

Untersuchungen zur Funktion multipler DnaJ-Proteine in
dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

von

Eva Düppre
aus Uchtelfangen

November 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2011

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in dass man viel Zeit und Mühe gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

(Albert Einstein)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Düppe, E., Rupprecht, E. and Schneider, D. Specific and promiscuous functions of multiple DnaJ proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 157, 1269-78 (2011).

Rupprecht, E., **Düppe, E.** and Schneider, D. Similarities and singularities of three DnaK proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 51, 1210-8 (2010).

Düppe, E., Rupprecht, E. and Schneider, D. How much DnaJ do we need in *Synechocystis* sp. PCC 6803? (2011). eingereicht

Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	15
1.1 Cyanobakterien und der Modellorganismus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	15
1.2 Proteinfaltung und Molekulare Chaperone	16
1.2.1 Chaperonfamilien	17
1.2.1.1 Die Familie der „Small-Heatshock-Proteins“ (sHsp).....	18
1.2.1.2 Die Familie der Hsp60-Proteine	19
1.2.1.3 Die Familie der Hsp90-Proteine	20
1.2.1.4 Die Familie der Hsp100-Proteine	21
1.2.1.5 Die Familie der Ribosom-assoziierten Chaperone.....	22
1.2.2 Die Familie der Hsp70-Proteine.....	24
1.2.2.1 Aufbau, Substrateigenschaften und Funktion der DnaK-Proteine.....	24
1.2.3 Die Familie der Hsp40-Proteine.....	28
1.2.3.1 Aufbau und Funktion der DnaJ Ko-Chaperone	29
1.2.4 Aufbau und Funktion des Nukleotidaustauschfaktors.....	31
1.2.4.1 Der DnaK-Chaperon-Zyklus	33
1.3 Ziele der Arbeit	35
2 Material und Methoden	37
2.1 Bakterienstämme.....	37
2.2 Plasmide	37
2.3 Oligonukleotide	40
2.4 Chemikalien, Enzyme, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	42
2.4.1 Chemikalien und Enzyme	42
2.4.2 Laborgeräte.....	42
2.4.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	43
2.4.4 Kits	44
2.5 Antikörper	44
2.6 Antibiotika und Medienzusätze	45
2.7 Nährmedien	45
2.7.1 <i>E. coli</i>	45
2.7.2 <i>Synechocystis</i> sp.	46
2.8 Kulturbedingungen	46
2.8.1 <i>E. coli</i>	46
2.8.2 <i>Synechocystis</i> sp.	46
2.9 Allgemeine molekularbiologische Methoden	46
2.9.1 Zellzahlbestimmung	46

2.9.1.1 Gesamtzellzahl	46
2.9.1.2 Optische Dichte	47
2.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
2.9.2.1 Kolonie-PCR.....	48
2.9.3 TA-Klonierung	48
2.9.4 DNA-Sequenzierung	48
2.9.5 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	48
2.9.6 Präparation von genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i>	49
2.9.7 Spektrometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	49
2.9.8 Restriktionsverdau	50
2.9.9 Erzeugung von „blunt-ends“ mittels Klenow-Enzym	50
2.9.10 Ligation	50
2.9.11 Agarosegelelektrophorese	51
2.9.12 Reisolation von DNA aus Agarosegelen.....	51
2.9.13 Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	52
2.9.13.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	52
2.9.13.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen	52
2.9.14 Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. Zellen	52
2.10 Biochemische Methoden	53
2.10.1 Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	53
2.10.2 <i>E. coli</i> -Zellaufschluss mittels Ultraschall	53
2.10.3 Aufbruch von <i>Synechocystis</i> -Zellen.....	53
2.10.4 Reinigung heterolog exprimierter Proteine aus <i>E. coli</i>	54
2.10.4.1 Affinitätschromatographie.....	54
2.10.4.2 Beladen von Säulenmaterial mit zweiwertigen Ionen.....	54
2.10.4.3 Umpuffern.....	54
2.10.4.4 Ionenaustausch-Chromatographie	55
2.10.4.5 Gelfiltration	55
2.10.5 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure und DOC	55
2.10.6 Proteinbestimmung	56
2.10.7 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes.....	56
2.10.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.10.9 Coomassie-Färbung	58
2.10.10 Western-Blot	58
2.10.10.1 Semidry-Blotting	59
2.10.10.2 Immunodetektion.....	59

2.10.11 Vorbereitung heterolog exprimierter DnaJ-Proteine aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 zur Herstellung von Antikörpern	60
2.10.12 Wachstumskurven	61
2.10.13 „Pull-Down“ Experimente	61
2.10.14 Steady State ATPase-Test	62
2.10.15 Promotoraktivitätsstudien.....	62
2.11 Spektroskopie.....	63
2.11.1 Absorptionsspektren	63
2.11.2 77K-Spektren	63
2.11.3 CD-Spektroskopie.....	64
3 Ergebnisse.....	65
3.1 Sieben kanonische DnaJ-Proteine sind im Genom des Cyanobakteriums <i>Synechocystis</i> sp. kodiert.....	65
3.2 <i>In vivo</i> Komplementationsstudien der sieben DnaJ-Proteine aus <i>Synechocystis</i> sp. ..	67
3.3 Disruption der sieben <i>dnaJ</i> -Gene aus <i>Synechocystis</i>	69
3.4 Doppeldeletion von zwei <i>dnaJ</i> -Genen aus <i>Synechocystis</i>	72
3.5 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Δ <i>dnaJ</i> -Stämme	74
3.6 Untersuchungen zur Pigmentzusammensetzung der Δ <i>dnaJ</i> -Stämme	76
3.7 Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von Δ <i>sll0897</i> bei Expression verkürzter <i>Sll0897</i> -Varianten	78
3.8 Zelluläre Lokalisation der DnaJ-Proteine in dem Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	84
3.9 <i>In vivo</i> Promotoraktivitätsstudien der <i>dnaJ</i> -Gene aus <i>Synechocystis</i>	86
3.10 Heterologe Expression der DnaJ-Proteine aus <i>Synechocystis</i> sp. in <i>E. coli</i>	88
3.11 Reinigung der DnaJ-Proteine	92
3.11.1 Reinigung des Typ I DnaJs <i>Sll0897</i>	92
3.11.2 Reinigung des Typ II DnaJ-Proteins <i>Slr0093</i>	95
3.11.3 Reinigung des Typ III DnaJ-Proteins <i>Sll0909</i>	97
3.11.4 Reinigung des Typ III DnaJ-Proteins <i>Sll1666</i>	99
3.11.5 Reinigung der DnaJ-Proteine <i>Sll1011</i> , <i>Sll1384</i> und <i>Sll1933</i>	101
3.12 Charakterisierung der gereinigten DnaJ-Proteine aus <i>Synechocystis</i> sp.....	102
3.12.1 Bestimmung der Schmelztemperatur mittels CD-Spektroskopie	102
3.13 Biochemische Charakterisierung der gereinigten DnaJ-Proteine	105
3.13.1 Gelfiltrationsanalysen der gereinigten DnaJ-Proteine.....	105
3.13.2 Affinitäts-„Pull-Down“ Untersuchungen.....	108
3.13.3 Einfluss der DnaJ-Proteine auf die ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins.....	109
4 Diskussion	113

4.1 Die sieben DnaJ-Proteine aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803: Einteilung und <i>in vivo</i> Charakterisierung	113
4.2 Identifizierung der minimal notwendigen Domänen des DnaJ-Proteins SII0897	119
4.3 Die zelluläre Lokalisation und die Stressantworten der DnaJ-Proteine	121
4.4 Reinigung der verschiedenen DnaJ-Proteine zur <i>in vitro</i> Charakterisierung	124
4.5 Thermostabilität und oligomerer Zustand der DnaJ-Proteine	125
4.6 Ein DnaJ-DnaK Interaktionsnetzwerk in <i>Synechocystis</i> sp.	129
4.7 Ein Chaperonnetzwerk in <i>Synechocystis</i> sp.	133
5 Zusammenfassung	137
6 Summary	139
7 Literaturverzeichnis	141
Danksagung	152
Lebenslauf	153

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
β-DM	Dodecyl-β-D-maltosid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
° C	Grad Celsius
ca.	circa
cat/cm ^R	Chloramphenicol
CD	„circular dichroism“
cm	zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTD	C-terminale Domäne
CV	„column volume“
Cys	Cystein
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
DSP	Dithiobis-(succinimidyl-propionat)
E	Einstein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
G/F	Glycin/Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde (hora)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HPD	Histidin-Prolin-Asparaginsäure
HRP	„horse radish peroxidase“
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
kDa	Kilo Dalton
km/km ^R	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
m	Meter
mAu	„milli absorption units“ (Milliabsorptionseinheiten)
MCS	„multiple cloning site“
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mS	Millisievert
N-	Amino-
NAC	„nascent-chain-associated complex“
NAD(H)	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NBD	Nukleotidbindedomäne
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose
nm	nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC	„Pasteur Culture Collection“
PCR	„polymerase chain reaction“
PDB	„Protein Data Bank“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pl	Isoelektrischer Punkt
PK	Pyruvatkinase

PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quartäres Ammonium
RAC	„ribosom-associated complex“
Rnase	Ribonuklease
rpm	„rotations per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBD	Substratbindedomäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHsp	„small heat shock protein“
SP	Sulfopropyl
sp.	Spezies
spc/spec ^R	Spectinomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	„Tris bufferd saline“
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TF	Trigger Faktor
TM	Transmembran
TPR	Tetratrikopeptid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Amino-Methan
U	„Unit“
UV/VIS	„ultraviolett/visible“
V	Volt
v/v	„volume per volume“
vgl.	Vergleiche
w/v	„weight per volume“
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
μE	Mikroeinsteinstunde
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Cyanobakterien und der Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Cyanobakterien stellen die größte Gruppe oxygener phototropher Bakterien dar (Hedges *et al.*, 2001; van de Meene *et al.*, 2006). Sie waren vermutlich die ersten sauerstofferzeugenden Organismen auf der Erde, weshalb sie von großer evolutionärer Bedeutung waren.

Cyanobakterien stellen geeignete Modellorganismen zur Untersuchung der oxygenen Photosynthese, wie sie auch in den Chloroplasten höherer Pflanzen abläuft, dar. Gemäß der Endosymbiontentheorie wird auf eine weitläufige Verwandtschaft der heutigen Cyanobakterien mit den Chloroplasten höherer Pflanzen geschlossen. Die endosymbiontische Aufnahme eines oxygenen phototrophen Organismus durch eine frühe Eukaryotenzelle führte dazu, dass diese photosynthetisch aktiv wurde. Aufgrund eines gemeinsamen Vorfahrs mit den Chloroplasten dienen Cyanobakterien als Modellorganismen, um Fragen bezüglich der Photosynthese, der Fixierung von Sonnenenergie und dem daraus resultierenden Energietransfer beantworten zu können (van de Meene *et al.*, 2006).

Sie weisen den Zellwandaufbau Gram-negativer Bakterien auf, besitzen aber auch eine entfernte, phylogenetische Verwandtschaft zu den Gram-positiven Bakterien (Mazon *et al.*, 2004; Madigan *et al.*, 2002). Neben der Cytoplasmamembran besitzen Cyanobakterien ein weiteres, internes Membransystem, die Thylakoidmembran (Stanier und Cohen-Bazire, 1977) (Abbildung 1), den Ort der photosynthetischen Elektronentransportkette. Eine Ausnahme stellt das Bakterium *Gloeobacter violaceus* dar, welches kein Thylakoidmembransystem besitzt und der photosynthetische Elektronentransport hier an bzw. in der Cytoplasmamembran erfolgt (Nakamura *et al.*, 2003; Rippka *et al.*, 1974).

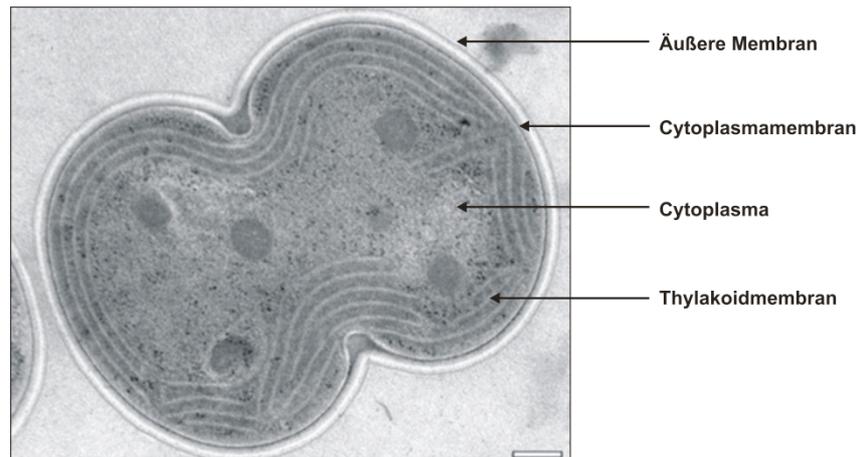


Abbildung 1: Transmissions-Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme einer sich teilenden *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zelle. Maßstab: 200 nm. (Verändert nach Kerfeld *et al.*, 2005)

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Organismus handelt es sich um das einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Das Genom dieses Bakteriums ist vollständig sequenziert und aufgrund der natürlichen Kompetenz ist eine einfache genetische Manipulation möglich, wobei fremde DNA durch homologe Rekombination in das Genom integrieren kann (Williams, 1988; Vermaas, 1994). Weitere Vorteile sind eine verglichen mit höheren Pflanzen relativ kurze Generationszeit von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und die Glukosetoleranz des verwendeten Stammes, weswegen eine Kultivierung unter heterotrophen Bedingungen möglich ist (Anderson und McIntosh, 1991).

1.2 Proteinfaltung und Molekulare Chaperone

Proteine sind wichtige Makromoleküle der Zelle und in fast jeden biologischen Prozess involviert. Die räumliche Struktur eines Proteins kann durch seine Aminosäuresequenz festgelegt sein (Anfinsen, 1973). Damit aus einer linearen Polypeptidkette ein funktionelles Protein entsteht, muss diese durch Faltung und „Zusammenbau“ in die native Konformation übergehen (Agashe und Hartl, 2000). Diese Beobachtung konnte für kleine Polypeptide mit einer einzigen Domäne und für einige größere und komplexere Proteine bestätigt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die meisten Proteine für eine effektive Faltung in einer biologisch relevanten Zeitspanne die Hilfe sogenannter molekularer Chaperone benötigen (Hartl *et al.*, 2011). Molekulare Chaperone sind Proteine, die nicht nativ gefaltete Proteine durch Interaktionen oder Stabilisierung zu einer nativen Konformation verhelfen. Die

Chaperone dissoziieren nach dem Faltungsprozess von ihren Substraten ab und stellen daher keine Komponente der assemblierten Proteine dar (Ellis und Hemmingsen, 1989; Hartl und Hayer-Hartl, 2009).

Molekulare Chaperone konnten in allen Organismen, von Bakterien bis zum Menschen, nachgewiesen werden. Die auch als Faltungshelfer bezeichneten Proteine sind in verschiedene Familien eingeteilt (Genevaux *et al.*, 2007). Viele verschiedene Familien strukturell nicht verwandter Chaperone kommen in einer Zelle vor und werden unter dem Begriff Hitzeschockproteine (Hsp) zusammengefasst. Aufgrund ihrer molaren Massen können sie in Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 sowie kleine Hsp-Proteine (sHsp) eingeteilt werden (Popp und Reinstein, 2009; Hartl *et al.*, 2011).

Chaperone können bei der *de novo* Faltung der naszierenden Polypeptidkette bei der Synthese an den Ribosomen helfen, steuern den Transport von Proteinen über Membranen, lösen Proteinaggregate auf und kontrollieren Konformationsänderungen bei Protein-Protein-Interaktionen (Kampinga und Craig, 2010). Neben ihrer Funktion bei physiologisch „normalen“ Bedingungen spielen molekulare Chaperone auch unter Stressbedingungen eine wichtige Rolle. Aufgrund von zellulären Stresssituationen, wie Temperaturänderungen oder Krankheiten, kann es zu Fehlfaltungen oder Aggregatbildungen von Proteinen kommen (Agashe und Hartl, 2000). In solchen Situationen wird die Expression molekularer Chaperone gesteigert.

1.2.1 Chaperonfamilien

Wie bereits beschrieben, werden molekulare Chaperone aufgrund ihrer molaren Massen in verschiedene Familien eingeteilt. Dabei stellen die Hsp70-Proteine eine wichtige Familie der Hsp-Proteine dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinbiogenese, sowie beim Transport und Abbau von Proteinen (Morano, 2007). Hsp40-Proteine stellen die Ko-Chaperone der Hsp70-Proteine dar und interagieren mit ihnen im Chaperonzyklus bei der Proteinfaltung (Kampinga und Craig, 2010). Hsp90-Proteine sind in Eukaryoten für den sekretorischen Weg und den zellulären Transport unter normalen Wachstumsbedingungen wichtig. Bei Stressbedingungen sorgen sie dafür, dass der Zellzyklus korrekt abläuft (McClellan *et al.*, 2007). In dem Bakterium *Escherichia coli* kooperieren die Hsp100-Proteine mit den Hsp70-Proteinen, um dadurch Proteinaggregate aufzulösen (Mayer, 2010). Hsp60-Proteine werden auch als Chaperonine bezeichnet und unterstützen ebenfalls den Ablauf der

Proteinfaltung (Horwich *et al.*, 2007, Saibil, 2008). Die aufgeführten Familien können in allen Organismen von Prokaryoten bis hin zu Eukaryoten gefunden werden. Archeen hingegen kodieren in ihrem Genom sHsp-Proteine („small-heatshock-proteins“) und Chaperonine (Hsp60), wohingegen bisher kein Hsp90-Protein identifiziert werden konnte. Proteine des Hsp70-Systems konnten in allen mesophilen und einigen thermophilen Archeen nachgewiesen werden (Popp und Reinstein, 2009). Neben den bisher genannten Hitzeschockproteinen kommen innerhalb der pro- bzw. eukaryotischen Zelle noch sogenannte Ribosom-assoziierte Chaperone vor, die am initialen Schritt des Faltungsprozesses beteiligt sind (Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Das System der molekularen Chaperone sorgt für einen effizienten Faltungsprozess der meisten Proteine. Chaperone der unterschiedlichen Familien üben dabei unterschiedliche Funktionen aus.

1.2.1.1 Die Familie der „Small-Heatshock-Proteins“ (sHsp)

Die kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) stellen die am weitesten verbreitete und gleichzeitig die am wenigsten konservierte Familie der Chaperone dar. Sie konnten bisher in allen Reichen (Prokaryoten, Eukaryoten und Archeen) mit Ausnahme einiger pathogener Bakterien gefunden werden. Die Einteilung von Proteinen in die Familie der sHsps erfolgt aufgrund der geringen molekularen Masse eines Monomers von 12-43 kDa (Haslbeck *et al.*, 2005). Obwohl sie bezüglich der Proteinsequenz und der Größe stark voneinander abweichen, weisen sie dennoch einige gemeinsame charakteristische Merkmale auf. Neben der geringen molaren Masse besitzen sie eine konservierte α -Kristallin-Domäne, die sich meist am C-terminalen Ende befindet und aus etwa 90 Aminosäureresten besteht (Haslbeck, 2002). Proteine der sHsp-Familie bilden große Oligomere von 200-800 kDa aus, die eine dynamische Quartärstruktur aufweisen (van Montfort *et al.*, 2001).

Die Funktion dieser Proteinfamilie besteht darin, in Stresssituationen, in denen sie vermehrt exprimiert werden, ungefaltete Proteine zu binden. Dadurch werden stabile Komplexe gebildet und eine irreversible Aggregation verhindert. „Small-Heatshock“-Proteine haben eine hohe Tendenz fehlgefaltete Proteine zu binden. Dabei wird ein nicht nativ gefaltetes Polypeptid von einem oligomeren sHsp-Komplex gebunden, wodurch das Polypeptid in einer für eine nachträgliche Faltung idealen Konformation gehalten wird, die durch das ATP-abhängige Hsp70-System vermittelt wird (Nakamoto und Vigh, 2007; Haslbeck *et al.*, 2005, van Montfort *et al.*, 2001).

Die Beteiligung kleiner Hitzeschockproteine konnte bei zahlreichen zellulären Prozessen nachgewiesen werden, weshalb ihre klinische Bedeutung gewachsen ist. Sie sind beim Schutz gegen oxidativen Stress und des Alterungsprozesses involviert. Außerdem haben sie einen Einfluss auf Apoptose und neuroprotektive Effekte (Haslbeck *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Die Familie der Hsp60-Proteine

Die auch als Chaperonine bezeichneten Hsp60-Proteine sind in allen Organismen zu finden und bestehen aus zylindrischen, fassähnlichen Oligomeren aus zwei gestapelten Ringkomplexen mit einer Größe im Megadaltonbereich. Jeder Ring enthält eine Kavität zur Einbindung nicht nativ gefalteter Proteine in einem ATP-abhängigen Prozess und dient dabei der Faltung der Proteine in eine native Konformation (Mayer, 2010; Saibil, 2008; Horwich *et al.*, 2007).

Aufgrund ihres evolutionären Ursprungs werden Chaperonine in zwei Gruppen eingeteilt: Proteine der Gruppe I sind in Prokaryoten, Mitochondrien und Plastiden zu finden. Zur Gruppe II gehören Proteine, die in Archeen und im Cytosol von Eukaryoten auftreten (Spiess *et al.*, 2004).

Ein bekannter Vertreter der Gruppe I ist das GroEL-Protein aus *E. coli*, welches wie alle Hsp60-Proteine dieser Gruppe Homooligomere mit sieben Untereinheiten (je 57 kDa) pro Ring bildet, wobei zwei Ringe zu einer fassähnlichen Struktur gestapelt sind. Somit ist die Struktur dieser Gruppe aus 14 identischen Untereinheiten aufgebaut. Das GroEL-Protein benötigt ein ringförmiges Ko-Chaperon, das GroES-Protein. Dieses Ko-Chaperon wirkt beim Faltungsprozess wie ein Deckel, wodurch das System auf GroEL und GroES eine geschlossene, hydrophobe Kammer zur Faltung von Proteinen bildet (Spiess *et al.*, 2004; Mayer, 2010). In Abbildung 2 ist der Prozess der Proteinfaltung in einem sogenannten „Käfig“ aus GroEL und GroES gezeigt. Nach Übertragung des Substrates von Hsp70-Proteinen auf GroEL kommt es durch Hydrolyse von sieben ATP-Molekülen zur einer Konformationsänderung und einer Umlagerung von GroES vom *trans* zum *cis* GroEL-Ring. Eine erneute ATP-Hydrolyse bewirkt eine erneute Konformationsänderung, die zur Dissoziation des GroES vom *cis* GroEL-Ring und damit der Freisetzung des nativen Proteins führt.

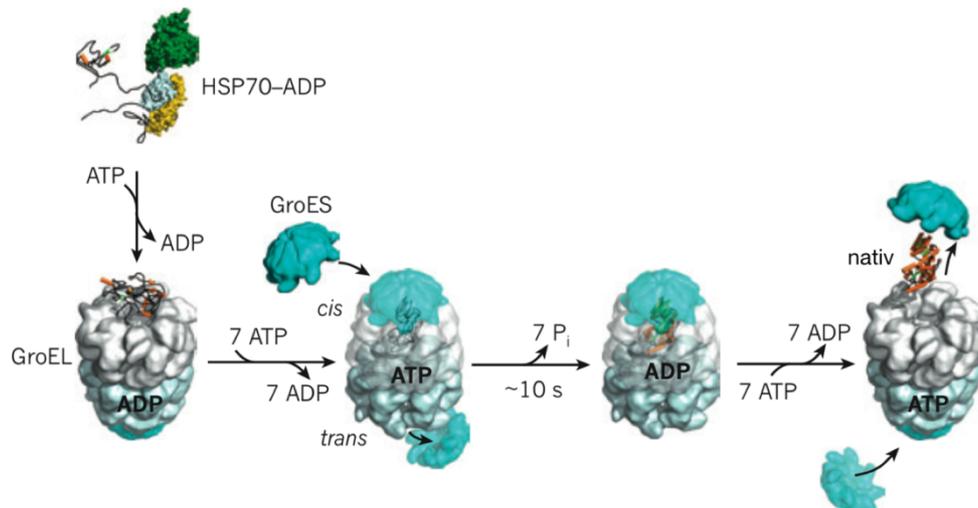


Abbildung 2: Faltungsmechanismus des Hsp60-Chaperonin Komplexes aus GroEL und GroES in *E. coli*. Das von Hsp70-Chaperonen gebundene Substrat wird auf GroEL übertragen. Zur Konformationsänderung und Umlagerung von GroES werden sieben ATP-Moleküle benötigt. Durch Bindung von GroES an den *cis* GroEL-Ring wird das Substrat in dem GroEL-Fass gebunden. Nach ATP-Hydrolyse und Umlagerung von GroES an den *trans* GroEL-Ring wird das native Protein freigesetzt. (Verändert nach Hartl *et al.*, 2011)

Chaperone der Gruppe II bilden Homo- oder Heterooligomere mit 8-9 Untereinheiten (57-62 kDa) pro Ring. Dazu gehört z. B. das TRiC-Protein („TCP1 ring complex“), welches im Cytosol von Eukaryoten lokalisiert ist. Ein weiterer Vertreter ist das CCT-Protein („Chaperon containing TCP1“), welches im Thermosom von Archeen vorkommt. Chaperonine der Gruppe II benötigen keinen Ko-Chaperon. Sie besitzen stattdessen einen Einschub in der apikalen Domäne, der als Deckel fungieren kann (Gutsche *et al.*, 1999). Der Unterschied zu Gruppe I ist dabei, dass eine ATP-Hydrolyse zur Schließung der fassähnlichen Kammer notwendig ist und nicht wie bei Gruppe I die Bindung von ATP und GroES erforderlich (Mayer, 2010).

1.2.1.3 Die Familie der Hsp90-Proteine

Proteine der Hsp90-Familie kommen z. B. als TRAP1 in der mitochondrialen Matrix, als Hsc82 oder Hsp82 im Cytosol von Hefen oder als HtpG im Cytosol von Bakterien vor. Innerhalb der eukaryotischen Zelle sind Hsp90-Proteine essentiell für die Aktivierung vieler Signalproteine. Hsp90-Proteine bilden Homodimere aus, die mit den 190 C-terminalen Aminosäureresten ihrer internen Untereinheit in Kontakt treten. Am N-Terminus befindet sich eine hoch konservierte 25 kDa große Domäne mit einer ATP-Bindestelle (Young *et al.*, 2001; Pearl und Prodromou, 2006).

Hsp90-Proteine stellen eine zentrale Komponente eines komplexen Chaperon-systems dar, dessen Funktion und Mechanismus bisher nur wenig verstanden ist

(Jakob *et al.*, 1995). Obwohl die Struktur von Hsp90 weitestgehend aufgeklärt werden konnte, ist bisher unklar, wie diese Chaperone ihre Substrate erkennen und deren Konformation beeinflussen (Prodromou *et al.*, 1996). Es ist bekannt, dass sie native, sich in der Nähe befindliche Substratproteine zu einem späten Zeitpunkt des Faltungsprozesses binden (McClellan *et al.*, 2007).

Die Aktivität eukaryotischer Hsp90-Proteine ist von der Wechselwirkung mit Proteinen der Hsp70-Familie über Ko-Chaperone (Hop/Sti1, p23, Cdc37) abhängig (Pearl und Prodromou, 2006). Das am besten untersuchte Ko-Chaperon von Hsp70 und Hsp90 stellt das sogenannte Hop/Sti1-Protein („Hsp70/Hsp90 Organizing Protein“) dar. Es wurde zuerst in Hefen identifiziert und fungiert hier als ein Adapter, der das Hsp90 zu einem Hsp70-Proteinkomplex im Cytoplasma dirigiert (Odunuga *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004). Das Ko-Chaperon Hop/Sti1 und ihm homologe Proteine besitzen ein charakteristisches Strukturmotiv, welches Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Dabei handelt es sich um ein neunfaches „helix-turn-helix Tetratrikopeptid-Motiv“ (TPR) (McClellan *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2001; Odunuga *et al.*, 2004).

1.2.1.4 Die Familie der Hsp100-Proteine

Die Funktion der Hsp100-Proteine ist am besten in Bakterien untersucht, aber auch in Eukaryoten sind Hsp100-Proteine konserviert. Hsp100 oder auch Clp/Hsp100-Proteine gehören zur AAA⁺-Superfamilie. Dabei handelt es sich um Enzyme, die Prozesse wie Bewegung, Entwinden, Abbau und Entfaltung von Proteinen katalysieren (Ogura und Wilkinson, 2001). Clp/Hsp100-Proteine haben einen konservierten strukturellen Kern, der als AAA⁺-Modul bezeichnet wird und bilden große hexamere Ringstrukturen. Die Untereinheiten der Ringstrukturen sind annähernd identisch um den Ring angeordnet (Maurizi und Xia, 2004).

Die Clp/Hsp100-Proteinfamilie wird aufgrund ihrer Funktionen in zwei Unterfamilien, ClpB/Hsp104 und ClpA (ClpA, ClpC, ClpX und HslU) eingeteilt. Mitglieder von ClpB wechselwirken in Zusammenarbeit mit den Hsp70-Chaperonen, um Proteine, die nach Stresssituationen aggregiert sind, wieder in Lösung zu bringen. Proteine der ClpA-Familie haben eine entfaltende Wirkung auf Proteine und interagieren mit Proteasen wie ClpP oder ClpQ (HslV), um die ATP-abhängige Proteolyse zu steuern (Maurizi und Xia, 2004; Lee *et al.*, 2004). Eine weitere Einteilung kann aufgrund der Anzahl von AAA⁺-Modulen gemacht werden. Zur Klasse 1 gehören Proteine mit zwei

AAA⁺-Modulen, wie ClpA, ClpB/Hsp104 und ClpC. Im Gegensatz zur Klasse 1 weist die Klasse 2 mit den Proteinen ClpX und ClpY (HslU) nur ein AAA⁺-Modul auf (Lee *et al.*, 2004). ClpB/Hsp104-Proteine haben neben den beiden Modulen eine zusätzliche charakteristische Domäne. Diese besteht aus zwei entgegengesetzt verlaufenden α -helikalen „coiled-coil“ Strukturen, die ähnlich eines Propellers angeordnet sind (Lee *et al.*, 2003; Maurizi und Xia, 2004).

1.2.1.5 Die Familie der Ribosom-assoziierten Chaperone

Diese Chaperon-Familie dient der Stabilisierung der wachsenden Polypeptidkette am Ribosom und ist damit in einen initialen Schritt des Faltungsprozesses involviert. Ribosom-assoziierte Chaperone kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vor (Hartl und Hayer-Hartl, 2009; Craig *et al.*, 2003). Jedoch weisen weder die in Pro- noch in Eukaryoten gefundenen Ribosom-assoziierten Chaperone eine Homologie bezüglich ihrer Sequenz oder Struktur auf. Dennoch zeigen sie funktionell ähnliche Mechanismen bei der Interaktion mit der großen ribosomalen Untereinheit. Dabei handelt es sich um einen hoch konservierten Mechanismus, der in Bakterien und Chloroplasten von dem sogenannten „Trigger“-Faktor (TF) und in Eukaryoten von einem speziellen Hsp70-System übernommen wird (Wegrzyn und Deuerling, 2005). In Eukaryoten stellt dieser Mechanismus ein Zusammenspiel von zwei Ribosom-assoziierten Chaperonsystemen, dem RAC („ribosom-associated complex“) und dem heterodimeren NAC („nascent-chain-associated complex“) dar. Der eukaryotische RAC-Komplex besteht aus dem Hsp70/40-Paar Ssz und Zuo, welches mit dem weiteren Hsp70-Protein Ssb interagiert. Zusammen bilden die drei Proteine Ssz/Zuo/Ssb die sogenannte ribosomale Chaperonen-Triade (Gautschi *et al.*, 2002; Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Zusätzlich dazu interagiert der NAC-Komplex sowohl mit dem Ribosom als auch mit der wachsenden Polypeptidkette. Die genaue Funktion dieses Systems ist bislang jedoch noch nicht geklärt und wird lediglich aufgrund der Interaktion mit dem Ribosom und der Polypeptidkette vorgeschlagen (Kramer *et al.*, 2009).

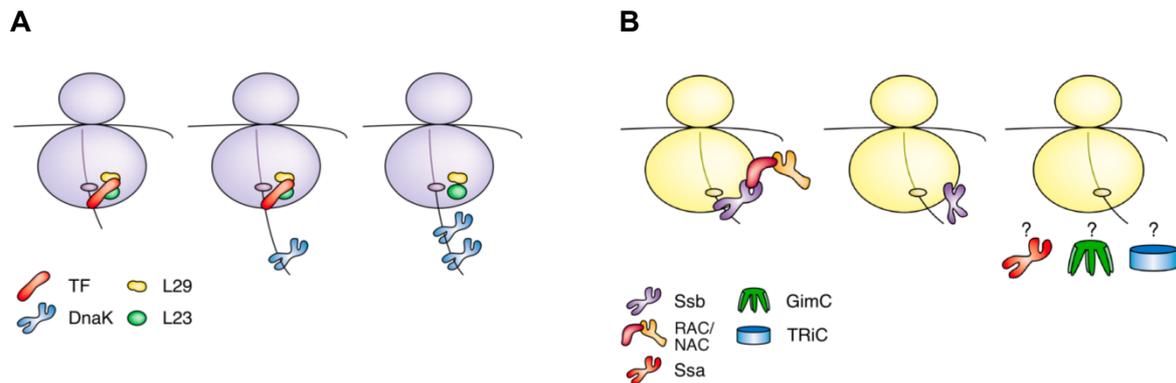


Abbildung 3: Modell der Funktionsweise der Ribosom-assoziierten Chaperone in Prokaryoten (A) und Eukaryoten (B). **A:** Prokaryoten: Im ersten Schritt bindet der „Trigger“-Faktor (rot) an die Proteine L23 (grün) und L29 (gelb) am Ausgangstunnel des Ribosoms. Im Cytosol binden sowohl in An- als auch in Abwesenheit des TF DnaK-Proteine (blau) an die wachsende Polypeptidkette. **B:** Eukaryoten: Ein Chaperonsystem aus RAC und NAC (bordeaux und orange) stellt einen Komplex aus Hsp70 und Hsp40-Protein dar (Ssz/Zuo), der zusammen mit einem weiteren Hsp70-Chaperon (Ssb: lila) an den Ausgangstunnel am Ribosom bindet. Ohne RAC kann das Ssb nicht mit der wachsenden Polypeptidkette interagieren. (Verändert nach Craig *et al.*, 2003)

Ein schematischer Vergleich beider Systeme in Pro- und Eukaryoten ist in Abbildung 3 dargestellt. Das bakterielle „Trigger“-Faktor-System interagiert mit allen wachsenden Polypeptidketten, die das Ribosom am Ausgangstunnel verlassen. Deletionsstudien in *E. coli* haben gezeigt, dass das TF-Protein nicht essentiell ist, da ein Δtig -Stamm bei normaler Wachstumstemperatur lebensfähig ist (Deuerling und Bukau, 2004). Bei dem TF handelt es sich um ein aus drei Domänen aufgebautes Protein mit einer molekularen Masse von 48 kDa. Es kommt sowohl in einer dimeren Form vor, in der es frei im Cytosol vorliegt, als auch in einer monomeren, Ribosom-assoziierten Form. Am N-Terminus befindet sich das sogenannte „TF-signature“-Motiv (GFRxGxxP) und ein Helix-Schleifen-Helix Element. Das „TF-signature“-Motiv dient der Bindung des „Trigger“-Faktors an die ribosomalen Proteine L23 und L29 am Ausgangstunnel des Ribosoms. Der mittlere Abschnitt des Proteins besteht aus einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase). Den größten Teil stellt jedoch der C-terminale Abschnitt dar, der zwei helikale Bereiche besitzt. Der „Trigger-Faktor“ besitzt zur Bindung der wachsenden Polypeptidkette keine einzelne Substratbindedomäne, sondern dazu eine innere Oberfläche, die eine Kavität bildet und sowohl einen hydrophoben als auch hydrophilen Charakter aufweist. Die Freisetzung der Polypeptidkette wird durch einen ATP-unabhängigen Schritt katalysiert (Young *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2010; Hartl und Hayer-Hartl, 2009).

1.2.2 Die Familie der Hsp70-Proteine

Die Hsp70-Proteine stellen die vielseitigste und ubiquitär vorkommende Familie der Hitzeschockproteine dar. Hsp70-Proteine werden sowohl konstitutiv als auch stressinduziert exprimiert (Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Sie weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und teilen sich einen biochemischen Aktivitätsmechanismus. Dieser Mechanismus stellt einen Zyklus (Abbildung 9) aus ATP-abhängiger Substratbindung und Freisetzung dar (Kampinga und Craig, 2010).

In dem Bakterium *E. coli* wurden die Hitzeschock-Gene ursprünglich als Wirtsgene identifiziert, die für die Initiation der Replikation des Bakteriophagen λ verantwortlich sind. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass ihre Produkte zur Familie der Hitzeschockproteine zählen, die während des Evolutionsprozesses stark konserviert wurden (Wall *et al.*, 1994; Zylicz *et al.*, 1989). Das Hsp70-Protein aus *E. coli* ist das am besten untersuchte und wird als DnaK-Protein bezeichnet. Für den Chaperonzyklus benötigen Hsp70-Proteine die Hilfe sogenannter Ko-Chaperone. Diese werden als Hsp40- bzw. DnaJ-Proteine und als Nukleotidaustauschfaktor (GrpE) bezeichnet (Genevaux *et al.*, 2007). Erstmals wurden die Gene der Chaperone 1977 in *E. coli* im Zusammenhang mit „Missense“-Mutationen (*dnaK756*, *dnaJ259* und *grpE280*) beschrieben (Georgopoulos, 1977; Sunshine *et al.*, 1977; Saito und Uchida, 1977).

1.2.2.1 Aufbau, Substrateigenschaften und Funktion der DnaK-Proteine

Die Funktion der DnaK-Proteine stellt einen allosterischen Mechanismus aus ATP-Bindung und Hydrolyse dar, wodurch die Bindung und Freisetzung hydrophober Polypeptidabschnitte reguliert wird. (Smock *et al.*, 2011). Das DnaK-Protein aus *E. coli* besteht aus 638 Aminosäuren und hat eine molare Masse von 69,1 kDa. Der N-terminale Abschnitt mit einer molaren Masse von 41,6 kDa wird auch als Nukleotidbindedomäne (NBD) bezeichnet. Die Bindung von ATP bzw. ADP erfolgt an der Nukleotidbindedomäne, welche eine geringe ATPase-Aktivität aufweist. Durch Bindung des Nukleotidaustauschfaktors (GrpE) wird eine offene Konformation der NBD stabilisiert, welche dadurch eine geringe Affinität zur Nukleotidbindung besitzt (Harrison, 2003). Der C-terminale Abschnitt stellt die Substratbindedomäne (SBD) mit einer molaren Masse von 12,3 kDa dar. Diese Domäne folgt eine C-terminale Subdomäne, die als Deckel („Lid“) (14,3 kDa) bezeichnet wird. Am C-Terminus des

DnaK-Proteins befindet sich zusätzlich ein dynamischer und flexibler Bereich aus 33 Aminosäuren (Schweizer *et al.*, 2011). Die Nukleotidbindedomäne und die Substratbindedomäne sind über ein kurzes, hoch konserviertes Verbindungsmotiv („Linker“), den sogenannten Interdomänenlinker verbunden (Smock *et al.*, 2011; Van Durme *et al.*, 2009; Aponte *et al.*, 2010; Broadley und Hartl, 2009; Bertelsen *et al.*, 1999). Die Struktur der beiden Domänen NBD und SBD und der Linkerregion wurde mittels Kristallographie und NMR-Analysen des bovinen Hsc70 aufgeklärt (Bertelsen *et al.*, 2009; Flaherty *et al.*, 1994; Bertelsen *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1996). Die Gesamtstruktur des *E. coli* DnaK-Proteins wurde durch Bertelsen *et al.* gelöst. Es konnte gezeigt werden, dass beide Domänen locker über eine dynamische „random coil“-Struktur miteinander verbunden sind (Bertelsen *et al.*, 2009). Abbildung 4 zeigt die schematische Anordnung der Domänen (A) und die Proteinstruktur (B) des DnaK-Proteins aus *E. coli*.

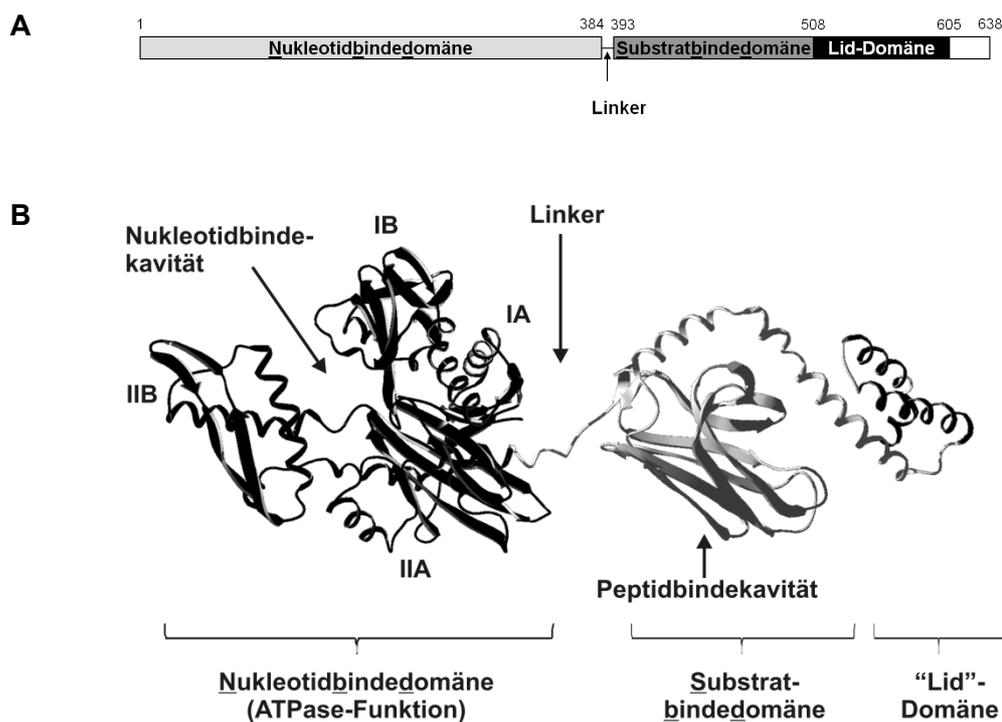


Abbildung 4: Domänen- und Proteinstruktur des DnaK-Proteins aus *E. coli*. **A:** Schematische Anordnung der Domänen innerhalb des DnaK-Proteins. **B:** Proteinstruktur des DnaK-Proteins aus *E. coli* (PDB-Nummer: 2KHO). In beiden Darstellungen ist N-terminal die Nukleotidbindedomäne (NBD) mit der ATPase-Funktion gezeigt. Gefolgt von der Linker-Sequenz und der Substratbindedomäne (NBD). Am C-Terminus ist die „Lid“-Domäne gezeigt, die aus drei α -Helices besteht. (Verändert nach Aponte *et al.*, 2010)

Die Nukleotidbindedomäne besteht aus zwei annähernd gleich großen, in je zwei weitere Domänen unterteilte Bereiche (IA, IB, IIA, IIB), welche durch eine Kavität getrennt sind (Abbildung 4). Die Bindung eines Nukleotides (ATP oder ADP) in Verbindung mit einem Mg^{2+} und zwei K^{+} -Ionen erfolgt innerhalb der Kavität und sorgt

für eine Interaktion mit allen vier Subdomänen der NBD (Flaherty *et al.*, 1990; Zhang und Zuiderweg, 2004; Bertelsen *et al.*, 2009).

Die Substratbindedomäne (Abbildung 1) ist N-terminal aus zwei Subdomänen aufgebaut, die durch eine helikale Linkerregion verbunden sind. Der N-terminale Abschnitt der SBD besteht aus einem kompakten „ β -Sandwich“ aus acht antiparallelen β -Strängen, welche zwei β -Faltblattstrukturen ausbilden, die über Schleifenregionen miteinander verbunden sind. Die beiden inneren Schleifen des zweiten β -Faltblattes ragen aus der Struktur heraus. Zwischen den beiden β -Faltblattstrukturen befindet sich eine polypeptidbindende Kavität. Diesem N-terminalen Abschnitt folgen fünf α -Helices (A-E). Helix A und B gehören zum N-terminalen Abschnitt der Peptidbindedomäne und stabilisieren das „ β -Sandwich“ über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Der C-terminale Teil der Substratbindedomäne besteht aus drei α -Helices (C-E), welche die „Lid“-Domäne ausbilden. Die letzten 33 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins stellen einen sehr flexiblen und dynamischen Teil des DnaK-Proteins dar, dessen Funktion bisher jedoch unklar ist (Schweizer *et al.*, 2011; Rüdiger *et al.*, 1997; Zhang und Zuiderweg, 2004).

Hsp70-Proteine erkennen denaturierte oder teilweise denaturierte Polypeptide. Dabei binden sie an exponierte hydrophobe Bereiche von fehlgefalteten oder aggregierten Peptidabschnitten (Van Durme *et al.*, 2009; Rüdiger *et al.*, 1997). DnaK-Proteine binden bevorzugt Peptide aus vier bis fünf Aminosäuren, die eine Konsensussequenz aus einem charakteristischen Kern hydrophober Aminosäuren, wie Leucin oder Valin und zwei flankierenden basischen Resten aufweisen. Dieses Muster kommt durchschnittlich etwa alle 36 Aminosäuren vor, so dass die meisten Proteine eine oder mehrere dieser Erkennungsmuster besitzen (Schweizer *et al.*, 2011; Rüdiger *et al.*, 1997). Gragerov *et al.* identifizierten ein Substratpeptid aus den Aminosäuren NRLLLTG, welches eine starke Bindung mit DnaK eingeht. Kristallisationsstudien zeigten, dass das DnaK aus *E. coli* mit den in gestreckter Konformation vorliegenden NRLLLTG-Peptiden komplexiert (Gragerov *et al.*, 1994; Landry *et al.*, 1992). Dabei lagern sich die hydrophoben Aminosäuren des Polypeptides an der hydrophoben Substratbindetasche des DnaK-Proteins an und die basischen Reste interagieren mit der negativen Ladung im äußeren Bereich der Substratbindetasche. Abbildung 5 A zeigt das DnaK-Protein mit einem gebundenen Substrat (NRLLLTG) und die vergrößerte Darstellung der Peptidbindekavität (B).

