
Juli 1997	DSH-Prüfung
16 April 1997-7 Mai 2000	Promotion im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie der Universität Kaiserslautern Thema: " Untersuchungen zur Konformations-kopplung bei der GroEL-gestützten Proteinfaltung"
2 Nov 2001	Tag der wissenschaftlichen Aussprache
Sprachen	Arabisch, Deutsch, Englisch, Griechisch