



Doctoral Thesis

## The tryptophan residues of mitochondrial creatine kinase roles in enzyme structure and function

**Author(s):**

Gross, Martin

**Publication Date:**

1994

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000959249> →

**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.10719

**The Tryptophan Residues of  
Mitochondrial Creatine Kinase:  
Roles in Enzyme Structure and Function**

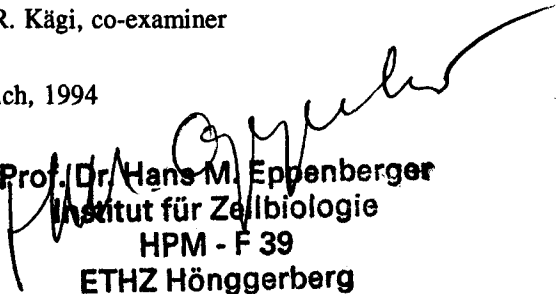
A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH**  
for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by  
**Martin Gross**  
Dipl.-Biochem., University of Hannover, Germany

born June 30, 1965, in Innsbruck, Austria  
German citizen

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. M. Eppenberger, examiner  
Prof. Dr. T. Wallimann, co-examiner  
Prof. Dr. J. H. R. Kägi, co-examiner

Zürich, 1994

  
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger  
Institut für Zellbiologie  
HPM - F 39  
ETHZ Hönggerberg  
CH-8093 ZÜRICH

**12. Juli 1994**

# Summary

Mitochondrial creatine kinase (Mi-CK), in contrast to the exclusively dimeric cytosolic CK isozymes, additionally forms octamers, consisting of four stable dimers each. This octameric structure of Mi-CK appears to be a specific adaptation which enables the enzyme to associate with the mitochondrial membranes in the intermembrane space where the protein is located. Together with the cytosolic CK isozymes, Mi-CK is postulated to form an intricate cellular energy shuttling system, the so-called phosphocreatine circuit, which allows the rapid communication between sites of ATP production and demand in biological high-performance systems such as muscle, heart, or neural tissues. In the present thesis, mainly fluorescence spectroscopic methods have been applied to study the structure and function of the Mi-CK octamer, focussing on the Trp residues of the enzyme which served as highly sensitive spectroscopic probes.

A fluorescence and CD spectroscopic characterization of Mi-CK, including a comparison to other CK isozymes and guanidino kinases (GuaK), as well as a consideration of sequence homologies, was undertaken, showing a high structural conservation of the guanidino kinases throughout the animal kingdom. All GuaK were predicted to uniformly contain 34-36%  $\alpha$ -helix, 19-23% antiparallel  $\beta$ -sheet, and 19-24% turns, but no or only minor amounts of parallel  $\beta$ -sheet. From near-UV CD spectra, it was concluded that Tyr and Trp residues are structurally conserved as well.

The kinetics of Mi-CK octamer formation and dissociation were investigated fluorescence-spectroscopically, based on the finding that a Trp residue is located at the dimer-dimer interfaces, becoming quenched upon exposure to the solvent. It was shown that this Trp residue is distinct from a Trp located at the active site which is quenched upon substrate binding. The dissociation of octamers, induced by addition of a mixture forming a transition-state analogue complex (TSAC mixture, MgADP+creatine+nitrate), appeared to be a one-step process, exhibiting a unimolecular rate constant of  $0.19 \text{ min}^{-1}$  at  $30^\circ\text{C}$  and pH 7.0. The formation of octamers, induced by adding EDTA to TSAC-dissociated Mi-CK, was found to involve an unstable, tetrameric intermediate, and displayed a bimolecular association rate constant of  $318 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , being slow compared to other subunit associations. The influence of temperature, pH, and of substrate concentrations on the rate of octamer decay was studied as well, leading to the conclusion that *in vivo*, the oligomeric transitions of Mi-CK are probably too slow to play a role in fast metabolic adaptation, however they could be important in long/medium-term modulations and in the optimization of aerobic energy supply.