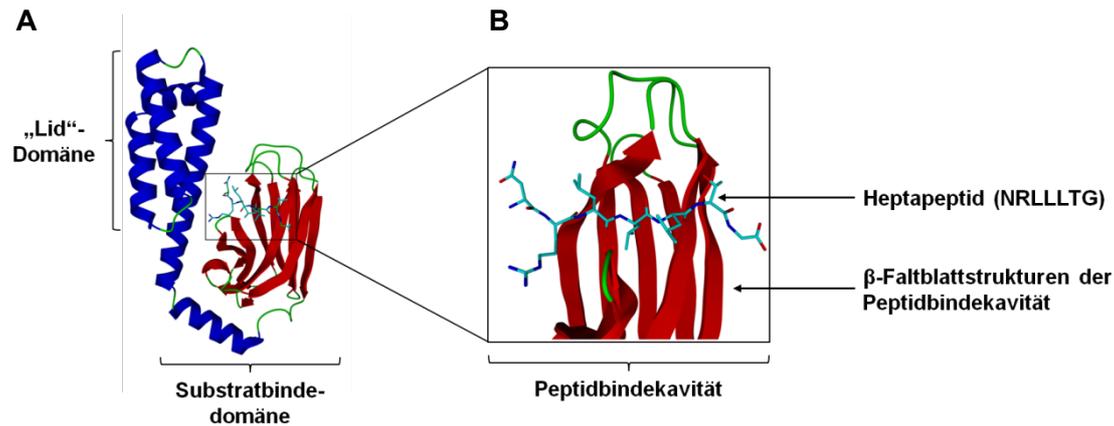


Abbildung 5: Bindung eines Substratpeptides an das DnaK-Protein. A: Substratbindedomäne des DnaK mit einem gebundenen Substrat (hellblau, stabförmig) und den drei C-terminalen Helices der „Lid“-Domäne (blau). B: Detailansicht des β-„Sandwich“ (rot) der Peptidbindekavität mit dem Heptapeptid (NRLLLTG) (hellblau). (Verändert nach Van Durme et al., 2009)

Die Funktion der DnaK-Proteine besteht darin, Aggregationen von nicht nativ gefalteten Proteinen durch Interaktion mit den hydrophoben Bereichen zu verhindern, die Faltung von Proteinen in einen nativen Zustand zu unterstützen und bereits aggregierte Proteine zu lösen und erneut in den Faltungsprozess zu einschleußen (Erbse *et al.*, 2004). Die Interaktion eines Hsp70-Proteins mit einem nicht nativ gefalteten Substrat verhindert die Aggregation durch die ATP-unabhängige Bindung der hydrophoben Abschnitte. Dadurch werden diese Proteinbereiche vor unspezifischen intramolekularen Wechselwirkungen abgeschirmt. Ein DnaK-Protein, das diese Funktion ausübt wird aufgrund seiner „Halte-Funktion“ auch als „Holdase“ bezeichnet. Hsp70-Proteine spielen bei der Faltung eine eher passive Rolle, indem sie wiederholt an das Substrat binden und es erneut freilassen. Durch den Zyklus aus wiederholtem Binden und Freilassen wird die Konzentration freier Substrate reduziert und dadurch Aggregatbildungen verhindert (Genevaux *et al.*, 2007; Slepnev und Witt, 2002 ; Mayer und Bukau, 2005).

Eine weitere Funktion der Hsp70-Proteine wird als „Falter“-Funktion („Foldase“) bezeichnet. Dabei unterstützen Hsp70-Proteine nicht nativ gefaltete Protein-Zwischenstufen während des Faltungsprozesses eine native Konformation zu erreichen. Der Zyklus aus Substratbindung und Freisetzung führt dazu, dass das Substrat lokal entfaltet und dann in einem nativen Zustand gehalten wird (Sharma *et al.*, 2009; Mayer und Bukau, 2005). Neueste Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesem Prozess nicht um eine „Falter“-, sondern vielmehr um eine „Entfalter“-Funktion („Unfoldase“) handelt. Bei der Interaktion des DnaK-Proteins mit seinen Ko-Chaperonen wird ein großer Bereich des Polypeptides unter ATP-Hydrolyse lokal

entfaltet, welcher nach Freisetzung spontan in seine native Konformation übergeht oder erneut in den Chaperon-Zyklus eingeschleußt wird (Sharma *et al.*, 2010; Baneyx und Nannenga, 2010; Sharma *et al.*, 2009).

1.2.3 Die Familie der Hsp40-Proteine

Um ihre Funktion innerhalb des ATP-abhängigen Zyklus (Abbildung 9) ausüben zu können benötigen Hsp70-Proteine die Hilfe sogenannter Ko-Chaperone. Eine wichtige Klasse von Ko-Chaperonen stellen die Proteine der Hsp40-Familie dar (Craig *et al.*, 2006). Diese auch als DnaJ-Proteine bezeichneten Chaperone spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung, Entfaltung und der Assemblierung von Proteinen, sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen (Walsh *et al.*, 2004). Hsp40-Proteine werden nach dem Hauptvertreter und am besten untersuchten Hsp40-Protein, dem DnaJ aus *E. coli* benannt. Innerhalb einer Zelle kommen DnaJ-Proteine in größerer Anzahl als DnaK-Proteine vor. Diese DnaJ-Proteine weisen einen hohen Grad an Sequenz- und Strukturunterschieden auf. Der Mensch besitzt z. B. elf Hsp70-Proteine und 41 DnaJ-Proteine und das Genom der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für zehn DnaK-Proteine und 22 DnaJ-Proteine (Walsh *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2006). Auch bei Prokaryoten ist das Vorhandensein multipler DnaJ-Proteine bekannt. So besitzt z. B. das Bakterium *E. coli* drei DnaK-ähnliche Proteine und sechs DnaJ-Proteine (Qiu *et al.*, 2006). Cyanobakterien wie beispielsweise *Synechococcus elongatus* PCC 7942, welches drei DnaKs und vier DnaJs in seinem Genom kodiert, weisen ebenfalls multiple DnaJ-Proteine auf (Watanabe *et al.*, 2007). Weitere Cyanobakterien mit multiplen DnaJ-Proteinen sind z. B. *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 bzw. *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 mit vier bzw. sechs DnaJ-homologen Proteinen (Cyanobase: <http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/>). In dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 werden drei DnaK-Proteine und mindestens zwölf DnaJ-ähnliche Proteine kodiert (Kaneko *et al.*, 1996). Das Vorkommen multipler DnaJ-Proteine vergrößert das Wirkungsspektrum der Hsp70-Chaperone (Walsh *et al.*, 2004; Kampinga und Craig, 2010).

1.2.3.1 Aufbau und Funktion der DnaJ Ko-Chaperone

DnaJ-Proteine weisen untereinander eine eingeschränkte Sequenzhomologie auf, wobei alle DnaJs eine sogenannte J-Domäne, die der Proteinfamilie den Namen gab und zur Interaktion mit DnaK erforderlich ist, besitzen. Zusätzlich zeichnen sich DnaJ-Proteine durch das Vorkommen weiterer Domänen aus. Anhand der Domänenstruktur werden sie ausgehend vom Aufbau der *E. coli* DnaJ-Proteine historisch in drei Typen unterteilt (Cheetham und Caplan, 1998). Abbildung 6 zeigt die schematische Domänenstruktur der DnaJ-Proteine und die Klassifizierung der drei Typen. DnaJ-Proteine des Typs I weisen die im Haupt-DnaJ aus *E. coli* vorkommenden vier Domänen auf. Dabei handelt es sich um die typische N-terminale J-Domäne, eine Glycin-Phenylalanin-reiche Region (G/F) gefolgt von einer Cystein-reichen Region (CYS) und einer C-terminalen Domäne (CTD). DnaJ-Proteinen des Typs II fehlt die Cystein-reiche Region und Typ III DnaJ-Proteine besitzen einzig die typische J-Domäne, welche innerhalb des Proteins variabel lokalisiert sein kann. Zusätzlich können Typ III-Proteine noch weitere Domänen, wie z. B. eine Transmembrandomäne oder ein TPR-Motiv aufweisen. Typ I und Typ II DnaJ-Proteine besitzen ähnliche Funktionen und können nicht nativ gefaltete Substrate binden. Die Proteine des Typ III zeigen keine Bindung nicht nativ gefalteter Polypeptide und wirken daher nicht als selbständige Chaperone (Qiu *et al.*, 2006).

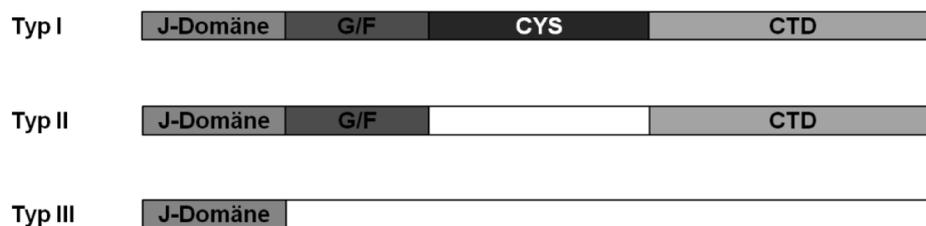


Abbildung 6: Domänenstruktur der drei DnaJ-Protein Klassen (Cheetham und Caplan, 1998). Typ I DnaJ-Protein besitzen eine charakteristische J-Domäne, eine Glycin-Phenylalanin-reiche Region (G/F), eine Cystein-reiche Domäne (CYS) und eine C-terminale Domäne (CTD). Typ II DnaJ-Proteinen fehlt die CYS-Domäne und Typ III Proteine weisen lediglich die J-Domäne auf.

Die Struktur der charakteristischen J-Domäne des DnaJ-Proteins aus *E. coli* wurde mit Hilfe von NMR-Analysen gelöst. Später konnte auch die Struktur der J-Domäne des humanen Hsp40, Hdj1, geklärt werden (Szyperski *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1996). Alle bisher gelösten Strukturen zeigen, dass die J-Domäne aus vier α -Helices (I-IV), die aus etwa 70 Aminosäuren bestehen, aufgebaut ist

(Abbildung 7). Helix II weist eine geladene Oberfläche mit mindestens einem Paar basischer Aminosäurereste auf, die für eine Interaktion mit der ATPase-Domäne der Hsp70-Proteine essentiell ist (Genevaux *et al.*, 2002). Zwischen Helix II und III befindet sich ein konserviertes Tripeptidmotiv aus den Aminosäuren His-Pro-Asp (HPD). Das HPD-Motiv ist für eine Stimulierung der ATPase Aktivität des DnaK-Proteins erforderlich.

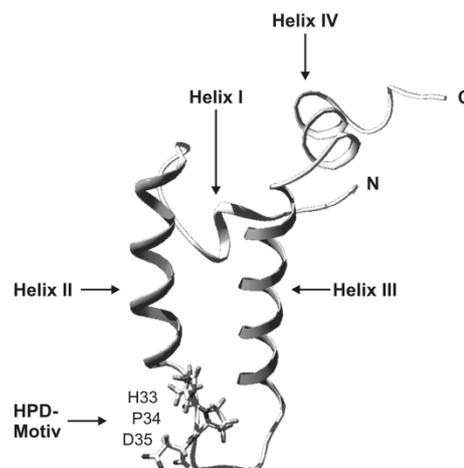


Abbildung 7: Struktur der J-Domäne des DnaJ-Proteins aus *E. coli*. Die J-Domäne besteht aus vier α -Helices. Zwischen Helix II und III liegt das charakteristische HPD-Motiv aus den Aminosäuren Histidin an Position 33 (H33), Prolin an Position 34 (P34) und Aspartat an Position 35 (D35) dargestellt. PDB-Nummer: 1XBL

Der beschriebenen J-Domäne schließt sich eine Glycin- und Phenylalanin-reiche Region (G/F) an, die etwa 40 % Glycin- und 15 % Phenylalaninreste aufweist (Cheetham und Caplan, 1998). Im Gegensatz zur J-Domäne zeigt die G/F-Domäne eine flexible, ungeordnete Struktur mit variabler Länge (Szyperski *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999). Die genaue Funktion der G/F-Domäne ist bisher jedoch nur wenig verstanden. Zusammen mit der J-Domäne bewirkt sie eine maximale Stimulierung der ATPase Aktivität des DnaK. Es wird vermutet, dass die G/F-Domäne eine strukturelle Veränderung der J-Domäne bewirkt und dadurch eine geordnete Struktur annimmt (Huang *et al.*, 1999). Die auf die G/F-Domäne folgende Cystein-reiche Domäne (CYS) ist aus vier Wiederholungen der Aminosäurenabfolge CxxCxGcG aufgebaut, die ein Zinkfinger-Motiv darstellen (Bardwell *et al.*, 1986; Ohki *et al.*, 1986). Diese Domäne ist für die spezifische Erkennung und Bindung an denaturierte Proteine notwendig (Szabo *et al.*, 1996). Am C-terminalen Ende eines DnaJ-Proteins befindet sich eine Verlängerung, die aus zwei fassartigen Domänen (CTD I und CTD II) aufgebaut ist. Die C-terminale Domäne CTD I besitzt eine hydrophobe Bindetasche für Substratproteine und weist eine Zinkfinger-Domäne auf, die

ebenfalls an der Substratbindung involviert ist (Kampinga und Craig, 2010). Diese Domäne ist auch für die Dimerisierung verantwortlich, wodurch das DnaJ-Protein als Homodimer seine Funktion ausüben kann (Genevaux *et al.*, 2007).

1.2.4 Aufbau und Funktion des Nukleotidaustauschfaktors

Ein weiteres Ko-Chaperon des DnaK-Proteins stellt der Nukleotidaustauschfaktor (NEF) dar. In dem Bakterium *E. coli* wird er als GrpE-Protein bezeichnet und ist für das Wachstum des Organismus essentiell (Saito und Uchida, 1977; Ang und Georgopoulos, 1989). Das bakterielle GrpE-Protein besitzt eine molare Masse von etwa 22 kDa (Schonfeld *et al.*, 1995). GrpE-Proteine aus Pro- und Eukaryoten weisen eine relativ geringe Sequenzidentität im Vergleich mit den Identitäten in anderen Chaperonfamilien, wie etwa den Hsp70-Proteinen, auf (Laloraya *et al.*, 1994). Nukleotidaustauschfaktoren der eukaryotischen Hsp70-Proteine (Bag1) oder der prokaryotischen DnaK-Proteine (GrpE) vermitteln den Austausch von ADP zu ATP. Dabei handelt es sich um einen entscheidenden Schritt im Hsp70-vermittelten Faltungsprozess von nicht nativ gefalteten Substraten. Die Bindung eines Substrates an ein DnaK-Protein wird durch die ATPase-Aktivität des DnaKs reguliert. Dieser Schritt wiederum ist abhängig von der Funktion des GrpE-Proteins. Im ADP-gebundenen Zustand besitzt DnaK eine hohe Affinität zu seinem Substrat. Der Austausch des Nukleotides ADP zu ATP und die damit verbundene Freisetzung des Substrates werden durch das GrpE-Protein vermittelt, indem das dimere GrpE mit dem DnaK interagiert (Nakamura *et al.*, 2003; Mayer und Bukau, 2005; Willmund *et al.*, 2007; Liberek *et al.*, 1991). GrpE weist eine hohe Affinität zu DnaK-ADP auf, bindet an das DnaK-Protein und stabilisiert so die offene Konformation der Nukleotidbindekavität von DnaK (Harrison, 2003).

Die Struktur des *E. coli* GrpE-Proteins wurde in Ko-Kristallisation mit der ATPase-Domäne des DnaKs von Harrison *et al.* gelöst (Harrison *et al.*, 1997). Das GrpE-Dimer kann dabei in vier Domänen unterteilt werden (Abbildung 8). Am N-Terminus befindet sich eine unstrukturierte Region, die durch den hydrophoben Charakter vermutlich für eine Interaktion mit der Substratbindedomäne des DnaKs verantwortlich ist (Brehmer *et al.*, 2004). Dieser unstrukturierten Domäne folgen lange gepaarte α -Helices. Für die Paarbildung benötigen sie vermutlich das Vier-Helix-Bündel, welches für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist und die langen gepaarten α -Helices stabilisiert (Nakamura *et al.*, 2010). Das Vier-Helix-

Bündel ist aus jeweils zwei kurzen α -Helices eines GrpE-Monomers aufgebaut. Am C-Terminus befindet sich eine β -Faltblatt-Region, über die der Großteil der Interaktion mit der ATPase-Domäne des DnaK-Proteins stattfindet. Weitere Interaktionen erfolgen über das Vier-Helix-Bündel des GrpE-Proteins mit der Domäne IIB des DnaK und den oberen Bereichen der langen α -Helices des GrpEs mit den Schleifen-Regionen der Nukleotidbindedomäne. Der Bereich der Domäne IIB des DnaK-Proteins wird auch als GrpE-Erkennungsmotiv bezeichnet (Gelinias *et al.*, 2002; Brehmer *et al.*, 2004, Mehl *et al.*, 2003; Buchberger *et al.*, 1994).

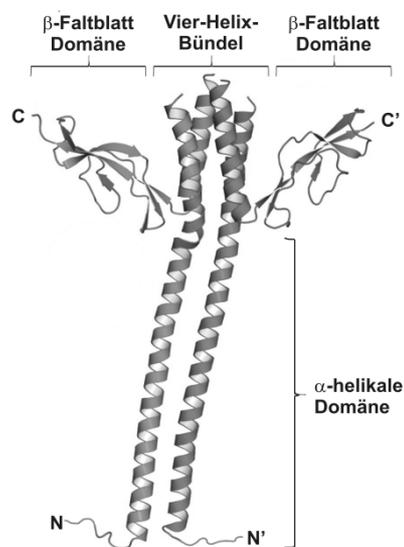


Abbildung 8: Struktur des dimeren GrpE-Proteins aus *E. coli* (verändert nach Nakamura *et al.*, 2010). Am N-Terminus befinden sich unstrukturierte Bereiche, gefolgt von der α -helikalen Domäne aus zwei langen gepaarten α -Helices und dem zentralen Vier-Helix-Bündel. C-terminal befinden sich die kompakten β -Faltblatt Domänen.

Die Interaktion von GrpE mit der geschlossenen Nukleotidbindekavität des DnaKs erfolgt durch eine einfache Konformationsänderung der Domäne IIB des DnaKs (Abbildung 4). Die Bindestelle, die auch als GrpE-Signatur-Motiv bezeichnet wird, stellt die verlängerte Schleife der IIB-Domäne dar (Brehmer *et al.*, 2001). Durch diese Konformationsänderung werden die über drei Aminosäure-Seitenketten vermittelten Bindungen von DnaK mit Adenin und den Riboseringen des Nukleotids zerstört. Dies führt zu einer festen Komplexbildung von GrpE und DnaK, die lediglich durch ATP gelöst werden kann (Zylicz *et al.*, 1987; Voos *et al.*, 1994). Die Bindung von GrpE an DnaK steigert den Austausch von ADP zu ATP um das 5000-fache (Packschies *et al.*, 1997).

Das GrpE-Protein übernimmt innerhalb des Chaperonzykluses die Rolle eines Thermosensors. Innerhalb des *E. coli* GrpE-Proteins finden daher bei niedrigen Temperaturen bis zu dem Optimum bei etwa 40 °C, vollständig reversible Konformationsänderungen statt (Grimshaw *et al.*, 2003). Diese Konformationsänderungen führen dazu, dass das GrpE-Protein vorübergehend nicht mit der Nukleotidbindedomäne des DnaK interagieren kann und so der Komplex aus DnaK, ADP und Substrat stabilisiert wird (Groemping und Reinstein, 2001). Vergleichende Untersuchungen zur Thermostabilität der GrpE-Proteine aus dem mesophilen Bakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 und dem thermophilen Bakterium *Thermosynechococcus elongatus* BP1 zeigten, dass unterschiedliche Domänen die Funktion des Thermosensors übernehmen. So konnte gezeigt werden, dass in *Synechocystis* sp. die gepaarten α -Helices für die Dimerisierung verantwortlich sind und als Thermosensor fungieren, wohingegen in *Thermosynechococcus elongatus* diese Funktion durch das Vier-Helix-Bündel übernommen werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Übergang zur monomeren GrpE-Form und damit der Funktionsverlust des GrpE-Proteins in *Synechocystis* in einem Schritt abläuft (Barthel *et al.*, 2011).

1.2.4.1 Der DnaK-Chaperon-Zyklus

Der DnaK-Chaperon-Zyklus (Abbildung 9) beschreibt die Interaktionen von Hsp70-Proteinen (DnaK), Hsp40-Proteinen (DnaJ) und dem Nukleotidaustauschfaktor (GrpE) bei der Faltung von Substraten. Die ATP-abhängige Chaperonaktivität des DnaK-Proteins wird durch die Ko-Chaperone DnaJ und GrpE reguliert (Mayer, 2010; Kampinga und Craig, 2010). Die Ko-Chaperone bewirken, dass es innerhalb des Faltungsprozesses durch das DnaK zu einem alternierenden Prozess aus ATP-Hydrolyse und ADP-Austausch kommt. Die Bindung des DnaJ-Proteins an ein nicht nativ gefaltetes Substrat über die CYS und CTD-Domäne stellt den ersten Schritt innerhalb des Zyklus dar (1.2.3.1, S. 29). Der DnaJ-Substrat-Komplex wird zur Substratbindedomäne des DnaKs transportiert, welches in einer ATP-gebundenen Form eine geringe Affinität zum Substrat aufweist (Acebron *et al.*, 2008; Han und Christen, 2003; Laufen *et al.*, 1999). Die Interaktion der N-terminalen J-Domäne mit der ATPase-Domäne innerhalb der Nukleotidbindedomäne des DnaK-Proteins bewirkt eine Steigerung der ATP-Hydrolyse um mehr als das 1000-fache (Laufen *et al.*, 1999). Dies bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb der Substratbinde-

domäne des DnaKs, woraufhin sich die α -helikale „Lid“-Domäne schließt und ein stabiler Komplex aus DnaK-ATP und Substrat vorliegt. Das DnaJ-Protein dissoziiert von diesem Komplex ab und kann erneut Substrate binden und in den Zyklus einschleusen. Die daraus resultierende ADP-gebundene Form des DnaKs weist eine hohe Affinität zum Substrat auf (Genevaux *et al.*, 2007; Kampinga und Craig, 2010). Die Freisetzung des Substrates wird erst durch die Interaktion des Ko-Chaperons GrpE mit DnaK katalysiert. GrpE interagiert mit der ATPase-Domäne des DnaK und bewirkt eine Konformationsänderung. Dadurch kommt es zu einer Dissoziation des ADPs und des Substrates. Durch den Austausch des Nukleotids und die erneute Bindung eines ATPs wird das DnaK-Protein wieder in seinen Ausgangszustand überführt und steht für einen weiteren Zyklus zur Verfügung.

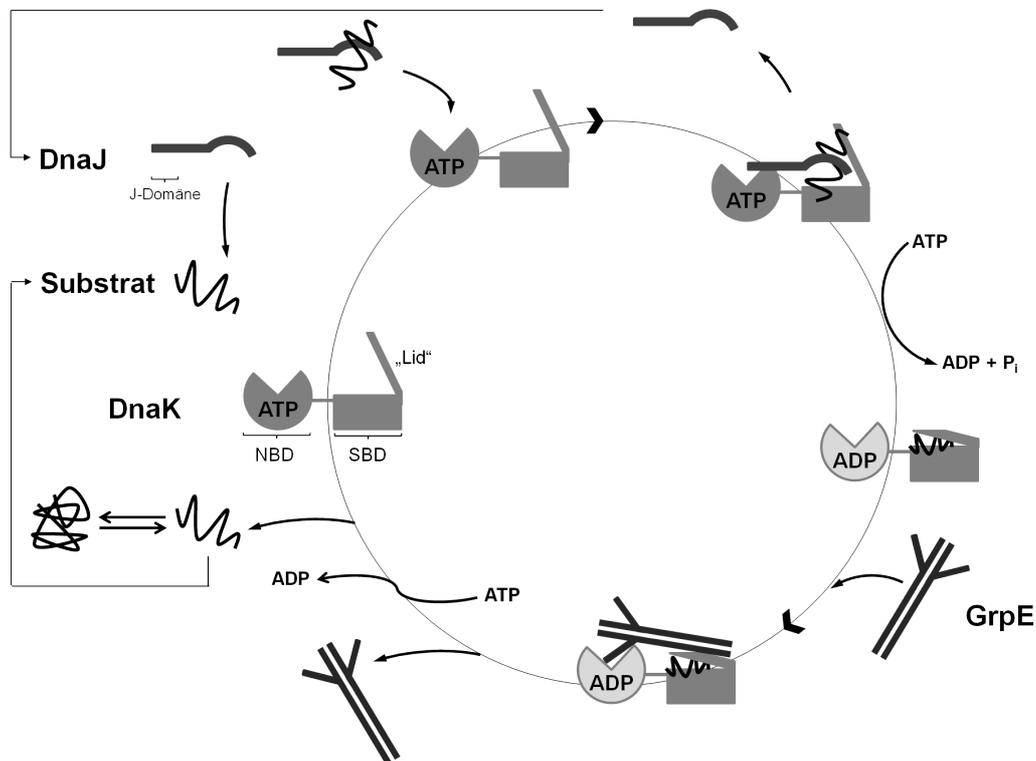


Abbildung 9: Zyklischer Reaktionsmechanismus des DnaK-Proteins und seiner Ko-Chaperone DnaJ und GrpE. Im ersten Schritt liegt das DnaK-Protein in der ATP-gebundenen Form vor und die Substratbindedomäne (SBD) mit der C-terminalen „Lid“-Domäne ist offen. Das DnaJ-Protein bindet über die C-terminale Region nicht nativ gefaltete Substrate und dirigiert diese zur SBD des DnaK. Über eine Interaktion des charakteristischen HPD-Motivs der J-Domäne mit der Nukleotidbindedomäne (NBD) des DnaK bewirkt das DnaJ eine gesteigerte ATP-Hydrolyse innerhalb des DnaKs. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und einer Schließung der SBD über die „Lid“-Domäne. Die Interaktion des GrpE-Proteins über die β -Faltblattregion mit der NBD des DnaKs führt erneut zu einer Strukturänderung im DnaK und einer Freisetzung des Substrates und des ADPs. Durch erneutes Binden von ATP liegt das DnaK wieder im Ausgangszustand vor.

1.3 Ziele der Arbeit

Innerhalb des Genoms des in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 werden multiple DnaK und DnaJ-Proteine kodiert. Bisher ist jedoch wenig über die Funktion der Proteine und über mögliche Interaktionen untereinander bekannt. In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass die drei DnaK-Proteinen aus *Synechocystis* sp. mit dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE interagieren und dem DnaK2 eine Hauptfunktion bei Hitzestress zukommt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das DnaK3 (SII1932) in *Synechocystis* an den Membranen lokalisiert ist (Rupprecht *et al.*, 2007).

Durch Interaktion von DnaK und DnaJ-Proteinen kann das Vorkommen multipler DnaJ-Proteine aufgrund vieler Kombinationsmöglichkeiten das Wirkungsspektrum von DnaK-Proteinen erhöhen. Daher sollten in dieser Arbeit die sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis*, die eine charakteristische J-Domäne aufweisen näher untersucht werden. Komplementationsstudien mittels eines temperatursensitiven *E. coli* Δ *dnaJ*-Stammes sollten Hinweise zur Funktion der sieben DnaJ-Proteine liefern.

Erste Informationen über essentielle Funktionen einzelner Proteine sollten durch Generierung von Deletionsstämmen und der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Deletionsstämme bei unterschiedlichen Temperaturen erhalten werden. Die Auswirkungen der Mutationen der *dnaJ*-Gene auf die Pigmentzusammensetzung sollte mit Hilfe von Absorptions- und 77 K-Spektren untersucht werden. In einem weiteren Schritt sollten Stämme, in denen das endogene *dnaJ* *sII0897* vollständig deletiert ist und die an einer neutralen Stelle im Genom verkürzte Versionen des DnaJ SII0897 exprimieren, erzeugt werden. Auch diese Stämme sollten bezüglich ihres Wachstumsverhaltens bei unterschiedlichen Temperaturen charakterisiert werden, um die für ein Wachstum minimal notwendigen Domänen zu identifizieren.

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern sollte die subzelluläre Lokalisation der sieben DnaJ-Proteine innerhalb des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. untersucht werden, um anhand möglicher Ko-Lokalisationen mit DnaK-Proteinen erste Interaktionspartner zu identifizieren. Studien mit Promotor-Reporterstämmen der einzelnen *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* sollten Hinweise auf das Expressionsverhalten der Proteine bei unterschiedlichen Stressbedingungen liefern.

Des Weiteren sollten geeignete Bedingungen zur heterologen Expression der sieben DnaJ-Proteine in *E. coli* und zur nativen Reinigung der Proteine getestet und etabliert werden. Untersuchungen der gereinigten Proteine bezüglich ihrer Thermostabilität sollten Erkenntnisse zur Struktur und Stabilität der Proteine liefern. Innerhalb des Chaperonzyklus interagieren DnaJ-Proteine mit den nicht nativ gefalteten Substraten und den DnaK-Proteinen als Dimer (Zylicz *et al.*, 1985; Bardwell *et al.*, 1986; Ohki *et al.*, 1986). Daher sollten die gereinigten Proteine mittels Gelfiltrations- sowie Western-Blot-Analysen auf ihre oligomere Struktur hin überprüft werden. Erste Hinweise auf Interaktions-Netzwerke zwischen den DnaK und den DnaJ-Proteinen sollten mittels „Pull-Down“ Analysen mit gereinigten Proteinen ermittelt werden

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Escherichia coli* und *Synechocystis* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Standard-Klonierungen wurden mit dem Stamm DH5 α durchgeführt. TA-Klonierungen erfolgten mit DH5 α Zellen oder Nova Blue Singles™-Zellen. Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden BL21(DE3)-Zellen oder HMS174(DE3)-Zellen verwendet.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme sowie deren Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Referenz/Anbieter
DH5 α	F ⁻ Φ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) Rif ^R phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	Hanahan, 1983
NovaBlue Single™	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^f ZDM15::Tn10] (Tet ^R)	Novagen®, Darmstadt
BL21 (DE3) pLysE	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysE (Cam ^R)	Groberg und Dunn, 1988
HMS174 (DE3) pLysS	F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (DE3) pLysS (CamR, Rif R)	Studier und Moffatt, 1986
OD259 (Δ dnaJ)	MC4100 dnaJ::Tn10 DcbpA::Kan ^R Dara714 araD139	Kelley und Georgopoulos, 1997
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Wildtyp	"The Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC)"

2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten und konstruierten Plasmide sowie deren Ausgangsplasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide sowie deren Eigenschaften und Herkunft

Plasmid	Resistenzen	Charakteristika und integrierte Gene	Herkunft
TA-Klonierungsplasmide			
pCR® 2.1-TOPO	Amp ^R , Kan ^R	lineares Plasmid mit 3' T-Überhangen und kovalent gebundener Topoisomerase, lacZ α Fragment zur Blau-Weiß Selektion	Invitrogen, Darmstadt
pGEM®-T Easy	Amp ^R	lineares Plasmid mit 3' T-Überhangen, lacZ α Fragment zur Blau-Weiß Selektion	Promega, Mannheim
pSTBlue-1 AccepTor™	Amp ^R , Kan ^R	lineares Plasmid mit 3' U-Überhangen, lacZ α Fragment zur Blau-Weiß Selektion	Novagen, Darmstadt

Expressionsplasmide			
pRSET6aNT-HisMCS	Amp ^R	Abwandlung von pRSET6a mit „Multiple Cloning Site“ und His-Tag kodierender Sequenz	Prodöhl <i>et al.</i> , 2007
pRSET6a	Amp ^R	Derivat von pBlueScript KS+ und pRSET	AG Schneider, Universität Mainz
pET19b	Amp ^R	T7-Promotor, His-Tag kodierende Sequenz	Novagen, Darmstadt
pILA	Kan ^R	<i>luxAB</i> , RS1 und RS2 zur homologen Rekombination	Kunert <i>et al.</i> , 2000
pMalpAcYc	Cat ^R	Fusion aus pACYC184 (<i>HincII</i> und <i>HindIII</i>) und pMal-p2X (<i>MscII</i> und <i>HindIII</i>)	AG Schneider, Mainz
<i>dnaJ</i>-Expressionsplasmide			
pRSET-His-slr0093	Amp ^R	<i>slr0093</i> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	Rupprecht, 2007
pRSET6aNT-HisMCS-sll0897	Amp ^R	<i>sll0897</i> (<i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>) über <i>HindIII</i> („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) und <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pET19b-sll0909	Amp ^R	<i>sll0909</i> (<i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>) über <i>HindIII</i> („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) und <i>NdeI</i>	Rupprecht, 2007
pRSET6aNT-HisMCS-sll1011	Amp ^R	<i>sll1011</i> (<i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>) über <i>HindIII</i> („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) und <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pRSET-His-sll1384	Amp ^R	<i>sll1384</i> (<i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>) über <i>HindIII</i> („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) und <i>NdeI</i>	Rupprecht, 2007
pRSET-His-sll1666-TM	Amp ^R	verkürztes <i>sll1666</i> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	Rupprecht, 2007
pRSET-His-sll1933	Amp ^R	<i>sll1933</i> (<i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>) über <i>HindIII</i> („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) und <i>NdeI</i>	Rupprecht, 2007
Plasmide für Einzel- und Doppeldisruptionen der <i>dnaJ</i>-Gene			
pCR [®] 2.1-slr0093cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>slr0093</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>HincII</i>	Rupprecht, 2007
pCR [®] 2.1-sll0897cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sll0897</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>HpaI</i>	Rupprecht, 2007
pCR [®] 2.1-sll0909cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sll0909</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>StuI</i>	Rupprecht, 2007
pCR [®] 2.1-sll1011cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sll1011</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>AfeI</i>	Rupprecht, 2007

pCR [®] 2.1-sII1384cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sII1384</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>HpaI</i>	Rupprecht, 2007
pCR [®] 2.1-sII1666cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sII1666</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>AfeI</i>	Rupprecht, 2007
pCR [®] 2.1-sII1933cm ^R	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sII1933</i> unterbrochen durch Insertion einer <i>cat</i> -Resistenzkassette über <i>AsiSI</i> (beides „blunt-end“ mit Klenow-Polymerase)	diese Arbeit
pSpecI	Spc ^R	R100.1-Plasmid mit <i>spc</i> ^R über <i>SmaI</i>	Prentki und Krisch, 1984
pCR [®] 2.1-slr0093spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>slr0093</i> (geschnitten mit <i>HincII</i>) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
pCR [®] 2.1-sII0897spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>sII0897</i> (geschnitten mit <i>HpaI</i>) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
pCR [®] 2.1-sII0909spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>sII0909</i> (geschnitten mit <i>StuI</i>) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
pCR [®] 2.1-sII1011spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>sII1011</i> (geschnitten mit <i>AfeI</i>) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
pCR [®] 2.1-sII1384spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>sII1384</i> (geschnitten mit <i>HpaI</i>) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
pCR [®] 2.1-sII1666spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>sII1011</i> (geschnitten mit <i>AfeI</i>) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
pCR [®] 2.1-sII1933spec ^R	Amp ^R , Kan ^R , Spc ^R	<i>sII1933</i> (geschnitten mit <i>AsiSI</i> , „blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) unterbrochen durch Insertion einer <i>spc</i> -Resistenzkassette (geschnitten mit <i>SmaI</i>)	diese Arbeit
<i>dnaJ</i>-Plasmide für Domänen-exprimierende Stämme			
pILA-sII0897_1-195	Kan ^R	Nukleotide 1-195 von <i>sII0897</i> (J-Domäne) über <i>PstI</i> und <i>XbaI</i>	diese Arbeit
pILA-sII0897_1-408	Kan ^R	Nukleotide 1-408 von <i>sII0897</i> (J + GF-Domäne) über <i>PstI</i> und <i>XbaI</i>	diese Arbeit
pILA-sII0897_1-660	Kan ^R	Nukleotide 1-660 von <i>sII0897</i> (J, GF + CYS-Domäne) über <i>PstI</i> und <i>XbaI</i>	diese Arbeit
pILA-sII0897_1-1134	Kan ^R	Nukleotide 1-1134 von <i>sII0897</i> (J, GF, CYS + CTD-Domäne) über <i>PstI</i> und <i>XbaI</i>	diese Arbeit

pGEM [®] -T Easy-sII0897cm ^R del	Amp ^R , Kan ^R , Cat ^R	<i>sII0897</i> deletiert durch eine <i>cat</i> -Resistenzkassette („blunt-end“ mit Klenow-Polymerase) über <i>HincII</i> und <i>Sspl</i>	diese Arbeit
<i>dnaJ</i>-Plasmide zur funktionellen Komplementation			
pMalpAcYc-dnaJEC	Cat ^R , Kan ^R	<i>dnaJEC</i> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pMalpAcYc-slr0093	Cat ^R , Kan ^R	<i>slr0093</i> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	Rupprecht, 2007
pMalpAcYc-sII0897	Cat ^R , Kan ^R	<i>sII0897</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	Rupprecht, 2007
pMalpAcYc-sII0909	Cat ^R , Kan ^R	<i>sII0909</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	Rupprecht, 2007
pMalpAcYc-sII1011	Cat ^R , Kan ^R	<i>sII1011</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	Rupprecht, 2007
pMalpAcYc-sII1384	Cat ^R , Kan ^R	<i>sII1384</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	Rupprecht, 2007
pMalpAcYc-sII1666-TM	Cat ^R , Kan ^R	verkürztes <i>sII1666</i> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	Rupprecht, 2007
pMalpAcYc-sII1933	Cat ^R , Kan ^R	<i>sII1933</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	Rupprecht, 2007
Plasmide mit den Promotorregionen der <i>dnaJ</i>-Gene			
pILA-slr0093prom	Kan ^R	Promotor von <i>slr0093</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007
pILA-sII0897prom	Kan ^R	Promotor von <i>sII0897</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007
pILA-sII0909prom	Kan ^R	Promotor von <i>sII0909</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007
pILA-sII1011prom	Kan ^R	Promotor von <i>sII1011</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007
pILA-sII1384prom	Kan ^R	Promotor von <i>sII1384</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007
pILA-sII1666prom	Kan ^R	Promotor von <i>sII1666</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007
pILA-sII1933prom	Kan ^R	Promotor von <i>sII1933</i> über <i>PstI</i> und <i>KpnI</i>	Rupprecht, 2007

2.3 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen Biomers und MWG Biotech.

Tabelle 3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotide. Die Sequenzen sind jeweils in 5'→ 3' Orientierung angegeben.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Primer zur Amplifikation der <i>Synechocystis</i> und <i>E. coli dnaJ</i>-Gene	
5' slr0093	ATAGGC CATATG GCATCA ACAGAT TTCAA G
5' sII0897	ATAGGC CATATG CCTGGG GATTAT TACCAA AC
5' sII0909	ATAGGC CATATG GACGAC CTCACC ATCTAC
5' sII1011	ATAGGC CATATG CAAGAG TTTTCC CACTAT TAC
5' sII1384	ATAGGC CATATG AGCTCG TTTCCC ATCAAG

5' sll1666	ATATGC CATATG GCCCCT TCTCCT TTTGC
5' sll1933	ATATGC CATATG GAACAA GTGCGG AATTAT TATC
3' slr0093	ATACGG GATCCT TATGCC AACAAA TTGGCG
3' sll0897	ATACGA AGCTTT ATTTAT GGAATA ATCCCC CTAAAA ATC
3' sll0909	ATACGA AGCTTT AAACCC CTAATT GTTCTT TTAAAT C
3' sll1011	ATACGA AGCTTT AACTAT GCTTAG TGCCAT CG
3' sll1384	ATACGA AGCTTT ATTTCT TTTTGC CCGCG
3' sll1666-TM	ATACGA GATCTT TACTCC CCCGCC GACAAA GG
3' sll1666fl	CGTGCC TCGAGT TAGTTG ATGAAC CATGGT AAC
3' sll1933	ATAGCA AGCTTT AAAAAT CAAAGA ACTTTT GCCG
5' dnaJ_EC	CCGCAT ATGGCT AAGCAA GATTAT TACG
3' dnaJ-EC	GCCGGA TCCTTA GCGGGT CAGGTC GTC
Primer zur Amplifikation der sll0897-Domänen	
3' sll0897fl	TAGACT AGTGCT CATTTA TGGAAT AATCCC C
3' sll0897ohneCTD	TAGACT AGTTTA CCGTAA ACCAGC ATCTCC TTC
3' sll0897ohneCYSCTD	TAGACT AGTTTA CTCACA GACCTG ACAGGA TTC
3' sll0897ohneGFCYSCTD	TAGACT AGTTTA GGCAAA ATCGCC CATATT GCC
5' sll0897dom	TCATGC CTGCAG GGTGGA CTATGG CATTAT CG
Primer zur Kontrolle der kompletten Segregation in <i>Synechocystis</i>	
pLA_SeqCheck	GCTGTT ACAATT CCCCTT TCC
pLA_SeqCheck2	CCCAAC AGATTG CCTTTG AC
5' sll0897+	AAAATC TCAGCA CCCAG AAA
3' sll0897+	AAAAGT GGGGCA AAAGGT CAT
Primer zur Amplifikation der Resistenzkassetten	
5' cm ^R	CACTTT GCGCCG AATAAA TACC
3' cm ^R	TTACGC CCCGCC CTGCC
Primer zur Amplifikation der <i>Synechocystis</i> dnaJ-Promotoren	
5' slr0093prom	TATGCC TGCAGA GGGTTT GCTGAT TTGCC
5' sll0897prom	ATATGC CTGCAG GCAAAT CAAAGC GGCCGG
5' sll0909prom	ATATGC CTGCAG GGAAAA TCGTAG GGTTGG CC
5' sll1011prom	ATGCCT GCAGCG AAGCTT CGGGAA CTGG
5' sll1384prom	TATGCC TGCAGC GATCTC ATCGAT GTGGCC
5' sll1666prom	TATGCC TGCAGC CAAAAT AACCGG CAATTT GC
5' sll1933prom	TATGCC TGCAGC GACGAT CGCCGT TCTAGC
3' slr0093prom	ATACGG GTACCT GGTCAC TCCCAA AATTTG G
3' sll0897prom	ATACGG GTACCG CGTCAC TCCAAG CGTTTG G
3' sll0909prom	ATACGG GTACCT CTTCTT CTTCCG GACTTG
3' sll1011prom	ATACGG GTACCT CTAGCC CCAGGA TTTC
3' sll1384prom	ATACGG GTACCC GTCATA ATTAAA CAGTCC TTG
3' sll1666prom	ATACGG GTACCA AAACAC CGTAAT AACTGT C

3' sll1933prom	ATACGG GTACCG GGAAC TCCCAA AATTTG
Sequenzierprimer	
T7_term	CTAGTT ATTGCT CAGCGG T
T7	TAATAC GACTCA CTATAG GG
SP6-18er	ATTTAG GTGACA CTATAG
SP6-24er	CATACG ATTTAG GTGACA CTATAG
T7_prom	TAATAC GACTCA CTATAG GG
spec ^R -intern	GCTGCC ATTCTC CAAATT GC

2.4 Chemikalien, Enzyme, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

2.4.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Verwendet wurden die Enzyme der Firmen Finnzymes (Espoo, Finnland), Gibco (Invitrogen, Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich, USA), sowie Stratagene (La Jolla, USA).

2.4.2 Laborgeräte

Die Herkunft und Bezeichnung der in der Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 4 alphabetisch aufgeführt.

Tabelle 4: Die wichtigsten in der vorliegenden Arbeit verwendeten Laborgeräte.

Gerät mit Bezeichnung	Hersteller
FPLC-Systems ÄKTApurifier™ 10	GE Healthcare, Freiburg
Brutschrank B28	Binder, Tuttlingen
Mini Beadbeater	Biospec Products, Kanada
Elektrophoresekammern: Mini-Protean® 3 Cell Mini-Protean® Tetra Cell PerfectBlue Gelsystem Mini S, M, L	Bio-Rad, München PeqLab, Erlangen
Elektrophorese-Netzgeräte PowerPac Basic™ peqPower 300 Volt	Bio-Rad, München PeqLab, Erlangen
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Lumineszenz-Spektrometer Aminco Bowman Series 2 Fluorimeter	Thermo Spectronic
Agarosegel-Dokumentationssystem Quantum	PeqLab, Erlangen
CD Spektropolarimeter J-815	Jasco, Gross-Umstadt

Chemilumineszenz-Dokumentationssystem Stella	Raytest, Straubenhardt
Brutschrank Economic Delux, ECD01E	Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande
Inkubationsschüttler Multitron HAT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Sauerstoff-Elektrode fiber-optic oxygen meter	PreSens, Regensburg
pH-Meter pH 211 Microprocessor	Hanna instruments, Kehl am Rhein
Photometer Lambda 35 UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Waltham, USA
SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler Primus 25	PeqLab, Erlangen
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Ultraschall-Aufbruchspitze und -gerät Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Zentrifugen: Allegra® X-15R Centrifuge Avanti® J-26 XP Optima™ L Series Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP Ultrazentrifuge 5415R 5424	Beckmann Coulter, Krefeld Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenrotoren: 70 Ti 90 Ti JA-25.15 JA-25.50 JLA-8.1000 JLA-16.250 MLA-130 TLA-100 F-45-24-11 FA-45-24-11	Beckman Coulter, Krefeld Eppendorf, Hamburg

2.4.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Braun (Melsungen), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (AG & Co, Nümbrecht) und VWR (Darmstadt) bezogen.

2.4.4 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
High-Speed Plasmid Mini kit	Avegene, Taiwan
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Darmstadt
pSTBlue-1 AccepTor™ Vector Kit	Novagen, Darmstadt
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene, Taiwan
JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Kit, Midi	Genomed, Löhne

2.5 Antikörper

In den nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper und Antikörper-Konjugate aufgeführt, so wie deren in Western-Blot-Analysen eingesetzten Verdünnungen (Tabelle 6 und Tabelle 7).

Tabelle 6: In der vorliegenden Arbeit verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	gerichtet gegen	Eigenschaft	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Anti-DnaK1	DnaK1	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:5000
Anti-DnaK2	DnaK2	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:5000
Anti-DnaK3fl	DnaK3	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-Slr0093	Slr0093	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-SII0897	SII0897	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-SII0909	SII0909	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-SII1011	SII1011	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-SII1384	SII1384	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-SII1666	SII1666	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-SII1933	SII1933	polyklonal (Hase)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
Anti-DnaJEC	DnaJ <i>E. coli</i>	polyklonal (Hase)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA	1:100
His-Tag® Antibody HRP Conjugate Kit	His ₅	monoklonal	Novagen, Darmstadt	1:1000

Tabelle 7: In der vorliegenden Arbeit verwendete sekundäre Antikörper-Konjugate.

Antikörper	Konjugat	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Anti-Rabbit IgG	HRP	Sigma Aldrich	1:10000
Anti-Rabbit IgG	AP	Sigma Aldrich	1:30000
Anti-Mouse IgG	HRP	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA	1:100

2.6 Antibiotika und Medienzusätze

Antibiotika und Lösungen wie IPTG wurden durch Filtration sterilisiert und dem Flüssig- bzw. Festmedium nach dem Autoklavieren bzw. zur Induktion der Expression zugefügt (Tabelle 8). Die Lagerung dieser Antibiotika und Lösungen erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 8: Den Medien zugesetzte Antibiotika und Lösungen sowie die Konzentrationen der Stammlösungen.

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	100 mg/ml	50 % Ethanol
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O _{deion}
Tetracyclin	5 mg/ml	H ₂ O _{deion}
Chloramphenicol	50 mg/ml	H ₂ O _{deion}
Spectinomycin	50 mg/ml	H ₂ O _{deion}
IPTG	1 M	H ₂ O _{deion}

2.7 Nährmedien

2.7.1 *E. coli*

LB-Medium

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)
(Agar	1,5 % (w/v))

Das LB-Medium wurde nach Sambrook und Russel, 2001 hergestellt. Zur Herstellung von Selektionsmedium wurden die entsprechenden Antibiotika nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

2.7.2 *Synechocystis* sp.

