

8. ZUSAMMENFASSUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE ZUR APIKALEN DOMÄNE VON GROEL

8.1. Thermodynamische Stabilität und Faltung von Fragmenten des Chaperonins GroEL (apikale Domäne, Minichaperone)

Durch limitierte Proteolyse mit Thermolysin konnten 1993 erstmals stabile Fragmente (Molekulargewicht 34 kDa, Fragment 150-456) des Chaperonins GroEL hergestellt werden, die die Faltung von Rhodanase auch ohne Cochaperonin GroES und Hydrolyse von ATP unterstützen (Makino *et al.*, 1993). Verschiedene Fragmente der apikalen Domäne von GroEL mit unterschiedlichem Molekulargewicht können rekombinant in *Escherichia coli* produziert werden, wie die Fragmente 191-376, 191-345 (**R8**) und 193-335 (Kobayashi *et al.*, 1999; Tanaka & Fersht, 1999). Diese werden auch als Minichaperone bezeichnet und sind monomere Proteine. Die Kristallstruktur des Minichaperons 191-376 wurde mit einer Auflösung von 1,7 Å gelöst und entspricht im wesentlichen der apikalen Domäne in GroEL (Braig *et al.*, 1994; Buckle *et al.*, 1997).

GroEL vermittelt die Faltung zytosolischer Proteine in *Escherichia coli*, wobei eine Wechselwirkung mit etwa 300 Proteinen nachgewiesen wurde (Houry *et al.*, 1999). Die Messung der funktionellen Aktivität des Chaperonins GroEL auf die Faltung von Proteinsubstraten ist für Rhodanase (auch ohne Hydrolyse von ATP) und Malat-Dehydrogenase (Hydrolyse von ATP) etabliert (Mendoza *et al.*, 1992). Durch Kernresonanzspektroskopie war gezeigt worden, daß die durch GroEL mögliche reversible Faltung der PPlase Cyp18 auf einer Wechselwirkung von dessen entfalteter Polypeptidkette mit der apikalen Domäne des Chaperonins beruht (Nieba-Axmann *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 1994). Die Minichaperone können wegen des Fehlens der basalen Domäne kein ATP hydrolysieren. Die Bestimmung ihrer funktionellen Aktivität wurde aus diesem Grund mit Rhodanase (Horovitz, 1995) und Cyp18 (Zahn *et al.*, 1994) untersucht und dadurch bestätigt, daß die durch GroEL unterstützte Faltung dieser Substratproteine auch ohne Hydrolyse von ATP erfolgen kann (**R9**).

Das Chaperonin GroEL ist ein Tetradekamer, bestehend aus zwei heptameren Ringen (Braig *et al.*, 1994). Von ELLIS wurde 1991 das Modell des ANFINSEN-Käfigs (ANFINSEN-*cage*) aufgestellt (Ellis, 1996). Die Bildung des Binärkomplexes der Polypeptidkette mit dem Chaperonin erfolgt an multiplen Bindungsstellen im Inneren

des Moleküls (Hohlzylinder). Nach heutigen strukturellen und mechanistischen Erkenntnissen umfaßt der ANFINSEN-*cage* im engeren Sinne nur einen heptameren Ring des Chaperonins und sieben Moleküle des Cochaperonins GroES (GroEL₇GroES₇). Verschiedene heterooligomere Zustände des Chaperonins im Komplex mit dem Cochaperonin sind nachgewiesen worden, so auch GroEL₁₄(GroES₇)₂ (Azem *et al.*, 1994). Es wurde durch analytische Ultrazentrifugation gezeigt, daß die Minichaperone 191-376 und 191-345 als Monomere vorliegen und keinen ANFINSEN-Käfig bilden (**R10**). Daher ist auch eine Aktivität dieser Fragmente gegenüber Proteinsubstraten die essentiell unter Hydrolyse von ATP im ANFINSEN-Käfig falten, wie zum Beispiel Malat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase, nicht zu erwarten (Coyle *et al.*, 1997; Ellis & Hartl, 1999).