All five Trp residues of Mi-CK were individually substituted by Phe or Cys by means of site-directed mutagenesis, leading to the identification of Trp-223 as the active site residue and of Trp-264 as the dimer-dimer interface residue. Replacement of Trp-223, which is strictly conserved in all GuaK, even by Phe, in addition to abolishing the substrate-dependent quenching effects, nearly inactivated the enzyme, suggesting a role in catalytic function, e.g., in water exclusion from the active site. Substitution of Trp-264 by Cys resulted in a drastic octamer destabilization and in a loss of the fluorescence effect associated with octamer dissociation. Most remarkably, as shown by Van't Hoff analysis of the octamer/dimer equilibrium, substitution of Trp-264 appeared to completely abolish hydrophobic dimer-dimer interactions which were found to contribute substantially to the stabilization of wild-type octamers. In addition, Trp-206, the second Trp common to all GuaK, was shown to be a putative hydrophobic-core residue, its replacement resulting in a significant active-site distortion and in a dimer destabilization which could be counteracted by the addition of substrates.

The close structural relation between the enzymes of the GuaK family was further shown by a study of the denaturant-induced equilibrium unfolding of Mi-CK, MM-CK, and ArgK. All three enzymes, in spite of their differing quaternary structures, exhibited a very similar multiphasic unfolding behavior, with a characteristic molten globule-like intermediate at moderate denaturant concentrations. The comparison of various unfolding parameters, including Trp fluorescence, near- and far-UV CD, ANS binding, and hydrodynamic investigations, revealed that the GuaKs probably unfold both in a sequential (i.e., independent unfolding of the two domains) and hierarchical manner (i.e., unfolding on several structural levels within the individual domains). The significance of the observed equilibrium unfolding intermediates to the kinetic folding process of the GuaKs is discussed.

## Zusammenfassung

Die mitochondriale Creatinkinase (Mi-CK) bildet - im Gegensatz zu den ausschliesslich dimeren cytosolischen CK-Isoenzymen - auch oktamere Strukturen, bestehend aus jeweils vier stabilen Dimeren. Die oktamere Struktur der Mi-CK repräsentiert wahrscheinlich eine spezifische Anpassung an die Lokalisation dieser Isoform im mitochondrialen Intermembranraum, denn sie begünstigt die Assoziation des Enzyms an die mitochondrialen Membranen. Es wird angenommen, dass die Mi-CK zusammen mit den cytosolischen CK ein komplexes zelluläres Energietransportsystem (den sog. Phosphocreatin-Shuttle) bildet, welches die effiziente Kommunikation zwischen ATP-produzierenden und -verbrauchenden Kompartimenten ermöglicht, so z.B. in Systemen mit hohem und fluktuierendem Energieumsatz wie Muskel, Herz oder neuronalen Geweben. In der vorliegenden Dissertation wurden vorwiegend fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Untersuchung von Struktur und Funktion des Mi-CK-Oktamers eingesetzt, wobei die Tryptophan-Reste des Enzyms als hochempfindliche Reportergruppen im Zentrum des Interesses standen.

In einer fluoreszenz- und CD-spektroskopischen Charakterisierung der Mi-CK im Vergleich mit anderen CK-Isoenzymen und Guanidinokinase (GuaK) unter Berücksichtigung von Sequenzhomologien zeigte sich eine starke Strukturkonservierung innerhalb der im gesamten Tierreich verbreiteten GuaK-Familie. Sekundärstrukturberechnungen anhand von CD-Spektren im fernen UV ergaben für alle GuaK einheitlich 34-36%  $\alpha$ -Helices, 19-23% antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, 19-24% Turns, jedoch keine oder nur sehr geringe parallele  $\beta$ -Faltblattanteile. CD-Spektren im nahen UV deuteten ausserdem auf eine ausgeprägte strukturelle Konservierung von Tyr- und Trp-Resten hin.