Das zur Kultivierung des Organismus *Synechocystis* sp. verwendete BG11-Medium und BG11-Platten wurden laut Rippka *et al.* hergestellt (Rippka *et al.*, 1979). Dabei wurden das Medium und die Glukose getrennt autoklaviert. Nach Abkühlen des Agars bzw. vor Gebrauch wurden dem Medium 5 mM Glukose zugesetzt. Zur Selektion von Mutanten wurden die entsprechenden Antibiotika in den nötigen Konzentrationen eingesetzt.

2.8 Kulturbedingungen

2.8.1 *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Platten bei 37 °C mit 220 rpm auf dem Rundschtüttler bzw. im Brutschrank kultiviert. Die Inkubation des temperaturempfindlichen Stammes OD259 ($\Delta dnaJ$) erfolgte bei 30 °C.

2.8.2 *Synechocystis* sp.

Die verwendeten cyanobakteriellen *Synechocystis* sp.- Stämme wurden in BG11-Flüssigmedium bzw. auf BG11-Platten bei 30 °C auf einem Rundschtüttler (100 rpm) bzw. im Brutschrank bei fluoreszierendem kalt-weißem Licht ($30 \mu E m^{-2} s^{-1}$) inkubiert.

2.9 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.9.1 Zellzahlbestimmung

2.9.1.1 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer, mit einer Kammertiefe von 0,1 mm und einer Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ pro Kleinstquadrat, bestimmt. Zum Auszählen wurden 10 μl verdünnte Kultur in die Zählkammer gegeben. Dabei wurde die Verdünnung (meist 1:10) so gewählt, dass eine Zellzahl von 20 Zellen pro Großquadrat nicht überschritten wurde. Es wurden fünf Großquadrate mikroskopisch ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und die Zellzahl berechnet.

2.9.1.2 Optische Dichte

Die Messungen der optischen Dichte (OD) einer Bakterienkultur erfolgten mit einem „Lambda 35 UV/VIS Spektrometer“ bei einer Wellenlänge von 600 nm (*E. coli*) bzw. 750 nm (*Synechocystis* sp.).

2.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um *in vitro* Nukleinsäure-Fragmente einer spezifischen DNA-Sequenz zu amplifizieren. Dabei ergänzen thermostabile Enzyme, so genannte DNA-abhängige DNA-Polymerasen, einen DNA-Einzelstrang in Anwesenheit von komplementären Oligonukleotiden (Primern) zu einem dsDNA-Molekül (Saiki *et al.*, 1988).

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Primer verwendet. Das im Folgenden aufgeführte PCR-Programm diente als Grundlage für alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen zur DNA-Amplifizierung und wurde nach Standard-Protokollen durchgeführt und gegebenenfalls angepasst (Sambrook und Russel, 2001). Die „Annealing“-Temperatur ist dabei abhängig vom GC-Gehalt der eingesetzten Primer. Ein typisches PCR-Programm ist im Folgenden aufgeführt:

Denaturierung	1 x	95 °C	5 min
Denaturierung	20-30 x	95	30 s
„Annealing“		60 °C	60 s
Elongation		72 °C	60-120 s/kb
Elongation	1 x	72 °C	10 min

Folgende Reagenzien wurden für einen PCR-Ansatz mit dem Endvolumen 50 µl auf Eis zusammenpipettiert:

10 x Polymerase-Puffer	1 x
MgCl ₂ [25 mM]	2,5 mM
DMSO	2,0 µl
dNTP-Mix [2 mM]	200 µM
5'-Primer [100 pM]	0,25 µM
3'-Primer [100 pM]	0,25 µM
template-DNA	0,1-0,5 µg
Polymerase	2,5 U
H ₂ O steril	ad 50,0 µl

Um die Amplifikate in einen TA-Vektor klonieren zu können, wurde die *Taq*-Polymerase verwendet, da diese einen Adenin-Überhang am 5'-Ende anfügt. Bei Amplifikaten, die später in Vektoren kloniert wurden die mit Restriktionsenzymen „blunt-end“ geschnitten wurden,

wurde die „Phusion“-Polymerase verwendet. Der Erfolg der PCR wurde in einem analytischen Agarosegel überprüft.

2.9.2.1 Kolonie-PCR

Um den Erfolg von Ligationen, TA-Klonierungen oder Transformationen schnell und effizient überprüfen zu können, wurde die Technik der Kolonie-PCR angewandt. Dabei wurden ganze Zellen in Form einer Einzelkolonie in der PCR-Reaktion als „DNA-template“ eingesetzt. Die Kolonien wurden parallel auf eine LB-Masterplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, damit positive Klone erhalten bleiben. Der Kolonie PCR-Ansatz setzte sich wie der einer PCR zusammen, wurde jedoch nur mit einem Endvolumen von 10 µl angesetzt. Das Ergebnis der PCR-Analyse wurde mittels eines Agarosegels überprüft.

2.9.3 TA-Klonierung

Die Methode der TA-Klonierung dient der direkten Insertion eines mittels *Taq*-Polymerase oder eines Polymerasegemisches amplifizierten PCR-Produkts mit einem Adenin-Überhang in einen Vektor mit 3'-Thymin-Überhang. Die Klonierung erfolgte gemäß der Protokolle des verwendeten Vektors: pCR[®]2.1-TOPO der Firma Invitrogen, pGEM[®]-T Easy der Firma Promega bzw. pSTBlue-1 AccepTor[™] Vektor der Firma Novagen.

2.9.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden von der Firma Eurofins MWG (Martinsried) durchgeführt.

2.9.5 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Gewinnung von reiner, RNA-freier Plasmid-DNA erfolgte mittels des „High-Speed Plasmid Mini Kits“. Diese Art der Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften der eingesetzten Silikamembran der Säule. Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurde eine Midi-Präparation mit Hilfe des Kits „Jetstar 2.0“ durchgeführt.

2.9.6 Präparation von genomischer DNA aus *Synechocystis*

TES-Puffer

Tris-HCl, pH 8,5	5 mM
NaCl	50 mM
EDTA	5 mM

TE-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	0,1 mM

Zur Isolierung genomischer cyanobakterieller DNA wurde eine 30 ml Kultur von *Synechocystis* bei einer $OD_{750} \geq 2$ geerntet (5100 x g, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet anschließend mit TES-Puffer viermal gewaschen. Danach wurde das Pellet in 450 µl TES-Puffer resuspendiert, 50 µl Lysozym (20 mg/ml) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurde der Zellsuspension 50 µl einer 10%igen Sarcosyllösung und 600 µl Phenol zugegeben und unter Taumeln 15 min bei RT inkubiert. Mittels eines darauffolgenden Zentrifugationsschrittes (15900 x g, 10 min, 4 °C) konnte die wässrige Phase abgetrennt werden, welcher 5 µl RNase (10 µg/ml) zugesetzt wurden. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei RT unter Taumeln erfolgte die Zugabe von 100 µl NaCl (5 M) und 80 µl eines Gemischs aus 10 % CTAB und 0,7 M NaCl sowie 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15900 x g, 5 min, 4 °C). Die wässrige Phase wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und mehrmals gemischt, um die DNA zu fällen. Die Pelletierung, sowie das anschließende Waschen der DNA mit 70 % Ethanol erfolgte bei 15900 x g, 10 min, 4 °C. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde dieses in 50 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei - 20 °C gelagert.

2.9.7 Spektrometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration und -Reinheit wurde durch Bestimmung der UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entspricht $A_{260} = 1$ der Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe des Quotienten aus A_{260}/A_{280} kann die Reinheit bestimmt werden (Sambrook und Russel, 2001). Reine DNA besitzt eine „Ratio“ von 1,8. Werte größer 1,8 deuten auf RNA-Verunreinigungen hin, kleinere Werte auf Protein-Verunreinigungen.

2.9.8 Restriktionsverdau

Diese Methode beruht auf der hydrolytischen Spaltung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen. In dieser Arbeit wurden die Enzyme der Firmen New England Biolabs, MBI Fermentas und Gibco verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurden jeweils 0,5-1 µg isolierte Plasmid-DNA zur Restriktion verwendet. Restriktionsansätze zur Analyse hatten ein Endvolumen von 20 µl, präparative Ansätze ein Endvolumen von 50 µl und wurden bei 37 °C 1,5 h bzw. 4 h inkubiert. Mittels Agarosegelelektrophorese wurde der Erfolg der Restriktion überprüft.

2.9.9 Erzeugung von „blunt-ends“ mittels Klenow-Enzym

Zur Erzeugung von „blunt-ends“ nach hydrolytischer Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen, welche 5'-Überhänge erzeugen, wurde diese mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Mit diesen DNA-Fragmenten konnten Ligationen in Vektoren mit „blunt-ends“ durchgeführt werden.

10 x Klenow-Puffer	1 x
dNTP-Mix [2 mM]	0,05 mM
Klenow-Enzym	1 µl
DNA-Lösung	10 µl
H ₂ O steril	ad 50,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 25 °C inkubiert und anschließend über Säulchen (2.9.12) gereinigt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.10 Ligation

Bei der Ligation lagern sich zwei DNA-Fragmente durch Basenpaarung aneinander und werden mit Hilfe von Enzymen verknüpft. Die mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmente wurden mit der T4-DNA Ligase nach den Angaben des Herstellers ligiert. Ein Standard-Ligationsansatz wurde 1-2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Dabei wurden das Insert und der Vektor in einem Verhältnis von 3:1 in ein Volumen von 20 µl gegeben.

2.9.11 Agarosegelelektrophorese

6x Probenpuffer

Glyzerin	50 % (v/v)
SDS	1 %
Na ₂ EDTA	125 mM
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)

50x TAE-Puffer

Tris	0,4 M
EDTA (0,5 M, pH 8)	10 mM
Essigsäure	0,2 M

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt (Sambrook und Russel, 2001). Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt. Die gelelektrophoretische Trennung der Proben und des Größenstandards erfolgte je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente in 1-2%igen Agarosegelen mit 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 110-130 V. Bei den verwendeten Standards handelt es sich um die Marker „Gene Ruler™ 1 kb Ladder“ bzw. „Gene Ruler™ 50 bp Ladder“ (MBI Fermentas).

Die Färbung des Gels erfolgte in einem Ethidiumbromid-haltigen Färbebad für 5-20 Minuten. Dokumentation und Detektion erfolgten unter UV-Licht mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes „Quantum“.

2.9.12 Reisolation von DNA aus Agarosegelen

Bei der Reisolation handelt es sich um eine Methode, die auf reversibler Adsorption von Nukleinsäuren an eine Glasfasermembran beruht. Die durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach Färbung und Detektion mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel geschnitten. Die Reisolation erfolgte mittels des Gelextraktionskits „Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit“ mit einem Volumen von 30 µl. Die extrahierte DNA wurde bei - 20 °C gelagert.

2.9.13 Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in *E. coli*

2.9.13.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Chung *et al.*, 1989. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei - 80 °C.

2.9.13.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Zur Transformation wurde ein Aliquot chemisch-kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA versetzt (50-500 ng Plasmid-DNA pro Ansatz), vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis belassen. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde das komplette Volumen von 20 µl eingesetzt. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C von 60 s. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden 1000 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen 60 min bei 30 °C bzw. 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Selektion erfolgte auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C.

2.9.14 Transformation von *Synechocystis* sp. Zellen

Bei dem Organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 handelt es sich um ein natürlich kompetentes Bakterium. Dies bedeutet, dass die Zellen freie DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen, ohne dass es hierfür einer Stimulierung bedarf. Durch homologe Rekombination integriert die transformierte DNA in das Genom von *Synechocystis*. Zur Transformation wurden *Synechocystis* sp. Kulturen mixotroph und mit entsprechendem Antibiotikum bis zu einer OD₇₅₀ von < 1 kultiviert und anschließend 10 min bei 4400 x g und RT abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit frischem BG11-Medium wurde das Zellpellet in so viel Medium aufgenommen, dass die OD₇₅₀ der Zellsuspension 2,5 betrug. Davon wurden 400 µl in ein steriles Reagenzglas gegeben und mit 5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA und 5 mM Glukose versetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit sterilem Wasser. Die Ansätze wurden bei 30 °C über Nacht und einer konstanten Belichtung von 30 µE m⁻² s⁻¹ inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze komplett auf BG11-Agarplatten mit dem zur Selektion notwendigen Antibiotikum mit einer Konzentration von 10 µg/ml ausplattiert und bis zur Kolonienbildung bei 30 °C inkubiert. Positive Klone wurden mit kontinuierlich ansteigenden Konzentrationen des entsprechenden Antibiotikums über den Zeitraum von mindestens einem Jahr kultiviert, die genomische DNA isoliert und mittels Segregations-PCR auf komplette Integration der Fremd-DNA überprüft.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Diese Methode dient der Gewinnung großer Proteinmengen durch heterologe Expression in *E. coli*. Hierzu wurden die Gene der zu exprimierenden Proteine in *E. coli* Expressionsplasmide kloniert und in verschiedene *E. coli* Expressionsstämme transformiert. Zur Expression wurden 1,5 l LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen, mit 10 % der Vorkultur angeimpft, so dass die OD₆₀₀ etwa 0,1 betrug und bei 37 °C, 220 rpm inkubiert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,0 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert, anschließend geerntet (9000 x g, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet bei - 20 °C gelagert.

2.10.2 *E. coli*-Zellaufschluss mittels Ultraschall

Nach Expression wurde das Zellpellet in 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8 resuspendiert und mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma Aldrich) im Verhältnis 1:1000 versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250). Die Beschallung erfolgte in 4-5 Intervallen von je 4 min bei 20 microns. Zwischen den Beschallungsphasen wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 39000 x g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer, unaufgebrochene Zellen sowie Einschlusskörperchen zu entfernen. Durch Ultrazentrifugation (288000 x g, 1 h, 4 °C) wurde der zellfreie Rohextrakt in lösliche Proteinfraction und Membranpellet aufgetrennt.

2.10.3 Aufbruch von *Synechocystis*-Zellen

Der Aufbruch von zuvor mixotroph gewachsenen *Synechocystis* sp.-Zellen dient der Gewinnung von Gesamtzellextrakt und zur Fraktionierung von löslichen Proteinen und von Membranproteinen. Die bis zu einer OD₇₅₀ von <1,5 gewachsene Cyanokultur mit einem Volumen von 1 l wurde durch Zentrifugation (11000 x g, 4 °C, 15 min) geerntet und das Zellpellet anschließend mit 20 mM HEPES-KOH, pH 7,5 gewaschen. Danach wurden die abzentrifugierten Zellen in 1-2 ml HEPES-KOH, pH 7,5 resuspendiert und mit Proteaseinhibitor-Cocktail im Verhältnis 1:1000 versetzt. Die Zellsuspension wurde in Aufbruchröhrchen, die zur Hälfte mit Gasperlen mit 0,25-0,5 mm Durchmesser befüllt waren, gegeben. Der Zellaufbruch erfolgte in einem Mini Beadbeater (Biospec Products) in fünf Intervallen von je einer Minute bei 480 x g. Zwischen den Aufschlussphasen wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Lysat bei 6000 x g, 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der

Vorgang drei- bis viermal wiederholt, um die unaufgebrochenen Zellen und Glasperlen zu entfernen. Der gewonnene Zellextrakt wurde zur Trennung der löslichen Proteinfraction von der Membranfraction bei 314000 x g, 1 h bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde die lösliche Proteinfraction vorsichtig abgenommen und das Membranpellet in einem Volumen 20 mM HEPES-KOH des Gesamtzellextraktes resuspendiert.

2.10.4 Reinigung heterolog exprimierter Proteine aus *E. coli*

Die Reinigung der heterolog exprimierten Proteine aus *E. coli* erfolgte über Affinitätschromatographie bzw. Ionenaustausch-Chromatographie.

2.10.4.1 Affinitätschromatographie

Die affinitätschromatographische Reinigung der rekombinaten Proteine mit einem deca-His-Tag wurde mit Hilfe von „Ni-NTA Agarose“ (Qiagen) bzw. mit Zink beladener „Chelating Sepharose Fast Flow“ (GE Healthcare) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte dabei aus verschiedenen Zellfraktionen und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Äquilibrierung des Säulenmaterials wurde 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8 mit 300 mM NaCl verwendet. Die Elution der Proteine erfolgte durch ansteigende Konzentrationen an Imidazol (100-500 mM) in 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8 mit 300 mM NaCl.

2.10.4.2 Beladen von Säulenmaterial mit zweiwertigen Ionen

Die Methode dient dazu, zweiwertige Ionen an unbeladenes Säulenmaterial zu binden. Dazu wurde das Säulenmaterial „Chelating Sepharose Fast Flow“ (GE Healthcare) mit fünf Volumen H_2O_{dest} 5 min gewaschen. Anschließend wurde ein Volumen einer 0,2 M Zinksulfat-Lösung mit 10 % Essigsäure zugegeben und das Säulenmaterial zur Bindung der zweiwertigen Ionen 5 min bei RT unter Taumeln inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit fünf Volumen H_2O_{dest} 5 min gewaschen und bis zur Verwendung in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Dieses Protokoll wurde auch für die Bindung von Kupfer- (0,2 M Kupfersulfat-Lösung) oder Kobaltionen (0,2 M Kobaltnitrat-Lösung) an das Säulenmaterial verwendet.

2.10.4.3 Umpuffern

Diese Methode dient dazu Proteine schnell und effizient in den benötigten Puffer zu überführen oder Salze zu entfernen. Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe von „PD-10 Entsalzungssäulen“ (GE Healthcare) nach Herstellerangaben umpuffert.

1/10 Volumen TCA-Lösung wurde der Ansatz gemischt und mindestens 2 h oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 15900 x g und bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet zweimal mit 1 ml kaltem Aceton (-20 °C) gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Für die SDS-PAGE wurde das Pellet in einem möglichst kleinen Volumen 5x Probenpuffer (vgl. 2.10.8) aufgenommen. Eine eventuelle Gelbfärbung nach Probenpufferzugabe deutet auf TCA-Rückstände hin und wurde durch Titration mit 1 M NaOH neutralisiert.

2.10.6 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „BCA™ Protein Assay Kit“ (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Als Referenz wurde eine Eichgerade mit BSA im Konzentrationsbereich von 25 bis 2000 µg/ml erstellt. Die zu untersuchenden Proben wurden in drei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt und genau wie die Standards behandelt. Nach Inkubation der Ansätze bei 37 °C für 30 min, erfolgte die Detektion der Absorption bei $\lambda=562$ nm.

Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE Analysen bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Mengen des Standardproteins BSA (0,1-5 µg) und unterschiedliche Volumina der zu untersuchenden Proteinlösung unbekannter Konzentration im SDS-Gel wie in 2.10.8 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt (2.10.9). Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, USA).

2.10.7 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Chlorophyllkonzentration bestimmt. Hierfür wurden ganze Zellen, Gesamtzellextrakt oder isolierte Membranen des Bakteriums *Synechocystis* sp. verwendet. Hierfür wurde die Probe 1:10 mit 100 % Methanol in einem Endvolumen von 1 ml verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 15900 x g und RT abzentrifugiert und der Überstand photometrisch bei 665,2 nm und 652 nm gemessen. Als Leerwert diente reines Methanol. Die Chlorophyllkonzentration in µg/ml wurde wie in Porra *et al.* beschrieben nach folgender Formel berechnet (Porra *et al.*, 1989):

$$Chl\ a = (16,29 * A_{665,2}) - (8,54 * A_{652})$$

2.10.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

5x Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	250 mM
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
Glyzerin	50 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	500 mM

Trenngelpuffer

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Sammelgelpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

10x SDS-Laufpuffer

Tris	0,25 M
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine entsprechend ihrer molaren Masse getrennt (Shapiro *et al.*, 1967). In dieser Arbeit wurden 8 bzw. 14%ige Trenngelle mit 6%igen Sammelgelen überschichtet.

Das Trenngel setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngel

Trenngelpuffer	2,5 ml
Acrylamid-Lösung (40 %)	2 bzw. 3,5 ml
Mix 37,5:1	
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml
APS (10 %)	50 µl
TEMED	20 µl

Das eingesetzte Volumen an Acrylamid richtete sich nach der molaren Masse der zu trennenden Proteine.

Die Trenngellösung wurde bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach dem vollständigen Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt, das Gel mit H₂O_{deion} gespült und anschließend mit einem 6%igen Sammelgel überschichtet:

Sammelgel

Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid-Lösung (40 %)	1,5 ml
Mix 37,5:1	
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml
APS (10 %)	50 µl
TEMED	20 µl

Vor dem Auftragen der zu untersuchenden Proben wurden diese mit Probenpuffer im Verhältnis 4:1 versetzt und bei 100 °C 5 min denaturiert. Als Proteingrößenstandards dienten der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ bzw. der „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ (Fermentas). Es wurden die Gelelektrophoresapparaturen „Mini-Protean® 3 Cell“ und „Mini-Protean® Tetra Cell“ verwendet. Die Elektrophorese erfolgte etwa 15 min bei einer Spannung von 120 V, welche anschließend auf 200 V erhöht wurde.

2.10.9 Coomassie-Färbung

Färbelösung

Ethanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie R250	0,2 % (w/v)

Entfärbelösung

Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Trenngel mit H₂O_{deion} gewaschen, um überschüssiges SDS zu entfernen und anschließend 15-60 min bei RT unter Taumeln in Färbelösung belassen. Danach wurde das Gel so lange in unter Taumeln Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren (Zehr *et al.*, 1989; Weber und Osborn, 1969). Dazu wurde der Entfärber mehrmals gewechselt. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

2.10.10 Western-Blot

Blotting-Puffer

Methanol	15 % (v/v)
10x SDS-Laufpuffer ohne SDS	10 % (v/v)

10x TBS

Tris-HCl, pH 7,8	200 mM
NaCl	1,8 M

Waschpuffer

1x TBS	10 % (v/v)
Tween 20	0,05 % (v/v)

Blocking-Puffer

Magermilchpulver	4 % (w/v) in Waschpuffer
------------------	--------------------------

AP-Puffer

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

NBT

NBT	5 % (w/v)
DMF	75 % (v/v)

BCIP

BCIP	5 % (w/v)
DMF	75 % (v/v)

2.10.10.1 Semidry-Blotting

Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die „Roti®-PVDF“ erfolgte nach der Semidry-Blotting Methode. Hierzu wurde die PVDF-Membran zuerst mit Methanol angefeuchtet und anschließend in Blotting-Puffer äquilibriert. Die eingesetzten Whatman-Papiere wurden vor Gebrauch ebenfalls in Blotting-Puffer äquilibriert. Das Blotten erfolgte in einer „Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell“ nach Herstellerangaben für 45 min bei einer Spannung von 15 V.

2.10.10.2 Immunodetektion

Um ein unspezifisches Binden von Antikörpern nachdem Blotten an die PVDF-Membran zu verhindern, wurden die freien reaktiven Bereiche auf der Blotting-Membran durch eine einstündige Inkubation unter Taumeln in Blocking-Puffer abgesättigt. Anschließend wurde die Membran dreimal fünf Minuten mit Waschpuffer bei RT gewaschen. Die Inkubation der Membran mit den in Waschpuffer verdünnten primären Antikörperlösungen (Tabelle 6)

erfolgte eine Stunde bei RT unter Taumeln. Der Blot wurde danach dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend folgte eine Inkubation mit sekundärem Antikörper-Konjugat (anti-rabbit HRP-gekoppelter Antikörper) in Waschpuffer (Verdünnung nach Herstellerangaben) für 1 h bei RT unter Taumeln. Die überschüssigen, sekundären Antikörper wurden durch drei Waschschriffe von je 5 min mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde das Chemilumineszenz-Substrat „Pierce® ECL Western Blotting Substrate“ (Thermo Fisher Scientific) zugegeben und nach Herstellerangaben inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Überführung des im Substrat enthaltenen Luminols in dessen oxidierte Form. Das hierbei entstehende, angeregte Intermediärprodukt geht unter Emission eines Photons der Wellenlänge $\lambda_E=425$ nm in den Grundzustand über. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte mittels eines CCD-Kamera-Systems von Raytest („Stella“) mit unterschiedlicher Belichtungsdauer. Zum colorimetrischen Nachweis der Proteine wurde der Blot mit einem AP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran in 10 ml frischem AP-Puffer mit je 25 μ l NBT und 25 μ l BCIP inkubiert. NBT/BCIP dient als Substrat der alkalischen Phosphatase (AP), die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Bei der Umsetzung des Substrates durch das Enzym bildet sich ein Farbstoff, wodurch die Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden können. Die Membran wurde mit der Färbelösung bis zum Erkennen einzelner Proteinbanden inkubiert, danach die Reaktion mit H_2O_{deion} abgestoppt und die Membran getrocknet.

2.10.11 Vorbereitung heterolog exprimierter DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 zur Herstellung von Antikörpern

Ponceaurot

Ponceau-S	2 % (w/v)
Trichloressigsäure	3 % (w/v)

Zur Herstellung primärer Antikörper gegen DnaJ-Proteine aus dem Bakterium *Synechocystis* sp. wurden diese heterolog exprimiert. Dazu wurden die Expressionsplasmide (pRSET-His-slr0093, pRSET6aNT-HisMCS-sll0897, pET19b-sll0909, pRSET6aNT-HisMCS-sll1011, pRSET-His-sll1384, pRSET-His-sll1666 und pRSET-His-sll1933) (vgl. Tabelle 2) in die *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3) pLysE und HMS174(DE3) pLysS, wie in 2.9.13 beschrieben, transformiert. Die heterologe Expression, der anschließende Zellaufbruch und die affinitätschromatographische Reinigung der Proteine mittels His-Tag erfolgte wie in 2.10.1 bis 2.10.4 beschrieben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines BCA-Tests. Die vorgereinigten Proteine wurden mittels einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf mit H_2O_{deion} äquillibrierter Nitrocellulose Transfermembran

(Whatman Protran, Dassel) geblottet (2.10.10.1). Anschließend wurde die Membran mit Ponceaurot-Lösung gefärbt, bis Proteinbanden detektiert werden konnten. Die Membran wurde danach mehrmals mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gewaschen und die Proteinbanden, die den gereinigten Proteinen entsprachen mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. 700 μg des gereinigten und geblotteten Proteins wurden bei der Firma Gramsch zur Immunisierung von Kaninchen für die Antikörperherstellung eingesetzt.

2.10.12 Wachstumskurven

Die Analysen des Wachstumsverhaltens verschiedener *Synechocystis*-Stämme wurden anhand von Wachstumskurven durchgeführt.

Die zu untersuchenden *Synechocystis* sp.-Stämme, sowie der *Synechocystis* Wildtyp-Stamm wurden dazu in antibiotikahaltigem BG11-Medium mit 5 mM Glukose bei 30 °C vorkultiviert. Die Hauptkulturen wurden unter drei verschiedenen Bedingungen: autotroph (BG11-Medium), mixotroph (BG11-Medium mit 10 mM Glukose) und heterotroph (BG11-Medium mit 10 mM Glukose und 10 μM DCMU) kultiviert. Dabei wurden je 100 ml Medium mit einer OD_{750} von 0,05 angeimpft. Die zu untersuchenden *Synechocystis*-Stämme wurden bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 30 °C und 42 °C) bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Während dieser Wachstumsperiode wurde zweimal täglich die OD_{750} photometrisch bestimmt.

2.10.13 „Pull-Down“ Experimente

Lysepuffer

HEPES-KOH, pH 7,5	20 mM
KCl	10 mM

Die „Pull-Down“ Experimente dienen der Identifizierung von *in vitro* Interaktionspartnern von Proteinen. 0,15-0,4 mg des gereinigten Proteins mit deca-His-Tag wurden dazu an eine Ni-Agarose-Matrix gebunden und die Matrix zusammen mit dem gereinigten Protein eine Stunde bei 4 °C auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Matrix zweimal mit Lysepuffer gewaschen und danach in zwei Ansätze (+ ATP und – ATP) mit gleichem Volumen aufgeteilt. Zu einem Ansatz (+ ATP) wurden 5 mM ATP, 80 mM Kreatinphosphat, 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Kreatinphosphatkinase und 10 mM MgCl_2 gegeben. Dem zweiten, ATP-freien Ansatz (- ATP) wurden 5 U Apyrase und 10 mM MgCl_2 zugegeben. Danach wurde zu beiden Ansätzen 100 μl des *Synechocystis*-Gesamtzellextraktes (2.10.3) mit 0,1 % Triton X-100 gegeben und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Crosslinkers DSP. Dieser wurde in einer 25-fach höheren Konzentration als die gebundenen Proteine

eingesetzt. Die Ansätze wurden erneut 30 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Crosslink-Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Tris-HCl, pH 7,5 erreicht (15 min, RT). Es wurde so viel Tris-HCl Lösung zugegeben, dass die Endkonzentration 25 mM betrug. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.10.14 Steady State ATPase-Test

Diese Methode dient der Bestimmung der ATPase-Aktivität der gereinigten DnaK und DnaJ-Proteine. Bei diesem Test handelt es sich um einen gekoppelten Enzymtest, der die Reaktionen der Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Laktatdehydrogenase (LDH) verbindet. Dabei kann die Oxidation von NADH + H⁺ photometrisch bei 340 nm verfolgt werden.

Ein Ansatz zur Messung der ATPase-Aktivität setzt sich wie folgt zusammen.

Ascorbinsäure [20 mM]	1 mM
ATPxMg ²⁺ [20 mM]	1 mM
Phosphoenolpyruvat [60 mM]	3 mM
NADH [12 mM]	0,21 mM
MgCl ₂ [20 mM]	1 mM
PK/LDH-Mix	3,5 µl
Protein(e)	0,1 µM
HEPES-KOH, pH 7 [50 mM]	ad 200,0 µl

Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert. Der PK/LDH-Mix wurde unmittelbar vor Messbeginn zugefügt. Die Abnahme der OD₃₄₀ wurde über einen Zeitraum von 180 s verfolgt und jede Sekunde ein Messpunkt aufgenommen. Als Leerwert diente der Ansatz ohne Protein.

2.10.15 Promotoraktivitätsstudien

Decanal-Lösung

Decanal 50 mM in 100 % Ethanol

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Aussagen über die Aktivität von Promotoren verschiedener Gene mittels Biolumineszenz-Entwicklung treffen.

Vollständig segregierte *Synechocystis* sp.-Promotorstämme wurden in BG11-Medium mit 5 mM Glukose und entsprechendem Antibiotikum bei 30 °C unter normalen Wachstumsbedingungen vorkultiviert. Die Kulturen wurden am Vortag der Messung in 100 ml BG11-Medium ohne Antibiotikum und Glukose mit einer OD₇₅₀ zwischen 0,5-1 verdünnt und über Nacht bei 30 °C und normalen Lichtbedingungen (2.8.2) inkubiert. Die Hauptkultur wurde mit

einer OD_{750} von 0,5 in frischem BG11-Medium angeimpft und der jeweiligen Stressbedingung ausgesetzt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Untersuchte Stressbedingungen der Promotoraktivitätsstudien

Bezeichnung	Bedingung
Hitzestress	42 °C
Kältestress	16 °C
Säurestress	pH 5,5
Osmotischer Stress	0,5 M Mannitol
Oxidativer Stress	1 mM H_2O_2
Hochlicht Stress	430 $\mu E m^{-2} s^{-1}$

Die Kulturen wurden jeweils 420 min unter den genannten Stressbedingungen kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten von je 1 ml der Zellsuspension in dreifacher Bestimmung die Luciferase-Reaktion gemessen. Nach Zugabe von 1 ml des Substrates Decanal wurde die Lumineszenzentwicklung nach 30 s Inkubation mit dem Luminometer „Lumat LB 9507“ gemessen. Je höher der Wert der Lumineszenz ist, desto aktiver ist der Promotor, was auf eine höhere Genexpression unter der untersuchten Stressbedingung hinweist.

2.11 Spektroskopie

2.11.1 Absorptionsspektren

Die Messung der Absorptionsspektren dient der Bestimmung der Pigmentzusammensetzung in *Synechocystis* Zellen. Hierzu wurde die Gesamtzellzahl durch Auszählen bestimmt, die Proben auf eine konstante Zellzahl eingestellt und anschließend in einem Bereich zwischen 250-800 nm mit Hilfe einer „50 MM integrierenden Sphäre“ (Labsphere) in dem Spektralphotometer „Lambda 25“ aufgenommen.

2.11.2 77K-Spektren

Die Messung der 77 K-Spektren dient dazu, Aussagen über die relativen Verhältnisse von PS I, PS II und Phycobilisomen ganzer Zellen treffen zu können.

Synechocystis sp. Zellen wurden zur Messung der Spektren in BG11-Medium auf eine OD_{750} von zwei eingestellt und anschließend 1 ml Kultur in einer Glasküvette in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messung erfolgte mit einem „Aminco Bowman Series 2“ Lumineszenz Spektrometer. Die Emissionsspektren wurden in einem Bereich von 630 nm bis 760 nm

aufgenommen. Die Anregung der Phycobilisomen erfolgte bei 580 nm, die der Chlorophylle bei 435 nm. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.11.3 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) lassen sich Aussagen über Sekundärstrukturelemente von Proteinen und deren thermischer Stabilität treffen (Winter und Noll, 1998). Die CD-Spektren wurden in dieser Arbeit mit dem CD-Spektropolarimeter „J-815“, in einem Bereich von 190-250 nm aufgenommen, wobei in 1 nm-Schritten gemessen wurde. Die Messgeschwindigkeit betrug 200 nm/min. Zur Messung wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Der Temperaturmessbereich lag zwischen 10-95 °C bzw. 95-10 °C, wobei die Temperatur in 1 °C Schritten erhöht wurde und vor jeder Messung die Temperatur 5 s konstant gehalten wurde. Für jede Probe wurde eine Messung mit Pufferlösung als Nullwert durchgeführt, die dann von den gemessenen Spektren der Proteinlösungen subtrahiert wurde. Die Auswertung erfolgte mit der Software Spectra Analysis von Jasco, wodurch die molare Elliptizität der gemessenen Werte bestimmt wurde. Mit Hilfe der Messwerte bei 222 nm wurden die Schmelzkurven der Proteine ermittelt. Dazu wurden die erhaltenen Werte der molaren Elliptizität bei 222 nm gegen die Temperatur von 10-95 °C aufgetragen. Die dabei erhaltene Kurve beschreibt die Schmelzkurve, wobei der Wendepunkt dem Schmelzpunkt entspricht.

3 Ergebnisse

3.1 Sieben kanonische DnaJ-Proteine sind im Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. kodiert

Sequenzanalysen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 von Kaneko *et al.* zeigten, dass in dem Genom von *Synechocystis* zwölf DnaJ-ähnliche Proteine kodiert werden (Kaneko *et al.*, 1996). Die offenen Leserahmen *sll0414*, *slr0719*, *slr0967* und *slr1851* weisen lediglich eine Ähnlichkeit zur J-Domäne auf und besitzen kein charakteristisches HPD-Motiv. Bei diesen vier Proteinen handelt es sich jedoch um unbekannte oder in ihrer Funktion unbestimmte Proteine. Sieben der zwölf DnaJ-ähnlichen Proteine besitzen eine für DnaJ Proteine charakteristische J-Domäne, mit dem hoch konservierten HPD-Motiv, welches für die Interaktion des DnaJ mit der ATPase-Domäne der DnaK-Proteine erforderlich ist. Bei den sieben Genen handelt es sich um die Leserahmen *slr0093*, *sll0897*, *sll0909*, *sll1011*, *sll1384*, *sll1666* und *sll1933*. Die DnaJ-Proteine aus *E. coli* werden entsprechend ihrer Domänenstruktur in drei Typen unterteilt (Abbildung 6) (Cheetham und Caplan, 1998). Basierend auf dieser Einteilung können auch die sieben DnaJ Proteine mit einer charakteristischen J-Domäne aus *Synechocystis* entsprechend eingruppiert werden (Abbildung 10). Zu den Typ I DnaJ-Proteinen werden solche gezählt, die alle auch im *E. coli* DnaJ vorkommenden Domänen besitzen. Dabei handelt es sich um eine N-terminale J-Domäne, eine Glycin/Phenylalanin-reiche Domäne (G/F), eine Cystein-reiche Domäne (CYS) und eine C-terminale Domäne (CTD). In dem Cyanobakterium *Synechocystis* kann lediglich das Protein Sll0897 zu diesem Typ gezählt werden. Typ II Proteine weisen eine charakteristische J-Domäne, eine Glycin/Phenylalanin-reiche Domäne und eine CTD-Domäne auf. Hierzu zählen die Proteine Slr0093 und Sll1933 aus *Synechocystis*. Die restlichen vier DnaJs Sll0909, Sll1011, Sll1384 und Sll1666 aus *Synechocystis* besitzen nur eine J-Domäne, weshalb sie zum Typ III gezählt werden. Diese Typ III DnaJ-Proteine enthalten zusätzlich noch weitere Domänen, wie z. B. ein Pentapeptid (Sll1011), ein Tetratrikopeptid-Motiv (Sll1384) oder eine Transmembrandomäne (Sll1666), welche meist am C-Terminus lokalisiert sind. Neben den bisher beschriebenen elf DnaJ-Proteinen wird in *Synechocystis* noch ein zwölftes Protein (Sll0169) mit einer potentiellen N-terminalen J-Domäne kodiert. Diesem Protein fehlt ebenfalls das für die Stimulierung der ATPase-Aktivität

des DnaKs entscheidende HPD-Motiv, weshalb eine Einteilung als Typ III DnaJ unklar ist.

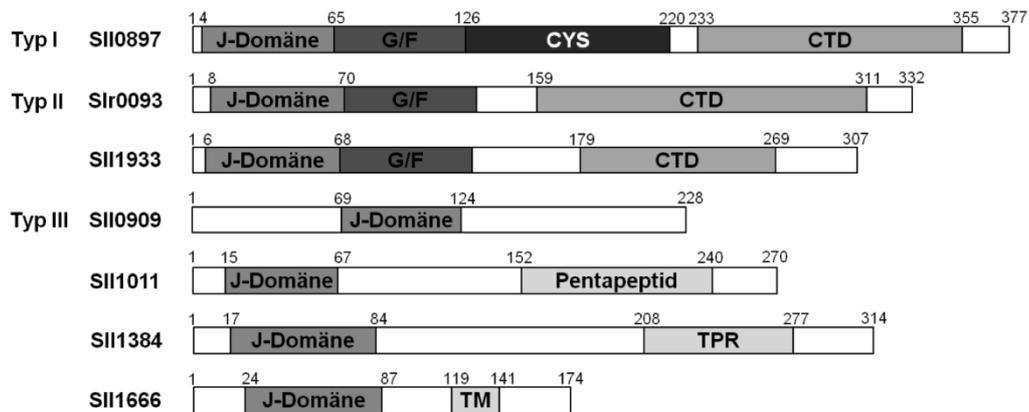


Abbildung 10: Domänenstruktur der sieben DnaJ Proteine aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, die eine J-Domäne mit charakteristischem HPD-Motiv besitzen. N-terminal befindet sich die J-Domäne, gefolgt von der Glycin/Phenylalanin-reichen Domäne (G/F), der Cystein-reichen Domäne (CYS) und der C-terminalen Domäne (CTD). Bei Typ III-Proteinen sind C-terminal weitere Domänen lokalisiert: eine Pentapeptid-Domäne, eine Tetratriklopeptid-Domäne (TPR) und eine Transmembrandomäne (TM). Gezeigt ist die Einteilung in die drei verschiedenen DnaJ-Klassen. Die Zahlen stellen die Nummerierung der Aminosäuren dar.

Durch Proteinsequenzvergleiche sollten die Identitäten und Ähnlichkeiten der DnaJ-Proteine untersucht werden. Dazu wurden ein Abgleich der Proteinsequenzen mit Hilfe einer Computeranalyse (Clustal W) durchgeführt und die erhaltenen Daten anhand des Computerprogramm Genedoc ausgewertet. Ein Sequenzvergleich der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* mit dem DnaJ-Protein aus *E. coli* zeigte eine Homologie der charakteristischen J-Domäne dieser Proteine (Ergebnisse nicht gezeigt). Die ermittelten Identitäten und Ähnlichkeiten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Daten weisen eine hohe Identität und Ähnlichkeit der Proteine des Typ I und II mit dem Typ I DnaJ-Protein aus *E. coli* auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Proteine SII0897, Slr0093 und SII1933 aus *Synechocystis* die höchste Identität und Ähnlichkeit untereinander aufweisen. Generell fällt auf, dass die Identität bzw. die Ähnlichkeit der Typ III DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* im Vergleich zu dem *E. coli* DnaJ-Protein bzw. den Typ I und Typ II DnaJ-Proteinen aus *Synechocystis* am geringsten ausfällt.

Tabelle 10: Ermittelte Homologien und Ähnlichkeiten der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* und des DnaJ-Proteins aus *E. coli* nach Proteinsequenzvergleich. Die fett gedruckten Werte geben die Identität (Prozent) der Proteine an, die normal gedruckten Werte stellen die Ähnlichkeit (in Prozent) dar.

	SII0897	Sir0093	SII1933	SII1666	SII1384	SII1011	SII0909
DnaJ_{E. coli}	42 % 59 %	28 % 44 %	23 % 38 %	9 % 18 %	10 % 21 %	11 % 19 %	6 % 15 %
SII0897		26 % 39 %	23 % 38 %	9 % 16 %	12 % 24 %	10 % 18 %	7 % 15 %
Sir0093			37 % 53 %	11 % 20 %	10 % 22 %	12 % 23 %	6 % 17 %
SII1933				12 % 23 %	14 % 28 %	13 % 26 %	8 % 20 %
SII1666					10 % 19 %	11 % 18 %	4 % 13 %
SII1384						11 % 23 %	5 % 15 %
SII1011							5 % 14 %

3.2 *In vivo* Komplementationsstudien der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp.

Die Tatsache, dass *Synechocystis* multiple DnaJ-Proteine im Genom kodiert, lässt die Frage nach deren Funktionen aufkommen. Die Interaktion von DnaK- mit DnaJ-Proteinen im Chaperonzyklus erhöht die funktionelle Vielfalt der DnaK-Proteine, wobei die DnaJ-Proteine eine wichtige Rolle spielen. Sie geleiten Substrate zur DnaK-Proteinbindetasche und stellen somit einen ersten Schritt bei der Chaperonfunktion dar. Erste Hinweise auf die Funktionen der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis*, bei denen eine Einteilung in die klassischen Typen möglich ist, sollten mit Hilfe von *in vivo* Komplementationsstudien gewonnen werden. Dazu wurden die *Synechocystis dnaJ* Gene und das *E. coli dnaJ* als Positivkontrolle über *NdeI* und *BamHI* in das Plasmid pMalpAcYc kloniert und nach Transformation in dem temperaturempfindlichen *E. coli* $\Delta dnaJ$ -Stamm OD259 exprimiert (Kelley und Georgopoulos, 1997). Nach Deletion des *E. coli dnaJ* Gens kann bei 30 °C ein normales Wachstum beobachtet werden, wohingegen bei höheren Temperaturen ein Wachstumsdefekt auftritt und Temperaturen über 40 °C lethal für den Stamm sind.

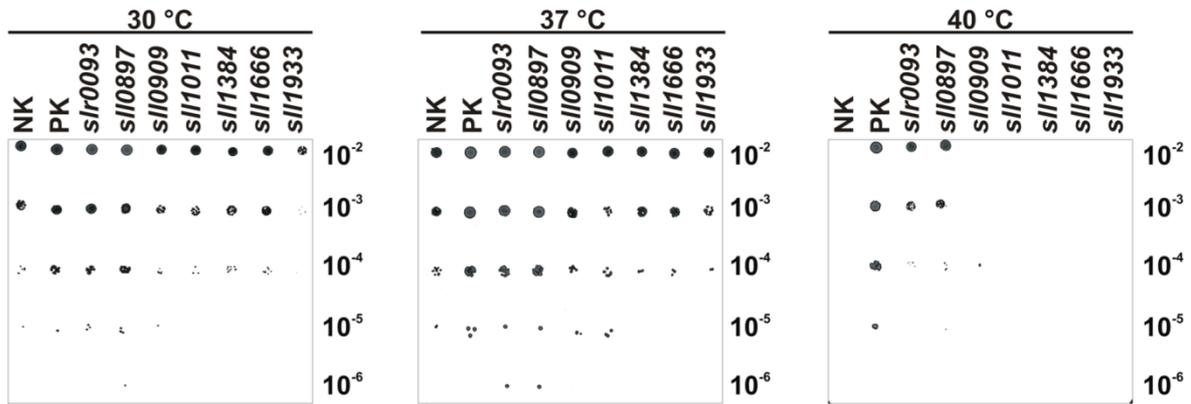


Abbildung 11: Komplementation des temperaturempfindlichen $\Delta dnaJ$ *E. coli*-Stammes OD259 durch Expression der DnaJ-Proteine aus *Synechocystis*. Nach Transformation des $\Delta dnaJ$ *E. coli*-Stammes mit Plasmiden, die die cyanobakteriellen *dnaJ* Gene und das *E. coli dnaJ*-Gen kodieren, wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf Agarplatten getropft und bei drei unterschiedlichen Temperaturen (30 °C, 37 °C und 40 °C) inkubiert. Als Positivkontrolle (PK) diente der *E. coli* $\Delta dnaJ$ -Stamm transformiert mit dem Plasmid, welches das *E. coli* DnaJ kodiert. Die Negativkontrolle (NK) stellte der mit dem Leerplasmid transformierte *E. coli*-Stamm dar.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, wies der mit dem Leerplasmid (Negativkontrolle) transformierte $\Delta dnaJ$ -Stamm bei 30 °C und 37 °C in fast allen Verdünnungsstufen ein Wachstum auf, wohingegen bei 40 °C kein Wachstum beobachtet werden konnte. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um den Stamm OD259 transformiert mit dem Plasmid pMalpAcYc-dnaJEC, welches das *E. coli dnaJ* kodiert. Dieser Stamm zeigte bei allen getesteten Temperaturen in fast jeder Verdünnungsstufe ein Wachstum. Bei Expression der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* konnte sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C bei allen Zellen ein Wachstum beobachtet werden. Die Expression der Gene *slr0093* und *slI0897* führte bei beiden Temperaturen zu einem Wachstum der Zellen bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} . Bei 40 °C konnte, neben der Positivkontrolle, nur die Expression der Proteine Slr0093 bzw. SlI0897 den Wachstumsdefekt des *E. coli* $\Delta dnaJ$ -Stammes komplementieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die DnaJ-Proteine Slr0093 und SlI0897 die Funktion des DnaJ-Proteins aus *E. coli* in dem heterologen System übernehmen können. Der Erfolg einer Komplementation hängt von einer erfolgreichen Expression des zu untersuchenden Proteins ab. Um dies zu überprüfen, wurden die *E. coli* Zellextraktproben durch Zentrifugation in die einzelnen Zellfraktionen aufgeteilt und gleiche Proteinkonzentrationen von je 10 μ g der löslichen Fraktionen der bei 30 °C gewachsenen Komplementationsstämme in 14%igen SDS-Gelen aufgetrennt. In anschließend durchgeführten Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Proteinexpression mit den jeweils spezifischen anti-DnaJ Antikörpern (Abbildung 12).

