

Summary

The main objective of my PhD thesis was the analysis of the functional relationship of the HSP100/Clp protein ClpC with its adaptor proteins. ClpC is not only involved in the removal of misfolded and aggregated proteins, but also controls, through regulated proteolysis, key steps of several developmental processes in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. ClpC differs from other members of the HSP100 family in that it requires an adaptor protein for virtually all its activities.

A variety of molecular biological, biochemical and biophysical methods were employed to address the mechanistic and functional interplay of ClpC and its adaptor protein network.

(1) It could be demonstrated that the activation of ClpC is based on the adaptor mediated assembly of the ClpC hexamer and that the oligomerized complex constitutes the functional and substrate binding species of this chaperone complex.

(2) It could be shown that the formation of the whole proteolytic complex, ClpCP, depends on the preceding adaptor mediated assembly of the ClpC oligomer. Once assembled, hexameric ClpC facilitates the oligomerization and thereby activation of the otherwise monomeric proteolytic component, ClpP. Thus, ClpCP mediated proteolysis appears to be regulated in a hierarchic mode governed by an adaptor protein.

(3) A functional characterization of a ClpC homolog from a photobiontic organism revealed that the adaptor dependent activation is not a common feature among the ClpC homologs. Thus, ClpC of *B. subtilis* exhibits a unique characteristic even within the ClpC family.

Besides the activation of ClpC, adaptor proteins also fulfill a substrate recognition role enabling the specific degradation of a huge variety of substrate proteins by ClpCP. The substrate spectrum of ClpCP includes key regulators such as ComK, ComS, SpoIIAB, CtsR and MurAA. The wide range of ClpC substrates argues for a substantial number of ClpC adaptors to allow a specifically controlled degradation. The cognate adaptor protein for one of these regulatory proteins, CtsR, could be identified and thus (4), adding McsB to the adaptor protein network of ClpC. McsB could be characterized as tyrosine kinase, exhibiting adaptor properties only in its kinase-on state. The kinase activity is crucial for the regulation of the class III heat

shock genes in *B. subtilis*. (i) McsB phosphorylates CtsR, which diminishes the DNA-binding ability of CtsR and marks it for degradation and (ii) only phosphorylated McsB is enabled to subsequently target CtsR for proteolysis by ClpCP. The kinase activity of McsB is tightly controlled, as it is induced by its activator McsA and inhibited by the partner ATPase ClpC and the cognate phosphatase YwIE. Thus, McsB can be considered as a regulated adaptor protein.

(5) Although McsB exhibits no similarity to the two established ClpC adaptor proteins, MecA and YpbH, all three use the same binding sites on ClpC. The interaction of adaptor proteins with ClpC might therefore not occur simultaneously. This assumption was held up by the finding that McsB-P could successfully compete with MecA. Finally, a model of the class III heat shock regulation is proposed, integrating the novel aspects of the specific adaptor protein for CtsR, McsB, the phospho-relay between McsB, CtsR and YwIE and the interplay of ClpC with additional adaptor proteins. The competition of the different adaptor proteins for ClpC binding might probably constitute a central part of the control of regulated proteolysis in general.

Zusammenfassung

Das Ziel meiner Dissertation war die Aufklärung des funktionellen Zusammenhangs zwischen dem HSP100/Clp Protein ClpC und seiner Adaptorproteine. ClpC nimmt eine duale Funktion wahr. Zum einen ist ClpC durch die unspezifische Proteolyse missgefalteter und aggregierter Proteine ein Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle, darüber hinaus, ist ClpC aber auch in den gezielten Abbau spezifischer Regulatorproteine involviert. Da diese Regulatorproteine Schlüsselpositionen in Signaltransduktionswegen einnehmen, ist ClpC in eine Vielzahl von Entwicklungs-, Differenzierungs- und Adaptionsprozessen involviert. ClpC ist bereits für basale Funktionen auf ein Adaptorprotein angewiesen und in dieser Abhängigkeit unterscheidet sich ClpC von von homologen Clp ATPasen.

