



Doctoral Thesis

Assembly and mechanism of the ClpAP chaperone protease

Author(s):

Kress, Wolfgang Benedikt

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005900296> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 18611

Assembly and Mechanism of the ClpAP Chaperone Protease

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Wolfgang Benedikt Kress

Dipl. Biochem. M.-L. Univ. Halle-Wittenberg

born on December 16th 1978

German

accepted on the recommendation of

Dr. Eilika Weber-Ban
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber

2009

Chapter 1

Summary/Zusammenfassung

1.1 Summary

Energy-dependent protein degradation in all cells is carried out by cylindrical assemblies consisting of chaperone- and protease rings. In proteobacteria, the ring-shaped, hexameric chaperone ClpA binds to both ends of the protease ClpP to form the active ClpAP protease complex. ClpA catalyzes the ATP-dependent unfolding and translocation of substrate proteins through its central pore into the ClpP cylinder where protein degradation takes place. The first part of this thesis describes the complete assembly pathway of this bacterial chaperone-protease complex in real time using fluorescence and light scattering stopped-flow methods. It consists of ATP-induced ClpA hexamer formation and the subsequent association of ClpA hexamers with the ClpP core cylinder. Experimental evidence is presented showing that ClpA assembles into hexamers via a tetrameric intermediate and that hexamerization coincides with the appearance of ATPase activity. It is shown that ATP-induced oligomerization of ClpA is a prerequisite for binding of ClpA to ClpP, while the ClpA hexamer formation is not influenced by the presence of ClpP. Models for ClpA hexamerization and ClpA-ClpP association are presented along with rate parameters obtained from numerical fitting procedures. The hexamerization kinetics show that the tetrameric intermediate transiently accumulates, forming rapidly at early time points and then decaying at a slower rate to generate the hexamer. The association of assembled ClpA hexam-

ers with the ClpP core cylinder displays cooperativity, supporting the coexistence of interchanging ClpP conformations with different affinities for ClpA.

The ClpA chaperone belongs to the larger family of AAA⁺ ATPases and contains, besides an N-terminal domain, two ATPase domains termed D1 and D2. In the second part of the dissertation, the relevance of ATP hydrolysis in the two ATPase domains of ClpA was investigated. ClpA Walker B variants were designed lacking ATPase activity in the first (D1) or the second ATPase domain (D2) without impairing ATP binding. The results show that the two ATPase domains of ClpA operate independently even in the presence of the protease ClpP or the adaptor protein ClpS. Notably, ATP hydrolysis in the first ATPase module is sufficient to process a small, single-domain protein of low stability. Substrate proteins of moderate local stability were efficiently processed when D1 was inactivated. However, ATP hydrolysis in both domains was required for efficiently processing substrates of high local stability. Furthermore, evidence is provided for the ClpS-dependent directional translocation of N-end rule substrates from N- to C-terminus and a mechanistic model is proposed for substrate handover from the adaptor protein to the chaperone.

1.2 Zusammenfassung

Der energieabhängige Abbau von Proteinen wird in allen Zellen durch zylinderförmige Komplexe bewerkstelligt, die aus *Chaperone*- und Protease-Untereinheiten bestehen. In Proteobakterien bindet das ringförmige, hexamere *Chaperone* ClpA beidseitig an ClpP und bildet so den aktiven ClpAP-Komplex. ClpA katalysiert die ATP-abhängige Entfaltung und Translokation von Substrat-Proteinen durch die zentrale Pore hindurch in den ClpP-Zylinder, wo die Degradation des Substrates stattfindet. Der erste Teil dieser Dissertation beschreibt die vollständige Assemblierung dieser bakteriellen *Chaperone*-Protease mit Hilfe von 'Stopped-Flow' Fluoreszenz- und Lichtstreuungs-Messungen. Die Assemblierungsreaktion besteht aus der Hexamerisierung von ClpA und der anschließenden Bildung des ClpA-ClpP-Komplexes. Die Experimente belegen, dass ein ClpA-Tetramer als Assemblierungsintermediat auftritt und dass die Bildung des Hexamers mit dem Auftreten der ATPase-Aktivität von ClpA einhergeht. Es wird weiter gezeigt, dass die ClpA

Oligomerisierung die Voraussetzung für die Interaktion mit ClpP ist, während ClpP selbst keinen Einfluss auf die Assemblierung von ClpA hat. Ein Assemblierungsmodell für die ClpA-Hexamersierung und für die Bildung des ClpAP-Komplexes wird vorgestellt. Die numerische Anpassung dieses Modells an die experimentellen Fluoreszenz- und Lichtstreuungs-Daten lieferte die einzelnen Ratenkonstanten. Die kinetischen Messungen zeigen, dass der Tetramer zu Beginn der Reaktion schnell gebildet wird und transient akkumuliert. Die langsamere Abnahme des Tetramers geht einher mit der Bildung des aktiven ClpA-Hexamers. Die Bindung des ClpA-Hexamers an ClpP erfolgt kooperativ, was darauf hindeutet, dass ClpP in zwei, im Gleichgewicht stehenden, Konformationen vorkommt, die unterschiedliche Affinitäten für ClpA aufweisen.

ClpA gehört zu der grossen Familie der AAA⁺ ATPasen und besitzt, neben einer N-terminalen Domäne, zwei ATPase-Domänen, die D1 und D2 genannt werden. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Bedeutung der ATP-Hydrolyse in den beiden ATPase-Domänen von ClpA untersucht. ClpA Walker B Varianten wurden so konzipiert, dass die ATP-Hydrolyse entweder in D1 oder D2 unterbunden ist, ohne allerdings die ATP-Bindung in der jeweiligen Domäne zu beeinträchtigen. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden ATPase Domänen unabhängig voneinander arbeiten, auch in Anwesenheit von ClpP und Adaptor-Protein ClpS. Bemerkenswerterweise reicht die Hydrolyse von ATP in D1 aus, um ein kleines Einzeldomänenprotein von geringer Stabilität zu prozessieren. Substrat-Proteine, die eine moderate lokale Proteinstabilität aufweisen, wurden effizient prozessiert auch wenn D1 inaktiviert wurde. ATP-Hydrolyse in beiden ATPase Domänen ist jedoch für die effiziente Prozessierung von Substraten erforderlich, die eine hohe lokale Stabilität aufweisen. Darüber hinaus belegt diese Arbeit, dass sogenannte '*N-end rule*'-Substrate ClpS-abhängig linear vom N-terminus her abgebaut werden, und ein Mechanismus für die Substratübergabe von ClpS zu ClpA wird vorgeschlagen.