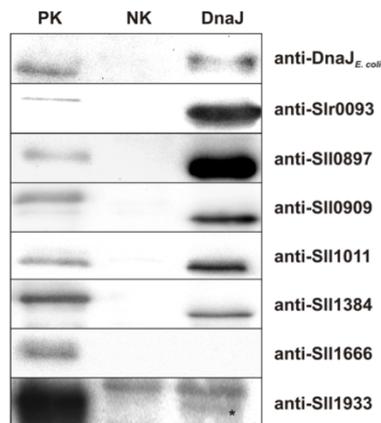


Abbildung 12: Western-Blot Analyse zum Nachweis der Expression der DnaJ-Proteine. Die Proteine (je 10 µg) der löslichen Fraktionen der untersuchten Komplementationsstämme wurden in 14%igen SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend die Expression mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Als Positivkontrolle (PK) diente das jeweils gereinigte DnaJ-Protein. Bei der Negativkontrolle (NK) handelte es sich um die lösliche Proteinfraction des OD259-Stammes, der mit dem Leerplasmid transformiert wurde. DnaJ: *E. coli* OD259 transformiert mit den jeweiligen Plasmiden, die die cyanobakteriellen *dnaJ*-Gene bzw. das *dnaJ* aus *E. coli* tragen. Die Immunodetektion erfolgte mit dem jeweils aufgeführten Antikörper. *: Bande, bei der es sich um das DnaJ-Protein Sll1933 handelt.

Die Ergebnisse zeigten, dass mit Ausnahme des C-terminal verkürzten DnaJ-Proteins Sll1666-TM alle DnaJ-Proteine in *E. coli* exprimiert werden, wobei das Expressionsniveau der DnaJ-Proteine unterschiedlich stark ist. Die beiden DnaJ-Proteine Slr0093 und Sll0897 zeigten das stärkste Expressionsniveau.

3.3 Disruption der sieben *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis*

Das Vorkommen multipler DnaJ-Proteine in *Synechocystis* sp. führt zu der Frage, ob jedes einzelne Protein und dessen Funktionen in dem Cyanobakterium essentiell ist, oder aber die Funktion eines DnaJ-Proteins durch ein anderes DnaJ ersetzt werden kann. Zur Charakterisierung der DnaJ-Proteinfamilie in *Synechocystis* wurden daher Deletions- und Insertionsmutanten generiert. Die sieben *dnaJ*-Gene, die eine kanonische J-Domäne mit einem HPD-Motiv kodieren, wurden durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochen, ohne dass ein Genabschnitt entfernt wurde. Die mittels Phusion-Polymerase aus dem Plasmid pAcYc184 amplifizierte Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde über „blunt-end“ Ligation in die geschnittenen pCR[®]2.1-Plasmide mit den *dnaJ*-Genen eingefügt. In Abbildung 13 sind die jeweiligen *dnaJ*-Gene mit den entsprechenden „blunt-end“ Schnittstellen gezeigt. Das Restriktionsenzym *Asi*I schneidet mit überhängenden Enden, weshalb ein Zwischenschritt zur Generierung von „blunt-ends“ mit Klenow-Polymerase notwendig war. Die einzige Ausnahme stellte *sll1666* dar, da keine geeignete

Schnittstelle zur Klonierung einer Insertionsmutanten vorlag. Daher wurde ein kurzer Genabschnitt entfernt, durch die Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt und dadurch eine teilweise Deletion von *sll1666* erzielt.

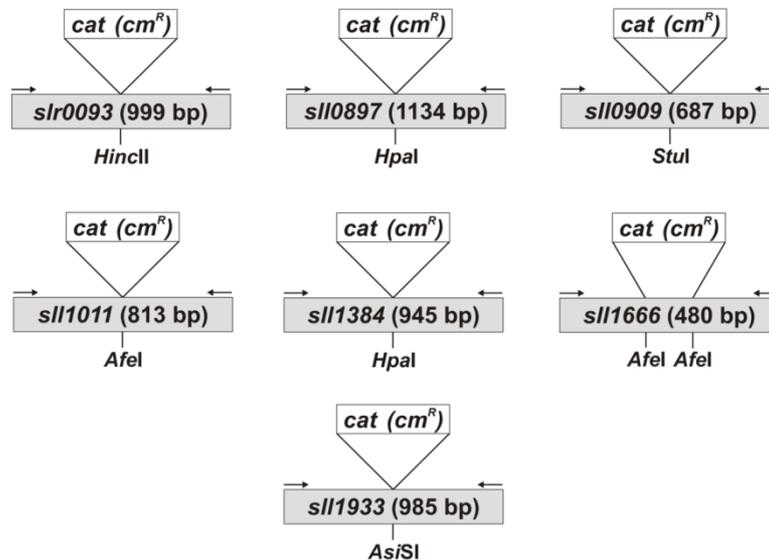


Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Disruption der *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* mittels Integration einer Chloramphenicol-Resistenzkassette. Die *dnaJ*-Gene wurden mittels PCR aus WT-DNA amplifiziert und in das pCR[®]2.1-Plasmid kloniert. Über die angegebenen Schnittstellen wurde die Resistenzkassette *cat (cm^R)* eingefügt. Die Größe der sieben *dnaJ*-Gene ist in Klammer angegeben. Die Größe der Chloramphenicol-Resistenzkassette beträgt 878 bp. Die Pfeile zeigen die Bindestellen der für die Amplifikation der *dnaJ*-Gene verwendeten Primer.

Die Disruptions- und Insertionskonstrukte (pCR[®]2.1 Δ *dnaJ*-*cm^R*-Plasmide) wurden in den *Synechocystis* WT-Stamm transformiert und die fremde DNA über homologe Rekombination in das Genom integriert. Dies führte dazu, dass das Wildtyp *dnaJ*-Gen durch das unterbrochene *dnaJ*-Gen ersetzt wird. *Synechocystis* weist multiple Genomkopien auf, weshalb zur vollständigen Integration der DNA in alle Genomkopien eine stetige Erhöhung des Selektionsdruckes erfolgen muss. Durch Kultivierung der Zellen auf Agarplatten mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr sollte eine vollständige Integration in alle Genomkopien erreicht werden. Zur Kontrolle einer vollständigen Integration der transformierten DNA in das *Synechocystis*-Genom wurde von Kolonien ab einer Antibiotikakonzentration von 70 μ g/ml der Segregationsstatus der Δ *dnaJ*-Stämme mittels analytischer PCR überprüft. Die Überprüfung erfolgte regelmäßig nach Koloniebildung auf Agarplatten mit der nächst höheren Antibiotikastufe. Hat keine Integration bzw. lediglich eine teilweise Integration stattgefunden, so wird der Wildtyp-DNA Abschnitt bzw. der Wildtyp-DNA

Abschnitt und der teilweise neu integrierte DNA-Abschnitt amplifiziert. Bei einer vollständigen Integration wird lediglich der neu eingebrachte und somit vollständig segregierte DNA-Abschnitt amplifiziert. Bei der Überprüfung der PCR mittels Agarosegelelektrophorese können die Amplifikate aufgrund ihrer Größe deutlich unterschieden werden. Nach Isolierung der genomischen DNA der einzelnen $\Delta dnaJ$ -Stämme und des WT-Stammes wurde 1-2 μ g DNA eingesetzt und mit Hilfe der in Tabelle 3 aufgelisteten Oligonukleotide zur Amplifikation der *Synechocystis dnaJ*-Gene eine analytische PCR durchgeführt. Das Ergebnis wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Als Positivkontrolle diente dabei das jeweilige pCR[®]2.1 $\Delta dnaJ$ -cm^R-Plasmid.

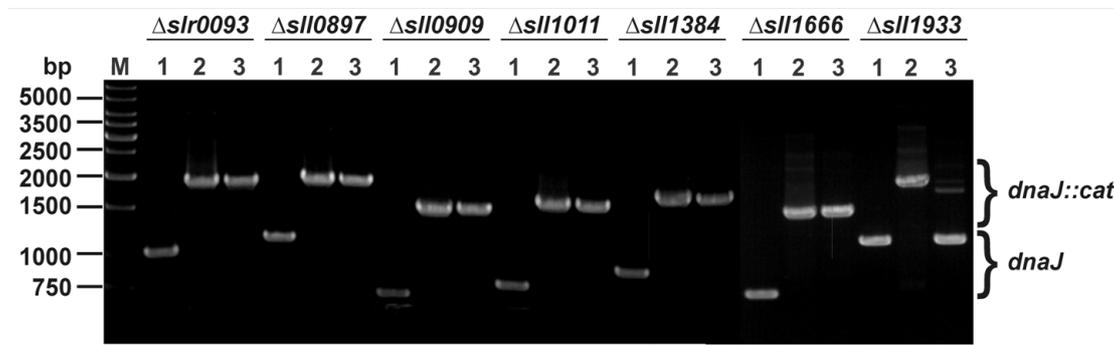


Abbildung 14: Analytische PCR zur Überprüfung der vollständigen Integration der unterbrochenen *dnaJ*-Gene in das *Synechocystis* WT-Genom der einzelnen $\Delta dnaJ$ -Stämme. Als Negativkontrolle (1) diente genomische *Synechocystis* WT-DNA als PCR „template“. Bei der Positivkontrolle (2) handelt es sich um die pCR[®]2.1 $\Delta dnaJ$ -cm^R-Plasmide. In Spur 3 sind die Produkte der PCR mit der jeweiligen isolierten genomischen DNA der $\Delta dnaJ$ -Stämme als „template“ gezeigt. M: Gene Ruler[™] 1 kb Ladder von Fermentas, *dnaJ::cat*: *dnaJ*-Gen, welches durch die Chloramphenicol-Resistenzkassette mutiert ist.

Die Ergebnisse der analytischen PCR zur Überprüfung des Segregationsstatus (Abbildung 14) zeigen, dass die mit der Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochenen *dnaJ*-Gene in den Stämmen $\Delta slr0093$, $\Delta sll0897$, $\Delta sll0909$, $\Delta sll1011$, $\Delta sll1384$ und $\Delta sll1666$ in allen Genomkopien vollständig das WT *dnaJ*-Gen ersetzt haben. Bei der Kontrolle nach Amplifikation der WT-DNA mit den entsprechenden *dnaJ*-Primern (Spur 1) sind PCR-Produkte, welche der Größe der einzelnen *dnaJ*-Gene zuzuordnen sind, zu erkennen. Das „template“ der zweiten Kontrolle stellten die Plasmide mit den durch die Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochenen *dnaJ*-Genen dar, weshalb die Ergebnisse der PCR etwa um 880 bp (Chloramphenicol-Resistenzkassette) vergrößerte Amplifikate zeigten (Spur 2). Die PCR-Produkte der $\Delta dnaJ$ -Stämme zeigten nach PCR-Analyse ebenfalls eine Vergrößerung der Amplifikate um etwa 880 bp (Spur 3) im Vergleich zum WT-

Amplifikat (Spur 1), was durch die Größe der eingefügten Chloramphenicol-Resistenzkassette erklärt werden kann. Die PCR-Analyse der genomischen DNA des $\Delta sll1933$ -Stammes zeigte zusätzlich zu dem Amplifikat von etwa 1300 bp, welches dem unterbrochenen *dnaJ* entspricht, eine weitere Bande bei etwa 980 bp. Diese entspricht der Größe des WT *sll1933*-Gens (Spur 1 und 3). Das PCR-Produkt nach Amplifikation des unterbrochenen, plasmidkodierten *sll1933*-Gens weist eine Größe von ca. 1500 bp auf (Spur 2). Der Größenunterschied bei Vergleich der Kontrolle mit dem PCR-Produkt des $\Delta sll1933$ -Stammes kann dadurch erklärt werden, dass die homologe Rekombination über den kompletten Bereich des *sll1933* erfolgen kann. Die eingesetzten Primer binden mit einer reduzierten Wahrscheinlichkeit an verschiedenen Stellen des *sll1933*-Gens, wodurch das Entstehen der Amplifikate erklärt werden kann. Das Ergebnis der PCR-Analysen der DNA des $\Delta sll1933$ -Stammes zeigte jedoch, dass das WT *sll1933* in diesem Stamm nicht in allen Genomkopien vollständig durch das unterbrochene *dnaJ* ersetzt wurde. Eine Einzeldisruption konnte bei den *dnaJ*-Genen *slr0093*, *sll0897*, *sll0909*, *sll1011*, *sll1384* und *sll1666* erreicht werden. Dies war jedoch nicht bei dem *dnaJ sll1933* möglich, weshalb anzunehmen ist, dass dieses Gen bei den untersuchten Wachstumsbedingungen essentiell ist.

3.4 Doppeldeletion von zwei *dnaJ*-Genen aus *Synechocystis*

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass eine Unterbrechung von sechs *dnaJ*-Genen aus *Synechocystis* möglich ist und deren physiologische Funktion durch die intakten *dnaJ*-Gene offensichtlich übernommen wird bzw. nicht essentiell ist. Nur *sll1933* scheint bei den untersuchten Wachstumsbedingungen essentiell zu sein, da das Gen nicht vollständig in allen Genomkopien unterbrochen werden konnte. Zur Untersuchung inwieweit die Funktionen der einzelnen DnaJ-Proteine überlappen oder ob einzelne DnaJ-Proteine spezifische Funktionen ausüben, sollten parallel zwei *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* durch Insertion von Resistenzkassetten unterbrochen werden. Eine vollständige Integration der beiden unterbrochenen *dnaJ*-Gene in das Genom würde zeigen, dass die spezifischen Funktionen dieser beiden Proteine nicht überlappen und von den intakten DnaJ-Proteinen übernommen werden können. Um das zu untersuchen, wurden die *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* durch Insertion einer Sepctionmycin-Resistenzkassette, wie bereits für die Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette beschrieben, unterbrochen. Die $\Delta dnaJ$ -

Stämme wurden jeweils mit einem pCR[®]2.1 $\Delta dnaJ$ -*spec*^R-Plasmid transformiert. Dadurch sollte neben dem durch die Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochenen *dnaJ*-Gen ein zweites *dnaJ*-Gen im Genom durch Insertion einer Spectinomycin-Resistenzkassette unterbrochen werden. Zur Selektion wurden die Stämme auf BG11-Agarplatten mit steigenden Konzentrationen an Spectinomycin kultiviert. Durch den Selektionsdruck sollte eine Integration der unterbrochenen *dnaJ*-Gene in alle Genomkopien erreicht werden. Der Erfolg der eingefügten *dnaJ* Mutation durch Insertion von *spec*^R in einen $\Delta dnaJ$ *Synechocystis*-Stamm wurde durch PCR-Analyse mit den in Tabelle 3 aufgeführten Primern überprüft. Die Ergebnisse der analytischen PCR zur Überprüfung des Segregationsstatus sind in Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 11: Übersicht der möglichen Doppeldisruptionen der *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochenen *dnaJ*-Stämme wurden mit einem Plasmid, das ein weiteres, durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette unterbrochenes *dnaJ* enthält, transformiert. Eine komplette Unterbrechung von zwei *dnaJ*-Genen gleichzeitig ist nur bei der Kombination $\Delta sll1384/\Delta sll0909$ möglich. Grau hinterlegte Felder stellen Kombinationen dar, die nicht möglich sind.

		<i>cm</i> ^R						
		$\Delta slr0093$	$\Delta sll0897$	$\Delta sll0909$	$\Delta sll1011$	$\Delta sll1384$	$\Delta sll1666$	$\Delta sll1933$
<i>spec</i> ^R	$\Delta slr0093$		-	-	-	-	-	
	$\Delta sll0897$	-		-	-	-	-	
	$\Delta sll0909$	-	-		-	✓	-	
	$\Delta sll1011$	-	-	-		-	-	
	$\Delta sll1384$	-	-	-	-		-	
	$\Delta sll1666$	-	-	-	-	-		
	$\Delta sll1933$							

Wie in Tabelle 11 gezeigt, können nur die *dnaJ*-Gene *sll1384* und *sll0909* in Kombination unterbrochen werden. Nur in diesem Fall konnte eine komplette Integration der beiden unterbrochenen *dnaJ*-Gene in allen Genomkopien nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die Funktionen beider *dnaJ*-Gene bei den untersuchten Wachstumsbedingungen nicht essentiell sind und von intakten *dnaJ*-Genen übernommen werden können. Die Tatsache, dass keine weiteren Doppelmutationen möglich sind, zeigt dass eine gleichzeitige Fehlfunktion von zwei DnaJ-Proteinen in *Synechocystis* nicht von anderen kompensiert werden kann. Da *sll1933* nicht in allen Genomkopien durch das mutierte *sll1933* ersetzt werden konnte, wurde der $\Delta sll1933$ Stamm für die Doppeldisruptionsstudien nicht verwendet.

3.5 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der $\Delta dnaJ$ -Stämme

Mit Hilfe der bisherigen Ergebnisse wurden mögliche Mutationen der *dnaJ* Gene in *Synechocystis* sp. unter normalen Wachstumsbedingungen untersucht. DnaJ-Proteine sind Ko-Chaperone der DnaK-Proteine und spielen bei der Stressantwort der Zelle, wie z. B. bei wechselnden Temperatureinflüssen eine entscheidende Rolle (Cyr *et al.*, 1994; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Daher sollten die Auswirkungen der Disruption der einzelnen *dnaJ*-Gene auf das Wachstumsverhalten der $\Delta dnaJ$ -Stämme charakterisiert werden. Dazu wurden Wachstumskurven mit den $\Delta dnaJ$ -Stämmen und dem *Synechocystis* WT-Stamm bei verschiedenen Temperaturen erstellt. Sowohl der Wildtyp-Stamm als auch die komplett segregierten $\Delta dnaJ$ -Stämme wurden autotroph in BG11-Flüssigmedium angeimpft und anschließend sowohl bei Normaltemperatur (30 °C) als auch unter Hitzeschock-Bedingungen (42 °C) und bei Kältestress (20 °C) kultiviert. Abbildung 15 zeigt die Wachstumskurven der untersuchten $\Delta dnaJ$ -Stämme.

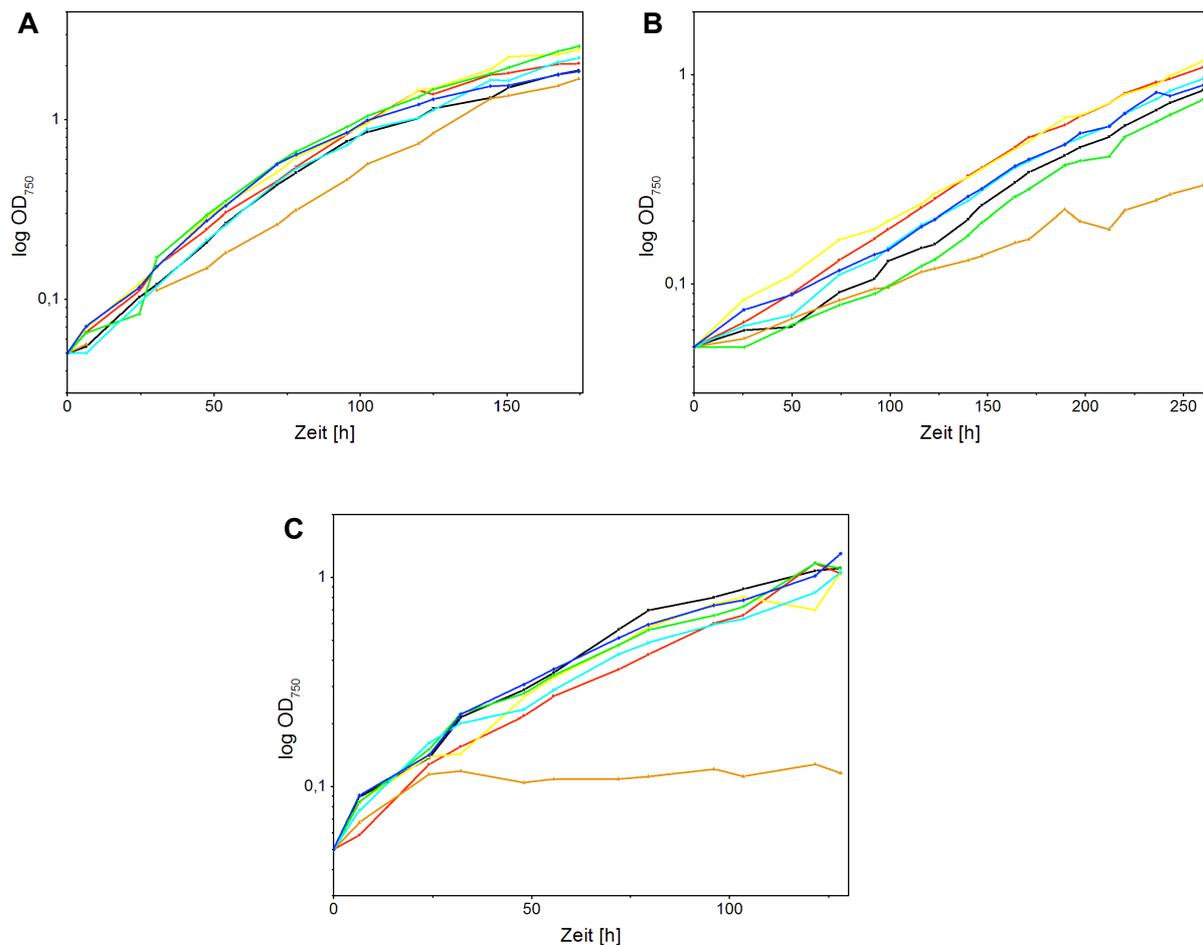


Abbildung 15: Wachstumskurven des *Synechocystis* WT-Stammes und der sechs $\Delta dnaJ$ -Stämme bei verschiedenen Wachstumstemperaturen. Zu Beginn der Messung wurde die OD_{750} bei allen untersuchten Kulturen auf 0,05 eingestellt und die Kulturen unter autotrophen Wachstumsbedingungen bei **A**: Normaltemperatur (30 °C), **B**: Kältestress (20 °C) und **C**: Hitzestress (42 °C) kultiviert. Die OD_{750} der untersuchten Stämme wurde bis zum Erreichen der stationären Phase zweimal täglich bestimmt. Die OD_{750} wurde logarithmisch gegen die Zeit [h] aufgetragen. **Schwarz**: *Synechocystis* WT, **rot**: $\Delta sll0093$, **orange**: $\Delta sll0897$, **gelb**: $\Delta sll0909$, **grün**: $\Delta sll1011$, **hellblau**: $\Delta sll1384$, **dunkelblau**: $\Delta sll1666$.

Bei den untersuchten Wachstumsbedingungen zeigten die untersuchten $\Delta dnaJ$ -Stämme ein vergleichbares Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Eine verringerte Wachstumsaktivität bei optimaler Kultivierungstemperatur (30 °C) und unter Kältestressbedingungen (20 °C) wies lediglich der $\Delta sll0897$ -Stamm (Abbildung 15 A und B, orange) auf. Unter Hitzestressbedingungen (42 °C) zeigte die Mutante $\Delta sll0897$ nach etwa 24 h kein Wachstum mehr, da keine Steigerung der OD_{750} mehr zu detektieren war (Abbildung 15 C). Auch hier zeigten die anderen $\Delta dnaJ$ -Stämme ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Anhand der ermittelten Wachstumskurven bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen wurden die Verdopplungszeiten der einzelnen Stämme bestimmt (Abbildung 16).

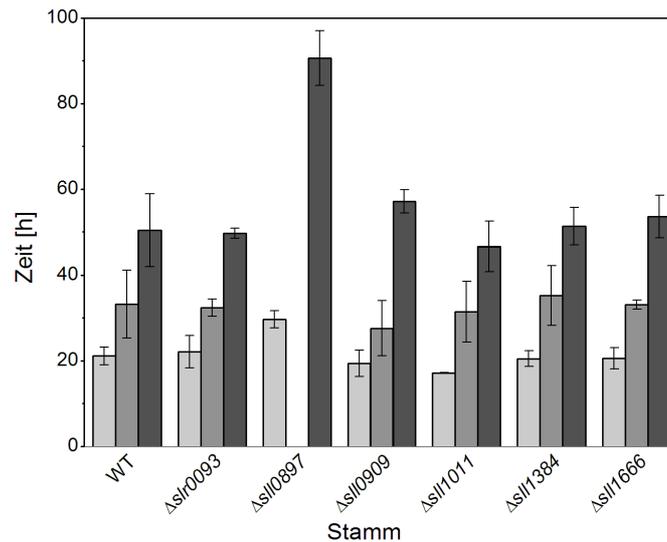


Abbildung 16: Verdopplungszeiten des Wildtyp-Stammes und der $\Delta dnaJ$ -Stämme bei verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die Verdopplungszeiten wurden anhand der gemessenen Wachstumskurven bei den unterschiedlichen Temperaturen ermittelt. Die Wachstumskurven wurden in Dreifachbestimmung gemessen und die daraus resultierenden Standardabweichungen (Fehlerbalken) errechnet. Die Verdopplungszeiten bei 30 °C (hellgrau), 42 °C (grau) und 20 °C (dunkelgrau) wurden gegen den jeweiligen Stamm (WT, $\Delta slr0093$, $\Delta sll0897$, $\Delta sll0909$, $\Delta sll1011$, $\Delta sll1384$ und $\Delta sll1666$) aufgetragen.

Die ermittelten Verdopplungszeiten zeigten, dass die Disruption des *sll0897*-Gens einen starken Einfluss auf das Wachstumsverhalten des $\Delta sll0897$ -Stammes hat. Bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C zeigte dieser Stamm eine Verdopplungszeit von etwa 30 h und lag damit etwa 50 % über den Zeiten des Wildtyp-Stammes und der anderen untersuchten $\Delta dnaJ$ -Stämmen. Gleiches war auch unter Kältestressbedingungen (20 °C) zu beobachten. Der Hitzestress bei 42 °C führte zum Absterben des $\Delta sll0897$ -Stammes. Abbildung 16 verdeutlicht außerdem eine Zunahme der Verdopplungszeiten der getesteten Stämme bei 42 °C und 20 °C im Vergleich zur optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C.

3.6 Untersuchungen zur Pigmentzusammensetzung der $\Delta dnaJ$ -Stämme

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Typ I DnaJ Sll0897 eine besondere Rolle für das Wachstumsverhalten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 aufweist und unter Hitzestressbedingungen essentiell ist. Um die besondere Rolle des Sll0897 näher zu untersuchen, wurde die Pigmentzusammensetzung der $\Delta dnaJ$ -Stämme untersucht. Dazu wurden von ganzen Zellen, sowohl der $\Delta dnaJ$ -Stämme als auch des *Synechocystis* WT-Stammes, Absorptionsspektren nach Kultivierung bei Hitzestress-Bedingungen (42 °C) aufgenommen. Eine Inkubation bei 42 °C ist für den Stamm $\Delta sll0897$ lethal, weshalb die Stämme dieser Stressbedingung nur 16 h ausgesetzt

wurden. Um die Spektren der verschiedenen Deletionsstämme direkt miteinander vergleichen zu können, wurde für die Messung die gleiche Anzahl von Zellen (300000) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 gezeigt.

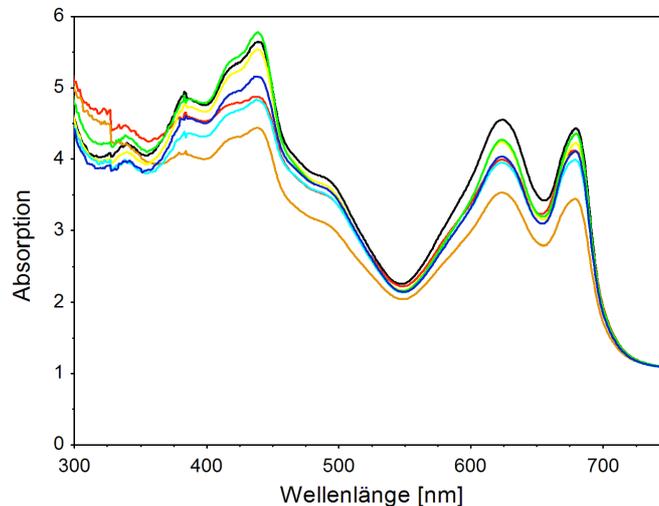


Abbildung 17: Absorptionsspektren des *Synechocystis* WT-Stammes und der $\Delta dnaJ$ -Stämme bei 42° C. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Zellsuspension von 300000 Zellen in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 750 nm. Die Spektren wurden auf den Messwert bei 750 nm normiert und gegen die relative Absorption aufgetragen. **Schwarz:** WT, **rot:** $\Delta slr0093$, **orange:** $\Delta sll0897$, **gelb:** $\Delta sll0909$, **grün:** $\Delta sll1011$, **hellblau:** $\Delta sll1384$, **dunkelblau:** $\Delta sll1666$. Die Absorptionsmaxima von Chlorophyll a liegen bei 430 nm und 680 nm, das Maximum der Karotinoide um etwa 500 nm und das der Phycobilisomen bei 620 nm.

Die Absorptionsspektren des $\Delta sll0897$ -Stammes zeigten im Vergleich zum WT und den anderen $\Delta dnaJ$ -Stämmen eine deutliche Absorptionsabnahme des Chlorophylls und der Phycobilisomen. Ebenfalls konnte eine Abnahme der Karotinoid-Absorption detektiert werden. Die in Abbildung 17 gezeigten Spektren unterstützen die Beobachtung der vorherigen Versuche, dass das Sll0897-Protein eine wichtige physiologische Funktion in *Synechocystis* zu haben scheint.

Um den $\Delta sll0897$ Mutationsstamm im Bezug auf die Photosysteme weiter zu charakterisieren, wurden sogenannte 77 K-Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Durch das Einfrieren ganzer Zellen bei 77 Kelvin ist es möglich, eine Veränderung des PS I- zu PS II-Verhältnisses spektroskopisch nachzuweisen. Um das Verhältnis der Photosysteme zu untersuchen, wurde der $\Delta sll0897$ -Stamm und der WT-Stamm etwa 16 h unter Hitzeschockbedingungen bei 42 °C kultiviert, anschließend ganze Zellen bei 77 K schockgefroren und nach Anregung der Chlorophylle bei 435 nm die Fluoreszenzemission gemessen. Abbildung 18 zeigt die 77 K-Spektren der untersuchten Stämme. Es ist zu erkennen, dass der für das Chlorophyll am Photosystem I charakteristische Peak bei 725 nm bei der Mutante im

Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Die beiden für das Photosystem II typischen Maxima bei 685 nm und 695 nm zeigen sowohl beim WT als auch bei der Mutante eine gleiche relative Fluoreszenzemission. Somit führte eine Disruption von *sII0897* zu einem verringerten PS I- zu PS II-Verhältnis.

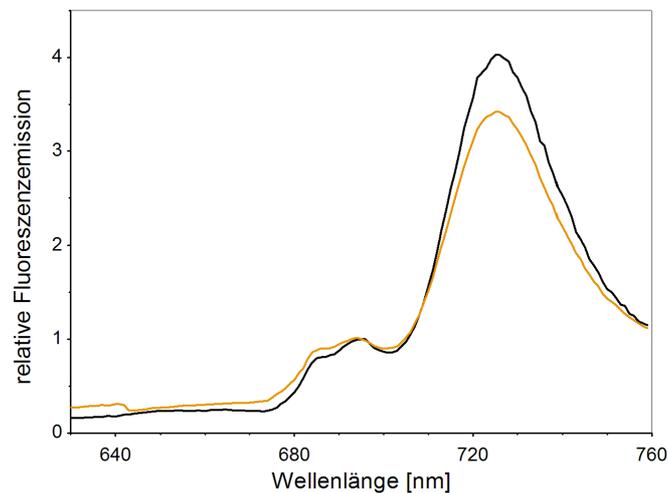


Abbildung 18: 77 K-Fluoreszenzemissionsspektren der *Synechocystis* WT und $\Delta sII0897$ -Zellen nach Kultivierung bei 42 °C. Nach Anregung der Chlorophylle bei 435 nm zeigte die Mutante (orange) im Vergleich zum WT (schwarz) eine Verringerung der für die Chlorophylle am PS I charakteristischen Absorption bei 725 nm. Die relative Fluoreszenzemission der PS II Maxima bei 685 nm und 695 nm war bei beiden Stämmen annähernd gleich. Die Spektren wurden auf 695 nm normiert.

3.7 Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von $\Delta sII0897$ bei Expression verkürzter SII0897-Varianten

Die Untersuchungen der $\Delta dnaJ$ -Disruptionsstämmen lassen auf eine wichtige Rolle des DnaJ-Proteins SII0897 in *Synechocystis* schließen. Der Disruptionsstamm des *sII0897*-Gens zeigte bei den verschiedenen Temperaturbedingungen im Vergleich zum Wildtyp ein langsames Wachstum bei 20 °C und 30 °C, wohingegen die Disruption von *sII0897* unter Hitzestressbedingungen zu einem Absterben des $\Delta sII0897$ -Stammes führte.

Um untersuchen zu können, welche Domänen des SII0897 DnaJ-Proteins für das Wachstum des Cyanobakteriums *Synechocystis* unter Hitzestressbedingungen notwendig sind, sollte das komplette genomische *dnaJ sII0897* durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette deletiert werden (Abbildung 19). Anschließend wurden verkürzte Genvarianten von *sII0897* wieder eingebracht, um nach Expression deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten untersuchen zu können.

Zur Deletion von *sll0897* wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *HincII* und *SspI* ein 505 bp großes Fragment herausgeschnitten und durch die Chloramphenicol-Resistenzkassette (878 bp) als Selektionsmarker ersetzt. Diese Deletion führte zu einer vollständigen Zerstörung des *sll0897*-Gens. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass ein Bereich des für die J-Domäne kodierenden Sequenzabschnittes und etwa ein Drittel des Bereichs, der für die C-terminale Domäne kodiert, entfernt wurden. Im Gegensatz zur Insertionsmutante, bei der die J- und G/F-Domäne enthalten sind und eventuell noch exprimiert werden können, kann bei der hier vorgestellten Deletion von *sll0897* keine Domäne vollständig exprimiert werden (Abbildung 19).

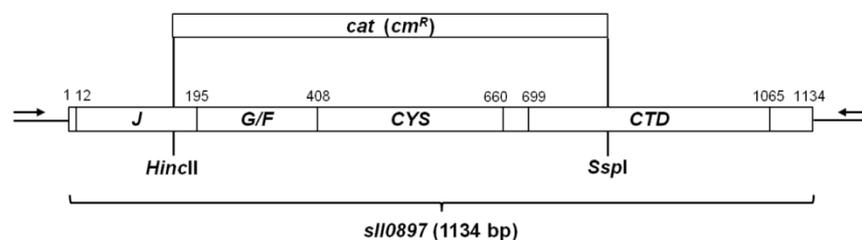


Abbildung 19: Klonierungsstrategie zur kompletten Deletion des endogenen *sll0897* aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Das aus genomischer WT-DNA amplifizierte und in das pCR[®]2.1-Plasmid ligierte *sll0897* wurde durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (*cat (cm^R)*) über *HincII* und *SspI* deletiert. J, G/F, CYS und CTD bezeichnet die Domänen, die von den entsprechenden Sequenzabschnitten kodiert werden. Die Zahlen geben die Nukleotide der einzelnen Sequenzabschnitte an. Die Pfeile zeigen die Bindestellen für die Primer, die zur Überprüfung der kompletten Segregation des deletierten *sll0897* in das Genom verwendet wurden.

Nach Transformation der *Synechocystis* WT-Zellen wurde der $\Delta sll0897$ -Deletionsstamm kontinuierlich auf Agarplatten mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen kultiviert. Die vollständige Segregation des deletierten endogenen *sll0897* im Genom von *Synechocystis* wurde mittels einer analytischen PCR überprüft. Abbildung 21 A ist zu entnehmen, dass nach Amplifikation der genomischen WT-DNA mit dem Primerpaar 5' *sll0897*+ / 3' *sll0897*+ eine Bande bei einer Größe von etwa 2000 bp zu erkennen ist (Spur 1), welche dem WT *sll0897* entspricht. Die PCR der genomischen DNA des $\Delta sll0897$ -Deletionsstammes wies zwei Banden bei ca. 2000 bp bzw. ca. 2300 bp auf (Spur 2), welche dem WT *sll0897* bzw. dem deletierten *sll0897* entsprechen. Die Ergebnisse zeigten, dass eine komplette Deletion von *sll0897* unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht möglich ist, da es sich scheinbar um ein essentielles Gen von *Synechocystis* handelt.

In einem weiteren Schritt wurde der teilweise segregierte $\Delta sll0897$ -Deletionsstamm für einen weiteren Transformationsschritt verwendet. Dazu wurden Plasmide, mit verkürzten Varianten des *sll0897*, in den Deletionsstamm transformiert. Die verkürzten *dnaJ*-Genbereiche wurden mit Hilfe der entsprechenden Primer (Tabelle 3) amplifiziert und anschließend über *PstI* und *XbaI* in das pLA-Plasmid ligiert. Die Transformation des pLA-Plasmids erlaubt die stabile Integration an einer neutralen Stelle innerhalb des *Synechocystis* Genoms. Mittels homologer Rekombination spezieller plasmidkodierter Sequenzen wird eine Integration des veränderten Gens erzielt. Diese Rekombinationssequenzen flankieren das in das pLA-Plasmid ligierte Gen, sowie einen Bereich der für eine Kanamycin-Resistenz-kassette kodiert (Kunert *et al.*, 2000, Williams, 1988). Mit Hilfe der Domänen-exprimierenden Stämme sollte die Frage geklärt werden, welche Domänen mindestens für ein Wachstum unter optimalen Wachstumsbedingungen notwendig sind. Bei den so eingebrachten verkürzten Genbereichen handelt es sich um die Bereiche 1-195 bp (J-Domäne), 1-408 bp (J-G/F-Domäne), 1-660 bp (J-G/F-CYS-Domäne) und 1-1134 bp (J-G/F-CYS-CTD-Domäne) des *sll0897*-Gens (Abbildung 20).

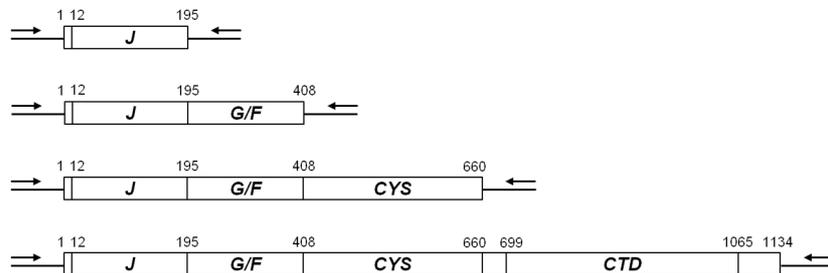


Abbildung 20: Schematische Darstellung der amplifizierten Genabschnitte von *sll0897*. *J*, *G/F*, *CYS* und *CTD* bezeichnet die Domänen, die von den entsprechenden Sequenzabschnitten kodiert werden. Bei dem verwendeten 5' Primer handelt es sich um 5' *sll0897*dom. Zur Amplifizierung der Genbereiche wurden folgende 3' Primer verwendet: 1-195 bp: 3' *sll0897*ohneGFCYSCTD; 1-408 bp: 3' *sll0897*ohneCYSCTD; 1-660 bp: 3' *sll0897*ohneCTD und 1-1134 bp: 3' *sll0897*fl.

Um eine vollständige Integration sowohl des deletierten *sll0897*-Gens, als auch der verkürzten Genbereiche von *sll0897* in das Genom zu erzielen, wurden die transformierten Stämme auf Agarplatten mit steigenden Kanamycin- und Chloramphenicol-Konzentrationen kultiviert. Die vollständige Integration der verkürzten *sll0897* Genfragmente an einer neutralen Stelle im *Synechocystis* Genom und der Fortschritt der Integration des deletierten endogenen *sll0897* im Genom wurden mit Hilfe einer analytischen PCR untersucht (Abbildung 21).

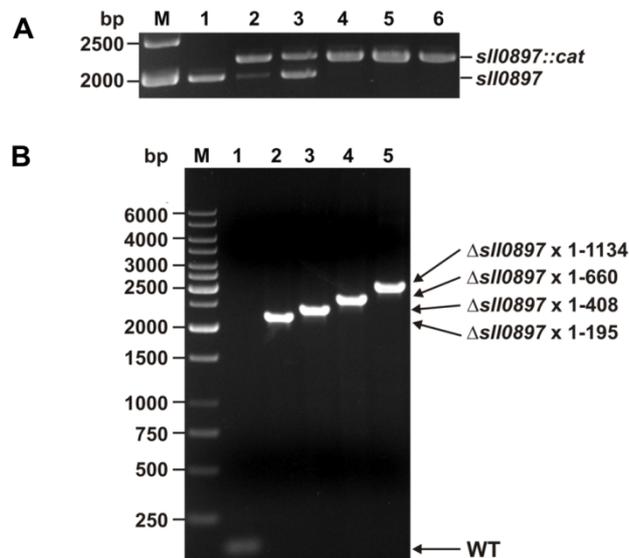


Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung des Segregationsstatus von $\Delta sll0897$ (A) und der vollständigen Integration der verkürzten *sll0897* Genabschnitte an einer neutralen Stelle im *Synechocystis* Genom (B). **A:** Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgte mit dem Primerpaar 5' sll0897+/3' sll0897+. Spur 1: Amplifikat der WT-DNA, Spur 2: Amplifikat des $\Delta sll0897$ -Stammes. In den Spuren 3-6 sind die PCR-Produkte des $\Delta sll0897$ -Stammes, welcher zusätzlich verkürzte Varianten des Sll0897 exprimiert, aufgetragen. 3: $\Delta sll0897$ x 1-195, 4: $\Delta sll0897$ x 1-408, 5: $\Delta sll0897$ x 1-660 und 6: $\Delta sll0897$ x 1-1134. **B:** Überprüfung des Segregationsstatus der *sll0897*-Genabschnitte durch Amplifikation der genomischen DNA mit dem Primerpaar pILA_SeqCheck/ pILA_SeqCheck2. Spur 1: WT-DNA, Spur 2: $\Delta sll0897$ x 1-195, Spur 3: $\Delta sll0897$ x 1-408, Spur 4: $\Delta sll0897$ x 1-660 und Spur 5: $\Delta sll0897$ x 1-1134. M. Größenstandard Gene Ruler™ 1 kb Ladder.

Zur Überprüfung des Segregationsstatus der *sll0897* Genabschnitte wurde die isolierte genomische DNA zu einer PCR-Analyse mit dem Primerpaar pILA_SeqCheck/pILA_SeqCheck2 eingesetzt (Abbildung 21 B). In Spur 1 (WT-DNA) ist ein PCR-Produkt unterhalb von 250 bp zu erkennen, wobei es sich um Abschnitte der Rekombinationssequenzen, die für die stabile Integration in das Genom notwendig sind, handelt. Die Fragmente in den Spuren 2 bis 5 mit den Größen von etwa 2400 bp, 2600 bp, 2900 bp und 3300 bp stellen die PCR-Produkte nach Amplifikation der genomischen DNA der Stämme $\Delta sll0897$ x 1-195, $\Delta sll0897$ x 1-408, $\Delta sll0897$ x 1-660 und $\Delta sll0897$ x 1-1134 dar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verkürzten *sll0897*-Genbereiche vollständig in alle Genomkopien von *Synechocystis* integriert wurden, da keine WT-Bande mehr detektiert werden konnte.

In einem weiteren Schritt wurden PCR-Analysen bezüglich des Segregationsstatus des $\Delta sll0897$ -Gens durchgeführt (Abbildung 21 A). Nach Amplifikation der genomischen DNA von $\Delta sll0897$ x 1-195 (Spur 3) konnten zwei Banden bei etwa 2000 bp und 2300 bp detektiert werden. Die Bande bei ca. 2000 bp entspricht der Größe des WT *sll0897* und die größere Bande dem durch Chloramphenicol-

Resistenzkassette deletierten $\Delta sll0897$. Nach Amplifikation der genomischen DNA von $\Delta sll0897 \times 1-408$, $\Delta sll0897 \times 1-660$ und $\Delta sll0897 \times 1-1134$ zeigte sich im Agarosegel jeweils eine einzelne Bande der Größe von etwa 2275 bp (Spuren 4-6), welche dem deletierten *sll0897* (*sll0897::cat*) entspricht. Dies zeigte eine vollständige Segregation des deletierten *sll0897* in das Genom von *Synechocystis* in den Stämmen $\Delta sll0897 \times 1-408$, $\Delta sll0897 \times 1-660$ und $\Delta sll0897 \times 1-1134$, nicht jedoch in dem Stamm $\Delta sll0897 \times 1-195$. Die Ergebnisse der PCR-Analysen (Abbildung 21) bestätigten, dass eine vollständige Deletion des endogenen *sll0897* nur bei gleichzeitiger Expression mindestens der J- und G/F-Domäne von einer neutralen Stelle im Genom möglich ist. Dies zeigt, dass diese beiden Domänen für ein Wachstum bei optimalen Temperaturen für *Synechocystis* sp. essentiell sind.

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der $\Delta dnaJ$ *sll0897*-Stämme, die gleichzeitig die J-G/F, J-G/F-CYS oder J-G/F-CYS-CTD Domänen exprimieren, wurden Wachstumsexperimente bei Normaltemperatur (30 °C) und unter Hitzestress (42 °C) durchgeführt. Die Stämme $\Delta sll0897 \times 1-408$, $\Delta sll0897 \times 1-660$ und $\Delta sll0897 \times 1-1134$ (vgl. Abbildung 20) und der *Synechocystis* WT-Stamm wurden autotroph ausgehend von einer OD_{750} von 0,05 in BG11-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert und die Entwicklung der OD_{750} verfolgt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche graphisch dargestellt.

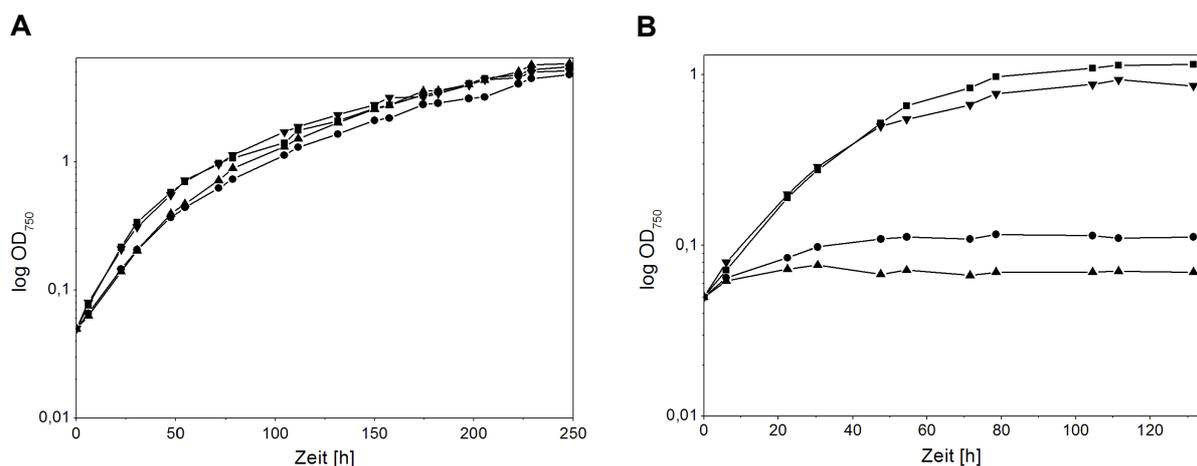


Abbildung 22: Wachstumskurven des *Synechocystis* WT-Stammes und der Stämme $\Delta sll0897 \times 1-408$, $\Delta sll0897 \times 1-660$, $\Delta sll0897 \times 1-1134$. A: Normaltemperatur (30 °C) und B: Hitzestress (42 °C). Zu Beginn der Messung wurde die OD_{750} bei allen Kulturen auf 0,05 eingestellt. Die gemessenen Werte wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. ■: WT, ●: $\Delta sll0897 \times 1-408$, ▲: $\Delta sll0897 \times 1-660$, ▼: $\Delta sll0897 \times 1-1134$.

