Proteinqualitätskontrolle

Mechanismen und Funktionen von bakteriellen AAA+-Entfaltungsmaschinen

AXEL MOGK

ZENTRUM FÜR MOLEKULARE BIOLOGIE DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG (ZMBH),
HEIDELBERG

Bacterial AAA+ proteins play crucial roles in proteostasis networks and ensure protein homeostasis during stress conditions. They function as ATP-dependent components of proteolytic complexes degrading misfolded proteins or as disaggregases reactivating aggregated proteins. AAA+ proteins generate an ATP-fueled threading force driving substrate unfolding and translocation. Their central functions in protein quality control qualify them as antibacterial drug target.

DOI: 10.1007/s12268-021-1515-7
© Der Autor 2021

■ Ein plötzlicher Wechsel der Wachstumsbedingungen, wie Temperaturanstieg oder Änderung des pH-Werts bzw. der Salzkonzentration, kann zur Missfaltung naszierender Polypeptidketten und der Entfaltung nativer Proteine führen. Bakterien sind Umweltschwankungen besonders stark ausgesetzt und verfügen daher über ein robustes Proteinqualitätskontrollsystem, um Proteinhomeostase unter Stressbedingungen zu erhalten. Starker Hitzestress kann das zelluläre Proteinqualitätskontrollnetzwerk überlasten und zur Proteinaggregation führen (Abb. 1). Das Überleben von Bakterien ist bei massiver Proteinaggregation von deren Fähigkeit abhängig, die Funktionalität aggregierter Proteine wiederherzustellen.

Das Proteinqualitätskontrollsystem besteht aus molekularen Chaperonen und Proteasen, welche missgefaltete bzw. aggregierte Proteine in die native Struktur zurückfalten oder degradieren. Mitglieder der ATP-abhängigen AAA+-Proteinfamilie spielen in diesem Netzwerk eine wesentliche Rolle. Sie bilden proteolytische Komplexe mit einer assoziierten bzw. fusionierten Peptidase-Untereinheit oder wirken als Disaggregasen, um aggregierte Proteine zurückzugewinnen (Abb. 1).

AAA+-Proteine besitzen eine konservierte ATPase(AAA)-Domäne, welche ATP-Bindung und -Hydrolyse vermittelt. Extra-Domänen, die an die AAA-Domäne fusioniert sind, verleihen den Familienmitgliedern funktionelle

Spezifität. AAA+-Proteine bilden ringförmige Strukturen, die i. d. R. aus sechs identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Der AAA+-Proteinring umschließt einen zentralen Kanal, durch den Substratproteine transloziert werden [1]. In diesem Prozess wandeln

AAA+-Proteine die Energie der ATP-Hydrolyse in eine mechanische Kraft zur Entfaltung bzw. Dissoziation von Substratproteinen um. AAA+-Proteine, die Teil eines proteolytischen Komplexes sind, transportieren missgefaltete Proteine in die assoziierte Peptidase zur Degradation (Abb. 1, [2]). AAA+-Disaggregasen (ClpB, ClpG) extrahieren auf ähnliche Weise entfaltete Proteinketten aus einem Aggregat. Die Disaggregase ClpB ist in den meisten Bakterien vorhanden und kooperiert mit einem Hsp70-Chaperon in der Aggregatauflösung. Hsp70 interagiert mit ClpB-M-Domänen und rekrutiert ClpB zum Proteinaggregat [3]. Manche Gram-negativen Bakterien besitzen zusätzlich die eigenständige ClpG-Disaggregase, die über eine spezifische N-terminale Domäne direkt ans Proteinaggregat bindet (Abb. 1, [4]). ClpG verfügt über eine höhere Disaggrega-

▲ **Abb. 1:** Rolle von bakteriellen AAA+-Proteinen in der Proteinqualitätskontrolle. Stressbedingungen führen zur Missfaltung und Aggregation naszierender Polypeptidketten und nativer Proteine. Entfaltete Proteinspezies werden durch ATP-abhängige Proteasen, welche aus einer AAA+- (z. B. ClpA, ClpC) und einer Peptidase-Komponente (z. B. ClpP) bestehen, degradiert. Aggregierte Proteine werden durch das Hsp70-abhängige AAA+-Protein ClpB oder die autonome AAA+-Disaggregase ClpG solubilisiert und renaturiert. Alternativ erfolgt deren Degradation durch die ClpC/ClpP-Protease in Kooperation mit einem Adaptorprotein (A).

tionsaktivität als ClpB und vermittelt extreme Hitzeresistenz in Bakterien [5].

