



Doctoral Thesis

Solution NMR with large macromolecular assemblies the GroE chaperonin system

Author(s):

Fiaux, Jocelyne

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004437539> →

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 Nr. 14616

**Solution NMR with large
macromolecular assemblies – the GroE
chaperonin system**

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

presented by:

Jocelyne Fiaux

Chimiste diplômée (Université de Lausanne, Switzerland)

born on July 14th, 1975

citizen of Hermenches, VD

accepted on the recommendation of:

Prof. K. Wüthrich, examiner

Prof. R. Glockshuber, co-examiner

2002

Summary

Nuclear magnetic resonance has been a method of choice for structural characterization of proteins and nucleic acids up to ~25 kDa and the introduction of transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) already has extended the size range of structures amenable to solution NMR investigations to about 150 kDa. The large size of many protein complexes however still represents a challenge for NMR studies, and the development of NMR approaches for investigations of larger molecular sizes is of considerable interest. This thesis describes studies of very large supramolecular structures in the range of 200-900 kDa with solution NMR, starting from the previously established TROSY and CRINEPT techniques.

Labeling of these large molecular assemblies with stable isotopes is essential for NMR investigations. Several labeling protocols were established for uniform and residue-specific labeling on a deuterated background. These experiments required knowledge about the amino acid biosynthetic pathways and built on experience obtained from a first research project on investigations of the central carbon metabolism in micro-organisms using ^{13}C -labeling of amino acids and 2D NMR. This work is summarized in the Appendix 1 in the form of a short introduction of the method applied, and a collection of the published work.

Refined implementations of experiments based on the TROSY and CRINEPT principles were established and applied to the *E. coli* chaperonin proteins GroE labeled with ^{15}N and ^2H . In this molecular chaperone system, GroEL, a double ring-shaped homo-tetradecamer, interacts with the dome-shaped heptameric co-chaperonin GroES in the

presence of ATP to form a chamber that is the site of productive protein folding. Spectra were recorded for GroES (72 kDa), GroEL (800 kDa), and the single-ring variant of GroEL, SR1 (400 kDa). Detailed analyses of the NMR signals provided a guideline for adequate selection of the experimental schemes, the water suppression technique, and parameters such as the polarization transfer delay and the recycle delay.

Investigations of complexes of isotope-labeled GroES with SR1 or GroEL using these techniques revealed that nearly complete [^{15}N , ^1H]-correlation spectra can be obtained at 472 and 872 kDa. Furthermore, observation of chemical shift changes in GroES upon complex formation with the chaperonins enabled a mapping of GroES surface areas involved in intermolecular contacts. The data showed that only the mobile loop of GroES undergoes a major conformational change upon binding to GroEL and becomes structured. Interestingly, residues in this region exhibit variable dynamic properties and raise interesting possibilities for the binding mode of these proteins. Applications of the same NMR techniques to isotope-labeled GroEL and SR1 yielded preliminary results on nucleotide and GroES binding.

Quite generally, the collection of informative solution NMR spectra of structures with molecular weights up to 900 kDa and the manifestation in these spectra of conformational changes upon complex formation opens entirely new possibilities for studying functional interactions and structural dynamics in large macromolecular assemblies.

Résumé

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est devenue une technique puissante pour étudier la dynamique et la structure des protéines et acides nucléiques de poids moléculaire inférieur à 25 kDa. Déjà, l'introduction de la technique TROSY ("transverse relaxation-optimized spectroscopy") a permis d'étendre la classe de macromolécules accessibles à l'étude par RMN en solution à une taille d'environ 150 kDa. La dimension importante de nombreux complexes protéiques représente toutefois un défi considérable pour l'application de la RMN; c'est pourquoi il existe un intérêt croissant pour le développement de nouvelles approches permettant l'étude de grosses macromolécules à l'aide de la RMN. La présente thèse décrit l'étude de structures supramoléculaires de l'ordre de 200-900 kDa par RMN en solution, à partir des principes de TROSY et CRINEPT ("cross-correlated relaxation-induced polarization transfer") récemment établis.

Le marquage isotopique des protéines à étudier est indispensable à l'étude RMN. Différents protocoles ont été développés pour le marquage uniforme et spécifique, ainsi que la deutériation des macromolécules. Ces méthodes présupposent, entre autres, la connaissance des voies métaboliques de synthèse des acides aminés. Ainsi, ces expériences s'appuient sur la compréhension acquise au cours d'un premier projet de recherche impliquant l'étude du métabolisme central de micro-organismes à l'aide de marquage ^{13}C et de la RMN à deux dimensions. Les résultats de ce travail sont présentés en annexe sous forme d'une brève introduction à la méthode appliquée et d'une collection de publications.

Des corrélations hétéronucléaires basées sur les techniques TROSY et CRINEPT ont été optimisées et appliquées à l'étude des protéines

chaperonines GroE de *E. coli*. Le chaperon moléculaire GroEL, composé de 2 anneaux de 7 sous-unités identiques, a pour fonction d'aider au repliement de substrats protéiques en association avec son cofacteur heptamérique GroES. Des spectres ont été mesurés pour GroES (72 kDa), GroEL (800 kDa) et SR1 (400 kDa), un variant de GroEL constitué d'un seul anneau heptamérique. L'analyse détaillée des résonances observées a fourni des indications précises pour la sélection des séquences appropriées, de la technique de suppression du solvant et de paramètres tels que le temps de transfert d'aimantation ou le délai entre les scans.

L'étude, à l'aide de ces techniques, de complexes entre GroES marquée et SR1 ou GroEL a démontré que les spectres de corrélation obtenus pour les tailles de 472 et 872 kDa, respectivement, contiennent un ensemble de résonances pratiquement complet. De plus, l'observation de changement du déplacement chimique pour certaines résonances appartenant à GroES lors de sa liaison à GroEL a permis de délimiter la surface d'interaction des chaperonines. Les données mettent en évidence la transition de la boucle mobile de GroES vers une conformation structurée dans le complexe avec GroEL. Le fait notable que les résidus de cette partie de la molécule possèdent des propriétés dynamiques variables soulève des questions intéressantes quant au mode de liaison de ces protéines. L'application des mêmes techniques aux protéines marquées GroEL et SR1 ont parallèlement fourni des résultats préliminaires au sujet des modes d'interactions des chaperonines avec des nucléotides et avec la co-chaperonine GroES.

De manière générale, la disponibilité de spectres porteurs d'informations pour des structures moléculaires de taille importante et l'observation, dans ces spectres, de transitions conformationnelles ouvrent de nouvelles voies pour l'étude des interactions fonctionnelles et de la dynamique pour de tels complexes.