Die Minichaperone 191-376 und 191-345 enthalten in ihrer Primärstruktur keine Tryptophanreste. Messungen zur Faltung dieser Proteine konnten durch Detektion der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz (Tyr199 in einer loop-Region, Tyr203 in einer ₃₁₀-Helix, Tyr360 in Helix K) durchgeführt werden (**R10**). Die Detektion der Änderungen der Tertiärstruktur erfolgte auch mittels Nah-UV, die der Sekundärstruktur mittels Fern-UV Circular dichroismus. Die thermodynamische Stabilität der Minichaperone 191-376 und 191-345 wurde durch chemische Denaturierung mit Harnstoff und durch thermische Denaturierung gemessen. Die Faltung der hier beschriebenen Fragmente von GroEL ist reversibel. Die Auswertung der Daten der chemischen Denaturierung nach einem Zweizustandsmodell ergab eine thermodynamische Stabilität von 5,7 kcal mol⁻¹ (Fern-UV Circular dichroismus). Das Minichaperon 191-376 umfaßt neben der apikalen Domäne von GroEL die Helix K (H12), die Teil der intermediären Domäne ist. Durch thermische Denaturierung und Detektion der Änderungen der Sekundärstruktur mittels Fern-UV Circular dichroismus wurde gezeigt, daß diese zusätzliche Helix eine wesentlich geringere Stabilität besitzt und als isoliertes Sekundärstrukturelement reversibel faltet (**R10**).

Die Kinetiken der Entfaltung und Faltung der Minichaperone 191-376 und 191-345 wurden nach Konzentrationsänderungen von Harnstoff mittels intrinsischer Fluoreszenz gemessen. Die Primärstruktur der Fragmente enthält sieben Prolinreste, die alle in *trans*-Konformation im nativen Zustand vorliegen (Buckle *et al.*, 1997). Die Population eines transienten Intermediates konnte durch die Analyse

der Hauptfaltungsphase der Fragmente gezeigt werden (*chevron*-Plots). Diese Eindomänenproteine falten nach einem Dreizustandsmodell (**R10**). Der TANFORD- β_T -Wert für die Faltung des Minichaperons 191-345 beträgt 0,78 (Jackson, 1998).

8.2. Bindung von *bis*-ANS – hydrophobe Bereiche

Die volle Kompetenz als Chaperon erreicht GroEL nach Ausbildung des ANFINSEN-Käfigs im *cis*-Komplex (GroEL₇GroES₇ – 7 ATP). Der molekulare Mechanismus der Chaperonaktivität umfaßt eine Kopplung von alternierenden Konformationsänderungen des Heterooligomers mit der Hydrolyse von ATP (Fersht, 1999; Rye & Horwich, 1997; Schmidt *et al.*, 1994; Todd *et al.*, 1994). Das Heterooligomer ist durch die Ausbildung des *cis*- bzw. *trans*-Komplexes funktionell asymmetrisch. Untersuchungen zu mechanistischen Details dieses Prozesses zeigten eine Bindung potentieller Substrate (Peptide, Proteine) an die apikale Domäne des Chaperonins (Corrales & Fersht, 1996). Zur Untersuchung der Spezifität dieser Wechselwirkungen und der daran beteiligten Strukturelemente bzw. Aminosäurereste wurde eine Serie von Fragmenten des GroEL's untersucht, die dessen apikale Domäne als zentrales Element enthalten (Minichaperone). Die Exponierung hydrophober Bereiche der apikalen Domäne war eine grundlegende These zur Erklärung ihrer Funktionalität (Motojima *et al.*, 2004). Der Nachweis hydrophober Bereiche (*hydrophobic patches*) eines Makromoleküls gelingt durch Bindungsstudien mit Fluoreszenzfarbstoffen. Für diese Untersuchungen kam *bis*-ANS zur Anwendung. Es konnte die Ausbildung hydrophober Bereiche der apikalen Domäne zweifelsfrei gezeigt werden (**R10**). Weiterhin wurden durch chemische Denaturierung Stabilitätsuntersuchungen der mit *bis*-ANS gesättigten Fragmente 191-345 und 191-376 durchgeführt, die bei beiden Proteinen bei 2,5 M Harnstoff die Population eines Intermediates mit stärker ausgeprägter Hydrophobizität zeigten. Daher muß der durch den Fluoreszenzindikator detektierte Bereich Strukturelemente umfassen, die beiden Proteinen gemeinsam sind. Dieses Intermediat ist auch kinetisch nachweisbar (**R10**).

Da die Faltungskompetenz der Minichaperone auch biotechnologisch interessant war, wurde deren strukturelle, funktionelle und physikochemische Charakterisierung in verschiedenen Arbeitsgruppen fortgesetzt. Es war einerseits von Interesse, welche Bereiche der Sekundärstruktur der apikalen Domäne von GroEL welche Sequenzen von potentiellen Substraten binden (Chatelier *et al.*, 1999; Chen & Sigler,