ATP-getriebener Mechanismus der Substrattranslokation

Wie treiben ATP-Bindung und -Hydrolyse den Transport von Substratproteinen durch die zentrale Pore an? Substratbindung und Transport werden durch mobile Schleifenstrukturen vermittelt. Diese sind direkt am AAA+-Kanal positioniert und interagieren über konservierte aromatische Seitenketten mit dem Proteinsubstrat (**Abb. 2A, B**). Durch das Bestimmen verschiedener hochaufgelöster Strukturen von AAA+-Hexameren durch Kryo-Elektronenmikroskopie wurde deutlich, dass AAA+-Ringe asymmetrisch sind, obwohl sie aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind. So befinden sich die zentralen Porenschleifen der ClpB-AAA+-Untereinheiten nicht auf einer Ebene, sondern bilden eine Wendeltreppe und kontaktieren das Substrat über eine Länge von 75 Å (**Abb. 2B**, [6]). Positionierung und Substratinteraktion der Porenschleifen werden durch die Aktivitätszustände der jeweiligen AAA+-Domänen gesteuert. Eine AAA+-Domäne ist aktiv, wenn sie ATP gebunden hat und das gebundene ATP durch einen allosterisch wirkenden Arginin-Finger einer benachbarten Untereinheit kontaktiert wird (**Abb. 2C**). Im ATPase-Zyklus verändern sich die Aktivitätszustände der AAA+-Domänen fortwährend, wobei die ATP-Hydrolyse im AAA+-Ring sequenziell gegen den Uhrzeigersinn voranschreitet. Porenschleifen von inaktiven Untereinheiten befinden sich am unteren Ende der Wendeltreppe. Sie dissoziieren vom Substrat und nehmen bei Aktivierung der AAA+-Domäne die oberste Position der Wendeltreppe ein. Durch sequenzielle ATP-Hydrolyse wird somit der Substrattransport in kleinen Schritten zu ca. zwei Aminosäuren vorangetrieben (**Fig. 2B, C**, [1, 6]).

Kontrolle der ATPase- und Entfaltungsaktivität durch Partnerproteine

Die ATPase- und Translokationsaktivitäten von AAA+-Proteinen sind enorm. Die Disaggregase ClpB kann einen Kraftzug von über 50 pN applizieren und bis zu 500 Substratreste pro Sekunde transportieren [7]. Dies erklärt mechanistisch, wie AAA+-Proteine Proteinaggregate auflösen oder extrem stabile Proteine wie GFP entfalten können. Gleichzeitig müssen zelluläre Prozesse vor unkontrollierten Entfaltungsaktivitäten durch AAA+-Proteine geschützt werden.

▲ **Abb. 2:** Mechanismus der Substratentfaltung durch AAA+-Proteine. **A**, Aromatische Seitenketten, die am zentralen Kanal von AAA+-Hexameren positioniert sind, binden Segmente von Substratproteinen und applizieren bei ATP-Hydrolyse eine Zugkraft, welche mit Entfaltung und Transport des Substrats gekoppelt ist. **B, C**, Diverse Strukturen der Porenschleifen und ATPase-Zentren der ClpB-AAA2-Domäne (modifiziert nach [6]). Substratbindende Porenschleifen bilden eine Wendeltreppe. Deren Positionen werden durch die Aktivitätszustände ihrer AAA+-Untereinheiten bestimmt und verändern sich während des ATPase-Zyklus fortwährend. Eine aktive AAA+-Untereinheit hat ATP gebunden, das durch einen Arginin-Finger einer benachbarten Untereinheit kontaktiert wird.

Deren ATPase-Aktivitäten unterliegen daher einer stringenten Kontrolle. *Coiled-coil*-M-Domänen spielen bei dieser Regulation eine zentrale Rolle und fungieren als molekulare Schalter zum Aus- und Einschalten des ATPase-Motors. M-Domänen der Disaggregase ClpB bilden einen reprimierenden Gürtel um den ATPase-Ring und schränken die konformationelle Dynamik der AAA+-Untereinheiten ein. Die Bindung von kooperierenden Hsp70-Chaperonen hebt die Repression durch M-Domänen auf und induziert einen sequenziellen ATPase-Mechanismus mit hoher katalytischer Aktivität [6]. Die Hsp70-vermittelte Bindung von ClpB an das Proteinaggregat ist somit direkt mit der Aktivierung der Disaggregase gekoppelt. Die Dis-

soziation von Hsp70 und die vollständige Translokation des Proteinsubstrats überführt ClpB erneut in den inaktiven Zustand (**Abb. 3A**). Hohe ClpB-Aktivitäten sind somit lokal auf die Aggregatoberfläche begrenzt.

M-Domänen fungieren auch im Falle des AAA+-Proteins ClpC als zentrale Regulatoren. Sie vermitteln im reprimierten Zustand die Ausbildung einer inaktiven dekameren Struktur, die niedrige ATPase-Aktivität besitzt und nicht mit der Peptidase ClpP interagiert. Das ClpC-aktivierende Adaptorprotein MecA bindet an M-Domänen und verhindert die Ausbildung der dekameren Struktur [8]. MecA überführt ClpC somit in einen hexameren Zustand, welcher hohe ATPase-Aktivität aufweist und mit ClpP asso-

► **Abb. 3:** Kontrolle der ATPase-Aktivität von AAA+-Proteinen.

A, Interagierende *coiled-coil*-MDs umschließen den ATPase-Ring der ClpB-Disaggregase und drosseln die ATP-Hydrolyse. Hsp70-Bindung an MDs führt zur Aktivierung der Disaggregase. Hsp70-Dissoziation hebt den aktivierten Zustand auf.