Die Wachstumsexperimente (Abbildung 22 A) mit den domänenexprimierenden Stämmen zeigten bei 30 °C, dass die Stämme, welche die J- und G/F- ($\Delta sII0897$ x 1-408) bzw. die J-G/F- und CYS-Domäne ($\Delta sII0897$ x 1-660) exprimieren, zu Beginn der Messung im Vergleich zum WT und dem Stamm, der alle vier Domänen des SII0897 ($\Delta sII0897$ x 1-1134) exprimiert, ein leicht verzögertes Wachstum aufwiesen. Unter Hitzestressbedingungen (Abbildung 22 B) wurde dieser Effekt deutlicher. Bei den $\Delta sII0897$ -Stämmen, die die J-G/F- und J-G/F-CYS-Domänen exprimieren, konnte nach etwa 20 h bei 42 °C kein Wachstum mehr verzeichnet werden. Der $\Delta sII0897$ -Stamm, der das vollständige SII0897 ($\Delta sII0897$ x 1-1134) von einer neutralen Stelle im Genom exprimiert, zeigte bei Hitzestress ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der WT-Stamm. Die Ergebnisse zeigten, dass der C-terminale Abschnitt des SII0897-Proteins für die Hitzeschockantwort essentiell zu sein scheint.

Mit Hilfe der gemessenen Wachstumskurven der Domänen-exprimierenden Stämme wurden die Verdopplungszeiten bei den beiden untersuchten Wachstumstemperaturen bestimmt.

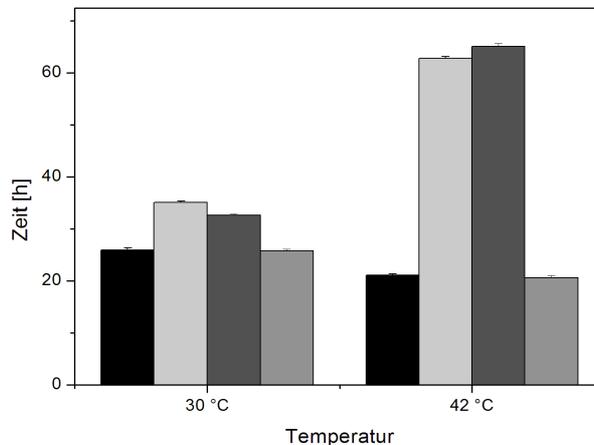


Abbildung 23: Verdopplungszeiten des WT-Stammes und der $\Delta sII0897$ x 1-195, $\Delta sII0897$ x 1-408, $\Delta sII0897$ x 1-660 und $\Delta sII0897$ x 1-1134-Stämme nach Kultivierung bei 30 °C bzw. 42 °C. Die Zeiten wurden anhand der gemessenen Wachstumskurven bei 30 °C und 42 °C ermittelt. Die Wachstumskurven wurden in Dreifachbestimmung ermittelt und die daraus resultierenden Standardabweichungen errechnet. Die Verdopplungszeiten der untersuchten Stämme wurden gegen die Temperatur aufgetragen. **Schwarz:** WT, **grau:** $\Delta sII0897$ x 1-408, **hellgrau:** $\Delta sII0897$ x 1-660 und **dunkelgrau:** $\Delta sII0897$ x 1-1134.

Abbildung 23 zeigt, dass der WT-Stamm und der $\Delta sII0897$ x 1-1134-Stamm sowohl bei 30 °C als auch bei 42 °C eine vergleichbare Verdopplungszeit besitzen. Bei 30 °C beträgt die Verdopplungszeit etwa 25 h, bei 42 °C verdoppeln sich die Zellen der beiden Stämme schneller (ca. 21 h). Die ermittelte Verdopplungszeit des

$\Delta s//0897$ x 1-408-Stammes beträgt bei 30 °C etwa 35 h und bei 42 °C etwa 63 h. Der Stamm $\Delta s//0897$ x 1-660 zeigt bei beiden Temperaturen auch eine im Vergleich zum WT gestiegene Verdopplungszeit. Diese beträgt bei 30 °C etwa 32 h und bei 42 °C etwa 65 h. Im Gegensatz zum Wildtyp und dem $\Delta s//0897$ -Stamm der das Volllängen-DnaJ exprimiert zeigten die ermittelten Verdopplungszeiten der Stämme $\Delta s//0897$ x 1-408 und $\Delta s//0897$ x 1-660 einen deutlichen Wachstumsdefekt an.

3.8 Zelluläre Lokalisation der DnaJ-Proteine in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen sollte die zelluläre Lokalisation der DnaJ-Proteine innerhalb des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 untersucht werden. Eine Ko-Lokalisation von DnaK und DnaJ in *Synechocystis* kann erste Hinweise auf mögliche DnaK-DnaJ Interaktionspartner liefern. Der Nachweis der Lokalisation erfolgte mittels Immunodetektion. Der Gesamtzellextrakt des *Synechocystis* Wildtyps wurde dazu in die lösliche Proteinfraction und die Membranfraction getrennt. Die Chlorophyllkonzentration des Zellextraktes und der Membranproteinfraktionen wurde wie in 2.10.7 beschrieben bestimmt. Jeweils 2 µg Chlorophyll wurden für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die verwendete Menge der löslichen Proteinfraction richtete sich nach der eingesetzten Menge des Zellextraktes. Die Proteine der einzelnen Fraktionen, des Gesamtzellextraktes sowie des Zellextraktes der $\Delta dnaJ$ -Stämme wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. In der anschließenden Western-Blot Analyse erfolgte der Nachweis der einzelnen DnaJ-Proteine mit dem jeweiligen Antikörper in der entsprechenden Konzentration (2.5). Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der immunologischen Detektion.

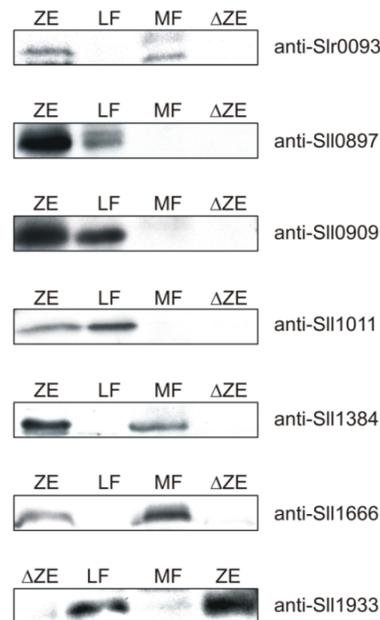


Abbildung 24: Western-Blot Analyse zum Nachweis der zellulären Lokalisation der sieben in *Synechocystis* sp. PCC 6803 exprimierten DnaJ-Proteine. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den angegebenen Antikörpern. Der als Negativkontrolle eingesetzte Zellextrakt (Δ ZE) ist jeweils dem entsprechenden Δ *dnaJ*-Stamm zuzuordnen. Zellextrakt (ZE), lösliche Fraktion (LF) und Membranfraktion (MF) wurden aus *Synechocystis* WT-Zellen gewonnen. Der Blot, der mit anti-Sll1933 entwickelt wurde zeigt ein verändertes Auftrageschema.

Der mit anti-Slr0093 inkubierte Blot zeigte sowohl im Gesamtzellextrakt, als auch in der Membranfraktion ein Signal, welches etwa einer molaren Masse von 36,4 kDa entspricht. Dies deutet auf eine Lokalisation des Slr0093-Proteins in oder an den Membranen hin. Bei den DnaJs Sll1384 (34,6 kDa) und Sll1666 (20,2 kDa) kann ebenfalls von einer Lokalisation in oder an den Membranen ausgegangen werden, da die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen ein eindeutiges Signal in dieser Fraktion zeigten. Bei den Proteinen Sll0897 (40,8 kDa), Sll0909 (26,4 kDa), Sll1011 (30,0 kDa) und Sll1933 (34,7 kDa) handelt es sich um lösliche Proteine, da ein Signal in der löslichen Fraktion detektiert werden konnte. Die Negativkontrollen zeigten keine Signale, da es sich dabei um den Zellextrakt der Stämme handelt, in denen das jeweilige *dnaJ* durch Disruption mutiert wurde. Lediglich bei dem Zellextrakt von Δ *sll1933* kann noch eine schwache Bande detektiert werden, da dieser Stamm nicht vollständig segregiert ist.

3.9 *In vivo* Promotoraktivitätsstudien der *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis*

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der drei *dnaK*-Gene aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. bei verschiedenen Stressbedingungen hochreguliert wird (Rupprecht *et al.*, 2007). Unter Hitzestressbedingungen konnte bei allen drei *dnaK*-Genen eine Steigerung der Promotoraktivität nachgewiesen werden, was einen Hinweis auf ihre Wirkung als Hitzeschockproteine gibt. Da es sich bei den DnaJ-Proteinen um die Ko-Chaperone der DnaKs handelt, sollten auch die Expression der *dnaJ*-Gene bei Hitze und weiteren Stressbedingungen eine Induktion der Promotoraktivität aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden die Promotorregionen der Gene *slr0093*, *sll0897*, *sll0909*, *sll1011*, *sll1384*, *sll1666* und *sll1933* über *Pst*I und *Kpn*I in das pLA-Plasmid vor das Reporter-gen *luxAB* aus dem Bakterium *Vibrio harveyi* kloniert (Kunert *et al.*, 2000). Das Reporter-gen *luxAB* kodiert für das Enzym Luziferase, welches somit unter der Kontrolle der jeweiligen *dnaJ* Promotorregion steht. Die pLA-dnaJprom-Plasmide wurden in *Synechocystis* WT-Zellen transformiert und nach kontinuierlicher Selektion auf Agarplatten mit steigenden Kanamycin-Konzentrationen eine analytische PCR zur Überprüfung des Segregationsstatus durchgeführt. Für alle Promotorstämme konnte eine vollständige Integration der Promotorregion der *dnaJ*-Gene mit dem Reporter-gen *luxAB* beobachtet werden. Die Promotoraktivitäten der einzelnen Reporterstämme wurden, wie in 2.10.15 beschrieben, ermittelt. Zur Auswertung wurde die relative Änderung der Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle nach 60 Minuten bei den verschiedenen Stressbedingungen ermittelt (Abbildung 25).

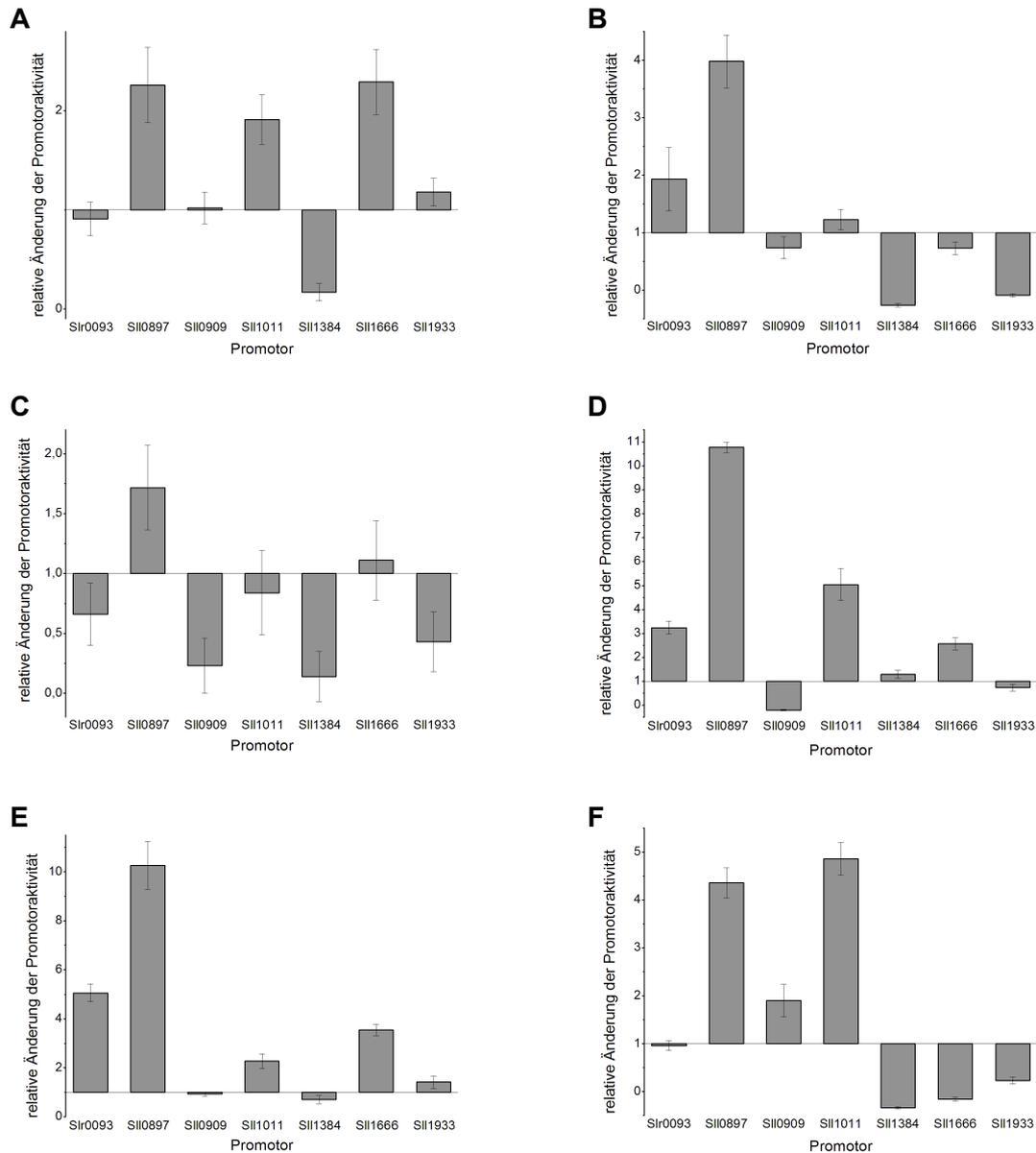


Abbildung 25: Relative Änderung der Promotoraktivität der *dnaJ*-Gene bei unterschiedlichen Stressbedingungen. Die Promotorregionen der *Synechocystis dnaJ*-Gene wurden vor das Reportergen *luxAB* fusioniert und nach vollständiger Segregation der Fusionsgene an einer neutralen Stelle im Genom des *Synechocystis* WT-Stammes die Promotoraktivität der Reporterstämme bei verschiedenen Stressbedingungen getestet. Dargestellt ist die relative Änderung der Promotoraktivität, nach Kultivierung des Stammes für 60 Minuten unter Stressbedingungen. Die Messungen wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt und die Standardabweichungen (Fehlerbalken) berechnet. **A:** Hitzestress (42 °C); **B:** Kältestress (16 °C); **C:** Säurestress (pH 5,5), **D:** osmotischer Stress (0,5 M Mannitol); **E:** oxidativer Stress (1 mM H₂O₂) und **F:** Hochlichtstress (430 µE m⁻² s⁻¹).

Bei der Kontrolle handelt es sich um einen Reporterstamm mit dem *luxAB*-Gen ohne eine vorgeschaltete *dnaJ*-Promotorregion. Der Promotor des *dnaJ sll0897* wies bei allen getesteten Stressbedingungen die stärkste Aktivität im Vergleich zu den Promotoren der ebenfalls untersuchten *dnaJ*-Gene auf. Unter Hitzestressbedingungen konnte die stärkste Änderung der Promotoraktivität von *sll0897* beobachtet werden (Abbildung 25 A). Bis auf die Promotoren der *dnaJ*-Gene *sir0093*

und *sll1384* zeigten die Promotoren der anderen *dnaJ*-Gene bei Hitzestress (42 °C) ebenfalls eine Aktivitätssteigerung oder annähernd das Ausgangsaktivitätsniveau. Die Promotoren der *dnaJ*-Gene *sll0897* und *sll1666* wiesen eine signifikante Aktivitätssteigerung auf, wohingegen der Promotor des *dnaJ sll1384* eine signifikante Aktivitätsverminderung zeigte. Bei Hochlichtstressbedingungen (430 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und osmotischem Stress (0,5 M Mannitol) wurden sowohl für den Promotor des *sll0897* als auch für den Promotor des *sll1011* im Vergleich zu den anderen *dnaJ* Promotoren signifikante Steigerungen der Promotoraktivität beobachtet (Abbildung 25 D, F). Bei oxidativem Stress (1 mM H_2O_2) wies neben dem Promotor des *sll0897* auch der Promotor des *dnaJ slr0093* eine signifikante Steigerung auf (Abbildung 25 E). Der Promotor des *sll1384* zeigte bei allen untersuchten Bedingungen nur eine geringe Steigerung oder sogar eine Reduktion der Promotoraktivität.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Promotoraktivitätsstudien der *dnaJ*-Gene zusammenfassend dargestellt. Der Überblick zeigt, dass der Promotor des *dnaJ sll0897* bei allen untersuchten Stressbedingungen eine signifikante Steigerung der Promotoraktivität aufweist.

Tabelle 12: Zusammenfassung der *in vivo* Promotoraktivitätsstudien der *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* bei verschiedenen Stressbedingungen. Änderungen der Promotoraktivität: –: keine Änderung; ↑: geringe Steigerung; ↑↑: signifikante Steigerung; ↓: geringe Verminderung; ↓↓: signifikante Verminderung.

<i>dnaJ</i> -Promotor	Hitzestress (42 °C)	Kältestress (16 °C)	Säurestress (pH 5,5)	Osmotischer Stress (0,5 M Mannitol)	Oxidativer Stress (1 mM H_2O_2)	Hochlichtstress (430 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>sll0897</i>	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
<i>slr0093</i>	–	↑	↓	↑	↑↑	–
<i>sll1933</i>	–	↓	↓	–	–	↓
<i>sll0909</i>	–	–	↓↓	↓	–	↑
<i>sll1011</i>	↑	–	–	↑	↑	↑↑
<i>sll1384</i>	↓↓	↓	↓↓	–	–	↓
<i>sll1666</i>	↑↑	–	–	↑	↑	↓

3.10 Heterologe Expression der DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp. in *E. coli*

Die bisher beschriebenen Ergebnisse stellen *in vivo* Untersuchungen der *dnaJ*-Gene aus *Synechocystis* bei verschiedenen Temperatur- und Stressbedingungen dar. Um die cyanobakteriellen DnaJ-Proteine biochemisch charakterisieren zu können, sollten in einem ersten Schritt geeignete Bedingungen zur heterologen Expression der Proteine in *E. coli* etabliert werden. Dazu sollten DnaJ-Fusionsproteine mit einem

N-terminalen deca-His-Tag in *E. coli* exprimiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression der Hsp40-Proteine toxisch auf *E. coli* wirkt (Blum *et al.*, 1992, Grossman *et al.*, 1987). Daher wurden verschiedene Expressionsstämme, Anzuchttemperaturen, Kulturmedien, Induktionszeitpunkte und Expressionsplasmide getestet, um eine optimale Überexpression der gewünschten Proteine zu erhalten. Eine Induktion des Promotors bei einer OD₆₀₀ von 1 mit 0,5 mM IPTG und einer weiteren Kultivierung des *E. coli* Stammes über Nacht bei 37 °C und 220 rpm stellte sich dabei als geeignete Methode heraus. Die Expression der sieben verschiedenen DnaJ-Proteine mit deca-His-Tag aus *Synechocystis* sp. erfolgte in unterschiedlichen Expressionsplasmiden und -stämmen, welche in Tabelle 13 zusammengefasst sind.

Tabelle 13: Zur Expression der DnaJ-Proteine eingesetzte Expressionsstämme und -plasmide.

Protein	Stamm	Expressionsplasmid
SIr0093	HMS174 (DE3) pLysS	pRSET-His
SII0897	BL21 (DE3) pLysE	pRSET6aNT-HisMCS
SII0909	HMS174 (DE3) pLysS	pET19b
SII1011	BL21 (DE3) pLysE	pRSET6aNT-HisMCS
SII1384	BL21 (DE3) pLysE	pRSET-His
SII1666-TM	BL21 (DE3) pLysE	pRSET-His
SII1933	BL21 (DE3) pLysE	pRSET-His

Um die heterologe Expression der DnaJ-Proteine zu überprüfen, wurden die jeweiligen Zellextrakte nach Expression in 14%igen SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend einer Western-Blot-Analysen unterzogen. Da die exprimierten Proteine zur Detektion und zur Affinitätschromatographischen Reinigung einen N-terminalen deca-His-Tag besitzen, erfolgte die Immunodetektion unter Verwendung eines anti-His Antikörpers. Dadurch konnte auch gleichzeitig sichergestellt werden, dass es sich bei dem exprimierten Protein auch tatsächlich um das jeweilige DnaJ handelt. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 26 dargestellt.

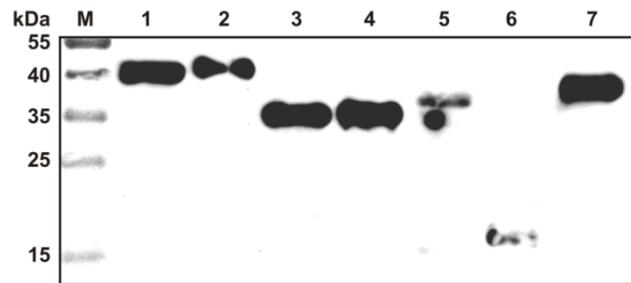


Abbildung 26: Western-Blot-Analysen der Gesamtzell-extrakte nach Expression der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis*. Es wurden jeweils gleiche Volumina der Zellextraktproben nach Expression der DnaJ-Proteine in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem anti-His Antikörper (Novagen). 1: Slr0093; 2: SII0897, 3: SII0909, 4: SII1011, 5: SII1384, 6: SII1666-TM und 7: SII1933. M: „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“.

In Western-Blot-Analysen konnte die Expression aller sieben DnaJ-Proteine in *E. coli* nachgewiesen werden. Das DnaJ Slr0093 (Spur 1) konnte bei etwa 40 kDa detektiert werden, was der errechneten molekularen Masse von 39,15 kDa mit His-Tag entspricht. Spur 2 zeigt ebenfalls ein Signal bei etwa 40 kDa. Dabei handelt es sich um das Typ I DnaJ SII0897 mit einer berechneten molaren Masse von 43,15 kDa. Das Protein SII0909 mit einer berechneten molaren Masse von 29,15 kDa konnte bei etwa 35 kDa nachgewiesen werden (Spur 3). In Spur 4 ist ein Signal bei 35 kDa zu erkennen, was dem DnaJ SII1011 mit einer berechneten molaren Masse von 32,78 kDa entspricht. Das DnaJ SII1384 (37,33 kDa) konnte ebenfalls bei 35 kDa detektiert werden (Spur 5). Die berechnete molare Masse des verkürzten SII1666 beträgt 17,8 kDa, was der Bande in Spur 6 bei etwa 17 kDa entspricht. In Spur 7 ist ein Signal bei etwa 40 kDa zu erkennen. Dies entspricht dem DnaJ SII1933 mit einer molaren Masse von 37,48 kDa.

Im Folgenden wird die Expression und Trennung der Zellfragmente in die verschiedenen Fraktionen am Beispiel des kanonischen DnaJ SII0897 genauer beschrieben. Abbildung 27 zeigt exemplarisch ein Coomassie-gefärbtes Gel der Expression des DnaJ SII0897. Es ist zu erkennen, dass bereits vor Induktion des Promotors mit IPTG (Spur 1) eine Bande bei etwa 43,6 kDa detektiert werden konnte. Dabei handelt es sich um das DnaJ SII0897, welches aufgrund der Basalexpression des T7-Systems exprimiert wurde. Aufgrund der starken Basalexpression konnte keine Zunahme der Überexpression des SII0897 Proteins nach Induktion der Expression im Coomassie-Gel detektiert werden.

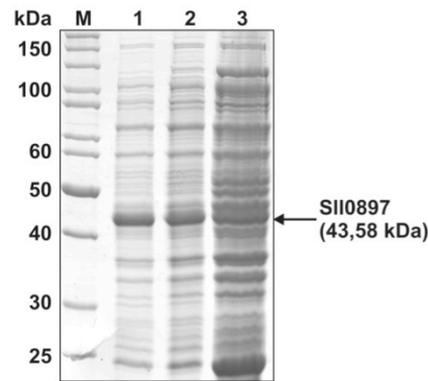


Abbildung 27: Coomassie-Gel der Expression des SII0897 in BL21 (DE3) pLysE-Zellen. Die Gesamtzellextraktproben wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. 1: vor Induktion bei einer OD_{600} von 1, 2: 2 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG und 3: Gesamtzellextraktprobe nach Expression über Nacht. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Mit Hilfe der optimierten Expressionsbedingungen konnte eine Anreicherung der DnaJ-Proteine in großen Mengen erzielt werden. Um die Proteine näher charakterisieren zu können, sollten diese bis zur Homogenität gereinigt werden. Die *E. coli*-Zellen wurden daher mittels Ultraschall aufgebrochen (2.10.2). Anschließend wurde der erhaltene Gesamtzellextrakt wie in 2.10.2 beschrieben in die lösliche Proteinfraction, die Membranproteinfraction und die Fraction der Einschlusskörperchen getrennt. Die Proteinfractionen wurden in einem 14%igen SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie gefärbt. Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der SII0897 Proteinproben zeigt sowohl in Spur 1 bei etwa 43,6 kDa (Gesamtzellextrakt) als auch in Spur 2 und 4 (lösliche Fraction und Einschlusskörperchen) eine Bande (Abbildung 27). Ebenso konnte in der Membranfraction (Spur 3) eine Bande bei ca. 43,6 kDa detektiert werden.

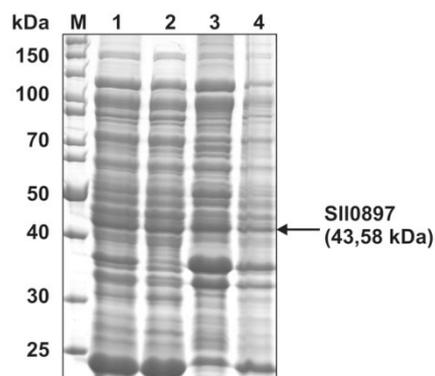


Abbildung 28: SDS-PAGE der Fractionen des Gesamtzellextraktes nach Expression von SII0897 in BL21 (DE3) pLysE. Die Proteinfractionen wurden in einem 14%igen SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt. Spur 1: Gesamtzellextrakt nach Aufbruch der Zellen, Spur 2: lösliche Fraction, Spur 3: Membranfraction und Spur 4: Einschlusskörperchen. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Eine Reinigung des DnaJ SII0897 aus der löslichen Proteinfraction konnte jedoch nicht erreicht werden. Zur Reinigung musste das DnaJ SII0897 mit Hilfe des nicht-ionischen Detergenz Dodecyl- β -D-maltosid (β -DM) aus der Membran solubilisiert werden. Die weiteren sechs DnaJ-Proteine konnten zum Teil in der löslichen und in kleinen Mengen ebenfalls in der Membranfraction detektiert werden. Daher konnten zur Reinigung der Proteine SIr0093, SII0909, SII1011, SII1384, SII1666 und SII19333 beide Fractionen vereint und eingesetzt werden.

3.11 Reinigung der DnaJ-Proteine

Die heterolog in *E. coli* exprimierten DnaJ-Proteine konnten in Kombination einer Affinitätschromatographie (IMAC - „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“) und einer anschließenden Ionenaustausch-Chromatographie (IEX - „Ion Exchange Chromatography“) gereinigt werden. Da nach Affinitätschromatographie noch starke Verunreinigungen in der Proteinlösung detektiert werden konnten, wurden die Proteine entsprechend mittels Ionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt.

3.11.1 Reinigung des Typ I DnaJs SII0897

Die Reinigung des SII0897-Proteins erfolgte aus der Membranproteinfraction. Dazu wurde das heterolog exprimierte SII0897 mit Hilfe des Detergenz β -DM aus der Membran solubilisiert und die Proteinlösung anschließend zur Reinigung eingesetzt. Um die Effektivität der affinitätschromatographischen Reinigung (2.10.4.1) des SII0897-Proteins zu optimieren, wurden verschiedene zweiwertige Ionen an unterschiedliche Matrices gebunden (2.10.4.2), wobei die effektivste Reinigung durch Verwendung einer mit Zn^{2+} -Ionen beladenen „Chelating Sepharose Fast Flow“-Matrix erzielt wurde. Die Proteine der einzelnen Elutionsfractionen wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt (Abbildung 29).

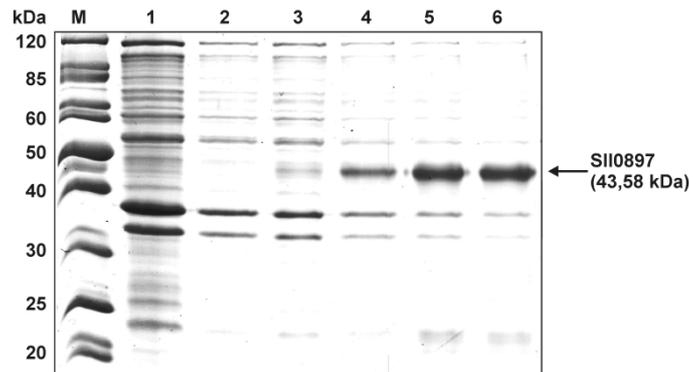


Abbildung 29: SDS-PAGE nach affinitätschromatographischer Reinigung von SII0897. Das heterolog exprimierte SII0897 wurde durch Verwendung einer mit Zn^{2+} -Ionen beladenen „Chelating Sepharose Fast Flow“-Matrix vorgereinigt. Je 5 μ l der Fraktionen der Reinigung wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt. Spur 1: Durchfluss; Spur 2: Waschschrift; Spur 3: Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol; Spur 4: Elutionsfraktion mit 300 mM Imidazol; Spur 5: Elutionsfraktion mit 400 mM Imidazol; Spur 6: Elutionsfraktion mit 500 mM Imidazol. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Das Protein SII0897 konnte weder im Durchfluss (Spur 1) noch im Waschschrift (Spur 2) und nur in geringen Mengen in der Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol (Spur 3) nachgewiesen werden. Das DnaJ SII0897 konnte hauptsächlich in den Elutionsfraktionen bei 300, 400 und 500 mM Imidazol (Spur 4-6) bei etwa 44 kDa detektiert werden (Abbildung 29). Nach diesem ersten affinitätschromatographischen Reinigungsschritt wurden die Elutionsfraktionen 300-500 mM Imidazol vereinigt und störende Salze durch Umpuffern entfernt. Nach der Aufnahme der Proteine in den für die Ionenaustausch-Chromatographie notwendigen Puffer erfolgte die chromatographische Auftrennung unter Verwendung einer 5 ml „Q-Sepharose“-Säule (GE Healthcare). Aufgrund des ermittelten pI-Wertes des SII0897 von 7,01 wurde für die native Reinigung des Proteins eine Anionenaustausch-Chromatographie mit einem 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 8,2 verwendet. Es wurden 10 ml der umgepufferten und vorgereinigte Proteinlösung bei auf die Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit steigenden NaCl-Konzentrationen im linearen Gradienten. Das Elutionsdiagramm der Reinigung von SII0897 ist in Abbildung 30 dargestellt.

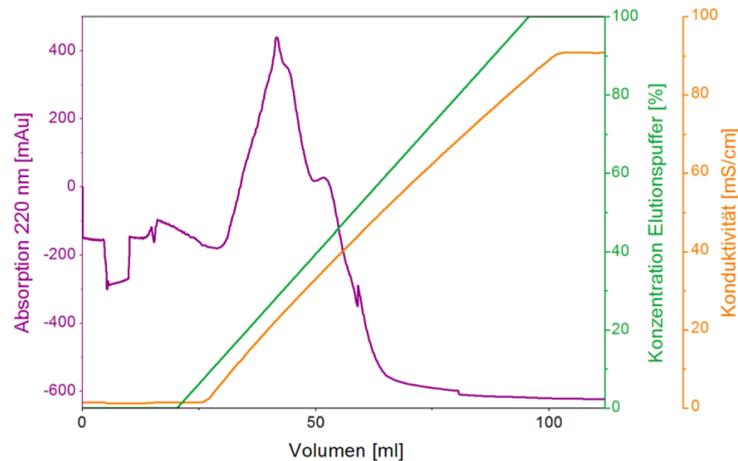


Abbildung 30: Elutionsdiagramm der Anionenaustausch-Chromatographie von SII0897. Verwendet wurde eine 5 ml „Q-Sepharose“-Säule mit einem 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 8,2. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten über 20 Säulenvolumen aus Laufpuffer und Elutionspuffer (Laufpuffer + 1 M NaCl). Das Volumen der eingesetzten Probe betrug 10 ml und wurde bei einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min, die Fraktionsgröße betrug 2 ml. **Violett:** Absorption bei 220 nm, **grün:** Konzentration des Elutionspuffers und **orange:** Leitfähigkeit.

Das Elutionsdiagramm der Reinigung des SII0897 zeigte bei einer Absorption bei 220 nm einen über mehrere Milliliter ausgedehnten Peak. Das DnaJ SII0897 weist in seiner Aminosäuresequenz wenige aromatische Aminosäuren auf, weshalb eine Absorption bei 280 nm nur geringe Signale zeigte. Daher wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm, bei der die Peptidbindung absorbiert, detektiert. Der Anstieg begann bei etwa 13 % des Elutionspuffers und endete bei etwa 46 %. Die dem Peak zugehörigen 2 ml Proteinfractionen wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt (Abbildung 31).

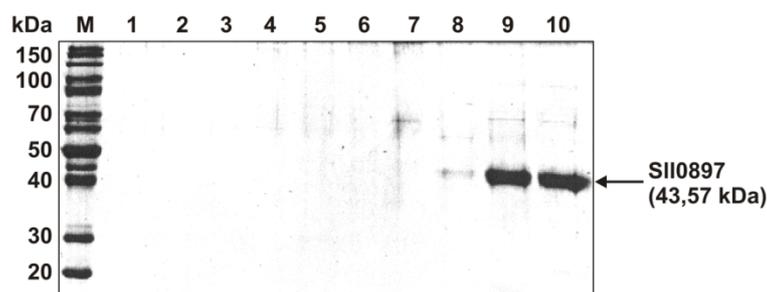


Abbildung 31: SDS-PAGE nach Reinigung des nativen SII0897 mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Es wurden jeweils 10 µl der Fraktionen des Elutionspeaks in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und dieses anschließend Coomassie-gefärbt. Spur 1-7: Fraktionen 15-21, Spur 8-10: Fraktionen 23-25. Als Marker (M) diente der „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Das Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese zeigt, dass das DnaJ SII0897 gereinigt werden konnte. Das Protein kann in den Fraktionen 23-25 (Spur 8-10), welche der Schulter des ausgedehnten Peaks bei etwa 50 ml entsprechen, mit einer molaren Masse von etwa 44 kDa detektiert werden.

3.11.2 Reinigung des Typ II DnaJ-Proteins Slr0093

Das DnaJ Slr0093 wurde in HMS174 (DE3) pLysE-Zellen exprimiert und konnte nach Trennung in die verschiedenen Zellfraktionen sowohl in der löslichen Proteinfraction als auch in der Membranfraction detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Zur affinitätschromatographischen Reinigung über Ni-NTA-Agarose (2.10.4.1) wurden daher beide Fraktionen eingesetzt. In Abbildung 32 ist das Coomassie-gefärbte SDS-Gel der gereinigten Proteine dargestellt.

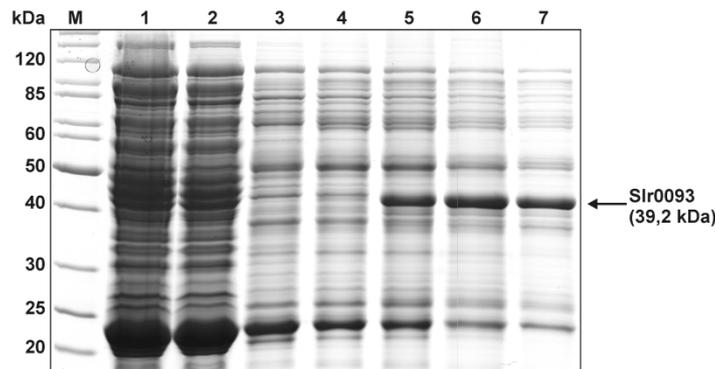


Abbildung 32: SDS-PAGE des heterolog exprimierten Slr0093-Proteins nach Affinitätschromatographie mittels „Ni-NTA-Agarose“. Es wurden je 5 µl der Fraktionen in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und dieses anschließend Coomassie-gefärbt. Spur 1: Durchfluss; Spur 2: Waschfraktion; Spur 3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol; Spur 5: Elutionsfraktionen mit 300 mM Imidazol; Spur 6: Elutionsfraktionen mit 400 mM Imidazol; Spur 7: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

In der Durchflussfraktion, sowie in der Waschfraktion (Spur 1 und 2) kann kein Slr0093 detektiert werden. In den Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol (Spur 3 und 4) ist eine schwache Bande bei etwa 39 kDa zu erkennen, was der molaren Masse des DnaJs Slr0093 entspricht. Das Protein wurde jedoch hauptsächlich in den Elutionsfraktionen 300-500 mM Imidazol (Spur 5-7) nachgewiesen. Diese Fraktionen wurden für den nächsten Reinigungsschritt über Ionenaustausch-Chromatographie eingesetzt. Aufgrund des berechneten pI-Wertes des Proteins bei 8,61, wurden die vorgereinigten Proteine in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7 umgepuffert und eine anschließende Reinigung mittels Kationenaustausch-Chromatographie über eine 6 ml „Resource S“-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Durch vorangegangene Tests konnte gezeigt werden, dass das Protein bei höheren Konzentrationen zur Präzipitatbildung neigt, weshalb zur Stabilisierung des Proteins zusätzlich 20 mM NaCl, 20 % Glycerin und 0,5 M Mannitol zugesetzt wurden. Zur Elution wurden steigende NaCl-Konzentrationen in einem linearen Gradienten eingesetzt. Abbildung 33 zeigt ein Elutionsdiagramm nach Reinigung von 10 ml vorgereinigter Protein-

lösung. Es waren zwei deutliche Peaks bei 19 % und 26 % des Elutionspuffers zu erkennen. Zusätzlich konnte ein Peak bei etwa 13 % des Elutionspuffers detektiert werden.

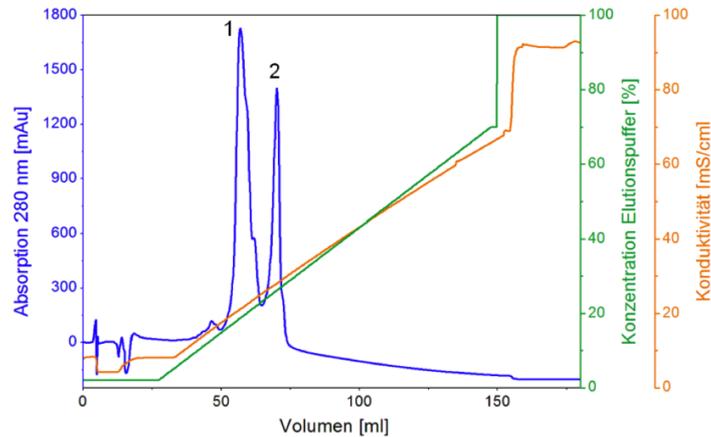


Abbildung 33: Elutionsdiagramm nach Reinigung von Slr0093 mittels Kationenaustausch-Chromatographie. Verwendete Säule: 6 ml „Resource S“-Säule (GE Healthcare); Laufpuffer: 20 mM Natriumphosphat, pH 7 + 20 mM NaCl + 20 % Glycerin + 0,5 M Mannitol; Volumen der Probe: 10 ml; Auftragesgeschwindigkeit: 0,5 ml/min; Elutionspuffer: Laufpuffer mit 1 M NaCl; Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min; linearer Elutionsgradient von 2-70 % über 20 Säulenvolumen; Fraktionsgröße: 2 ml. **Blau:** Absorption bei 280 nm, **grün:** Konzentration Elutionspuffer und **orange:** Leitfähigkeit.

Um die Reinheit der eluierten Proteine zu überprüfen, wurden die Proben der Fraktionen die den Elutionspeaks entsprechen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Wie in Abbildung 34 zu erkennen ist, befinden sich in den ersten Fraktionen des ersten Peaks (Spur 1-8) neben dem Slr0093 auch niedermolekulare Proteinverunreinigungen. Innerhalb der Fraktionen des zweiten Peaks (Spur 9-14) konnte ausschließlich das gereinigte Slr0093 bei etwa 39 kDa im Coomassie-gefärbten SDS-Gel detektiert werden.

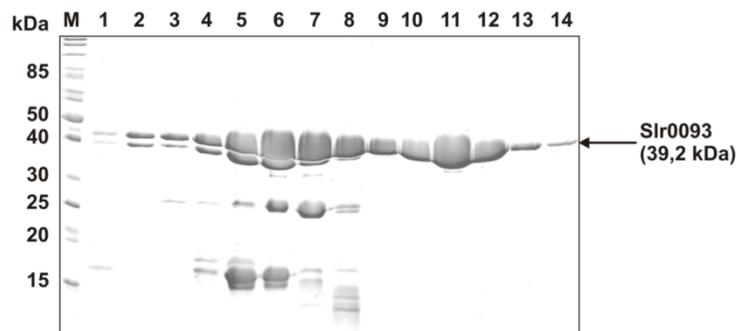


Abbildung 34: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel nach Reinigung von Slr0093 mittels Kationenaustausch-Chromatographie. Es wurden je 10 µl der Elutionsfraktionen in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt. Spur 1-8: Fraktionen des ersten Peaks, Spur 9-14: Fraktionen des zweiten Peaks, M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

3.11.3 Reinigung des Typ III DnaJ-Proteins SII0909

Das Typ III DnaJ-Protein SII0909 wurde in HMS174 (DE3) pLysS-Zellen exprimiert und konnte nach Trennung des Zellextraktes sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion detektiert werden. Aus diesen beiden Fraktionen konnte das Protein über Ni-NTA-Agarose affinitätschromatographisch vorgereinigt werden (2.10.4.1). Die Proteine der einzelnen Elutionsfraktionen, sowie die Durchflussprobe und die Proteinprobe des Waschschrtes wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt.

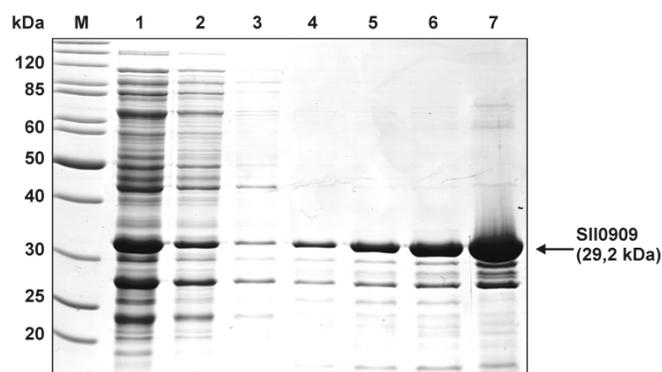


Abbildung 35: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel nach affinitätschromatographischer Reinigung von SII0909. Das heterolog exprimierte SII0909 wurde durch Verwendung einer „Ni-NTA-Agarose“ vorgereinigt. Je 5 µl der Fraktionen der Reinigung wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt. Spur 1: Durchfluss; Spur 2: Waschschrte; Spur 3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol; Spur 5: Elutionsfraktion mit 300 mM Imidazol; Spur 6: Elutionsfraktion mit 400 mM Imidazol; Spur 7: Elutionsfraktion mit 500 mM Imidazol. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, kann das DnaJ SII0909 sowohl im Durchfluss (Spur 1), als auch im Waschschrte (Spur 2), sowie in den beiden Elutionenfraktionen mit 100 mM Imidazol (Spur 3 und 4) nachgewiesen werden. Das Protein wurde jedoch hauptsächlich mit 300-500 mM Imidazol (Spur 5-7) eluiert, da in diesen Fraktionen die stärksten Signale bei ca. 29 kDa detektiert wurden. Diese Elutionsfraktionen mit dem vorgereinigten SII0909 wurden für weitere Reinigungsschritte über eine Anionenaustausch-Chromatographie in den entsprechenden Puffer durch Umpuffern überführt. Entsprechend dem errechneten isoelektrische Punkt des Proteins SII0909 von 4,63, wurde ein 20 mM BisTris-Puffer, pH 6,5 als Laufpuffer verwendet. Vorangegangene Untersuchungen haben eine hohe Tendenz des Proteins zur Präzipitatbildung gezeigt, weshalb 10 % Glyzerin, 0,5 M Mannitol und 0,05 % Brij58 zugefügt werden mussten. 10 ml der vorgereinigten Proteinlösung wurden auf eine 5 ml „Q-Sepharose“-Säule aufgetragen und mittels eines linearen Gradienten von 0-100 % des Elutionspuffers (Laufpuffer + 1 M NaCl) eluiert (Abbildung 36).

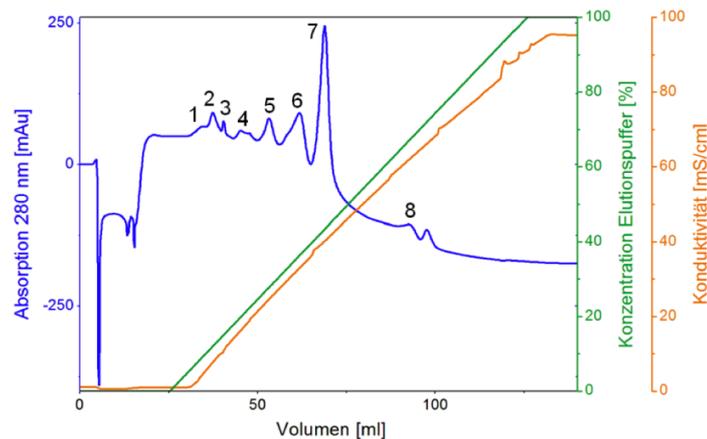


Abbildung 36: Elutionsdiagramm nach Reinigung von SII0909 mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Die Reinigung erfolgte über eine 5 ml „Q-Sepharose“-Säule (GE Healthcare). Es wurde ein 20 mM BisTris-Laufpuffer, pH 6,5 + 10 % Glycerin + 0,5 M Mannitol + 0,05 % Brij58 verwendet. Der Laufpuffer + 1 M NaCl diente als Elutionspuffer. Die Auftrageschwindigkeit betrug 0,5 ml/min, die Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0-100 % über 20 Säulenvolumen. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. **Blau:** Absorption bei 280 nm, **grün:** Konzentration Elutionspuffer und **orange:** Leitfähigkeit.

Im Elutionsdiagramm sind mehrere Peaks zu erkennen. Im Elutionsbereich von etwa 12-36 % des Elutionspuffers konnten sechs Peaks detektiert werden. Ein siebter wurde bei einer Konzentration von etwa 43,2 % des Elutionspuffers ermittelt. Um die Reinheit der eluierten Proteine zu ermitteln, wurden die Fraktionen der einzelnen Peaks in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 37).

