

Allosterische Aktivierung der HtrA-Protease DegP durch Stress-Signale während der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle**

Michael Meltzer, Sonja Hasenbein, Patrick Hauske, Nicolette Kucz, Melisa Merdanovic, Sandra Grau, Alexandra Beil, Dafydd Jones, Tobias Krojer, Tim Clausen, Michael Ehrmann* und Markus Kaiser*

Die zelluläre Proteinqualitätskontrolle (PQK) überwacht die strukturelle und funktionale Integrität und die Lokalisierung von Proteinen und ist insbesondere unter erhöhten Stressbedingungen, wie sie z. B. während des Hitzeschocks vorliegen, essenziell.^[1] Da Proteininfektionen jedoch auch unter homöostatischen Bedingungen auftreten können, ist eine effiziente PQK unter allen Umweltbedingungen lebensnotwendig. Ein Versagen der PQK führt häufig zur Bildung von Proteinaggregaten, die im Mittelpunkt einer Vielzahl schwerer Erkrankungen wie der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Krankheit stehen.^[2] Darüber hinaus steht die PQK auch im Zusammenhang mit der Virulenz pathogener Bakterien, da die Überlebensrate in Wirtszellen von einer funktionierenden PQK abhängt.^[3] Dementsprechend könnte die selektive Hemmung der PQK in Bakterien eine vielversprechende Strategie für die Entwicklung neuartiger Antibiotika sein.

Die zwei HtrA-Proteasen (Htr = high temperature requirement) DegP und DegS tragen entscheidend zu einer effizienten PQK im bakteriellen Periplasma bei. HtrA-Proteasen unterschiedlicher Organismen sind stark konserviert und sind modular aus einer Chymotrypsin-artigen Protease-domäne und einer oder zwei PDZ-Domänen aufgebaut.^[4]

Ihre proteolytische Aktivität wird durch zelluläre Stress-Signale reguliert, die ein reversibles Anschalten der Proteasen bewirken. Eine Untersuchung solcher Stress-Signale führte zur Aufklärung eines allosterischen Aktivierungsmechanismus bei der HtrA-Protease DegS. Als Aktivierungssignal konnte die Bindung eines falsch lokalisierten Membranproteins der äußeren Zellhülle an die PDZ- und Proteasedomäne von DegS identifiziert werden.^[5] Die Aktivierung von DegS induziert eine proteolytische Signalkaskade, die in der erhöhten Expression von DegP mündet.^[6] Der proteolytische Abbau der fehlgefalteten Proteine im Periplasma wird dann von der Substrat-unspezifischen Protease DegP übernommen.

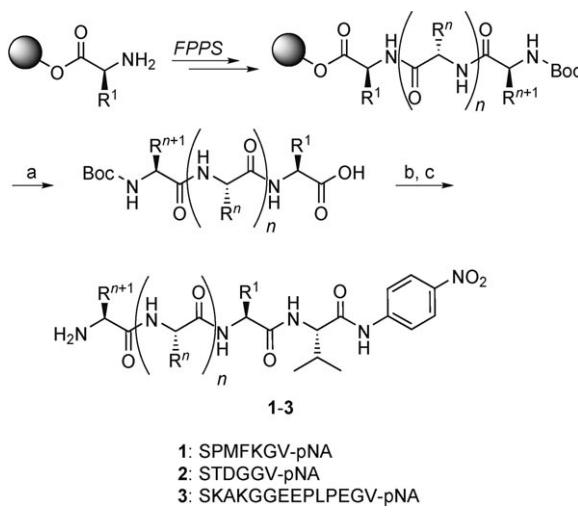
DegP ist aus einer Protease- und zwei PDZ-Domänen aufgebaut und bildet komplexe, multimere Partikel. Es kann sowohl als Chaperon (Proteinreparaturfaktor) wie auch als Protease wirken und schaltet temperaturabhängig zwischen diesen beiden Funktionen um.^[7] Bei niedrigen Temperaturen erfüllt DegP die Funktion eines Chaperons, bei höheren Temperaturen jedoch dominiert die Proteaseaktivität, sodass bei 37°C bereits eine ausgeprägte proteolytische Aktivität vorliegt. Trotz der Aufklärung der molekularen Struktur der Chaperonkonformation von DegP^[8] ist die Regulation der beiden katalytischen Aktivitäten von DegP bisher noch nicht verstanden. Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Fragestellung, ob neben der bereits bekannten temperaturabhängigen Proteaseaktivierung von DegP auch ein zusätzlicher, chemischer Regulationsmechanismus existiert. Da DegP bei 37°C bereits merklich proteolytisch aktiv ist, sollte ein solcher Aktivierungsmechanismus zu einer Verstärkung der temperaturabhängigen Proteolyse führen.