B, Interaktion von ClpC-MDs führt zur Ausbildung eines inaktiven dekameren Oligomers. Das Adaptorprotein MecA überführt diesen ClpC-Zustand in ein aktives Hexamer, welches mit der Peptidase ClpP einen proteolytischen Komplex bildet. Die Degradation des Adaptors bedingt die Inaktivierung von ClpC. Das zyklische Peptid Cyclomarin A (CymA) führt zur dauerhaften, toxischen ClpC-Aktivierung.

ziiert. Dies ermöglicht nachfolgend die Degradation von Substratproteinen. Der Adaptor MecA präsentiert sich in Abwesenheit von verfügbaren Proteinsubstraten selbst als Substrat und seine Degradation führt zur automatischen Inaktivierung der Protease.

Der Verlust der M-Domänen vermittelten Aktivitätskontrolle in ClpB und ClpC ist toxisch, da es zu einer persistierenden Aktivierung der ATPase-Motoren und damit zu unkontrollierter Entfaltung bzw. Degradation von Substratproteinen kommt. Dies unterstreicht die essenzielle Notwendigkeit, den ATPase-Motor exakt zu regulieren.

Bakterielle AAA+-Proteine als mögliche Ziele von Antibiotika

Die fortschreitende Verbreitung bakterieller Antibiotikaresistenzen macht die Entwicklung neuer Pharmaka gegen bis dato weitgehend unbeachtete bakterielle Angriffsziele notwendig. Durch ihre Funktionen in bakterieller Stressresistenz und Virulenz sind AAA+-Maschinen ein mögliches Ziel von Antibiotika. Interessant in diesem Kon-

text ist die Disaggregase ClpG, da sie Bakterien das Überleben von thermischen Sterilisationsmethoden in der Milch- und Käseproduktion sowie im Krankenhausbereich ermöglicht [4]. Dies erhöht die Gefahr einer bakteriellen Kontamination von Nahrungsmitteln oder medizinischen Geräten. Das codierende *clpG* Gen weist Charakteristika von Resistenzgenen auf. Es liegt entweder auf einem Plasmid oder als Teil einer mobilen genomischen Insel vor und kann durch horizontalen Gentransfer in andere Bakterien übertragen werden. Moleküle, die die ClpG-Disaggregationsaktivität hemmen, könnten daher die Gefahr einer verstärkten Kontamination durch pathogene Bakterien abwenden.

Neben einer möglichen Inhibition der AAA+-Proteinaktivität ist deren toxische Deregulation eine alternative Möglichkeit. So induziert das zyklische Peptid Cyclomarin A eine dauerhafte und somit letale Aktivierung der ClpC/ClpP-Protease [9]. Da der Verlust der ATPase-Kontrolle in AAA+-Proteinmutanten toxisch ist, bietet sich diese Strategie auch für weitere Familienmitglieder an. ■

Literatur

- [1] Puchades C, Sandate CR, Lander GC (2020) The molecular principles governing the activity and functional diversity of AAA+ proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:43–58
- [2] Olivares AO, Baker TA, Sauer RT (2018) Mechanical protein unfolding and degradation. *Annu Rev Physiol* 80:413–429
- [3] Mogk A, Kummer E, Bukau B (2015) Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front Mol Biosci* 2:22
- [4] Lee C, Franke KB, Kamal SM et al. (2018) Stand-alone ClpG disaggregase confers superior heat tolerance to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E273–E282
- [5] Katikaridis P, Meins L, Kamal SM et al. (2019) ClpG Provides Increased Heat Resistance by Acting as Superior Disaggregase. *Biomolecules* 9:815
- [6] Deville C, Franke K, Mogk A et al. (2019) Two-step activation mechanism of the ClpB disaggregase for sequential substrate threading by the main ATPase motor. *Cell Rep* 27:3433–3446
- [7] Avellaneda MJ, Franke KB, Sunderlikova V et al. (2020) Processive extrusion of polypeptide loops by a Hsp100 disaggregase. *Nature* 578:317–320
- [8] Carroni M, Franke KB, Maurer M et al. (2017) Regulatory coiled-coil domains promote head-to-head assemblies of AAA+ chaperones essential for tunable activity control. *eLife* 6:e30120
- [9] Maurer M, Linder D, Franke KB et al. (2019) Toxic activation of an AAA+ protease by the antibacterial drug cyclomarin A. *Cell Chem Biol* 26:1169–1179

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Axel Mogk
 Zentrum für Molekulare Biologie der Universität
 Heidelberg
 Universität Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 282
 D-69120 Heidelberg
a.mogk@zmbh.uni-heidelberg.de
www.zmbh.uni-heidelberg.de/Bukau/default.shtml

AUTOR

Axel Mogk

Jahrgang 1968. Biochemiestudium an der Universität Bayreuth. 1997 Promotion. 1998–2006 Postdoc und wiss. Assistent am Institut für Biochemie, Universität Freiburg und am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Bukau. Seit 2007 akademischer Rat und Privatdozent am ZMBH.