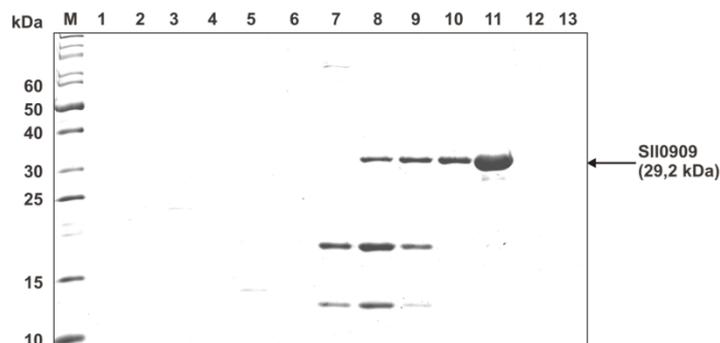


Abbildung 37: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Reinigung von SII0909 mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Es wurden je 10 µl der gesammelten Fraktionen des Chromatographie-Laufes über eine 5 ml „Q-Sepharose“-Säule in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt. Spur 1-8: Fraktionen der Peaks 1-6, Spur 9-11: Fraktionen des Peaks 7, Spur 12 und 13: Fraktionen des Peaks 8. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigt, dass in den Fraktionen der ersten fünf Elutionspeaks (Spur 1-6) und des achten Elutionspeaks (Spur 12 und 13) keine Proteine im Gel nachgewiesen werden konnten. Die Fraktionen des sechsten Elutionspeaks

(Spur 7 und 8) zeigten zusätzlich zu dem DnaJ SII0909 niedermolekulare Verunreinigungen. In Spur 9, der ersten Fraktion des Elutionspeaks 7 wurden ebenfalls noch niedermolekulare Verunreinigungen nachgewiesen. In den Spuren 10 und 11 (Elutionspeak 7) konnte ausschließlich das gereinigte Protein SII0909 (29,2 kDa) nachgewiesen werden.

3.11.4 Reinigung des Typ III DnaJ-Proteins SII1666

Bei dem Protein SII1666 handelt es sich nach Strukturvorhersagen um das einzige DnaJ-Protein, welches eine Transmembranregion besitzt. In dieser Arbeit wurde allerdings zur Reinigung eine verkürzte Variante, SII1666 ohne Transmembranregion heterolog in BL21 (DE3) pLysE-Zellen exprimiert. Nach Trennung der verschiedenen Zellfraktionen konnte das verkürzte SII1666-TM in der löslichen Proteinfraction und der Membranfraction detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Der erste Reinigungsschritt erfolgte sowohl aus der löslichen Proteinfraction als auch aus der Membranproteinfraction über Affinitätschromatographie („Ni-NTA-Agarose“) (2.10.4.1). Die Proben der Reinigung wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt (Abbildung 38).

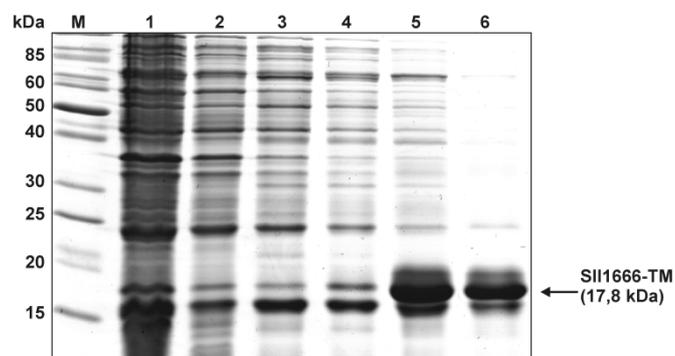


Abbildung 38: SDS-PAGE des heterolog exprimierten SII1666-TM-Proteins nach Affinitätschromatographie mittels „Ni-NTA-Agarose“. Es wurden je 5 μ l der Fraktionen in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und dieses anschließend Coomassie-gefärbt. Spur 1: Durchfluss; Spur 2: Waschfraktion; Spur 3: Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol; Spur 4: Elutionsfraktionen mit 300 mM Imidazol; Spur 5: Elutionsfraktionen mit 400 mM Imidazol; Spur 6: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

In den Spuren 1-3, die dem Durchfluss, dem Waschschriff, sowie der ersten Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol entsprechen, konnte eine schwache Bande bei etwa 18 kDa detektiert werden. Die effektivste Elution des mittels His-Tag gebunden Proteins von der Ni-NTA-Agarose-Matrix wurde mit 300-500 mM Imidazol erreicht (Spur 4-6). Diese Elutionsfraktionen zeigten zusätzlich zu dem SII1666 ohne

Transmembrandomäne noch weitere Protein-Verunreinigungen, weshalb ein weiterer Reinigungsschritt über eine Ionenaustausch-Chromatographie angeschlossen wurde. Der pI-Wert des Proteins liegt bei 6,72, weshalb ein 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,8 für die Anionenaustausch-Chromatographie gewählt wurde. Durch vorangegangene Tests konnte gezeigt werden, dass das Protein bei höheren Konzentrationen zur Präzipitatbildung neigt, weshalb zur Stabilisierung des Proteins zusätzlich 10 % Glycerin, 0,5 M Mannitol und 0,05 % Brij58 dem Laufpuffer zugesetzt werden mussten. 10 ml der vorgereinigten und umgepufferten Proteinlösung wurden auf eine 5 ml „Q-Sepharose“-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0-100 % Laufpuffer + 1 M NaCl wurden die Proteine eluiert. Ein Elutionsdiagramm ist in Abbildung 39 dargestellt.

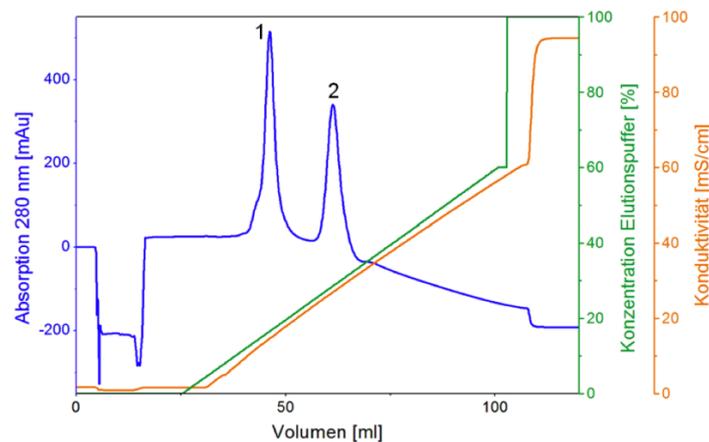


Abbildung 39: Elutionsdiagramm nach Reinigung des DnaJ-Proteins verkürzten SII1666 mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Es wurde eine 5 ml „Q-Sepharose“-Säule (GE Healthcare) verwendet. Laufpuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,8 + 10 % Glycerin + 0,5 M Mannitol + 0,05 % Brij58; Auftrageschwindigkeit: 0,5 ml/min; Elutionspuffer: Laufpuffer mit 1 M NaCl; Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min; linearer Elutionsgradient von 1-100 % über 20 Säulenvolumen; Fraktionsgröße: 2 ml. **Blau:** Absorption bei 280 nm, **grün:** Konzentration Elutionspuffer und **orange:** Leitfähigkeit.

Das Elutionsdiagramm der Reinigung des verkürzten SII1666 zeigte zwei deutliche Peaks bei etwa 16 % bzw. 28 % des Elutionspuffers. Die Proteinfractionen der beiden Elutionspeaks wurden in einem 14%igen SDS-Gel nach Coomassie-Färbung auf die Reinheit des Proteins SII1666 hin überprüft (Abbildung 40).

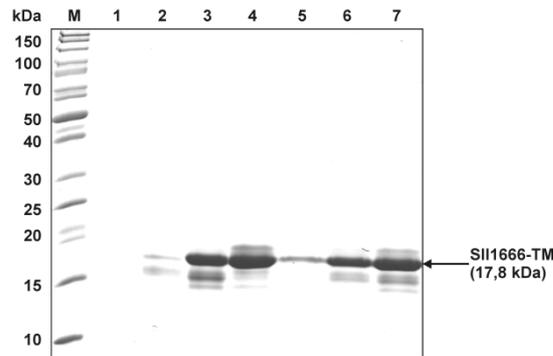


Abbildung 40: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Elutionsfraktionen nach Reinigung von SII1666 ohne Transmembrandomäne mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Die Fraktionen der Elutionspeaks wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1-4: Fraktionen des ersten Peaks, Spur 5-7: Fraktionen des zweiten Elutionspeaks. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigt, dass in beiden Peaks das Protein SII1666-TM mit einer molaren Masse von etwa 17,8 kDa in den Spuren 2-7 detektiert werden konnte. In Spur 1 und 2 ist kein Protein bzw. nur eine geringe Menge nachzuweisen. Das Coomassie-Gel zeigt zusätzlich Banden direkt unterhalb der Signale des SII1666-TM.

3.11.5 Reinigung der DnaJ-Proteine SII1011, SII1384 und SII1933

Neben den beschriebenen DnaJ-Proteinen SII0897, SII0093, SII0909 und SII1666 wurden bereits verschiedene Reinigungsbedingungen für die DnaJ-Proteine SII1011, SII1384 und SII1933 getestet. Alle drei Proteine konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden (3.10). Das DnaJ SII1933 konnte bereits über „Ni-NTA-Agarose“ affinitätschromatographisch vorgereinigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein abschließendes Reinigungs-Protokoll aufgestellt werden, da dieses Protein eine hohe Tendenz zur Präzipitatbildung aufweist. Diese konnte für SII1933 lediglich durch Verwendung eines Phosphatpuffers mit einem neutralen pH-Wert und durch Zugabe des Detergenz Brij58 und hoher Salzkonzentrationen verhindert werden, weshalb in einem weiteren Schritt ideale Bedingungen zur Reinigung mittels einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie getestet werden müssten.

3.12 Charakterisierung der gereinigten DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp.

3.12.1 Bestimmung der Schmelztemperatur mittels CD-Spektroskopie

Um ihre biologische Funktion ausüben zu können, müssen Chaperone ihre native Struktur bei physiologisch relevanten Temperaturen beibehalten (Popp und Reinstein, 2009). DnaJ-Proteine zählen, wie auch DnaK-Proteine, zu den Hitzeschockproteinen (Cyr *et al.*, 1994). Dabei erfüllen sie auch bei nicht-physiologischen Temperaturen die Funktion von Faltungshelfern, weshalb auch bei diesen Temperaturen ihre native Struktur bestehen bleiben muss.

Daher wurden CD-Spektren der im Rahmen dieser Arbeit gereinigten DnaJ-Proteine SII0897, SIr0093, SII0909 und SII1666 aufgenommen. Die gemessenen CD-Spektren der einzelnen Proteine bei 34 °C der physiologischen Wachstumstemperatur von *Synechocystis* sp., und bei 95 °C sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt. Damit können Aussagen zur Änderung der Sekundärstruktur der Proteine bei verschiedenen Temperaturen getroffen werden.

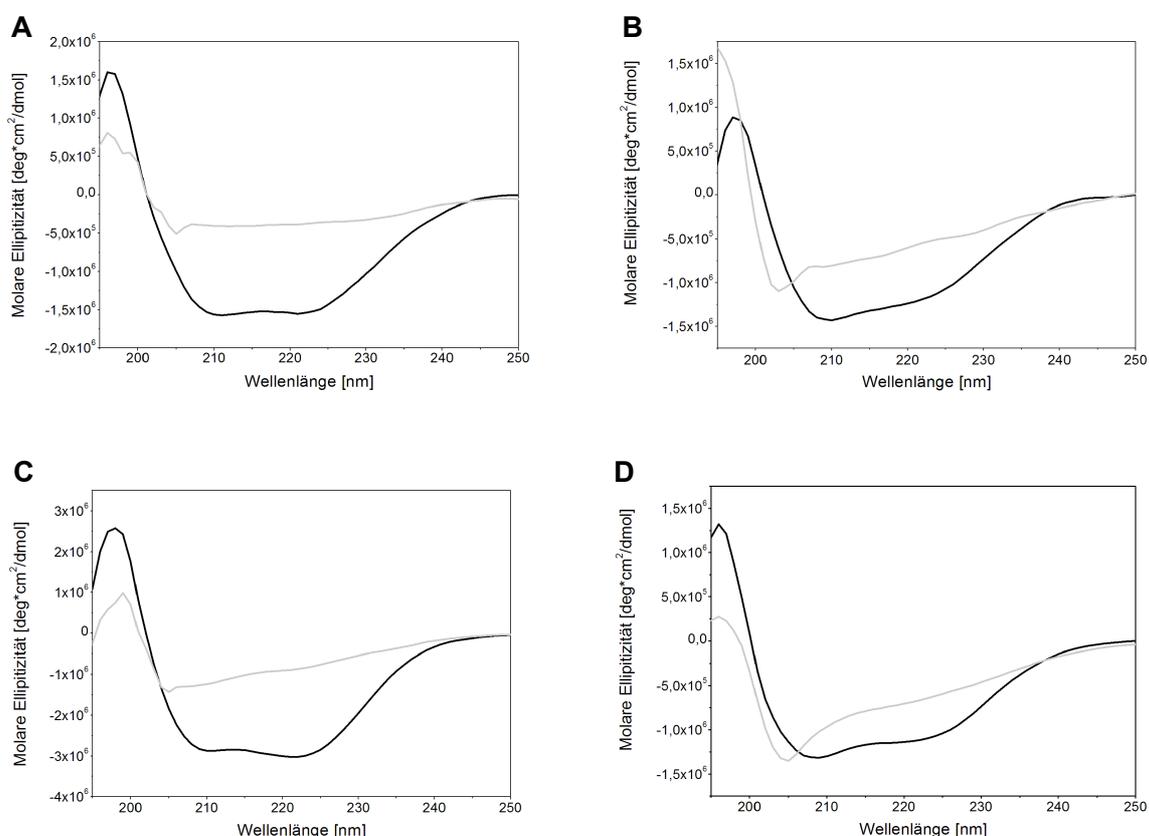


Abbildung 41: CD-Spektren der vier untersuchten DnaJ-Proteine SII0897 (A), SIr0093 (B), SII0909 (C) und SII1666 (D). Die CD-spektroskopische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 250-190 nm. **Schwarz:** Spektrum bei 34 °C; **grau:** Spektrum bei 95 °C.

Bei 34 °C zeigten die vier untersuchten DnaJ-Proteine SII0897, Slr0093, SII0909 und SII1666 die typischen negativen Maxima für stark α -helikale Proteine bei 208 nm und 222 nm. Bei 95 °C sind diese typischen Maxima nicht mehr zu erkennen und es lässt sich lediglich ein negatives Maximum bei etwa 200 nm erkennen.

In einem weiteren Schritt sollte der α -helikale Anteil der Proteine bei den Temperaturen 34 °C und 95 °C durch Computeranalysen bestimmt werden (www.cryst.bbk.ac.uk), um weitere Informationen zur Sekundärstruktur der Proteine zu erhalten. Die ermittelten Werte für den α -helikalen Anteil der Proteine bei 34 °C lagen bei den vier untersuchten Proteinen zwischen 42-55 %. Analysen der Spektren bei 95 °C wiesen eine deutliche Abnahme des α -helikalen Anteils auf. In Tabelle 14 sind die ermittelten Werte des α -helikalen Anteils, des β -Faltblatt Anteils sowie der „random coil“-Strukturen jeweils sowohl bei 34 °C als auch bei 95 °C für die jeweiligen DnaJ-Proteine zusammenfassend dargestellt. So nimmt der Gehalt der α -Helices von SII0897 bei 95 °C um etwa 86 % ab und liegt bei 7 %. Die DnaJ-Proteine Slr0093, SII0909 und SII1666 wiesen eine Abnahme um 30-50 % des α -helikalen Anteils bei einer Temperaturerhöhung auf 95 °C auf. Eine Zunahme der β -Faltblatt-Anteils sowie der „random coil“-Strukturen kann ebenfalls beobachtet werden.

Tabelle 14: Anteil von Sekundärstrukturelementen der untersuchten DnaJ-Proteine bei 34 °C und 95 °C. Die Werte wurden mittels Computeranalysen (www.cryst.bbk.ac.uk) anhand der gemessenen CD-Spektren bei 34 °C bzw. 95 °C ermittelt.

DnaJ-Protein	SII0897		Slr0093		SII0909		SII1666	
	34 °C	95 °C						
α -Helix	51 %	7 %	55 %	39 %	42 %	24 %	47 %	24 %
β -Faltblatt	25 %	46 %	19 %	30 %	30 %	34 %	28 %	33 %
„random coil“	18 %	27 %	21 %	23 %	19 %	30 %	19 %	27 %

Mit Hilfe der Schmelzkurven der isolierten Proteine sollte der Einfluss der Temperatur auf die Struktur der DnaJ-Proteine untersucht werden. Anhand der durch CD-Spektroskopie erhaltenen Daten wurden die Schmelzkurven der einzelnen Proteine ermittelt. Abbildung 42 zeigt die anhand des gemessenen Wertes bei 222 nm ermittelten Schmelzkurven der DnaJ-Proteine SII0897, Slr0093, SII0909 und SII1666.

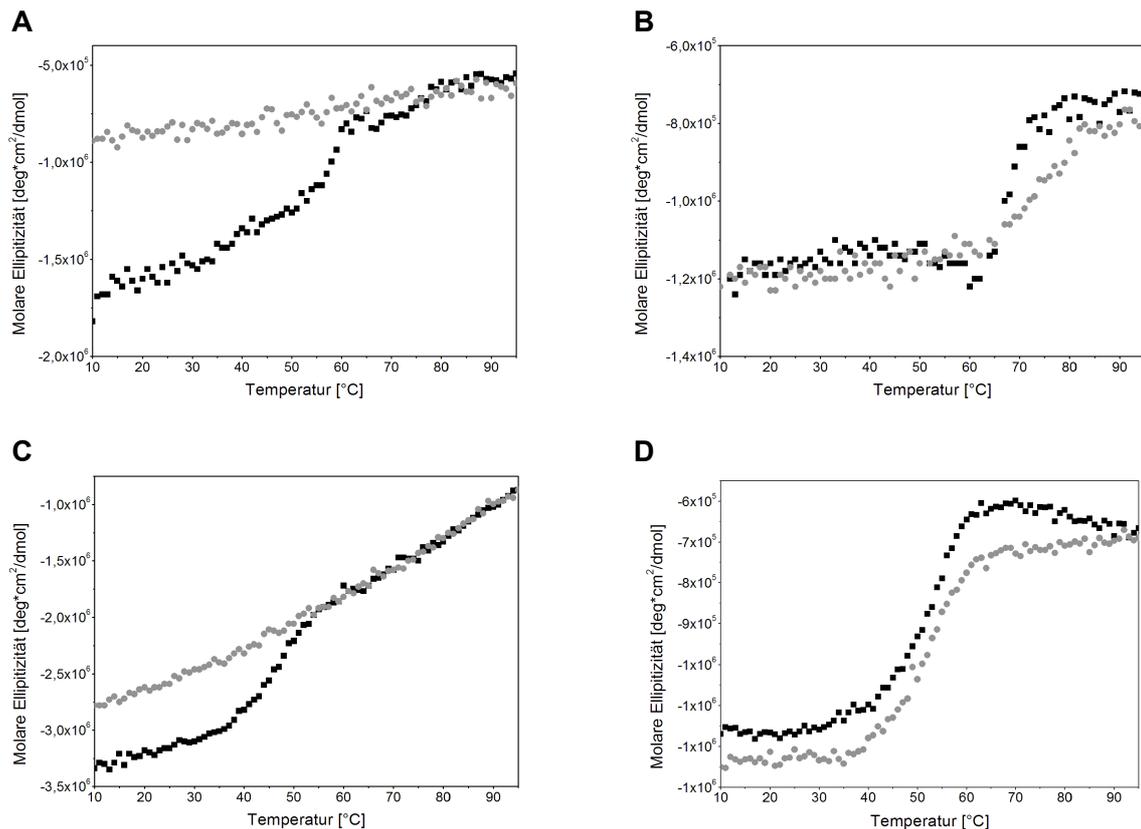


Abbildung 42: Schmelzkurven der DnaJ-Proteine SII0897, SII0909 und SII1666. Die gemessene molare Elliptizität bei 222 nm wurde gegen die Temperatur von 10-95 °C aufgetragen. Die erhaltene Kurve beschreibt die Schmelzkurve, wobei der Wendepunkt dem Schmelzpunkt entspricht. Die schwarzen Kurvenverläufe zeigen die Änderung des Wertes bei Erhitzen der Proteinlösung von 10 °C auf 95 °C. Bei den grauen Kurven handelt es sich um die Werte beim Abkühlprozess von 95 °C auf 10 °C. **A:** Typ I DnaJ SII0897; **B:** Typ II DnaJ SII0909; **C:** Typ III DnaJ SII0909 und **D:** Typ III DnaJ SII1666.

Die Schmelzkurve des Typ I DnaJ-Proteins SII0897 (Abbildung 42 A) zeigte, dass es sich bei der Denaturierung des Proteins um einen irreversiblen Prozess handelt, da die Kurvenverläufe sowohl beim Erhitzen als auch beim Abkühlen der Probe nicht identisch waren. Der berechnete Schmelzpunkt beim Erhitzen von 10 °C auf 95 °C lag bei 59,5 °C. Das Typ II DnaJ SII0909 zeigte (Abbildung 42 B) dagegen einen annähernd identischen Kurvenverlauf sowohl beim Erhitzen als auch bei Abkühlen der Proteinprobe. Daher handelt es sich hierbei um eine reversible Denaturierung. Der Schmelzpunkt für die Reaktion beim Erhitzen der Probe betrug 68,5 °C. Der Punkt des Abkühlprozesses bei dem wieder 50 % des Proteins rückgefaltet vorliegen betrug 73,6 °C. Die Denaturierung des Typ III DnaJ-Proteins SII0909 stellte ebenfalls einen irreversiblen Prozess dar (Abbildung 42 C), da die Kurvenverläufe beim Erhitzen bzw. Abkühlen nicht identisch waren. Der für das DnaJ SII0909 ermittelte Schmelzpunkt lag bei 52,7 °C. Die erhaltenen Schmelzkurven von SII1666 (Abbildung 42 D), einem Typ III DnaJ-Protein zeigten, dass die Denaturierung des

Proteins reversibel ist. Der Schmelzpunkt des SII1666 beim Hochzheizen der Probe betrug 50,7 °C. Der Punkt des Abkühlprozesses, bei dem die Hälfte des Proteins wieder renaturiert vorliegt betrug 51,7 °C.

3.13 Biochemische Charakterisierung der gereinigten DnaJ-Proteine

3.13.1 Gelfiltrationsanalysen der gereinigten DnaJ-Proteine

Im Chaperonzyklus interagieren dimere DnaJ-Proteine mit den Substraten und den DnaK-Proteinen (Genevaux *et al.*, 2007). Mit Hilfe von Gelfiltrationsanalysen sollte untersucht werden, ob die gereinigten DnaJ-Proteine SII0897, SII0093, SII0909 und SII1666 als Dimer, Monomer oder in höher oligomerer Form vorliegen. Eine „Superose™ 12 10/300 GL“-Säule (GE Healthcare) (2.10.4.5) wurde mit den Proteinen Conalbumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Ribonuklease A und Aprotinin kalibriert und die jeweiligen Elutionsvolumina dieser Proteine bestimmt. In einer Eichgeraden wurde der Logarithmus der molaren Massen gegen die Elutionsvolumina graphisch aufgetragen wird. Zur Analyse der gereinigten DnaJ-Proteine wurden jeweils 100 µg Protein mit einem Volumen von 0,5 ml auf die Gelfiltrationssäule „Superose™-12 10/300 GL“ aufgetragen und die Absorption während der Auftrennung bei 280 nm verfolgt. Die Ausnahme bildete SII0909, hier wurden aufgrund der geringen Ausbeute bei der Reinigung lediglich 50 µg zur Gelfiltrationsanalyse eingesetzt. Die Fraktionen der verschiedenen Elutions-Peaks der Gelfiltrationsanalysen wurden nach Proteinfällung mittels Trichloressigsäure und DOC (2.10.5) und anschließenden Western-Blot-Analysen auf das Vorhandensein der DnaJ-Proteine SII0897, SII0093, SII0909 und SII1666 untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den entsprechenden anti-DnaJ Antikörpern. In Abbildung 43 sind die Elutionsdiagramme der vier untersuchten DnaJ-Proteine sowie die Ergebnisse der durchgeführten Western-Blot-Analysen dargestellt. Das Typ I DnaJ SII0897 zeigte im Chromatogramm sechs verschiedene Peaks (Abbildung 43 A). Die sieben den Peaks entsprechenden Fraktionen (8, 9, 10, 11, 14, 16 und 18) wurden ebenfalls mittels Western-Blot und anschließender Immunodetektion mit dem anti-SII0897 Antikörper auf das Vorhandensein des DnaJs SII0897 überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass nur in den Fraktionen 9, 10 und 11 SII0897 detektiert werden konnten, wobei Fraktionen 10 und 11 aus dem gleichen Peak erhalten wurden. Das Elutionsdiagramm des DnaJ-Proteins SII0093 (Abbildung 43 B) zeigte

vier Peaks, die den Fraktionen 12, 13, 14 und 17 zuzuordnen waren. Nach Western-Blot Analyse der einzelnen Fraktionen mit dem spezifischen Antikörper gegen das DnaJ Slr0093 konnte das Protein ausschließlich in Fraktion 13 detektiert werden. Das Elutionsdiagramm des Proteins SII0909 zeigte ebenfalls sechs Peaks (Abbildung 43 C), die den Fraktionen 7, 10, 11, 12, 14 und 16 zuzuordnen waren. Nach Western-Blot-Analysen mit einem anti-SII0909 Antikörper konnte das Protein lediglich in Fraktion 10 und 11 detektiert werden. Im Chromatogramm der Gelfiltrationsanalyse mit dem DnaJ SII1666 konnten zwei Peaks detektiert werden (Abbildung 43 D). Diesen Peaks konnten die Fraktionen 14, 15 und 17 zugeordnet werden. Nach Fällung der Proteine der entsprechenden Fraktionen und anschließender Western-Blot Analyse konnte mit dem anti-SII1666 Antikörper nur in den Fraktionen 14 und 15 das Protein nachgewiesen werden. Diese beiden Fraktionen entsprachen dem ersten Peak des Chromatogramms.

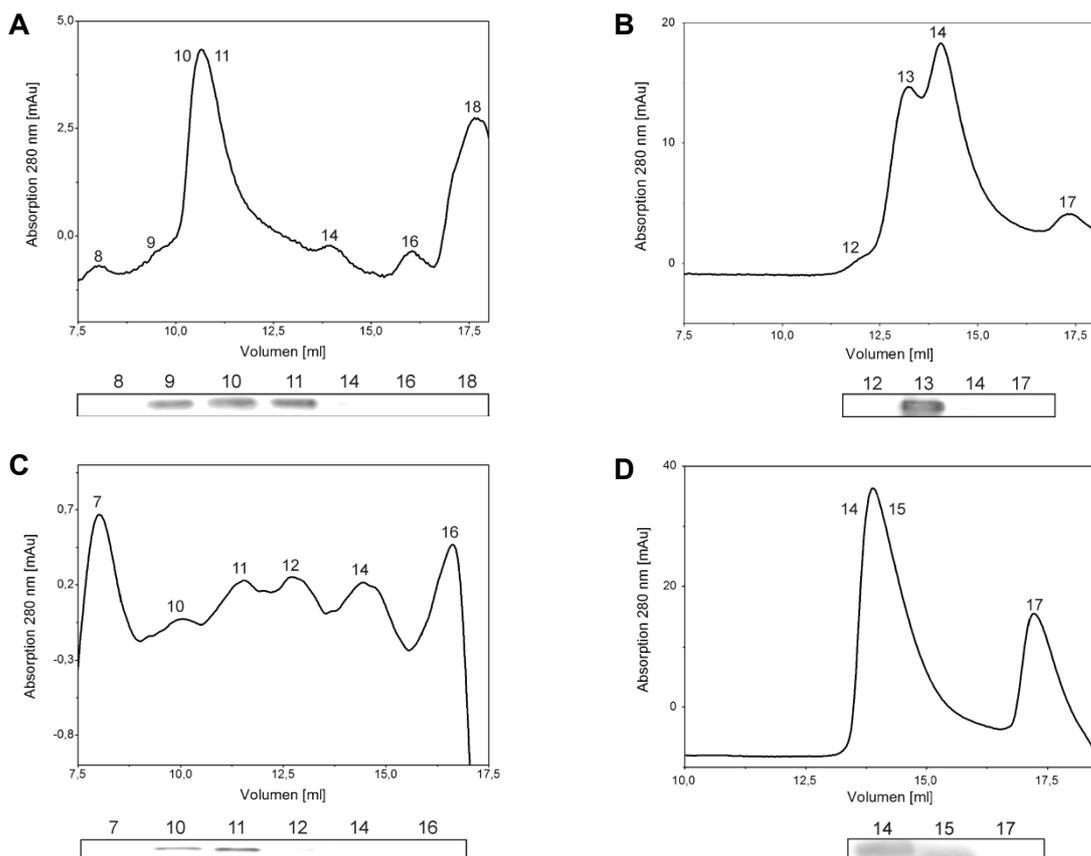


Abbildung 43: Elutionsdiagramme nach Gelfiltrationschromatographie und Western-Blot-Analysen der DnaJ-Proteine Slr0093 (A), SII0897 (B), SII0909 (C) und SII1666 (D). Verwendet wurde eine „Superose™ 12 10/300 GL“-Säule (GE Healthcare). Es wurden je 50-100 µg des zu untersuchenden Proteins mit einem Volumen von 0,5 ml aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7 mit 150 mM NaCl. Die Proteine der gekennzeichneten Peaks wurden mit Trichloressigsäure und DOC gefällt und mittels Western-Blot-Analysen und anschließender Immunodetektion mit den spezifischen anti-DnaJ Antikörpern untersucht. **A:** SII0897, **B:** Slr0093, **C:** SII0909 und **D:** SII1666. Als Größenstandard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ verwendet.

Mit Hilfe der Eichgeraden wurden die molaren Massen der untersuchten DnaJ-Proteine aus den jeweiligen Elutionsvolumina bestimmt. Die so ermittelten Werte sind in Tabelle 15 vergleichend mit den Werten, die anhand der Proteinsequenz berechnet wurden zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 15: Kalkulierte und mittels Gelfiltrationschromatographie ermittelte molare Masse der DnaJ-Proteine Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666. Die molaren Massen wurden anhand der Proteinsequenz bestimmt bzw. durch Gelfiltrationsanalysen berechnet. Die durch Größenausschlusschromatographie erhaltenen Werte beziehen sich auf die Peaks, in denen Protein nachgewiesen werden konnte.

Protein	molare Masse [kDa] durch Proteinsequenzanalysen	molare Masse [kDa] durch Gelfiltrationsanalysen
SII0897	43,57	359,05 185,9
Slr0093	39,15	38,47
SII0909	29,15	268,84 107,55
SII1666	17,84	25,39

Slr0093 und SII1666 konnten nach den Gelfiltrationsanalysen lediglich in einem Peak nachgewiesen werden. Der berechnete Wert des DnaJ Slr0093 (38,47 kDa) entspricht ungefähr der molaren Masse (39,15 kDa), welches anhand der Proteinsequenz ermittelt wurde. Dies trifft ebenso auf das Typ III DnaJ SII1666 zu. Der durch Gelfiltration erhaltene Wert beträgt 25,39 kDa und korreliert mit dem berechneten Wert von 17,84 kDa. Die Tatsache, dass Slr0093 und SII1666 in nur einem Peak detektiert werden konnten und die dadurch ermittelten molaren Massen den kalkulierten Werten entsprechen, weist auf die monomere Form der Proteine hin. Das DnaJ SII0897 konnte in drei Fraktionen aus zwei Peaks detektiert werden. Die ermittelten molaren Massen der Proteine liegen bei 359,05 kDa und 185,9 kDa. Dabei kann es sich um monomere und dimere Formen bzw. um höher oligomere Formen handeln. Das Chromatogramm des Typ III DnaJs SII0909 zeigte ebenfalls zwei Peaks, in denen nach Western-Blot-Analysen das Protein nachgewiesen werden konnte. Die dazu berechneten molaren Massen betragen 268,84 kDa und 107,55 kDa. Auch hierbei könnte es sich um Monomere bzw. oligomere Formen handeln.

3.13.2 Affinitäts-„Pull-Down“ Untersuchungen

Die physiologischen Funktionen der DnaK-Proteine werden durch spezifische Interaktionen mit bestimmten DnaJ-Proteinen beeinflusst. Um ein mögliches Netzwerk zwischen den DnaK- und DnaJ-Proteinen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 aufzuklären, sollten *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt werden und erste Hinweise auf Interaktionen von DnaK und DnaJ-Proteinen liefern. Mit Hilfe der nativ gereinigten DnaJ-Proteine SII0897, SII0093, SII0909 und SII1666 wurden Affinitäts-„Pull-Down“ Untersuchungen durchgeführt. Die gereinigten DnaJ-Proteine wurden mittels His-Tag an Ni-NTA-Agarose gekoppelt und diese Matrices anschließend mit *Synechocystis* Wildtyp-Zellextrakt inkubiert. Dabei sollten die gekoppelten DnaJ-Proteine mit den DnaK-Proteinen des Zellextraktes spezifisch interagieren. Um den Einfluss von ATP bzw. ADP bei der Interaktion des DnaKs mit dem DnaJ zu zeigen, wurden die Ansätze zum Einen mit ATP (5 mM ATP) und zum Andern ohne ATP (10 U Apyrase) durchgeführt. Die Durchflussproben, als auch die Agarose-Pellets wurden mit Probenpuffer versetzt und in 8%igen SDS-Gelen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der DnaK-Proteine erfolgte mit den spezifischen anti-DnaK Antikörpern (anti-DnaK1, anti-DnaK2 und anti-DnaK3). Als Negativkontrolle dienten Ansätze, bei denen kein DnaJ-Protein an die Ni-NTA-Agarose gekoppelt war.

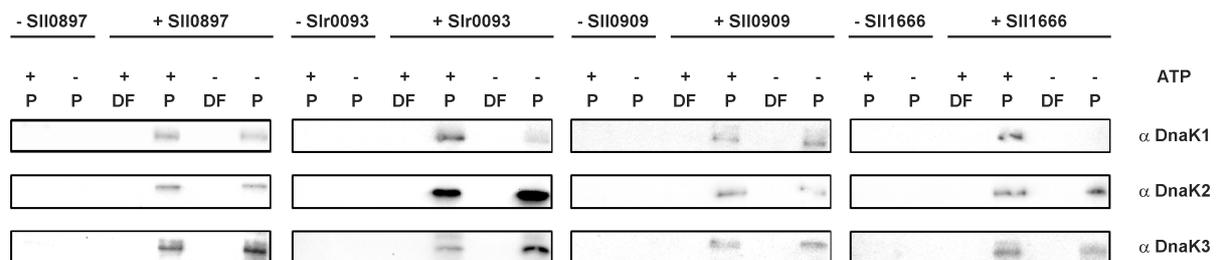


Abbildung 44: Western-Blot-Analysen nach Affinitäts-„Pull-Down“ Untersuchungen. Die vier nativ gereinigten DnaJ-Proteine SII0897, SII0093, SII0909 und SII1666 wurden an Ni-NTA-Agarose gekoppelt. Nach Inkubation mit *Synechocystis* WT-Zellextrakt wurden die Matrixproben (Pellets: P) und Überstände (DF) SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der Nachweis der DnaK-Proteine erfolgte anhand spezifischer Antikörper (α DnaK1, α DnaK2, α DnaK3). Als Negativkontrolle diente die Matrix ohne gekoppeltes DnaJ (- DnaJ). Die Studien wurden jeweils in Gegenwart von ATP (+ ATP) bzw. in Abwesenheit von ATP (- ATP) durchgeführt. Als Größenstandard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ verwendet.

Wie in Abbildung 44 zu erkennen ist, interagiert keines der drei DnaK-Proteine mit der Ni-NTA-Agarose Matrix, da kein Signal in den Pellet-Proben ohne gekoppeltes DnaJ zu erkennen ist. Die DnaK-Proteine DnaK1, DnaK2 und DnaK3 konnten in

keiner der Durchfluss-Probe nachgewiesen werden. Dies deutet auf ein effektives Binden der DnaK-Proteine aus dem Zellextrakt an die gebundenen DnaJ-Proteine hin. Für jedes DnaK konnte eine Interaktion mit den vier untersuchten DnaJ-Proteinen im ATP-gebundenen Zustand nachgewiesen werden. Für alle DnaK-Proteine konnte ebenfalls eine Interaktion im ATP-freien Zustand beobachtet werden. Eine Ausnahme stellte nur DnaK1 dar, das in Abwesenheit von ATP nicht mit SII1666 interagiert. Bei dieser Kombination konnte nur ein Signal im ATP-gebundenen Zustand detektiert werden.

3.13.3 Einfluss der DnaJ-Proteine auf die ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins

Innerhalb des Chaperonzyklus interagieren DnaK-Proteine mit DnaJ-Proteinen, wodurch die ATPase Aktivität der DnaK-Proteine um ein Vielfaches erhöht wird. Diese ATP-Hydrolyse ist für die Chaperonfunktion der DnaK-Proteine notwendig, da dadurch der Übergang in den Zustand mit hoher Affinität zum Substrat erfolgt und dieses dadurch fest am DnaK gebunden ist (Liberek *et al.*, 1991). Daher wurde die ATPase-Aktivität des gereinigten DnaK2-Proteins aus *Synechocystis* (Pieloth, 2011) alleine und in Anwesenheit eines der gereinigten DnaJ-Proteine Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666 untersucht. Dazu diente ein System mit zwei gekoppelten Reaktionen, indem die Hydrolyse des ATPs zu ADP durch das dem System zugefügten DnaK mit seiner ATPase-Funktion den ersten Reaktionsschritt darstellt (Abbildung 45). Die Pyruvat-Kinase (PK) katalysiert die Übertragung einer Phosphorylgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf ADP, unter Bildung von Pyruvat. Der nächste Schritt, die Reduktion des Pyruvats durch NADH zu Laktat wird durch die Laktat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert. Die Oxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ kann photometrisch verfolgt werden, da die reduzierte Form ein Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt und NAD^+ ein Maximum bei 260 nm aufweist. Die Hydrolyse des ATPs zu ADP durch DnaK stellt dem System ADP zur Verfügung wodurch die gekoppelte Reaktion von PEP über das Zwischenprodukt Pyruvat zu Laktat ablaufen kann. Das bedeutet, je mehr ATP hydrolysiert wird, desto mehr Laktat wird gebildet, dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidiert und eine Abnahme der Absorption bei 340 nm kann detektiert werden, wodurch diese ein Maß für die ATPase-Aktivität des DnaK-Proteins ist. Die Zugabe eines im Rahmen dieser Arbeit

gereinigten DnaJ-Proteins (SII0897, Slr0093, SII0909 oder SII1666) sollte bei einer Interaktion mit dem verwendeten DnaK2-Protein die ATPase-Aktivität steigern, wodurch mehr Laktat gebildet wird und gleichzeitig eine Abnahme der Absorption bei 340 nm gemessen werden kann.

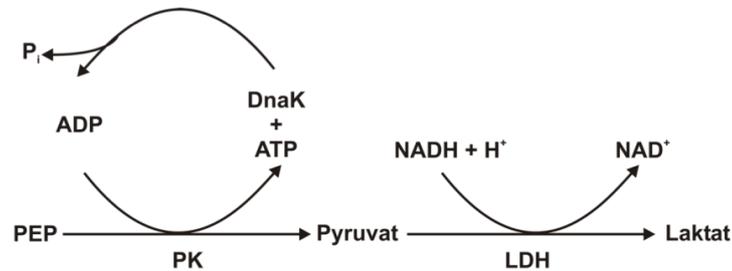


Abbildung 45: Reaktionsablauf des gekoppelten ATPase-Aktivitätstests. Durch Hydrolyse des ATPs zu ADP wird ADP zur Aufnahme der bei der Reaktion von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat frei werdenden Phosphorylgruppe zur Verfügung gestellt. Diese Reaktion wird von der Pyruvat-Kinase (PK) katalysiert. Im zweiten Schritt wird das Pyruvat durch $NADH + H^+$ zu Laktat reduziert. Dieser Schritt wird von der Laktat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert. Bei diesem Schritt wird $NADH + H^+$ zu NAD^+ oxidiert.

Mit Hilfe dieses Systems wurde die ATPase-Aktivität von je $0,1 \mu\text{M}$ DnaK2 bzw. jeweils $0,1 \mu\text{M}$ DnaK2 + Slr0093, DnaK2 + SII0897, DnaK2 + SII0909 und DnaK2 + SII1666, wie in 2.10.14 beschrieben, bestimmt. In Abbildung 46 ist exemplarisch für alle untersuchten Kombinationen die Abnahme der Absorption bei 340 nm gegen die Zeit der Reaktionsansätze mit DnaK2 bzw. DnaK2 + SII0897 gezeigt. Bei der schwarzen Kurve handelt es sich um einen Ansatz dem lediglich DnaK2 als Katalysator der ATP-Hydrolyse zugesetzt wurde. Dabei ist zu erkennen, dass die OD_{340} über die Zeit langsam abnimmt. Beim Vergleich dieser Abnahme mit der Abnahme nach Zugabe des DnaJ SII0897, zeigt sich eine schnellere Abnahme und eine frühere stationäre Phase (Abbildung 46).

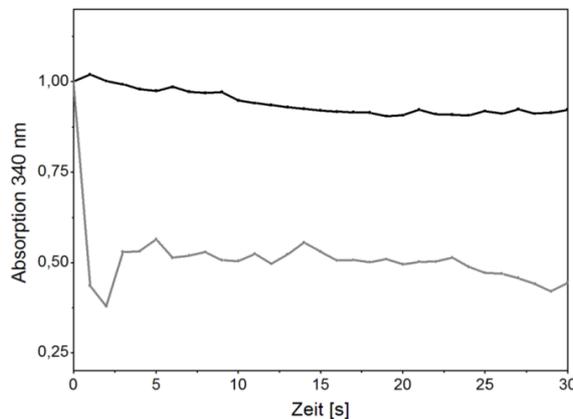


Abbildung 46: Enzym-gekoppelter Test zur Bestimmung der ATPase-Aktivität des DnaK2 mit SII0897. Verfolgt wurde die Abnahme der OD_{340} über die Zeit, wobei jede Sekunde ein Messwert aufgenommen wurde. Die gemessenen Werte wurden auf einen Startwert von 1 normiert. **Schwarz:** Reaktionsansatz bei Zugabe von DnaK2, **grau:** Reaktionsansatz bei Zugabe von DnaK2 + SII0897

Um Aussagen über die ATPase-Aktivität treffen zu können, wurde der k_{cat} -Wert für jede Kombination bestimmt. Dieser Wert ist definiert als die Menge an Enzym, die die Umsetzung von 1 μmol Substrat pro Minute in einem definierten System katalysiert (Pullman *et al.*, 1960). Die ermittelten k_{cat} -Werte für das DnaK2 bzw. DnaK2 und eines der DnaJ-Proteine sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Werte zeigen, dass das DnaK2 alleine eine relativ geringe ATPase-Aktivität besitzt. Erst in Kombination mit einem DnaJ steigt der Wert um ein Vielfaches an. Die Kombination aus DnaK2 + Slr0093 führte zu einer Steigerung um etwa das 13-fache der ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins. Das SII0909-Protein führte zu einer etwa 25-fachen Steigerung der ATPase-Aktivität und SII1666 steigerte den Wert um etwa das 33-fache. Die größte Steigerung der ATPase-Aktivität konnte bei der Kombination von DnaK2 und SII0897 beobachtet werden. Der Wert steigerte sich dabei um etwa das 270-fache der DnaK2 ATPase-Aktivität ohne DnaJ.

Tabelle 16: k_{cat} -Werte der ATPase-Aktivität des DnaK2 bzw. des DnaK2 in Kombination mit einem DnaJ. Die k_{cat} -Werte zeigen die maximale Anzahl von Substratmolekülen, die pro Molekül Enzym und pro Sekunde in das Produkt umgewandelt werden können.

DnaK	DnaJ	$k_{\text{cat}} [\text{s}^{-1}]$
DnaK2		$0,031 \pm 1,415 \cdot 10^{-4}$
DnaK2	SII0897	$8,317 \pm 0,146$
DnaK2	Slr0093	$0,392 \pm 0,001$
DnaK2	SII0909	$0,768 \pm 0,001$
DnaK2	SII1666	$1,005 \pm 0,020$

4 Diskussion

4.1 Die sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp. PCC 6803: Einteilung und *in vivo* Charakterisierung

Das Auftreten multipler DnaJ-Proteine konnte sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Organismen beobachtet werden. So kodiert das Genom des Bakteriums *E. coli* neben dem DnaJ-Protein noch fünf weitere DnaJ-Homologe (CbpA, DjlA, HscB, DjlB, DjlC) (Chenoweth und Wickner, 2008; Genevaux *et al.*, 2007). Cyanobakterien kodieren in ihrem Genom ebenfalls multiple DnaJ-Proteine. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 kodiert beispielsweise zehn DnaJ- bzw. DnaJ-ähnliche Proteine in seinem Genom. In den Genomen der Bakterien *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 bzw. *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 werden vier bzw. sechs DnaJ-Homologe kodiert (Cyanobase: <http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Im Gegensatz dazu sind in dem Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 sogar 16 Proteine mit einer J-Domäne und einem charakteristischem HPD-Motiv kodiert. Das Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 dagegen kodiert sieben DnaJ-Proteine (Abbildung 7), die eine charakteristische J-Domäne und das konservierte HPD-Motiv aufweisen (Kaneko *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2007).

Über die spezifischen Funktionen der sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp. war bisher wenig bekannt. Aufgrund der Domänenstruktur der DnaJ-Proteine aus *E. coli* und der daraus resultierenden Einteilung (Cheetham und Caplan, 1998) konnten auch die DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* in drei Typen eingeteilt werden (Abbildung 10). Dabei stellt das DnaJ SII0897 das einzige Protein dar, welches zur Klasse der Typ I-Proteine zählt. Es weist alle für DnaJ-Proteine charakteristischen Domänen (J-, G/F-, CYS- und CTD-Domäne) auf. Im Gegensatz dazu werden zwei der sechs DnaJ-Proteine, SIr0093 und SII1933 zur Klasse der Typ II-Proteine gezählt, da sie keine Cystein-reiche Domäne besitzen. Die restlichen vier DnaJs gehören zu den Typ III DnaJ-Proteinen. Den verschiedenen DnaJ-Typen werden verschiedene Funktionen zugeordnet. Typ I und Typ II-Proteine binden nicht-nativ gefaltete Substrate, wohingegen Typ III-Proteine nicht an Substrate binden und daher nicht selbständig als Chaperon wirken können (Qiu *et al.*, 2006). Inwieweit die Einteilung der DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* deren Funktion widerspiegelt sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

DnaJ-Proteine des Typ III besitzen neben der charakteristischen J-Domäne weitere Domänen mit vielseitigen Funktionen (Cheetham und Caplan, 1998). Das SII1011 weist an seinem C-terminalen Ende ein sogenanntes Pentapeptid-Wiederholungsmotiv (PRP) auf, wobei es sich um eine in Pro- und Eukaryoten verbreitete Domäne mit mehr als 500 Mitgliedern handelt. Das Pentapeptid-Wiederholungsmotiv weist eine Konsensus-Sequenz mit den Aminosäuren [S,T,A,V][D,N][L,F][S,T,R][G] auf (Vetting *et al.*, 2006). Innerhalb cyanobakterieller Proteine handelt es sich hierbei um ein weit verbreitetes Motiv, welches möglicherweise spezifische Funktionen in deren Metabolismus ausübt (Bateman *et al.*, 1998). Erstmals wurde dieses Motiv bei dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 nachgewiesen (Black *et al.*, 1995). Kaneko *et al.* konnten in *Synechocystis* 16 Proteine, die ein solches PRP-Motiv besitzen, identifizieren (Kaneko *et al.*, 1996). Für SII1011 konnte gezeigt werden, dass 39 % des gesamten Proteins aus solchen PRP-Motiven bestehen (Bateman *et al.*, 1998). Bisher konnte die genaue physiologische Funktion dieses Motivs jedoch noch nicht geklärt werden.