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von molekularbiologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden genutzt, um den funktionalen Mechanismus zwischen ClpC und seiner Adaptorproteine aufzuklären.

- (1) Es konnte gezeigt werden, dass der zu Grunde liegende Mechanismus der ClpC Aktivierung in der Adaptor vermittelten ClpC Oligomerisierung liegt. Der assemblierte Komplex ist zur Substratinteraktion befähigt und stellt somit den aktiven ATPase-Adaptor-Komplex dar.
- (2) Dieser vermittelt darüber hinaus aber auch die weitere Assemblierung zum funktionalen proteolytischen ClpCP Komplex. Die proteolytische Untereinheit, ClpP, liegt in *B. subtilis* als Monomer vor und bedarf für seine Assemblierung in ein aktives Tetradekamer einem oligomerisierten ATPase-Hexamer. ClpCP-abhängige Proteolyse ist daher einer hierarchischen Kontrolle unterlegen: zunächst wird durch ein Adaptorprotein ClpC in ein aktives Hexamer überführt, welches sodann ClpP rekrutieren und assemblieren kann.
- (3) Die Charakterisierung eines cyanobakteriellen ClpC-Homologs ergab, dass dieses für seine Basisaktivität keinen Adaptor benötigt. Die Abhängigkeit zwischen ClpC und Adaptor ist daher nicht innerhalb der ClpC-Familie konserviert und scheint somit ein spezifisches Merkmal des *B. subtilis* ClpC zu sein.

(4) Neben ihrer Aktivierungsfunktion, vermitteln Adaptorproteine auch die Substraterkennung für ClpC. Das bisherige ClpC Substratspektrum umfasst die regulatorischen Proteine ComK, ComS, SpoIIAB, CtsR und MurAA. Die Vielzahl der Substrate lässt eine entsprechend große Anzahl an Adaptoren vermuten. Der spezifische Adaptor für CtsR, dem Regulator der Klasse III Hitzeschockgene war bisher unbekannt und konnte in dieser Arbeit in McsB identifiziert werden. McsB ist damit neben MecA and seinem Paralog, YpbH, das dritte Adaptorprotein für ClpC. Die Besonderheit von McsB liegt in seiner zusätzlichen Aktivität als Tyrosinkinase und dass diese direkt mit der Adaptorfunktion gekoppelt ist. Der Kinase kommt eine zweifache Bedeutung zu (i) McsB phosphoryliert CtsR, welches die CtsR-DNA-Interaktion aufhebt und (ii) nur im phosphorylierten Zustand ist McsB befähigt, CtsR an ClpC zur anschließenden Proteolyse zu zuführen. Die Kinaseaktivität unterliegt einer strengen Kontrolle. Die Kinaseaktivität von McsB wird durch sein Aktivatorprotein McsA induziert, durch ClpC inhibiert und McsB durch seine spezifische Phosphatase YwIE dephosphoryliert. Aufgrund der Kopplung zwischen Kinase- und Adaptoraktivität kann McsB als regulierter Adaptor angesehen werden.

(5) Obwohl McsB keinerlei Ähnlichkeit zu MecA und YpbH aufweist, interagiert es mit den gleichen ClpC-Domänen. Dies wiederum legt die Vermutung nahe, dass sich die simultane Interaktion zweier verschiedener Adaptorproteine mit ClpC ausschließt. Die Annahme einer potentiellen Konkurrenz konnte experimentell erhärtet werden. In seiner phosphorylierten Form konnte McsB die Adaptorfunktion von MecA unterdrücken.

Abschließend konnte ein Modell zur Regulation der CtsR Aktivität aufgestellt werden, das die neuen Erkenntnisse z.B. die Identifizierung des spezifischen Adaptors für CtsR, McsB, den Phosphattransfer zwischen McsB, CtsR und YwIE und der Interaktion von ClpC mit seinen weiteren Adaptorproteinen, berücksichtigt.

Die Konkurrenz verschiedener Adaptorproteine könnte generell ein wesentlicher Bestandteil der Kontrolle der regulierten Proteolyse sein.