1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Tanaka & Fersht, 1999) und andererseits, ob eine oligomere Struktur in Anlehnung an den nativen Komplex die Funktionalität verändert (Chatelier *et al.*, 2000a; Chatelier *et al.*, 2000b). Dazu sind auch durch *protein engineering* veränderte Varianten der Minichaperone untersucht worden (Wang *et al.*, 1999). Da der Autor dieser Arbeit an diesen umfangreichen Untersuchungen nicht beteiligt war, sollen nur die wesentlichen Ergebnisse genannt und zu den eigenen Datensätzen gewertet werden. Die Bindung von *bis*-ANS an das Fragment 191-345 wurde quantitativ reevaluiert und mit GroEL verglichen (Smoot *et al.*, 2001). Der Fluoreszenzfarbstoff bindet kooperativ an die apikale Domäne mit einem Hill-Koeffizienten von 2 und einem K_D -Wert von $17,36 \pm 0,58 \mu\text{M}$. GroEL hat zwei Bindungsseiten für *bis*-ANS, K_{D1} von $0,56 \mu\text{M}$ (1,7 Mol Farbstoff pro Mol Untereinheit) und K_{D2} von $10,57 \mu\text{M}$ (8,5 Mol Farbstoff pro Mol Untereinheit). Die apikale Domäne hat relativ wenig hydrophobe Oberfläche in der unbeeinflussten (*unperturbed*) Struktur. Die Bindung von *bis*-ANS destabilisiert die native Struktur des Fragmentes und induziert die Ausbildung hydrophober Oberflächen. Bei steigenden Konzentrationen an *bis*-ANS nimmt die thermodynamische Stabilität dieses Minichaperons ab, sie beträgt $5,20 \pm 0,66 \text{ kcal mol}^{-1}$ bei 0 M *bis*-ANS und $2,88 \pm 1,08 \text{ kcal mol}^{-1}$ bei $30 \mu\text{M}$ *bis*-ANS. Der letztere Wert entspricht der Energiedifferenz des Intermediates zum entfalteten Zustand, da bei sättigenden Konzentrationen an *bis*-ANS gemessen wurde und ist mit dem kinetisch bestimmten Wert der thermodynamischen Stabilität des Intermediates vergleichbar (**R10**). Die Modulation hydrophober Oberflächen der apikalen Domäne erfolgt durch eine Perturbation der Tertiärstruktur (Smoot *et al.*, 2001). Die systematische Untersuchung der Bindung von Peptiden aus einer Peptidbibliothek (*randomly selected peptides*) an die apikale Domäne von GroEL zeigte deren Plastizität als Basis für die geringe Substratspezifität (*substrate diversity*) (Chen & Sigler, 1999). In den Kristallstrukturen dieser Komplexe (Chen & Sigler, 1999) und auch aus deren Untersuchungen mittels Kernresonanzspektroskopie (Kobayashi *et al.*, 1999) sind Helix H und Helix I die Bindungsstellen von potentiellen Substraten. Beide Helices sind sowohl in Fragment 191-345, als auch 191-376 realisiert.

8.3. Chaperonaktivität löslicher und immobilisierter (*column refolding*) Minichaperone

Von YOSHIDA und Mitarbeitern wurde 1994 von einem kovalent immobilisierten Fragment (Molekulargewicht 54 kDa) von *cpn60* aus *Thermus thermophilus* eine 10 %ige Aktivität als Chaperon auf die Faltung von Rhodanase berichtet (Taguchi *et al.*, 1994). Nach dem Beweis der funktionellen Aktivität der Minichaperone in Lösung (**R9**) war es für praktische Aspekte von Interesse, deren Funktionalität in immobilisierter Form zu untersuchen. Die Fragmente 191-345 und 191-376 der apikalen Domäne von GroEL wurden sowohl an Ni-NTA-Agarose, als auch an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Die funktionelle Aktivität des immobilisierten Minichaperons wurde im *batch*-Verfahren mit Cyp18 und im säulenchromatographischen Verfahren mit IGPS(49-252) (Fragment der Indol-3-glycerinphosphat-Synthase) als Proteinsubstrate gezeigt (**R11**) (Fersht, 1999). Durch diese Verfahren ist es möglich, durch Lagerung partiell inaktiviertes Cyp18, was als humanes Protein kein natürliches Substrat von GroEL ist, zu reaktivieren.

Das Verfahren des *column refolding* wurde patentiert und auf die Renaturierung anderer Proteine, wie des Skorpion-Toxins Cn5, erfolgreich angewandt (Altamirano *et al.*, 1999). Es ist eingeschränkt auf Substrate, die allein durch Wechselwirkung mit der Substratbindungsstelle (induzierte Konformationsänderung) eine unterstützende Faltung oder Entfaltung erfahren. Der Komplex von GroEL ist unter physiologischen Bedingungen *in vivo* durch die koordinierte Hydrolyse von ATP reguliert (Bindung von GroES, Ausbildung des ANFINSEN-Käfigs), daher schränkt die Deletion der für die allosterische Kontrolle des Chaperonins wichtigen Bereiche das Substratspektrum naturgemäß ein.