SII1384, ein weiteres Typ III DnaJ-Protein aus *Synechocystis* besitzt eine Domäne mit einem Tetratrikopeptid-Motiv (TPR). Dabei handelt es sich um Interaktionsdomänen, die in multipler Anzahl in einer Vielzahl funktionell verschiedener Proteine vorkommen und für spezifische Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Proteine, die ein solches TPR-Motiv aufweisen, sind häufig mit Multiprotein-komplexen assoziiert und sind daher häufig in DnaJ-Proteinen, die mit DnaK-Proteinen und Substraten interagieren, zu finden (Blatch und Lasse, 1999; Das *et al.*, 1998; Chen und Xu, 2009). In Hefen konnte ein DnaJ-Protein mit drei TPR-Domänen nachgewiesen werden, welches eine Verbindung des Hsp70-Systems mit dem Hsp90-System herstellt (Song und Masison, 2005). Untersuchungen des DnaJ-Proteins SII1384 von Chen und Xu, 2009 zeigten, dass eine Deletion dieses Gens keine Auswirkungen auf die Anpassung der Zellen an verschiedene Temperaturen hat, was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Chen und Xu, 2009). Die Deletion des *sII1384* führte aber zu einem kompletten Verlust der Fähigkeit der phototaktischen Bewegung. Diese Beobachtungen lassen auf eine Regulation der Phototaxis oder eines für die Phototaxis essentiellen Proteins durch das SII1384 schließen, welche über Protein-Protein-Interaktionen, möglicherweise durch die TPR-Domäne, erfolgt (Chen und Xu, 2009). *Synechocystis* kodiert für ein weiteres Typ III DnaJ-Protein mit einer zusätzlichen Domäne, wobei es sich um das

Protein Sll1666, welches eine C-terminale Transmembranregion aufweist, handelt. Diese Domäne ist für eine Verankerung des Sll1666 in der Membran verantwortlich. Für DnaJ-ähnliche Membranproteine wurde bereits beschrieben, dass sie in Kontakt mit den Ribosomen stehen und dort DnaK-ähnliche Chaperone rekrutieren. In Eukaryoten sind DnaJ-Proteine mit einer Transmembranregion am Proteintransport über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder der inneren Mitochondrien-Matrix beteiligt (Dudek *et al.*, 2002; Truscott *et al.*, 2003).

Erste Hinweise auf die Funktion der DnaJ-Proteine konnten anhand der *in vivo* Komplementationsstudien gewonnen werden. Die Ergebnisse (Abbildung 11) zeigten, dass das Typ I DnaJ Sll0897 und das Typ II DnaJ Slr0093 den Wachstumsdefekt des temperaturempfindlichen $\Delta dnaJ$ *E. coli*-Stammes OD259 komplementieren können. Dies zeigt, dass beide Proteine bei Hitzestress in *E. coli* sowohl exprimiert werden als auch die Funktion des *E. coli* DnaJ-Proteins übernehmen können und dass die DnaJ-Proteine Sll0897 bzw. Slr0093 möglicherweise ähnliche Funktionen aufweisen. Eine gesteigerte Expression von DnaJ-Proteinen wurde bereits in anderen Organismen beschrieben. So konnte für die Proteine aus *E. coli* und *Bacillus subtilis* bereits gezeigt werden, dass die Expression von Typ I DnaJ-Proteinen bei Hitzestress anstieg, wohingegen Typ II DnaJs keine gesteigerte Expression bei Hitze zeigten (Bardwell *et al.*, 1986; Wetzstein *et al.*, 1992; Yamashino *et al.*, 1994). Ein dem Slr0093 homologes DnaJ-Protein aus *Synechococcus* ist unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell und zeigt bei Hitzestressbedingungen eine gesteigerte Expression. Phylogenetische Analysen zeigten, dass in allen Cyanobakterien Typ I DnaJ-Proteine, welche auf Stressbedingungen reagieren, konserviert vorkommen (Sato *et al.*, 2007). Frühere Studien konnten eine Stressantwort im Bezug auf Hochlicht auch für Typ II und Typ III DnaJ-Proteine aufzeigen, so dass eine Rolle dieser DnaJs bei Stressbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann (Mary *et al.*, 2004). Sll1933, ein weiteres Typ II DnaJ aus *Synechocystis* komplementierte dagegen den Wachstumsdefekt des $\Delta dnaJ$ *E. coli*-Stammes bei höheren Temperaturen nicht. Mit Hilfe der Komplementationsstudien liesen sich die Funktionen der untersuchten DnaJ-Proteine nicht eindeutig klären, da diese heterolog in *E. coli* exprimiert wurden. Die heterologe Expression kann dazu führen, dass die DnaJ-Proteine nicht mit dem WT-DnaK aus *E. coli* interagieren können oder dass sie in Einschlusskörperchen vorliegen und daher ihre Funktion nicht ausüben können. Die Theorie, dass die DnaJ-Proteine ihre Funktion

auf Interaktionen mit Organismus-spezifischen DnaK-Proteinen beschränken, könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb *sll1933* den Wachstumsdefekt bei Hitzestress nicht komplementieren konnte. Eine fehlende Expression von *sll1933* kann aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden (Abbildung 12), wobei der Expressionslevel von Sll1933 im Vergleich zu Sll0897 und Slr0093 jedoch geringer ausfiel. Das um die Transmembrandomäne verkürzte Typ III DnaJ Sll1666 zeigte in *E. coli* keine Expression in der löslichen Proteinfraction, womit sich das Nicht-Komplementieren erklären lässt. Die Ergebnisse der Komplementationsstudien lassen auf eine besondere Rolle der beiden DnaJ-Proteine Sll0897 und Slr0093 schließen.

Die Ergebnisse der Disruptionsanalysen zeigten, dass die Gene *sll0897* und *slr0093* in *Synechocystis* unter normalen Wachstumsbedingungen jedoch vollständig durch eine unterbrochene Genvariante ersetzt werden konnten, weshalb die kodierenden Proteine unter den normalen Wachstumsbedingungen nicht essentiell sind. Bei den vier weiteren *dnaJ*-Genen *sll0909*, *sll1011*, *sll1384* und *sll1666* konnte die unterbrochene Genvariante ebenfalls in alle Genomkopien homolog rekombinieren. Dies deutet darauf hin, dass die Proteine spezifische Funktionen besitzen, die unter den untersuchten Wachstumsbedingungen nicht essentiell waren. Des Weiteren könnten die Funktionen der Genprodukte der Δ *dnaJ*-Gene durch die Produkte der intakten *dnaJ*-Gene übernommen worden sein.

Lediglich die Expression von *sll1933* scheint unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell zu sein (Abbildung 14), was auf eine essentielle Funktion dieses Proteins in *Synechocystis* schließen lässt. In den 34 bisher vollständig sequenzierten cyanobakteriellen Genomen wurde jeweils ein Gencluster aus *sll1932* (*dnaK3*) und *sll1933* gefunden (Nakamura *et al.*, 2000; Cyanobase: <http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Die Gene *sll1933* und *sll1932* (*dnaK3*) sind in *Synechocystis* sp. in einem Gencluster angeordnet, wobei die essentielle Rolle des DnaK3 bereits beschrieben wurde (Kaneko *et al.*, 2001; Rupprecht *et al.*, 2007). Untersuchungen der homologen, ebenfalls essentiellen Gene *sll1932* und *sll1933* aus *Synechococcus* zeigten eine Anordnung in einem Gen-Cluster und eine Interaktion der Genprodukte mit der Thylakoidmembran. Dies weist auf mögliche spezifische Funktionen hin, die im Zusammenhang mit der Thylakoidbiosynthese stehen könnten, hin. Die Interaktion der Chaperone könnte z. B. für die korrekte Lokalisation von photosynthetischen Proteinen an der Thylakoidmembran involviert

sein (Nimura *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2007). Diese Vermutung kann dadurch unterstützt werden, dass das Bakterium *Gloeobacter violaceus* keine Sll1932 bzw. Sll1933-Homologe besitzt und gleichzeitig das einzige Cyanobakterium darstellt, welches kein Thylakoidmembransystem aufweist (Nakamura *et al.*, 2003; Rippka *et al.*, 1974).

Untersuchungen des Wachstumsverhaltens der $\Delta dnaJ$ -Stämme zeigten bei optimaler Wachstumstemperatur keinen Unterschied zum Wildtyp. Sowohl unter Hitze- als auch unter Kältestressbedingungen zeigte sich jedoch ein klarer Wachstumsdefekt beim $\Delta sll0897$ -Stamm (Abbildung 15). Bei Temperaturstress hat das Genprodukt von *sll0897* somit einen Einfluss auf das Wachstum der *Synechocystis*-Zellen. Unter Hitzestressbedingungen ist das Gen *sll0897* essentiell, da die Zellen des $\Delta sll0897$ -Stammes kein Wachstum aufwiesen. Vergleichbare Ergebnisse zeigte die Deletion des *E. coli dnaJ*-Gens, welches für das Typ I DnaJ-Protein kodiert. Dabei konnte ebenfalls ein temperaturempfindlicher Phänotyp beobachtet werden, der durch Einstellung des Wachstums bei Hitze- und Kältestressbedingungen gekennzeichnet ist (Kelley und Georgopoulos, 1997). Eine verstärkte Expression des Proteins Sll0897 unter Hitzestress und somit eine Beteiligung an der Hitzeschockantwort wurde bereits beschrieben (Singh *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2007). Um Rückschlüsse auf die möglichen Funktionen der anderen DnaJ-Proteine zu erhalten, müssten Wachstumskurven bei weiteren Stressbedingungen wie z. B. Säurestress, osmotischem Stress oder Hochlichtstress, aufgenommen werden.

Weitere Untersuchungen des $\Delta sll0897$ -Stammes zeigten eine Reduktion der Chlorophyll-Absorption und ein verändertes Verhältnis von Photosystem I zu II unter Hitzestressbedingungen (Abbildung 17 und Abbildung 18). Ein Zusammenhang zwischen Hsp-Chaperonen und der Reparatur, dem Aufbau sowie der Stabilität von Photosystemen wurde bereits beschrieben und könnte auch bei dem $\Delta sll0897$ -Stamm eine Rolle spielen. Vertreter der DnaK-DnaJ-GrpE-Familie sind für die korrekte Assemblierung von Proteinkomplexen innerhalb der Thylakoidmembran notwendig (Marshall *et al.*, 1990; Schlicher und Soll, 1997). Die Deletion der *dnaJ*-Gene in *Arabidopsis thaliana* führt zu einer reduzierten Photosyntheserate und einer Destabilisierung der PS II-Komplexe (Chen *et al.*, 2010). In *Chlamydomonas* ist ein Hsp-Protein, das für den Zusammenbau des PS I wichtig ist, beschrieben (Bartsevich und Pakrasi, 1997). Heckathorn *et al.* konnten in Chloroplasten erstmalig ein Hsp-Protein nachweisen, welches das thermolabile PS II während eines Hitzestress'

schützt. (Heckathorn *et al.*, 1998). In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ebenfalls ein Hsp70-Protein gefunden, das in Schutz und Reparatur des PS II-Komplexen involviert ist (Schroda *et al.*, 1999). Die bisher beschriebene Verbindung zwischen Hsp-Chaperonen und der Stabilität, Reparatur und Biogenese von Photosystemen ist wahrscheinlich eine sowohl in Chloroplasten als auch in Cyanobakterien konservierte Gemeinsamkeit. Daher könnte auch das DnaJ-Protein SII0897 aus *Synechocystis* unter Hitzestressbedingungen eine für die Reparatur, den Aufbau sowie die Stabilität des PS I oder PS II essentielle Funktion besitzen.

Informationen über mögliche überlappende Funktionen von DnaJ-Proteinen sollten Disruptionen von zwei *dnaJ*-Genen in Kombination innerhalb eines Stammes liefern (Tabelle 11). Nur in einer Kombination ($\Delta sII0909\Delta sII1384$) war die Disruption zweier Gene möglich. Die beiden Proteine SII0909 und SII1384 zählen zu den Typ III DnaJ-Proteinen, welche spezifische, vermutlich jedoch für das Zellüberleben nicht essentielle Funktionen ausüben. Dem DnaJ-Protein SII1384 wurde bereits eine Beteiligung bei der Regulation der Phototaxis zugeschrieben. *Synechocystis* sp. PCC 6803 nutzt den Mechanismus der phototaktischen Bewegung um auf reduzierte Lichtverhältnisse zu reagieren (Chen und Xu, 2009). Eine Störung oder Verlust dieser Funktion hat keinen Einfluss auf das Überleben der Zelle, da dieser Stamm in der Lage ist photoautotroph zu wachsen, weshalb der Mechanismus der Phototaxis nicht essentiell für den Organismus ist. Eine spezifische Funktion für das SII0909-Protein wurde bisher noch nicht gezeigt. Die doppelte Disruption von *sII0909* und *sII1384* kann aber auch dadurch erklärt werden, dass die Funktionen der Genprodukte der beiden mutierten Gene durch andere DnaJ-Proteine übernommen werden können. Dies bedeutet, dass mindestens noch ein weiteres DnaJ-Protein ähnliche Funktionen wie SII0909 und SII1384 aufweisen muss. Wäre dies der Fall müssten jedoch noch mindestens zwei weitere Doppelmutationen möglich sein. Daher lässt sich anhand der Ergebnisse der Doppeldisruptionen zusammenfassend sagen, dass die DnaJ-Proteine SII0909 und SII1384 wahrscheinlich spezifische Funktionen aufweisen, die bei den untersuchten Wachstumsbedingungen nicht essentiell sind.

4.2 Identifizierung der minimal notwendigen Domänen des DnaJ-Proteins SII0897

Eine Einzeldisruption konnte für das *dnaJ*-Gen *sII0897* in *Synechocystis* erreicht werden. Bei dieser Mutante handelt es sich jedoch um keine Deletion des *sII0897*-Gens, da die Insertion der Resistenzkassette innerhalb der CYS-Domäne erfolgte. Somit konnten sowohl die J-Domäne als auch die G/F-reiche Domäne exprimiert werden und theoretisch weiterhin ihre Funktion innerhalb des Mutationsstammes ausüben. Eine vollständige Deletion von *sII0897*, wobei der Großteil des *dnaJ* ersetzt wurde und daher keine Domäne vollständig exprimiert werden konnte, war jedoch nicht möglich (Abbildung 21). Dies zeigt, dass entweder die J-Domäne oder beide Domänen (J- und G/F) für ein Wachstum von *Synechocystis* bei Normaltemperatur essentiell sind. In genetischen Untersuchungen sollte die für ein Wachstum bei Normaltemperatur mindestens notwendige Domäne ermittelt werden. Dazu wurden an einer neutralen Stelle im *Synechocystis*-Genom verkürzte Versionen des Volllängen-Proteins SII0897 exprimiert, um dadurch eine komplette Deletion von *sII0897* zu erreichen. Die Ergebnisse zeigten, dass unter optimalen Wachstumsbedingungen mindestens die J- und G/F-Domäne essentiell sind (Abbildung 21). In *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass eine verkürzte Form des DnaJ-Proteins aus J- und G/F-Domäne gleiche Wachstumseigenschaften wie das Volllängen-Protein bei Normaltemperatur aufweist (Wall *et al.*, 1994; Liberek *et al.*, 1995; Szyperski *et al.*, 1994). Die beiden beschriebenen Domänen (J- und G/F) sind für die ATPase-Aktivität des DnaK-Proteins essentiell. Werden lediglich die J und G/F-Domäne exprimiert, erreicht die ATPase-Rate des DnaK eine Sättigung bereits bei einem fünffach geringeren Wert, verglichen mit der ATPase-Rate bei Anwesenheit des WT DnaJ-Proteins (Wall *et al.*, 1994; Karzai und McMacken, 1996). Eine Stimulierung der ATP-Hydrolyse des DnaK-Proteins einzig durch die J-Domäne ist nur möglich, wenn diese ein kleines Peptid mit einer hohen Affinität zum DnaK gebunden hat (Karzai und McMacken, 1996). Daher sind die J- und G/F-Domäne mindestens notwendig, um die Funktion der Stimulierung der ATPase-Aktivität des DnaK-Proteins in jedem Fall sicherzustellen. Huang *et al.* untersuchten, welchen Einfluss die G/F-Domäne auf die Faltung der J-Domäne ausübt. Sie konnten zeigen, dass die J-Domäne alleine eine kompakte Helixstruktur aufweist. In NMR-Studien der J- und G/F-Domäne konnte eine Faltung der J-Domäne und eine undefinierte Struktur der G/F-Domäne nachgewiesen werden. Dabei waren jedoch Änderungen in

den „Loop“-Regionen zwischen Helix II und III und eine Änderung der Orientierung der Helix IV innerhalb der J-Domäne zu beobachten. Diese Konformationsänderung könnte möglicherweise der entscheidende Faktor für eine effektive Interaktion zwischen der J-Domäne und der Nukleotidbindedomäne des DnaKs darstellen und somit zu einer effektiven Steigerung der ATPase-Aktivität führen (Huang *et al.*, 1999; Genevoux *et al.*, 2002). Auch in Eukaryoten konnte eine Komplementation der vollständigen Deletion des *dnaJ sis1* in *S. cerevisiae* durch Expression lediglich der J- und G/F-Domäne bereits gezeigt werden. Eine Komplementation des Wachstumsdefekts allein durch die J-Domäne ist jedoch auch hier nicht möglich (Yan und Craig, 1999). Die maximale Aktivierung der ATP-Hydrolyserate des DnaKs benötigt zwei unabhängige Signale. Dabei handelt es sich zum Einen um die Interaktion der N-terminalen J-Domäne mit dem DnaK-Protein und zum Anderen um die korrekte Positionierung des C-terminal gebundenen Substrates. Die G/F-Domäne stellt einen flexiblen Linker zwischen den beiden Termini des DnaJ-Proteins dar, so dass eine korrekte Positionierung sowohl der J-Domäne als auch der C-terminalen Domäne am DnaK erfolgen kann (Karzai und McMacken, 1996).

Mit Hilfe von Wachstumsexperimenten sollten die Domänen, die für ein Überleben unter Hitzestress notwendig sind, ermittelt werden. Bei normaler Wachstumstemperatur konnte für die Stämme, welche die J-G/F, die J-G/F-CYS und die J-G/F-CYS-CTD-Domänen exprimieren ein im Vergleich zum Wildtyp annähernd gleiches Wachstum beobachtet werden. Unter Hitzestressbedingungen waren die Stämme, die lediglich die J-G/F bzw. J-G/F-CYS-Domänen exprimierten, nicht lebensfähig. Lediglich der Stamm, der das Volllängen-Protein SII0897 exprimiert, zeigte ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum. Ein verkürztes SII0897 aus den J-G/F-CYS-Domänen konnte die Funktion des Volllängen-Proteins unter Hitzestressbedingungen ebenfalls nicht übernehmen (Abbildung 22), weshalb der C-Terminus bei Hitzestress vermutlich essentiell ist. Die C-terminale Domäne des DnaJ vermittelt die Dimerbildung des Proteins. Dies konnte für das humane DnaJ-Protein bereits experimentell bestätigt werden, da die Deletion des C-terminalen Bereichs dazu führt, dass kein Dimer mehr gebildet wird (Borges *et al.*, 2005). Auch in *E. coli* kann nur das Volllängen-Protein, nicht aber das verkürzte DnaJ-Protein mit dem DnaK und einem Substrat interagieren. Eine um die C-terminale Domäne verkürzte Variante des SII0897 kann daher vermutlich auch kein denaturiertes Protein binden und mit dem DnaK interagieren, wodurch ein essentieller Mechanismus des Hitzeschock-

proteins inhibiert ist. (Liberek *et al.*, 1991, Szabo *et al.*, 1996). Möglicherweise ist das Sll0897 Volllängen-Protein unter Hitzestressbedingungen essentiell, um einen korrekten Ablauf bei der Stimulierung der ATPase-Aktivität des DnaK und der Bindung und Übertragung nicht nativ gefalteter Proteine auf das DnaK-Protein zu gewährleisten. Frühere Untersuchungen zeigten, dass eine Deletion der C-terminalen Domäne des DnaJ-Proteins Sis1 der Hefe unter Normalbedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Diese Deletion führt allerdings zu einem temperaturempfindlichen Phänotyp und ist unter Hitzeeinwirkung für die Zelle letal (Yan und Craig, 1999). Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente zeigten, dass unter normalen Temperaturbedingungen mindestens die J- und G/F-Domäne des Typ I DnaJ Sll0897 aus *Synechocystis* sp. für die Zelle notwendig sind. Unter Hitzestressbedingungen war jedoch das Volllängen-Protein für das Überleben der Zelle essentiell.

4.3 Die zelluläre Lokalisation und die Stressantworten der DnaJ-Proteine

Homologe DnaJ-Proteine von Hefen sind an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle lokalisiert. Dabei konnten sowohl Typ I als auch Typ II und Typ III DnaJ-Proteine im Cytoplasma und in Mitochondrien oder im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Walsh *et al.*, 2004; Becker und Craig, 1994). Die homologen DnaJ-Proteine aus *E. coli* weisen ebenfalls unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf. So handelt es sich z. B. bei dem DnaJ-Protein lediglich um ein membranassoziiertes Protein, wohingegen das DjlA-Protein in der Membran verankert ist (Genevaux *et al.*, 2007; Bardwell *et al.*, 1986; Zylicz *et al.*, 1985). Auch in Cyanobakterien wie z. B. in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wurde eine subzelluläre Lokalisation homologer DnaJ-Proteine sowohl im Cytosol als auch in den Membranen nachgewiesen (Sato *et al.*, 2007). Die Lokalisation der DnaJ-Proteine in *Synechocystis* sollte mit der Lokalisation der DnaK-Proteine verglichen werden, um anhand von Ko-Lokalisationen erste mögliche Hinweise auf DnaK-DnaJ-Interaktionspartner zu erhalten. Anhand von Western-Blot-Analysen konnte die zelluläre Lokalisation der sieben DnaJ-Proteine innerhalb von *Synechocystis* sp. bestimmt werden.

Für das in den bisherigen Versuchen als Haupt-DnaJ identifizierte Protein Sll0897, welches die höchste Struktur- und Sequenzhomologie zum DnaJ aus *E. coli* aufweist

(Tabelle 10), konnte eine Lokalisation im Cytoplasma detektiert werden (Abbildung 24). Bei dem DnaK2 aus *Synechocystis* sp., welches das Haupt-DnaK-Protein darstellt und ebenfalls bei Hitze verstärkt exprimiert wird, handelt es sich auch um ein lösliches Protein (Rupprecht *et al.*, 2007). Sowohl das DnaK2 als auch das SII0897-Protein sind beide für das Überleben von *Synechocystis* essentiell, im Cytoplasma lokalisiert und weisen eine Induktion der Expression bei Hitzestress auf. Diese Ergebnisse könnten auf eine funktionelle Interaktion dieser beiden Chaperone hinweisen. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind jedoch noch weitere Untersuchungen, wie z. B. Ko-Immunopräzipitations-Analysen erforderlich.

Sowohl das SII0909 als auch das SII1011-Protein konnten im Rahmen dieser Arbeit im Cytosol nachgewiesen werden. Für SII1011 wurde bereits eine Lokalisation im Cytoplasma aufgrund von Hydrophobizitäts-Profilen und Analysen des N-Terminus vorgeschlagen, welche mittels der erhaltenen Ergebnissen bestätigt werden kann (Kieselbach *et al.*, 1998).

Das DnaJ-Protein SII1933 aus *Synechocystis* ist im Gegensatz zu homologen Proteinen anderer Cyanobakterien nicht in der Membran lokalisiert. Die kodierenden Gene des löslichen SII1933 und des membrangebundenen DnaK3 sind wie in anderen Cyanobakterien auch in *Synechocystis* in einem Gencluster organisiert. Bei dem für das DnaK3 aus *Synechocystis* spezifischen DnaJ-Protein, könnte es sich aufgrund des Genclusters und den Ergebnissen früherer Studien verwandter Organismen um das SII1933 handeln. In *Synechococcus* wurde das DnaJ3, ein dem SII1933 homologes Protein, dagegen in der Membranfraktion nachgewiesen (Sato *et al.*, 2007). Auch in diesem Organismus sind die beiden Gene *dnaK3* und *dnaJ3* in einem Gencluster angeordnet. Eine spezifische Funktion, welche im Zusammenhang mit der Photosynthese und der Thylakoidmembranbiogenese steht wurde beispielsweise für das DnaJ3 und das DnaK3 aus *Synechococcus* bereits vorgeschlagen (Nimura *et al.*, 2001). Eine Beteiligung des DnaK3-Proteins aus *Synechococcus* am Transport von Proteinen zur Thylakoidmembran wurde bereits postuliert (Nimura *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus ist bisher jedoch nicht geklärt. Möglicherweise interagiert das DnaK3 spezifisch mit einem DnaJ-Protein, welches in der Thylakoidmembran lokalisiert ist, was zu einer Bindung des DnaK3 an die Thylakoidmembran führt. Ob auch in *Synechocystis* eine Interaktion des löslichen SII1933-Proteins mit dem membrangebundenen DnaK3-Protein stattfindet, oder ob die membrangebundenen DnaJ-Proteine Slr0093, SII1384 und SII1666 mit dem DnaK3 inter-

agieren, müsste anhand weiterführender Analysen, wie Ko-Immunopräzipitationen, bakteriellen „Two-Hybrid“-Systemen oder „Pull-Down“ Analysen überprüft werden. Bisher konnte die Lokalisation von DnaJ-Proteinen innerhalb der Membran sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten nachgewiesen werden. Membrangebundenen DnaJ-Proteinen wurde eine Beteiligung am Transport von Proteinen über die Membran zugeschrieben. In Hefen sind Hsp40-Chaperone der Mitochondrien-Membran für den Proteintransport über die Membran in die Matrix verantwortlich (Truscott *et al.*, 2003). Eine weitere Funktion von membranverankerten DnaJ-Proteinen besteht in der Modulation der Translation. Dabei kommt es zu einem Kontakt der cytosolischen Domäne des DnaJs mit einem Ribosom und einer Rekrutierung von DnaK-Proteinen an das Ribosom (Dudek *et al.*, 2002). Sll1666 weist als einziges DnaJ-Protein aus *Synechocystis* eine Transmembranhelix auf, weshalb die Lokalisation dieses Proteins in der Membranfraktion nicht verwundert. Das DnaJ Sll1666 gehört zum Typ III und weist keine C-terminale Domäne zur Interaktion mit Substraten auf. DnaJ-Membranproteine ohne eine solche Domäne wurden bereits als Helferproteine der Translokation von Polypeptiden durch die Membran beschrieben (Han und Christen, 2003). Eine Lokalisation des Proteins Sll1384, einem Typ III DnaJ mit einem TPR-Motiv, innerhalb der Thylakoidmembran ist wahrscheinlich, da Proteine mit TPR-Motiven am Aufbau von Multiproteinkomplexen, wie sie die Photosysteme innerhalb der Thylakoidmembran darstellen, beteiligt sind (Blatch und Lasse, 1999; Das *et al.*, 1998). Die Funktion von Sll1666 und den beiden weiteren membrangebundenen DnaJ-Proteinen Sll0093 und Sll1384 ist bisher jedoch noch nicht geklärt. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, um eine Lokalisation innerhalb der Cytoplasma- oder der Thylakoidmembran zu unterscheiden und um mögliche DnaK-Interaktionspartner zu identifizieren.

Nicht nur die Ko-Lokalisation, auch vergleichbare Stressantworten können einen Hinweis auf Interaktionen von DnaJ und DnaK-Proteinen geben. Pro- und Eukaryoten besitzen die Fähigkeit auf verschiedene Stressbedingungen, wie extreme Temperaturänderungen, oxidativen Stress, Abweichungen von den optimalen Salzkonzentrationen, Hochlicht-Bedingungen und viele mehr, zu reagieren (Wang *et al.*, 2004; Hecker *et al.*, 1996; Hightower, 1991). Mit Hilfe der Promotoraktivitätsstudien sollte durch Änderungen der relativen Promotoraktivität gezeigt werden, ob die sieben DnaJ-Proteine aus *Synechocystis* sp. als Hitzeschockproteine wirken und inwieweit die Reaktionen der multiplen DnaJ-Proteine bei verschiedenen Stress-

bedingungen variieren. Die Ergebnisse der Promotoraktivitätsstudien zeigten, dass bei allen untersuchten Stressbedingungen das Haupt-DnaJ SII0897 die größte relative Änderung der Promotoraktivität aufwies (Abbildung 25). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Steigerung der Promotoraktivität von *sII0897* unter Hitzestressbedingungen konnte bereits durch eine Hochregulation der Expression von *sII0897* aber auch von *dnaK2* bei Hitzeschockbedingungen anhand von Microarray-Analysen gezeigt werden (Singh *et al.*, 2006). Mit Hilfe der Promotoraktivitätsstudien konnte die in früheren Arbeiten durch RT-PCR Analyse ermittelte Steigerung des Transkriptionslevels von *sII0897* bei Hochlichtstress bestärkt werden (Mary *et al.*, 2004). Die Induktion der Genexpression des kanonischen *dnaJ sII0897* bei Hochlichtstress konnte ebenfalls mit Hilfe von Microarray-Analysen nachgewiesen werden (Hihara *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen konnte auch bei homologen Proteinen des Cyanobakteriums *Synechococcus* gemacht werden. So wurde beispielsweise eine Steigerung der Expression des Haupt-DnaJ und DnaK-Proteins (DnaJ2 und DnaK2) sowohl bei Hochlichtstress als auch bei Hitzestress beobachtet (Watanabe *et al.*, 2007). Mit Hilfe der Promotoraktivitätsstudien konnte im Rahmen dieser Arbeit für das *slr0093* eine Steigerung der Promotoraktivität unter osmotischen Stressbedingungen beobachtet werden. Anhand bereits beschriebener Microarray-Analysen, welche eine relativ starke Steigerung der Genexpression des *slr0093* unter osmotischen Stressbedingungen zeigten, können die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden (Kanesaki *et al.*, 2002). Eine stetig signifikante Steigerung der Promotoraktivität bei verschiedenen Stressbedingungen konnte jedoch lediglich für *sII0897* beobachtet werden. Dies weist erneut darauf hin, dass das Protein SII0897 das kanonische DnaJ in *Synechocystis* sp. darstellt und bei der Stressantwort beteiligt ist.

4.4 Reinigung der verschiedenen DnaJ-Proteine zur *in vitro* Charakterisierung

Um biochemische und biophysikalische Untersuchungen der DnaJ-Proteine durchführen zu können, sollten die Proteine in ausreichend großen Mengen angereichert und bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Folgen einer gesteigerten Expression von Chaperonen und deren Ko-Chaperone in *E. coli* wurden bereits beschrieben und zeigten, dass diese für die Zelle toxische Auswirkungen haben können (Blum *et al.*, 1992; McCarty und Walker, 1994; Genevaux *et al.*, 2007). Daher sollten geeignete Bedingungen etabliert werden, um die DnaJ-Proteine

aus *Synechocystis* heterolog in *E. coli* anzureichern. Dabei stellte eine Induktion der Expression bei hoher OD₆₀₀ und Inkubation der Zellen bei 37 °C über Nacht als die geeignetste Bedingung dar. Eine Reinigung der Proteine erfolgte sowohl aus der löslichen- als auch der Membranfraktion, da einige Proteine nur mit der Membran assoziiert vorzuliegen scheinen. Eine Reinigung des DnaJ SII0897 aus der löslichen Proteinfraction konnte jedoch nicht erreicht werden, da möglicherweise durch Konformationsänderungen der His-Tag nicht zugänglich war und daher das Protein unter den verwendeten Pufferbedingungen nicht mit den zweiwertigen Ionen der Affinitätschromatographie-Säule interagieren konnte. Daher wurde das kanonische DnaJ SII0897 mittels des Detergenz β -DM aus der Membran herausgelöst und anschließend zur Reinigung verwendet. Die Zugabe des Detergenz führte neben der Solubilisierung dazu, dass das SII0897 an die Affinitätschromatographie-Säule binden konnte. Für das DnaJ aus *E. coli* wurde ebenfalls eine Reinigung des Proteins aus der Membranfraktion beschrieben. Das *E. coli* DnaJ-Protein weist lange hydrophobe Regionen auf, weshalb bei der Reinigung ohne Zugabe hoher Salzkonzentrationen und Brij58 eine Interaktion des Proteins mit den verwendeten Säulenmaterialien beobachtet wurde (Zylicz *et al.*, 1985). Zur Reinigung der DnaJ-Proteine Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666 konnte ein zweistufiger Reinigungsprozess etabliert werden. In einem ersten Schritt wurde eine affinitätschromatographische Reinigung der Proteine mit deca-His-Tag durchgeführt, bevor in einem zweiten Schritt die Reinigung über eine Ionenaustausch-Chromatographie erfolgte. Literaturvergleiche zeigen, dass für die Reinigung nativer Chaperone mittels Affinitätschromatographie und/oder Ionenaustausch-Chromatographie bisher die größten Erfolge erzielt wurden, was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Schönfeld und Behlke, 1998). Die Ergebnisse der heterologen Expression zeigen, dass für alle sieben DnaJ-Proteine ein geeignetes Expressionssystem, sowie für Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666 ein Zwei-Schritt Reinigungsprotokoll etabliert werden konnte.

4.5 Thermostabilität und oligomerer Zustand der DnaJ-Proteine

Chaperone der Hsp70 und Hsp40-Familie sind an der Stressantwort einer Zelle beteiligt, indem sie z. B. eine wichtige Rolle bei der Hitzestressantwort spielen (Cyr *et al.*, 1994; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Damit die Proteine diese Aufgabe erfüllen können, müssen sie auch in einem nicht-physiologischen Temperaturbereiche ihre

native Struktur und Aktivität beibehalten (Grimshaw *et al.*, 2001; Popp und Reinstein, 2009; Schröder *et al.*, 1993). Um den Einfluss von Temperaturänderungen auf die Struktur der gereinigten DnaJ-Proteine Slr0093, Sll0897, Sll0909 und Sll1666 zu untersuchen, wurden CD-Spektren aufgenommen (Abbildung 41). Für das Typ I DnaJ-Protein Sll0897 aus *Synechocystis* sp. wurde in dieser Arbeit eine irreversible Denaturierung und ein Schmelzpunkt bei etwa 59,5 °C ermittelt. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für das *E. coli* DnaJ-Protein erhalten werden, wobei auch hier die Denaturierung einen irreversiblen Prozess darstellt und das Protein einen Schmelzpunkt bei etwa 58 °C aufweist (Grimshaw *et al.*, 2001; Popp und Reinstein, 2009). Die annähernd gleichen Schmelzpunkte des DnaJ-Proteins aus *E. coli* und des Sll0897-Proteins und der vergleichbare Einfluss der Temperaturänderung auf die Struktur beider Proteine könnte in der hohen Identität und Ähnlichkeit der Proteinsequenzen begründet sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Denaturierung der beiden DnaJ-Proteine Slr0093 und Sll1666 reversibel ist, da sowohl die Hinreaktion (10-95 °C) als auch die Rückreaktion (95-10 °C) annähernd gleiche Schmelzkuren zeigen. Slr0093 weist eine Schmelztemperatur von etwa 70 °C auf und liegt damit oberhalb der Schmelztemperatur des Sll0897. Eine Vermutung wäre, dass dieses DnaJ-Protein nach einem Hitzeschock zur Faltung der denaturierten DnaJ-Proteine dient, um so den Wiederaufbau des Chaperonsystems in *Synechocystis* sp. zu gewährleisten. Die Denaturierung des DnaJ Sll0909 ist irreversibel, wobei dieses Protein einen Schmelzpunkt von etwa 52,7 °C besitzt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem DnaJ um ein Ko-Chaperon, welches bei Temperaturen, die nicht-denaturierend auf das Protein wirken, eine Funktion in *Synechocystis* besitzt. Sll1666, mit einer Schmelztemperatur von etwa 50,7 °C könnte ebenfalls die Rolle eines Chaperons mit einer Funktion innerhalb des physiologischen Temperaturbereiches darstellen, da bei diesen Temperaturen das Protein noch nicht denaturiert ist. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie zeigten, dass die untersuchten gereinigten DnaJ-Proteine bis zu Temperaturbereichen weit oberhalb der optimalen Wachstumstemperatur stabil sind, was für Hitzeschockantworten und somit das Zellüberleben wichtig ist. Ähnliche Beobachtungen bzgl. des Schmelzpunktes wurden bereits für DnaJ-Proteine anderer Prokaryoten gemacht. Das DnaJ-Protein von *E. coli* besitzt eine Schmelztemperatur von 58 °C und liegt somit ebenfalls oberhalb der optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C. Ein weiteres Beispiel ist das DnaJ-Protein des Organismus *Methanothermobacter*

thermoautotrophicus ΔH , welches eine Schmelztemperatur in einem Bereich von 75-77 °C aufweist und damit oberhalb der für das Bakterium physiologischen Temperatur von 40-70 °C liegt (Popp und Reinstein, 2009).

Die Graphen der CD-Spektren zeigten für die vier untersuchten DnaJ-Proteine Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666 jeweils einen charakteristischen Verlauf für Proteine mit einem erheblichen Gehalt an α -Helices. CD-Spektren anderer DnaJ-Proteine z. B. aus dem Bakterium *E. coli* (DnaJ) oder dem Menschen (DjB4) zeigten Parallelen zu den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Die Graphen der CD-Spektren der Proteine dieser beiden Organismen wiesen ebenfalls den charakteristischen Verlauf für Proteine mit hohem α -helikalen Gehalt auf (Grimshaw *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2005). DnaJ-Proteine zeigen in ihren Domänen unterschiedliche Sekundärstrukturelemente. Die N-terminale J-Domäne besteht hauptsächlich aus α -Helices, wohingegen die G/F-Domäne eine ungeordnete Struktur aufweist (Genevaux *et al.*, 2002; Szyperski *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999). Analysen der C-terminalen Domäne des humanen DnaJs Hdj1 konnten zeigen, dass diese Domäne ebenfalls eine α -helikale Struktur besitzt, jedoch hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist (Suzuki *et al.*, 2010). Innerhalb der Cystein-reichen Domäne des Hefe DnaJs Ydj1 konnten ebenfalls β -Faltblattstrukturen nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2003). Diese für Typ I und II DnaJ-Proteine beschriebenen Strukturelemente zeigen, dass DnaJ-Proteine variierende Anteile α -helikaler Strukturelemente besitzen. Bei Typ III-Proteinen, welche C-terminal unterschiedliche Domänen aufweisen, kann der Anteil an α -Helices ebenfalls variieren. Dadurch lassen sich die Werte der α -helikalen Strukturelemente von 40-50 % innerhalb der untersuchten DnaJ-Proteine erklären.

Die C-terminale Domäne der Typ I und Typ II DnaJ-Proteine ist für die Dimerisierung der Proteine verantwortlich, wodurch DnaJ-Proteine innerhalb des Chaperonzyklus als Homodimere agieren. Typ III-Proteinen fehlt die zur Dimerisierung notwendige C-terminale Domäne. In *E. coli* wurde jedoch für das Typ III-Protein DjIA eine Dimerbildung durch die Transmembrandomäne des Proteins festgestellt. Das Dimer des *E. coli* DnaJ weist eine zweifache Symmetrie mit einer ω -förmigen Struktur auf (Shi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Genevaux *et al.*, 2007; Bird *et al.*, 2006). Die monomere Form der DnaJ-Proteine dagegen wird als S-förmig und wenig stabil beschrieben (Shi *et al.*, 2005). Mit Hilfe der Gelfiltrationsanalysen sollten die gereinigten DnaJ-Proteine bezüglich ihres oligomeren Zustandes untersucht werden.

Das Haupt-DnaJ SII0897, welches eine molare Masse von 43,57 kDa besitzt, konnte in zwei Fraktionen eluiert werden. Die ermittelten molekularen Massen lagen bei 185,9 kDa und 359,05 kDa, wobei es sich um Vielfache von 43,57 kDa handelt. Dabei könnte es sich möglicherweise um tetramere und oktamere Formen des SII0897 handeln, wenn von einer globulären Struktur des Proteins ausgegangen wird. Dazu wäre es jedoch nötig den Stoke Radius von SII0897 zu ermitteln. Weist das gereinigte SII0897 keine ideale, globuläre Struktur auf, so könnten die zwei Peaks der Gelfiltration auf monomere bzw. dimere Formen des DnaJ SII0897 hindeuten. Das Typ III-DnaJ SII0909 könnte anhand der Ergebnisse der Gelfiltration ebenfalls in einer tetrameren und einer höher oligomeren Form vorliegen, wenn von einer globulären Struktur und damit einem idealen Laufverhalten ausgegangen wird. Da auch hier kein Stoke Radius ermittelt wurde und somit nicht bekannt ist, ob das Protein globulär vorliegt, könnten die beiden Peaks auch die dimere bzw. monomere Form des SII0909 darstellen. Die Theorie, dass die Ergebnisse der Gelfiltration von SII0897 und SII0909 höher oligomere Strukturen aufzeigen, kann durch die Tatsache, dass Chaperone häufig als höhere Oligomere vorliegen und in Lösung zur Komplexbildung neigen, bekräftigt werden (Schönfeld und Behlke, 1998). Dafür würde auch die Beobachtung der Gelfiltrationsanalysen des DnaJ-Proteins aus *E. coli* sprechen, da auch hier im Elutionsspektrum mehrere Peaks, welche oligomeren Formen zugeordnet werden konnten, nachgewiesen wurden (Wawrzynow *et al.*, 1995). Die beiden DnaJ-Proteine SIr0093 und SII1666 konnten lediglich in einer Proteinform nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass beide Proteine unter den experimentellen Bedingungen in einer monomeren Form vorlagen. Die ermittelten molaren Massen entsprachen dabei dem berechneten Wert (Tabelle 15). Die Differenz zwischen der ermittelten und der berechneten molaren Masse kann durch Abweichungen von der globulären Struktur der untersuchten Proteine erklärt werden. Aufgrund von asymmetrischen Proteinstrukturen sind die Idealzustände einer annähernd globulären Struktur innerhalb der DnaJ-Proteine möglicherweise nicht gegeben. SII1666 gehört zu den Typ III DnaJ-Proteinen, denen die C-terminale Domäne der Typ I und II-Proteine, welche für die Dimerisierung notwendig ist, fehlt. Eine Dimerisierung eines Typ III DnaJ-Proteins wurde bereits in *E. coli* beschrieben, wobei die Transmembrandomäne für die Dimerisierung verantwortlich ist (Toutain *et al.*, 2003). SII1666 wurde in dieser Arbeit jedoch ohne Transmembrandomäne exprimiert und gereinigt, wodurch diesem Protein die

Dimerisierungsdomäne fehlt und das Ergebnis der Gelfiltrationsanalysen, welches nur die monomere Form des Sll1666 zeigt, nicht verwunderlich ist. Die Ergebnisse der Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass die DnaJ-Proteine sowohl in monomeren Formen als auch in dimeren bzw. höher oligomeren Formen vorliegen können. Um die molaren Massen und damit die oligomeren Zustände der untersuchten Proteine genauer bestimmen zu können sind weitere Untersuchungen, wie beispielsweise eine analytische Ultrazentrifugation oder MALDI-Analysen nötig.

4.6 Ein DnaJ-DnaK Interaktionsnetzwerk in *Synechocystis* sp.

Das Vorhandensein multipler DnaK und DnaJ-Proteine in *Synechocystis* kann zu einer Vielzahl von Interaktionen führen, wodurch ein Chaperonnetzwerk entstehen kann. Aufgrund dieser Netzwerke kann die Zelle möglicherweise besser auf verschiedene Umwelteinflüsse reagieren und diese tolerieren. Dies lieferte dem Bakterium eine Möglichkeit sein Überleben über Millionen von Jahren bei unterschiedlichsten Umweltbedingungen zu sichern (Sato *et al.*, 2007). Um die Funktionen der multiplen DnaK und DnaJ-Proteine des Chaperonsystems in *Synechocystis* besser verstehen zu können, sollten Interaktionen des DnaK-DnaJ-Chaperonnetzwerkes identifiziert werden. Bislang ist über Interaktionen der DnaJ Ko-Chaperone mit den DnaK Chaperonen noch wenig bekannt. Lediglich durch die Anordnung der Gene *sll1932* (*dnaK3*) und *sll1933* in einem Gencluster (Kaneko *et al.*, 1996) wird für die Proteine DnaK3 und das DnaJ Sll1933 eine potentielle Interaktion vorgeschlagen. Zur Identifizierung möglicher DnaK-Interaktionspartner der im Rahmen dieser Arbeit gereinigten DnaJ-Proteine Slr0093, Sll0897, Sll0909 und Sll1666 wurden Affinitäts-„Pull-Down“ Analysen durchgeführt.

Die Ergebnisse der „Pull-Down“ Analysen zeigten, dass die drei DnaK-Proteine sowohl im ATP-gebundenen als auch im ATP-freien Zustand mit den untersuchten DnaJ-Proteinen interagieren. Die einzige Ausnahme stellt DnaK1 dar, welches mit Sll1666 lediglich im ATP-gebundenen Zustand interagiert (Abbildung 44). Zumeist ist ein stärkeres Signal im ATP-gebundenen Zustand zu beobachten, was darauf hindeutet das ATP für die Interaktion von DnaK und DnaJ notwendig ist (Banecki *et al.*, 1996). Um einen Mangel an ATP und damit eine Limitierung möglicher Interaktionen auszuschließen, wurde bei den „Pull-Down“ Analysen ein ATP-regenerierendes System aus ATP, Kreatinphosphat und Kreatinphosphatkinase verwendet. Die Durchflussproben zeigten keine Signale, was durch ein effektives und

spezifisches Binden der DnaK-Proteine an die gekoppelten DnaJ-Proteine erklärt werden kann. Lediglich die Interaktion zwischen den Proteinen DnaK3 + Sll0897, DnaK3 + Slr0093 und DnaK2 + Slr0093 zeigten im ATP-freien Zustand stärkere Signale als im ATP-gebundenen Zustand. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die DnaJ-Proteine in diesem Fall eher Substrate der DnaK-Proteine, als deren Ko-Chaperone darstellen. Durch proteolytischen Abbau aufgrund von Proteasen des Zellextraktes kann ein Teil der DnaJ-Proteine degradiert sein, weshalb sie als Substrate im ATP-freien Zustand an die DnaK-Proteine binden. Auch für die weiteren untersuchten DnaK und DnaJ-Proteine ist eine Interaktion im ATP-freien Zustand auszumachen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass die DnaJ-Proteine möglicherweise Substrate der DnaK-Proteine darstellen. Eine weitere Erklärung für eine Interaktion der DnaJ-Proteine mit den DnaK-Proteinen in einem ADP-gebundenen Zustand wurde bereits in *E. coli* beschrieben. Die Hydrolyse des von DnaK gebundenen ATPs führt zu einer Konformationsänderung, bei der das DnaK-Protein Substrate schnell bindet und wieder freilässt. Um diesen DnaK-Substrat-Komplex zu stabilisieren ist das DnaJ-Protein notwendig. Dieses bewirkt in einem nächsten Schritt eine weitere Konformationsänderung des DnaK-Proteins, welche zu einer gesteigerten Bindung des Substrates führt (Banecki und Zylicz, 1996; Banecki *et al.*, 1996).