Es wurde gefunden, dass ein Trp-Rest der Mi-CK an den Dimer-Dimer-Kontaktstellen liegt und somit beim Zerfall des Oktamers dem Fluoreszenzquench durch Lösungsmittelbestandteile ausgesetzt wird. Dies konnte dazu genutzt werden, die Kinetik der Mi-CK-Oktamerbildung und -dissoziation fluoreszenzspektroskopisch zu verfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Grenzflächen-Trp klar verschieden ist von einem weiteren Trp, welches im Aktiven Zentrum des Enzyms liegt und durch Substratbindung gequench werden kann. Die kinetische Analyse ergab, dass die durch die Bildung eines dem enzymatischen Übergangszustand analogen Komplexes (transition-state analogue complex [TSAC]), bestehend aus Enzym  $\cdot$  MgADP  $\cdot$  Creatin  $\cdot$  Nitrat induzierte Oktamerdissoziation sehr wahrscheinlich in einem einzigen Schritt mit einer unimolekularen Geschwindigkeitskonstante von  $0.19 \text{ min}^{-1}$  ( $30^\circ\text{C}$ , pH 7.0) erfolgt. Für die Neubildung von Oktameren, welche durch Zugabe von EDTA zu TSAC-dissoziierter

Mi-CK induziert werden konnte und unter Beteiligung eines instabilen tetrameren Intermediats ablief, ergab sich eine bimolekulare Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von  $318\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , was sehr langsam im Vergleich zu anderen Untereinheiten-Assoziationen ist. Ferner wurde der Einfluss von Temperatur, pH, und von variierenden Substratkonzentrationen auf die Geschwindigkeit des Oktamerzerfalls untersucht, mit dem Ergebnis, dass die Oktamer/Dimerkonversion von Mi-CK wahrscheinlich zu langsam ist, um *in vivo* für eine schnelle Stoffwechselanpassung geeignet zu sein; möglicherweise jedoch könnten Oktamer/Dimerumwandlungen eine Rolle in der mittel- bis langfristigen Optimierung der aeroben Energieversorgung spielen.

Mittels gezielter Mutagenese wurden alle fünf Trp der Mi-CK einzeln gegen Phe- oder Cys-Reste ausgetauscht, was zur Identifizierung des Trp an den Dimer-Dimer-Grenzflächen als Trp-264 und des Trp im Aktiven Zentrum als Trp-223 führte. Der Austausch von Trp-223 bewirkte eine weitgehende Inaktivierung des Enzyms sowie den Verlust des substratbedingten Fluoreszenz-Quencheffekts; Trp-223 könnte möglicherweise eine Rolle beim Wasserausschluss am Aktiven Zentrum spielen. Mutation von Trp-264 führte zum Verlust des mit der Oktamerdissoziation verbundenen Fluoreszenzeffekts und zu einer deutlichen Destabilisierung der Oktamerstruktur. Eine Van't Hoff-Analyse des Oktamer/Dimer-Gleichgewichts zeigte, dass hydrophobe Dimer-Dimer-Wechselwirkungen, welche wesentlich zur Oktamerstabilisierung des Wildtyp-Enzyms beitragen, bei der Trp-264-Mutante wahrscheinlich völlig abhanden sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Trp-206 wahrscheinlich in hydrophoben Kern des Proteins liegt; dessen Austausch gegen Cys bewirkte eine deutliche Verzerrung der Struktur des Aktiven Zentrums, sowie eine Destabilisierung der Monomer-Monomer-Interaktion, welcher durch Zugabe von Substraten entgegengesteuert werden konnte.

Eine Gleichgewichts-Denaturierungsstudie an Mi-CK, MM-CK und ArgK unter Verwendung von Guanidinium-Hydrochlorid und Harnstoff belegte zusätzlich die enge strukturelle Verwandtschaft der Enzyme der GuaK-Familie. Alle drei Enzyme zeigten trotz unterschiedlicher Quartärstrukturen ein sehr ähnliches mehrphasiges Denaturierungsverhalten; insbesondere fand sich bei allen Proteinen ein "Molten Globule"-ähnliches Faltungsintermediat. Die simultane Verfolgung verschiedener Messparameter, u.a. Trp-Fluoreszenz, CD im nahen und fernen UV, ANS-Adsorption und hydrodynamische Eigenschaften, ergab, dass sich die GuaK sowohl sequentiell (d.h. unabhängige Entfaltung der einzelnen Domänen) als auch "hierarchisch" (d.h. Entfaltung einzelner Stabilitäts-Ebenen innerhalb der einzelnen Domänen) entfalten. Die mögliche Bedeutung dieser Befunde, insbesondere der Existenz von stabilen Intermediaten, für den kinetischen Faltungsprozess der GuaK wird erörtert.