Eine Interaktion des Sll1666 mit dem DnaK1 im ATP-gebundenen Zustand deutet an, dass Sll1666 ein Ko-Chaperon des DnaK1-Proteins darstellt. In *Synechocystis* sp. wird eine überlappende Funktion des DnaK1-Proteins mit dem an den Ribosomen lokalisierten „Trigger“-Faktor vorgeschlagen (Rupprecht, 2007). Eine direkte Bindung von DnaK-Proteinen mit Ribosomen konnte in Eukaryoten bereits nachgewiesen werden (Gautschi *et al.*, 2001). Ebenso wurde für DnaJ-Proteine, die eine Transmembrandomäne besitzen bereits eine Interaktion mit Ribosomen beschrieben (Truscott *et al.*, 2003; Dudek *et al.*, 2002). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wäre eine Interaktion zwischen dem DnaK1 und dem DnaJ-Protein Sll1666 denkbar. DnaK1 und DnaK2 stellen hauptsächlich lösliche Proteine, die jedoch auch membranassoziiert vorliegen können, dar (Rupprecht *et al.*, 2007). Dies könnte die beobachtete Interaktion der DnaK1 und DnaK2-Proteine mit den membran-gebundenen DnaJ-Proteinen Slr0093 und Sll1666 erklären. Eine Interaktion des Typ II DnaJs Slr0093 mit dem DnaK2-Protein konnte anhand der „Pull-Down“-Analysen gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in dem Cyano-

bakterium *Synechococcus* durch Interaktion zwischen dem DnaK2 und dem Typ II DnaJ (DnaJ2) postuliert (Sato *et al.*, 2007). SII1666 weist eine Lokalisation in der Membran auf (Abbildung 24) und DnaK3 liegt membranassoziiert vor, was einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion sein kann und somit eine Erklärung der durch „Pull-Down“ Analysen gezeigten Interaktion. Die Ergebnisse der „Pull-Down“ Analysen lassen lediglich Spekulationen über mögliche Interaktionen zu, so dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die Interaktionszustände genauer aufzulösen. Mit Hilfe von Ko-Immunopräzipitation oder bakteriellen „Two-Hybrid“ Systemen könnten solche Untersuchungen durchgeführt werden.

Ein weiterer Ansatz um mögliche Interaktionen zwischen DnaK und DnaJ-Proteinen zu charakterisieren, stellt die Bestimmung der ATPase-Aktivität dar. DnaK-Proteine sind molekulare Chaperone, die bei der Proteinfaltung und der Verhinderung von Aggregatbildungen beteiligt sind. Der Prozess der Substratbindung wird durch einen Zyklus aus ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und ADP-Freisetzung kontrolliert. Die intrinsische ATPase-Aktivität ist für die biologische Funktion von DnaK-Proteinen nötig und ohne eine Beteiligung des Ko-Chaperons DnaJ gering (Russell *et al.*, 1998; Liberek *et al.*, 1991; Barthel und Walker, 1999). Die Interaktion eines DnaJ Ko-Chaperons mit einem DnaK-Protein, bewirkt eine enorme Steigerung der ATPase-Aktivität (Karzai und McMacken, 1996; Jordan und McMacken, 1995; Russell *et al.*, 1999). Die maximale ATPase-Rate wird jedoch nur erreicht, wenn das DnaK zusätzlich ein Polypeptid gebunden hat. Für die Interaktion des DnaJ mit dem DnaK ist die J-Domäne verantwortlich, die jedoch zusätzlich die G/F-Domäne zur Stimulierung der ATPase-Aktivität benötigt (Genevaux *et al.*, 2002, Karzai und McMacken, 1996). Die ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins aus *Synechocystis* wurde alleine und in Kombination mit den im Rahmen dieser Arbeit gereinigten DnaJ-Proteinen Slr0093, SII0897, SII0909 oder SII1666 bestimmt. Die Ergebnisse zeigten für das DnaK2 einen k_{cat} -Wert von $0,031 \text{ s}^{-1}$. Ein Vergleich der in der Literatur angegebenen k_{cat} -Werte verschiedener Hsp70-Proteine zeigt Schwankungen in einem relativ großen Bereich. Für das *E. coli* DnaK konnten k_{cat} -Werte von $0,003 \text{ s}^{-1}$ bis zu $0,017 \text{ s}^{-1}$ beobachtet werden (Barthel und Walker, 1999; Klostermeier *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1998). Die Schwankung des k_{cat} -Wertes wurde auch bei höheren Eukaryoten beschrieben. So weist das bovine Hsc70-Protein k_{cat} -Werte von $0,003 \text{ s}^{-1}$ bzw. $0,0006 \text{ s}^{-1}$ auf (Ha und McKay, 1994). Palleros *et al.* konnten zeigen, dass die ATPase-Aktivität extrem abhängig von den Umgebungsbedingungen ist. Bei der

Analyse der ATPase-Aktivitäten kann beispielsweise die Reinigungsmethode des untersuchten Proteins eine Rolle spielen. So kann der Wert bei Proteinen, die mittels HPLC gereinigt wurden, um den Faktor 20-50 absinken. Einen weiteren Einfluss auf den k_{cat} -Wert haben Peptidverunreinigungen bereits in geringen Konzentrationen. Diese könnten während des Reinigungsprozesses oder der Lagerung entstanden sein und konnten mittels der verwendeten Nachweismethoden nicht detektiert werden. Dabei kann es sich z. B. um Abbauprodukte eines DnaK oder eines DnaJ-Proteins handeln, welche die ATPase-Aktivität stimulieren können. Es ist bereits bekannt, dass Peptide die ATPase-Aktivität der Hsp70-Proteine steigern (Jordan und McMacken, 1995; Flynn *et al.*, 1989). Eine Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Proteinkonzentration konnte jedoch nicht bestätigt werden (Russell *et al.*, 1998; Palleros *et al.*, 1993). Klostermeier *et al.* konnten bei Untersuchungen bezüglich der ATPase-Aktivität des *E. coli* DnaK-Proteins eine Temperaturabhängigkeit feststellen (Klostermeier *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse des ATPase-Aktivitätstests zeigten jedoch klar, dass durch die Interaktion zwischen dem DnaK2-Protein und einem der DnaJ-Proteine Slr0093, Sll0897, Sll0909 oder Sll1666 die ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins deutlich gesteigert werden konnte, wobei k_{cat} -Werte von $0,39 \text{ s}^{-1}$ bis $8,32 \text{ s}^{-1}$ erreicht wurden. Die ermittelte ATPase-Aktivität bei einer Interaktion des DnaK und DnaJ-Proteins aus *E. coli* kann ein k_{cat} -Wert von 1 s^{-1} erreicht werden (Groemping *et al.*, 2001). Die größte Veränderung des k_{cat} -Wertes zeigte eine Interaktion des Haupt-DnaJ Sll0897 mit dem Haupt-DnaK (DnaK2) aus *Synechocystis*. Diese Interaktion führte zu einer Steigerung der ATPase-Aktivität um den Faktor 270. Die Interaktion von Sll1666 und DnaK2 zeigte ebenfalls eine starke Veränderung des k_{cat} -Wertes im Vergleich zu dem k_{cat} -Wert des DnaK2-Proteins. Dabei ist jedoch zu beachten, dass DnaJ-Proteine, die nur eine J-Domäne besitzen, die ATPase-Aktivität nur steigern, wenn zusätzlich kleine Peptide mit einer hohen Affinität für das DnaK vorhanden sind (Karzai und McMacken, 1996). Die Ergebnisse des ATPase-Aktivitätstests zeigten, dass alle DnaJ-Proteine die ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins steigern, wodurch ebenfalls Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen gezogen werden können. Um das Interaktionsnetzwerk in *Synechocystis* weiter charakterisieren zu können, müssten die ATPase-Aktivitätstests ebenfalls mit den übrigen DnaK-Proteinen und DnaJ-Proteinen durchgeführt werden.

4.7 Ein Chaperonnetzwerk in *Synechocystis* sp.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, sollten mögliche DnaK-DnaJ-Interaktionspartner identifiziert werden, um dadurch ein Chaperonnetzwerk in *Synechocystis* sp. aufzudecken und einen Einblick in die physiologischen Funktionen multipler DnaK und DnaJ-Proteine zu erhalten. Mit Hilfe von „Pull-Down“ Analysen konnte bereits eine Interaktion der drei DnaK-Proteine mit dem GrpE-Protein aus *Synechocystis* gezeigt werden (Rupprecht, 2007). Ein anhand der erhaltenen Ergebnisse postuliertes Netzwerk ist in Abbildung 47 gezeigt.

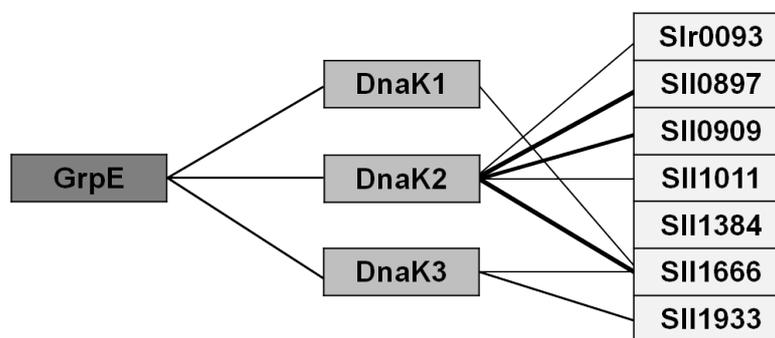


Abbildung 47: Interaktionsnetzwerk von GrpE, DnaK und DnaJ in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Gezeigt ist die Interaktion der drei DnaK-Proteine mit dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE. Mögliche Interaktionen der DnaK-Proteine mit den DnaJ-Proteinen sind ebenfalls gekennzeichnet. Die Intensität der Linien zeigt die anhand der Ergebnisse abgeleitete Stärke der Interaktion von DnaK und DnaJ an.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass dem SII0897 die Funktion des Haupt-DnaJ-Proteins in *Synechocystis* zukommt, da dieses Protein die stärkste Reaktion bei den getesteten Stressbedingungen zeigte und für eine Hitzeschockantwort essentiell ist (Abbildung 15; Abbildung 25). Für das DnaK2 wurden bereits ähnliche Funktionen in *Synechocystis* beschrieben (Rupprecht *et al.*, 2007; Rupprecht *et al.*, 2010). Daher erscheint eine Interaktion der beiden Chaperone aufgrund gleicher Funktionen wahrscheinlich. Dies kann durch eine Ko-Lokalisation beider Proteine im Cytoplasma von *Synechocystis* bestärkt werden (Rupprecht *et al.*, 2007; Abbildung 24). Ein weiterer Punkt, der für eine Interaktion des DnaK2 mit dem SII0897 spricht, ist die extreme Steigerung der ATPase-Aktivität des DnaK2 durch das SII0897. Zusammenfassend kann eine Interaktion des DnaK2 mit dem SII0897 aufgrund der erwähnten Fakten postuliert werden.

Die Anordnung der Gene von *sll1932* (*dnaK3*) und *sll1933* in einem Gencluster lässt auch hier eine mögliche Interaktion der beiden Genprodukte vermuten. DnaK3 und SII933 sind unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell (Rupprecht *et al.*,

2007; Abbildung 14). Anhand dieser Ergebnisse kann eine Interaktion des DnaK3 mit dem DnaJ Sll1933 postuliert werden.

Die Ko-Lokalisation des transmembranen DnaJ-Proteins Sll1666 und des membran-assoziierten DnaK1 kann einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion darstellen (Rupprecht *et al.*, 2007; Abbildung 24). Mittels der Affinitäts-„Pull-Down“ Analysen konnte eine Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden (Abbildung 44). Für DnaJ-Proteine mit Transmembranregion, wie es das Sll1666-Protein darstellt, wird eine Interaktion mit Ribosomen beschrieben (Truscott *et al.*, 2003). DnaK1 weist eine überlappende Funktion mit dem „Trigger“-Faktor auf, weshalb auch dieses Protein möglicherweise eine Verbindung mit Ribosomen besitzt (Rupprecht, 2007). Aufgrund der Ergebnisse dieser und früherer Arbeiten, sowie Literaturvergleichen kann auch für diese beiden Proteine eine Interaktion postuliert werden.

Die Ko-Lokalisation des teilweise membranassoziierten DnaK2-Proteins und des Membranproteins Slr0093 kann einen ersten Hinweis auf eine Interaktion beider Proteine liefern. Die Ergebnisse der „Pull-Down“ Analysen, aber auch die gezeigte Steigerung der Promotoraktivität bei oxidativen Stressbedingungen weisen auf DnaK2 und Slr0093 als mögliche Interaktionspartner hin (Rupprecht *et al.*, 2007; Abbildung 24; Abbildung 44; Abbildung 25).

Eine weitere funktionelle Interaktion könnte für DnaK3 mit Sll1666 postuliert werden. Beide Proteine sind membrangebunden, was einen ersten Hinweis auf eine mögliche Interaktion gibt. Sowohl DnaK3 als auch Sll1666 zeigten eine Steigerung der Expression unter Hochlichtstressbedingungen (Rupprecht *et al.*, 2007; Rupprecht *et al.*, 2010; Abbildung 24; Abbildung 25). Auch anhand der „Pull-Down“ Analysen konnte Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden (Abbildung 44).

Die Ergebnisse, die im Zusammenhang mit DnaJ Sll0909 erzielt wurden, zeigten eine mögliche Interaktion mit dem DnaK2-Protein. Beide Proteine zeigten eine gesteigerte Expression unter Hochlichtstressbedingungen. Sowohl Sll0909 als auch DnaK2 konnten in der löslichen Proteinfraction von *Synechocystis* nachgewiesen werden (Rupprecht *et al.*, 2010; Rupprecht *et al.*, 2007; Abbildung 25; Abbildung 24). Anhand der beschriebenen Ergebnisse und der beobachteten Interaktionen von Sll0909 und DnaK2 sowohl in „Pull-Down“ Analysen als auch bei ATPase-Aktivitätstests (Abbildung 44; Tabelle 16) kann ebenfalls eine Interaktion beider Proteine in *Synechocystis* postuliert werden.

Für Sll1666 und DnaK2 erscheint eine Interaktion möglich. Die Promotoren beider Gene zeigen eine signifikante Aktivitätssteigerung bei Hitzestressbedingungen (Abbildung 25; Rupprecht *et al.*, 2010). Einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion kann die Ko-Lokalisation des teilweise membrangebundenen DnaK2-Proteins und des Membranproteins Sll1666 geben (Abbildung 24; Rupprecht *et al.*, 2007). Die beobachtete Steigerung der ATPase-Aktivität des DnaK2 durch Interaktion mit Sll1666 (Tabelle 16) weist ebenfalls auf Sll1666 als ein Ko-Chaperon von DnaK2 hin. Eine weitere Interaktion wäre für das DnaK1 und das DnaJ Sll1011 denkbar. Die Promotoraktivitätsstudien beider Gene zeigten eine signifikante Aktivitätssteigerung sowohl bei Hitzestress als auch bei Hochlichtstress (Abbildung 25; Rupprecht *et al.*, 2010). Bei beiden Proteinen handelt es sich um lösliche Proteine (Abbildung 24; Rupprecht *et al.*, 2007). Diese Ko-Lokalisation kann ebenfalls einen Hinweis auf eine Interaktion von Sll1666 und DnaK1 darstellen.

Um weitere Interaktionen aufzudecken, sollten Untersuchungen von Interaktionen, z. B. durch Ko-Immunopräzipitation, bakterielle „Two-Hybrid“ Systeme aller DnaK und DnaJ-Proteine bzw. weiterführende „Pull-Down“ Analysen und ATPase-Aktivitätstests der bisher nicht untersuchten DnaK und DnaJ-Proteine durchgeführt und dabei unterschiedliche Versuchsbedingungen getestet werden.



5 Zusammenfassung

Sowohl in *Synechocystis* sp. PCC 6803 als auch in anderen Cyanobakterien konnten multiple DnaJ-Proteine nachgewiesen werden, deren Funktion jedoch noch weitestgehend unverstanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen der multiplen DnaJ-Proteine von *Synechocystis* sp. charakterisiert. Das DnaJ-Protein, SII0897 gehört aufgrund seiner Domänenstruktur zu den Typ I-Proteinen, Slr0093 und SII1933 zu den Typ II-Proteinen und SII0909, SII1011, SII1384 und SII1666 zu den Typ III DnaJ-Proteinen. Durch Komplementationsstudien des *E. coli* Δ *dnaJ*-Stammes OD259 konnte eine Komplementation des Wachstumsdefekts bei höheren Temperaturen durch die Proteine Slr0093 und SII0897 gezeigt werden. In *Synechocystis* war eine komplette Disruption von *sII1933* nicht möglich, weshalb das Protein SII1933 unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell ist. Doppelte Insertionsmutationen waren lediglich bei der Kombination der Gene *sII0909* und *sII1384* möglich. Untersuchungen des Wachstumsverhaltens der *dnaJ*-Disruptionsstämme unter Hitze- und Kältestressbedingungen zeigten, dass das Protein SII0897 eine wichtige Funktion bei der Stressantwort in *Synechocystis* besitzt und unter Hitzestressbedingungen essentiell ist. Eine vollständige Deletion des Gens *sII0897* war *Synechocystis* sp. bereits unter normalen Wachstumsbedingungen nicht möglich. Bei den für ein Wachstum mindestens notwendigen Domänen des SII0897 handelt es sich um die charakteristische J-Domäne und die Glycin-Phenylalaninreiche Domäne. Unter Hitzestressbedingungen ist das Volllängen-Protein SII0897 für ein Wachstum essentiell.

Neben den *in vivo* Wachstumsexperimenten wurde eine Methode zur heterologen Expression der sieben DnaJ-Proteine in *E. coli* und einer nativen Reinigung von Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666 etabliert. Untersuchungen zur Thermostabilität der gereinigten Proteine zeigten für das Slr0093 und SII1666 einen reversiblen Prozess, wodurch sie auch nach dem Hitzestress noch als Faltungshelfer fungieren können. Bei den Proteinen SII0897 und SII0909 ist der Prozess jedoch nicht reversibel, so dass sie nach Hitzestresseinwirkung neu synthetisiert oder durch Chaperoneinwirkung korrekt gefaltet werden müssen. Die Affinitäts-„Pull-Down“ Analysen lieferten keine klaren Hinweise auf die DnaK-Interaktionspartner der Proteine Slr0093, SII0897, SII0909 und SII1666, weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind. Mit Hilfe der Gelfiltrationsanalysen konnten die errechneten molaren Massen der Proteine Slr0093 und SII1666 bestätigt und beide Proteine in einer

monomeren Form nachgewiesen werden. Die DnaJ-Proteine SII0897 und SII0909 konnten in zwei oligomeren Zuständen detektiert werden. Analysen der ATPase-Aktivität des DnaK2-Proteins alleine und des DnaK2-Proteins zusammen mit den DnaJ-Proteinen SII0093, SII0897, SII0909 und SII1666 zeigten eine Steigerung der ATP-Hydrolyserate bei der Interaktion von DnaK und DnaJ, wobei SII0897 die größte Steigerung der ATPase-Aktivität des DnaK2 induzierte.

6 Summary

Within *Synechocystis* sp. PCC6803 as well as in other cyanobacteria multiple DnaJ proteins were identified, but most of their functions have not been understood yet. Within this study the functions of the multiple DnaJ proteins of *Synechocystis* sp. were characterized. Based on the domain structure the DnaJ protein SII0897 can be classified as a type I protein. Slr0093 and SII1933 are type II proteins and SII0909, SII1011, SII1384 and SII1666 represent type III DnaJ proteins. Only expression of the *dnaJ* genes *slr0093* and *sII0897* complemented the growth defect of the *E. coli* deletion strain OD259 at elevated temperatures. In *Synechocystis* a complete disruption of *sII1933* was not possible; therefore the SII1933 protein is essential under normal growth conditions. Only the two *Synechocystis dnaJ* genes *sII0909* and *sII1384* could be disrupted in combination. Investigations of the growth behavior of the *dnaJ* disruption strains under heat- and cold-stress conditions have shown that the SII0897 protein fulfills a major role in the stress response of *Synechocystis* and that this protein is essential under heat-stress conditions. Already under normal growth conditions a complete deletion of the *sII0897* gene was not possible in *Synechocystis*. It could be shown that the characteristic J-domain and the glycine-phenylalanine-rich region are sufficient for cell survival at normal growth temperatures but under heat-stress conditions the full length protein SII0897 is essential.

In addition to the *in vivo* growth experiments a method for heterologous expression of the seven DnaJ proteins in *E. coli* and a native purification of Slr0093, SII0897, SII0909 and SII1666 were established. Investigations of the thermo stability of the purified proteins Slr0093 and SII1666 had shown a reversible denaturation process, enabling them to function as a chaperone after heat-stress. In contrast this process is not reversible for the proteins SII0897 and SII0909. Therefore they have to be newly synthesized after heat-stress conditions or correctly be folded by chaperones. Affinity pull-down experiments did not show a clear evidence of DnaK interaction partners for the proteins Slr0093, SII0897, SII0909 and SII1666, making further investigations necessary. Gel filtration analyses could confirm the calculated molar masses of the Slr0093 and SII1666 proteins and a monomeric state could be proven for both proteins. The proteins SII0897 and SII0909 were detected in two oligomeric states. Analyses of the ATPase activity of the DnaK2 protein alone and in combination with the DnaJ proteins Slr0093, SII0897, SII0909 and SII1666 has shown an increase of

the ATP hydrolyses by interaction of DnaK and DnaJ. The major increase of the ATPase activity of DnaK2 was induced by the SII0897 protein.

7 Literaturverzeichnis

- Acebron, S. P., Fernandez-Saiz, V., Taneva, S. G., Moro, F. and Muga, A.** DnaJ recruits DnaK to protein aggregates. *J Biol Chem* 283, 1381-90 (2008).
- Agashe, V. R. and Hartl, F. U.** Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11, 15-25 (2000).
- Anderson, S. L. and McIntosh, L.** Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* 173, 2761-7 (1991).
- Anfinsen, C. B.** Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30 (1973).
- Ang, D. and Georgopoulos, C.** The heat-shock-regulated *grpE* gene of *Escherichia coli* is required for bacterial growth at all temperatures but is dispensable in certain mutant backgrounds. *J Bacteriol* 171, 2748-55 (1989).
- Aponte, R. A., Zimmermann, S. and Reinstein, J.** Directed evolution of the DnaK chaperone: mutations in the lid domain result in enhanced chaperone activity. *J Mol Biol* 399, 154-67 (2010).
- Banecki, B., Liberek, K., Wall, D., Wawrzynow, A., Georgopoulos, C., Bertoli, E., Tanfani, F. and Zylicz, M.** Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *J Biol Chem* 271, 14840-8 (1996).
- Banecki, B. and Zylicz, M.** Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J Biol Chem* 271, 6137-43 (1996).
- Baneyx, F. and Nannenga, B. L.** Chaperones: A story of thrift unfolds. *Nat Chem Biol* 6, 880-1 (2010).
- Bardwell, J. C., Tilly, K., Craig, E., King, J., Zylicz, M. and Georgopoulos, C.** The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 *dnaJ+* gene. A gene that encodes a heat shock protein. *J Biol Chem* 261, 1782-5 (1986).
- Barthel, S., Rupprecht, E. and Schneider, D.** Thermostability of two Cyanobacterial GrpE Thermosensors. *Plant Cell Physiol* (2011).
- Barthel, T. K. and Walker, G. C.** Inferences concerning the ATPase properties of DnaK and other HSP70s are affected by the ADP kinase activity of copurifying nucleoside-diphosphate kinase. *J Biol Chem* 274, 36670-8 (1999).
- Bartsevich, V. V. and Pakrasi, H. B.** Molecular identification of a novel protein that regulates biogenesis of photosystem I, a membrane protein complex. *J Biol Chem* 272, 6382-7 (1997).
- Bateman, A., Murzin, A. G. and Teichmann, S. A.** Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria. *Protein Sci* 7, 1477-80 (1998).
- Becker, J. and Craig, E. A.** Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219, 11-23 (1994).
- Bensadoun, A. and Weinstein, D.** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 70, 241-50 (1976).
- Bertelsen, E. B., Chang, L., Gestwicki, J. E. and Zuiderweg, E. R.** Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8471-6 (2009).
- Bertelsen, E. B., Zhou, H., Lowry, D. F., Flynn, G. C. and Dahlquist, F. W.** Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution. *Protein Sci* 8, 343-54 (1999).

- Bird, J. G., Sharma, S., Roshwalb, S. C., Hoskins, J. R. and Wickner, S.** Functional analysis of CbpA, a DnaJ homolog and nucleoid-associated DNA-binding protein. *J Biol Chem* 281, 34349-56 (2006).
- Black, K., Buikema, W. J. and Haselkorn, R.** The hglK gene is required for localization of heterocyst-specific glycolipids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 177, 6440-8 (1995).
- Blatch, G. L. and Lassle, M.** The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21, 932-9 (1999).
- Blum, P., Ory, J., Bauernfeind, J. and Krska, J.** Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 7436-44 (1992).
- Borges, J. C., Fischer, H., Craievich, A. F. and Ramos, C. H.** Low resolution structural study of two human HSP40 chaperones in solution. DJA1 from subfamily A and DJB4 from subfamily B have different quaternary structures. *J Biol Chem* 280, 13671-81 (2005).
- Brehmer, D., Gassler, C., Rist, W., Mayer, M. P. and Bukau, B.** Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. *J Biol Chem* 279, 27957-64 (2004).
- Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C. S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M. P. and Bukau, B.** Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol* 8, 427-32 (2001).
- Broadley, S. A. and Hartl, F. U.** The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett* 583, 2647-53 (2009).
- Buchberger, A., Schroder, H., Buttner, M., Valencia, A. and Bukau, B.** A conserved loop in the ATPase domain of the DnaK chaperone is essential for stable binding of GrpE. *Nat Struct Biol* 1, 95-101 (1994).
- Cheetham, M. E. and Caplan, A. J.** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3, 28-36 (1998).
- Chen, K. M., Holmstrom, M., Raksajit, W., Suorsa, M., Piippo, M. and Aro, E. M.** Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 10, 43 (2010).
- Chen, Z. and Xu, X.** DnaJ-like protein gene *sl1384* is involved in phototaxis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Chinese Science Bulletin* 54, 4381-4386 (2009).
- Chenoweth, M. R. and Wickner, S.** Complex regulation of the DnaJ homolog CbpA by the global regulators sigmaS and Lrp, by the specific inhibitor CbpM, and by the proteolytic degradation of CbpM. *J Bacteriol* 190, 5153-61 (2008).
- Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H.** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-5 (1989).
- Craig, E. A., Eisenman, H. C. and Hundley, H. A.** Ribosome-tethered molecular chaperones: the first line of defense against protein misfolding? *Curr Opin Microbiol* 6, 157-62 (2003).
- Craig, E. A., Huang, P., Aron, R. and Andrew, A.** The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156, 1-21 (2006).
- Cyr, D. M., Langer, T. and Douglas, M. G.** DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* 19, 176-81 (1994).
- Das, A. K., Cohen, P. W. and Barford, D.** The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J* 17, 1192-9 (1998).

- Deuerling, E. and Bukau, B.** Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, 261-77 (2004).
- Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Muller, A., Lerner, M., Feick, P., Schafer, K. H., Morgenstern, E., Hennessy, F., Blatch, G. L., Janoscheck, K., Heim, N., Scholtes, P., Frie, M., Nastainczyk, W. and Zimmermann, R.** A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. *Embo J* 21, 2958-67 (2002).
- Ellis, R. J. and Hemmingsen, S. M.** Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* 14, 339-42 (1989).
- Erbse, A., Mayer, M. P. and Bukau, B.** Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem Soc Trans* 32, 617-21 (2004).
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C. and McKay, D. B.** Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346, 623-8 (1990).
- Flaherty, K. M., Wilbanks, S. M., DeLuca-Flaherty, C. and McKay, D. B.** Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. II. Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type and mutant ATPase fragment. *J Biol Chem* 269, 12899-907 (1994).
- Flynn, G. C., Chappell, T. G. and Rothman, J. E.** Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245, 385-90 (1989).
- Gautschi, M., Lilie, H., Funschilling, U., Mun, A., Ross, S., Lithgow, T., Rucknagel, P. and Rospert, S.** RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zutin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3762-7 (2001).
- Gautschi, M., Mun, A., Ross, S. and Rospert, S.** A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4209-14 (2002).
- Gelinas, A. D., Langsetmo, K., Toth, J., Bethoney, K. A., Stafford, W. F. and Harrison, C. J.** A structure-based interpretation of E.coli GrpE thermodynamic properties. *J Mol Biol* 323, 131-42 (2002).
- Genevaux, P., Georgopoulos, C. and Kelley, W. L.** The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol* 66, 840-57 (2007).
- Genevaux, P., Schwager, F., Georgopoulos, C. and Kelley, W. L.** Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the *Escherichia coli* DnaJ (Hsp40) J-domain. *Genetics* 162, 1045-53 (2002).
- Georgopoulos, C. P.** A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. *Mol Gen Genet* 151, 35-9 (1977).
- Gragerov, A., Zeng, L., Zhao, X., Burkholder, W. and Gottesman, M. E.** Specificity of DnaK-peptide binding. *J Mol Biol* 235, 848-54 (1994).
- Grimshaw, J. P., Jelesarov, I., Schonfeld, H. J. and Christen, P.** Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system. *J Biol Chem* 276, 6098-104 (2001).
- Grimshaw, J. P., Jelesarov, I., Siegenthaler, R. K. and Christen, P.** Thermosensor action of GrpE. The DnaK chaperone system at heat shock temperatures. *J Biol Chem* 278, 19048-53 (2003).
- Grodberg, J. and Dunn, J. J.** ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170, 1245-53 (1988).
- Groemping, Y., Klostermeier, D., Herrmann, C., Veit, T., Seidel, R. and Reinstein, J.** Regulation of ATPase and chaperone cycle of DnaK from *Thermus thermophilus* by the nucleotide exchange factor GrpE. *J Mol Biol* 305, 1173-83 (2001).

- Groemping, Y. and Reinstein, J.** Folding properties of the nucleotide exchange factor GrpE from *Thermus thermophilus*: GrpE is a thermosensor that mediates heat shock response. *J Mol Biol* 314, 167-78 (2001).
- Grossman, A. D., Straus, D. B., Walter, W. A. and Gross, C. A.** Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1, 179-84 (1987).
- Gutsche, I., Essen, L. O. and Baumeister, W.** Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *J Mol Biol* 293, 295-312 (1999).
- Ha, J. H. and McKay, D. B.** ATPase kinetics of recombinant bovine 70 kDa heat shock cognate protein and its amino-terminal ATPase domain. *Biochemistry* 33, 14625-35 (1994).
- Han, W. and Christen, P.** Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. *J Biol Chem* 278, 19038-43 (2003).
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80 (1983).
- Harrison, C.** GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress Chaperones* 8, 218-24 (2003).
- Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F. and Kuriyan, J.** Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276, 431-5 (1997).
- Hartl, F. U., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M.** Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-32 (2011).
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M.** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-8 (2002).
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M.** Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* 16, 574-81 (2009).
- Haslbeck, M.** sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 59, 1649-57 (2002).
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D. and Buchner, J.** Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 842-6 (2005).
- Heckathorn, S. A., Downs, C. A., Sharkey, T. D. and Coleman, J. S.** The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol* 116, 439-444 (1998).
- Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U.** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19, 417-28 (1996).
- Hedges, S. B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D. Y., Thompson, A. S. and Watanabe, H.** A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evol Biol* 1, 4 (2001).
- Hightower, L. E.** Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66, 191-7 (1991).
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A. and Ikeuchi, M.** DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13, 793-806 (2001).
- Hill, R. B., Flanagan, J. M. and Prestegard, J. H.** 1H and 15N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ(1-78). *Biochemistry* 34, 5587-96 (1995).
- Hoffmann, A., Bukau, B. and Kramer, G.** Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta* 1803, 650-61 (2010).
- Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E. and Farr, G. W.** Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 115-45 (2007).

- Huang, K., Flanagan, J. M. and Prestegard, J. H.** The influence of C-terminal extension on the structure of the "J-domain" in *E. coli* DnaJ. *Protein Sci* 8, 203-14 (1999).
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. and Buchner, J.** Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem* 270, 7288-94 (1995).
- Jordan, R. and McMacken, R.** Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J Biol Chem* 270, 4563-9 (1995).
- Kampinga, H. H. and Craig, E. A.** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 579-92 (2010).
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S.** Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* 8, 205-13; 227-53 (2001).
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S.** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3, 109-36 (1996).
- Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K. and Murata, N.** Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 339-48 (2002).
- Karzai, A. W. and McMacken, R.** A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *J Biol Chem* 271, 11236-46 (1996).
- Kelley, W. L. and Georgopoulos, C.** The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3679-84 (1997).
- Kerfeld, C. A., Sawaya, M. R., Tanaka, S., Nguyen, C. V., Phillips, M., Beeby, M. and Yeates, T. O.** Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles. *Science* 309, 936-8 (2005).
- Kieselbach, T., Hagman, Andersson, B. and Schroder, W. P.** The thylakoid lumen of chloroplasts. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 273, 6710-6 (1998).
- Klostermeier, D., Seidel, R. and Reinstein, J.** Functional properties of the molecular chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* 279, 841-53 (1998).
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. and Bukau, B.** The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16, 589-97 (2009).
- Kunert, A., Hagemann, M. and Erdmann, N.** Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *J Microbiol Methods* 41, 185-94 (2000).
- Laloraya, S., Gambill, B. D. and Craig, E. A.** A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6481-5 (1994).
- Landry, S. J., Jordan, R., McMacken, R. and Gierasch, L. M.** Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature* 355, 455-7 (1992).
- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. and Bukau, B.** Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5452-7 (1999).

- Lee, S., Sowa, M. E., Choi, J. M. and Tsai, F. T.** The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. *J Struct Biol* 146, 99-105 (2004).
- Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y. H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M. and Tsai, F. T.** The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* 115, 229-40 (2003).
- Li, J., Qian, X. and Sha, B.** The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. *Structure* 11, 1475-83 (2003).
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M.** *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2874-8 (1991).
- Liberek, K., Wall, D. and Georgopoulos, C.** The DnaJ chaperone catalytically activates the DnaK chaperone to preferentially bind the sigma 32 heat shock transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6224-8 (1995).
- Marshall, J. S., DeRocher, A. E., Keegstra, K. and Vierling, E.** Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 374-8 (1990).
- Mary, I., Tu, C. J., Grossman, A. and Vaultot, D.** Effects of high light on transcripts of stress-associated genes for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313. *Microbiology* 150, 1271-81 (2004).
- Maurizi, M. R. and Xia, D.** Protein binding and disruption by Clp/Hsp100 chaperones. *Structure* 12, 175-83 (2004).
- Mayer, M. P.** Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell* 39, 321-31 (2010).
- Mayer, M. P. and Bukau, B.** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-84 (2005).
- Mazon, G., Lucena, J. M., Campoy, S., Fernandez de Henestrosa, A. R., Candau, P. and Barbe, J.** LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol Genet Genomics* 271, 40-9 (2004).
- McCarty, J. S. and Walker, G. C.** DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins results in filamentation. *J Bacteriol* 176, 764-80 (1994).
- McClellan, A. J., Xia, Y., Deutschbauer, A. M., Davis, R. W., Gerstein, M. and Frydman, J.** Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131, 121-35 (2007).
- Mehl, A. F., Heskett, L. D., Jain, S. S. and Demeler, B.** Insights into dimerization and four-helix bundle formation found by dissection of the dimer interface of the GrpE protein from *Escherichia coli*. *Protein Sci* 12, 1205-15 (2003).
- Morano, K. A.** New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 1-14 (2007).
- Nakamoto, H. and Vigh, L.** The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 64, 294-306 (2007).
- Nakamura, A., Takumi, K. and Miki, K.** Crystal structure of a thermophilic GrpE protein: insight into thermosensing function for the DnaK chaperone system. *J Mol Biol* 396, 1000-11 (2010).

- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S.** Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids (supplement). *DNA Res* 10, 181-201 (2003).
- Nakamura, Y., Kaneko, T. and Tabata, S.** CyanoBase, the genome database for *Synechocystis* sp. strain PCC6803: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 28, 72 (2000).
- Nimura, K., Takahashi, H. and Yoshikawa, H.** Characterization of the dnaK multigene family in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J Bacteriol* 183, 1320-8 (2001).
- Nimura, K., Yoshikawa, H. and Takahashi, H.** DnaK3, one of the three DnaK proteins of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942, is quantitatively detected in the thylakoid membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 334-40 (1996).
- Odonuga, O. O., Longshaw, V. M. and Blatch, G. L.** Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays* 26, 1058-68 (2004).
- Ogura, T. and Wilkinson, A. J.** AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6, 575-97 (2001).
- Ohki, M., Tamura, F., Nishimura, S. and Uchida, H.** Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* dnaJ gene and purification of the gene product. *J Biol Chem* 261, 1778-81 (1986).
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. and Reinstein, J.** GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* 36, 3417-22 (1997).
- Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L. and Fink, A. L.** DnaK ATPase activity revisited. *FEBS Lett* 336, 124-8 (1993).
- Pearl, L. H. and Prodromou, C.** Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75, 271-94 (2006).
- Popp, S. L. and Reinstein, J.** Functional characterization of the DnaK chaperone system from the archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus* DeltaH. *FEBS Lett* 583, 573-8 (2009).
- Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E.** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assay in chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975, 384-394 (1989).
- Prentki, P. and Krisch, H. M.** *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303-13 (1984).
- Prodöhl, A., Dreher, C., Hielscher, R., Hellwig, P. and Schneider, D.** Heterologous expression and *in vitro* assembly of the transmembrane cytochrome b6. *Protein Expr Purif* 56, 279-85 (2007).
- Prodromou, C., Piper, P. W. and Pearl, L. H.** Expression and crystallization of the yeast Hsp82 chaperone, and preliminary X-ray diffraction studies of the amino-terminal domain. *Proteins* 25, 517-22 (1996).
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A. and Racker, E.** Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 235, 3322-9 (1960).
- Qian, Y. Q., Patel, D., Hartl, F. U. and McColl, D. J.** Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J Mol Biol* 260, 224-35 (1996).
- Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S. and Wang, L.** The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* 63, 2560-70 (2006).

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y.** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111, 1-61 (1979).
- Rippka, R., Waterbury, J. and Cohen-Baziere, G.** A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Arch Microbiol* 100, 419-436 (1974).
- Rüdiger, S., Buchberger, A. and Bukau, B.** Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* 4, 342-9 (1997).
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. and Bukau, B.** Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo J* 16, 1501-7 (1997).
- Rupprecht, E., Düppre, E. and Schneider, D.** Similarities and singularities of three DnaK proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 51, 1210-8 (2010).
- Rupprecht, E., Gathmann, S., Fuhrmann, E. and Schneider, D.** Three different DnaK proteins are functionally expressed in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 153, 1828-41 (2007).
- Russell, R., Jordan, R. and McMacken, R.** Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone. *Biochemistry* 37, 596-607 (1998).
- Russell, R., Karzai, A. W., Mehl, A. F. and McMacken, R.** DnaJ Dramatically Stimulates ATP Hydrolysis by DnaK: Insight into Targeting of Hsp70 Proteins to Polypeptide Substrates. *Biochemistry* 38, 4165-4176 (1999).
- Saibil, H. R.** Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol* 18, 35-42 (2008).
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91 (1988).
- Saito, H. and Uchida, H.** Initiation of the DNA replication of bacteriophage lambda in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol* 113, 1-25 (1977).
- Sato, M., Yamahata, H., Watanabe, S., Nimura-Matsune, K. and Yoshikawa, H.** Characterization of dnaJ multigene family in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1021-7 (2007).
- Schlicher, T. and Soll, J.** Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol Biol* 33, 181-5 (1997).
- Schonfeld, H. J., Schmidt, D., Schroder, H. and Bukau, B.** The DnaK chaperone system of *Escherichia coli*: quaternary structures and interactions of the DnaK and GrpE components. *J Biol Chem* 270, 2183-9 (1995).
- Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F. A. and Beck, C. F.** A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11, 1165-78 (1999).
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U. and Bukau, B.** DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *Embo J* 12, 4137-44 (1993).
- Schweizer, R. S., Aponte, R. A., Zimmermann, S., Weber, A. and Reinstein, J.** Fine tuning of a biological machine: DnaK gains improved chaperone activity by altered allosteric communication and substrate binding. *Chembiochem* 12, 1559-73 (2011).
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. V., Jr.** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-20 (1967).

- Sharma, S. K., Christen, P. and Goloubinoff, P.** Disaggregating chaperones: an unfolding story. *Curr Protein Pept Sci* 10, 432-46 (2009).
- Sharma, S. K., De los Rios, P., Christen, P., Lustig, A. and Goloubinoff, P.** The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nat Chem Biol* 6, 914-20 (2010).
- Shi, Y. Y., Hong, X. G. and Wang, C. C.** The C-terminal (331-376) sequence of *Escherichia coli* DnaJ is essential for dimerization and chaperone activity: a small angle X-ray scattering study in solution. *J Biol Chem* 280, 22761-8 (2005).
- Singh, A. K., Summerfield, T. C., Li, H. and Sherman, L. A.** The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB. *Arch Microbiol* 186, 273-86 (2006).
- Slepenkov, S. V. and Witt, S. N.** The unfolding story of the *Escherichia coli* Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? *Mol Microbiol* 45, 1197-206 (2002).
- Smock, R. G., Blackburn, M. E. and Gierasch, L. M.** Conserved, Disordered C Terminus of DnaK Enhances Cellular Survival upon Stress and DnaK in Vitro Chaperone Activity. *J Biol Chem* 286, 31821-9 (2011).
- Song, Y. and Masison, D. C.** Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). *J Biol Chem* 280, 34178-85 (2005).
- Spiess, C., Meyer, A. S., Reissmann, S. and Frydman, J.** Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol* 14, 598-604 (2004).
- Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G.** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 31, 225-74 (1977).
- Sunshine, M., Feiss, M., Stuart, J. and Yochem, J.** A new host gene (groPC) necessary for lambda DNA replication. *Mol Gen Genet* 151, 27-34 (1977).
- Suzuki, H., Noguchi, S., Arakawa, H., Tokida, T., Hashimoto, M. and Satow, Y.** Peptide-binding sites as revealed by the crystal structures of the human Hsp40 Hdj1 C-terminal domain in complex with the octapeptide from human Hsp70. *Biochemistry* 49, 8577-84 (2010).
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U. and Flanagan, J.** A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *Embo J* 15, 408-17 (1996).
- Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. and Wuthrich, K.** NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11343-7 (1994).
- Toutain, C. M., Clarke, D. J., Leeds, J. A., Kuhn, J., Beckwith, J., Holland, I. B. and Jacq, A.** The transmembrane domain of the DnaJ-like protein DjlA is a dimerisation domain. *Mol Genet Genomics* 268, 761-70 (2003).
- Truscott, K. N., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. and Pfanner, N.** A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol* 163, 707-13 (2003).
- van de Meene, A. M., Hohmann-Marriott, M. F., Vermaas, W. F. and Roberson, R. W.** The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* 184, 259-70 (2006).
- Van Durme, J., Maurer-Stroh, S., Gallardo, R., Wilkinson, H., Rousseau, F. and Schymkowitz, J.** Accurate prediction of DnaK-peptide binding via homology modelling and experimental data. *PLoS Comput Biol* 5, e1000475 (2009).

- van Montfort, R. L., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C. and Vierling, E.** Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* 8, 1025-30 (2001).
- Vermaas, W. F. J.** Molecular-genetic approach to study photosynthetic and respiratory electron transport in thylakoids from cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* 1187, 181-186 (1994).
- Vetting, M. W., Hegde, S. S., Fajardo, J. E., Fiser, A., Roderick, S. L., Takiff, H. E. and Blanchard, J. S.** Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45, 1-10 (2006).
- Voos, W., Gambill, B. D., Laloraya, S., Ang, D., Craig, E. A. and Pfanner, N.** Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol Cell Biol* 14, 6627-34 (1994).
- Wall, D., Zylicz, M. and Georgopoulos, C.** The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol Chem* 269, 5446-51 (1994).
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D. and Lithgow, T.** The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* 5, 567-71 (2004).
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9, 244-52 (2004).
- Watanabe, S., Sato, M., Nimura-Matsune, K., Chibazakura, T. and Yoshikawa, H.** Protection of psbAII transcript from ribonuclease degradation in vitro by DnaK2 and DnaJ2 chaperones of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 279-82 (2007).
- Wawrzynow, A., Banecki, B., Wall, D., Liberek, K., Georgopoulos, C. and Zylicz, M.** ATP hydrolysis is required for the DnaJ-dependent activation of DnaK chaperone for binding to both native and denatured protein substrates. *J Biol Chem* 270, 19307-11 (1995).
- Weber, K. and Osborn, M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-12 (1969).
- Wegrzyn, R. D. and Deuerling, E.** Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol Life Sci* 62, 2727-38 (2005).
- Wetzstein, M., Volker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Herget, C., Hecker, M. and Schumann, W.** Cloning, sequencing, and molecular analysis of the dnaK locus from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174, 3300-10 (1992).
- Williams, J. G. K.** Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* 167, 766-778 (1988).
- Willmund, F., Muhlhaus, T., Wojciechowska, M. and Schroda, M.** The NH₂-terminal domain of the chloroplast GrpE homolog CGE1 is required for dimerization and cochaperone function in vivo. *J Biol Chem* 282, 11317-28 (2007).
- Wu, Y., Li, J., Jin, Z., Fu, Z. and Sha, B.** The crystal structure of the C-terminal fragment of yeast Hsp40 Ydj1 reveals novel dimerization motif for Hsp40. *J Mol Biol* 346, 1005-11 (2005).
- Yamashino, T., Kakeda, M., Ueguchi, C. and Mizuno, T.** An analogue of the DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by sigma s during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 13, 475-83 (1994).
- Yan, W. and Craig, E. A.** The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol Cell Biol* 19, 7751-8 (1999).
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K. and Hartl, F. U.** Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781-91 (2004).

Young, J. C., Moarefi, I. and Hartl, F. U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154, 267-73 (2001).

Zehr, B. D., Savin, T. J. and Hall, R. E. A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 182, 157-9 (1989).

Zhang, Y. and Zuiderweg, E. R. The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10272-7 (2004).

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. and Hendrickson, W. A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-14 (1996).

Zylicz, M., Ang, D. and Georgopoulos, C. The grpE protein of *Escherichia coli*. Purification and properties. *J Biol Chem* 262, 17437-42 (1987).

Zylicz, M., Ang, D., Liberek, K. and Georgopoulos, C. Initiation of lambda DNA replication with purified host- and bacteriophage-encoded proteins: the role of the dnaK, dnaJ and grpE heat shock proteins. *Embo J* 8, 1601-8 (1989).

Zylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S. and Georgopoulos, C. Purification and properties of the dnaJ replication protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 260, 7591-8 (1985).

Danksagung

Lebenslauf