Ein chromogenes Peptidsubstrat ist ein wertvolles Hilfsmittel zum Studium der Proteaseaktivität. Für die pathophysiologisch relevanten HtrA-Proteasen wurden bisher jedoch noch keine solchen Substrate beschrieben, wodurch auch deren weitergehende enzymatische Charakterisierung stark behindert wurde. Um einen Zugang zu einem solchen Substrat zu erhalten, wurden ein Verdau des bekannten DegP-Substrates Citralsynthase und eine Synthese von *para*-Nitroanilin(pNA)-Derivaten der entstehenden Fragmente durchgeführt. Durch 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese auf einem 2-Chlortritylharz, die nach Abspaltung vom Harz vollgeschützte Vorstufenpeptide lieferte, und anschließende Kupplung mit kommerziell erhältlichem H-Val-pNA in Lösung wurden die pNA-Verbindungen **1–3** (Schema 1) erhalten. Als geeignetes Substrat wurde das pNA-Derivat **1** mit der Sequenz SPMFKGV-pNA

[*] Dipl.-Biol. M. Meltzer, Dr. S. Hasenbein, Dipl.-Biol. N. Kucz, Dr. M. Merdanovic, Prof. Dr. M. Ehrmann
Zentrum für Medizinische Biotechnologie
FB Biologie und Geographie
Universität Duisburg-Essen, 45117 Essen (Deutschland)
Fax: (+49) 201-183-3315
E-Mail: michael.ehrmann@uni-due.de
Dipl.-Chem. P. Hauske, Dr. M. Kaiser
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-9742-6479
E-Mail: markus.kaiser@cgc.mpg.de
Dr. S. Grau, Dr. A. Beil, Dr. D. Jones, Prof. Dr. M. Ehrmann
Cardiff School of Biosciences, Cardiff University
Museum Avenue, Cardiff CF10 3US (Großbritannien)
Dr. T. Krojer, Dr. T. Clausen
Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie (IMP)
Dr. Bohr-Gasse 7, 1030 Wien (Österreich)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie (M.E.), dem Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF P17881-B10, T.K.) und dem BBSRC (D.J., M.E.) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Festphasenpeptidsynthese (FPPS) der chromogenen Substrate auf 2-Chlortriptylharz. a) Essigsäure/Trifluoorethanol/Dichlormethan (2:2:6); b) H-Val-pNA-HCl (2 Äquiv.), EDC-HCl (1.5 Äquiv.), HOBr (2 Äquiv.), DIEA (3.5 Äquiv.); c) TFA/H₂O/Ethandithiol/Triisopropylsilan (94:2,5:2,5:1). Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, EDC = N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid, HOBr = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, DIEA = N,N-Diisopropylethylamin, TFA = Trifluoressigsäure.

ermittelt, das kooperativ mit einem $K_{0.5}$ -Wert ($K_{0.5}$: Halbsättigungskonstante der Hill-Gleichung) von 2.7 mM, $v_{max} = 1.28 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_{cat} = 0.56 \text{ s}^{-1}$ und einer Spezifitätskonstante $k_{cat}/K_{0.5} = 0.21 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gespalten wurde, während bei **2** und **3** keine Reaktion stattfand. Durch eine systematische Variierung von pH-Wert, Puffern und Salzen wurden die optimalen Versuchsbedingungen (50 mM NaH₂PO₄-Puffer, pH 8.0) für spätere Protease-Aktivitätstests gefunden (eine detaillierte biochemische Charakterisierung findet sich in den Hintergrundinformationen).

Nach der Entwicklung eines geeigneten Aktivitätstestes konnte nun eine mögliche allosterische Aktivierung von DegP untersucht werden. Hierzu wurde photometrisch der DegP-katalysierte Abbau des pNA-Substrates **1** in Gegenwart von Casein, einem Modellprotein für ein denaturiertes Protein, verfolgt, um zu überprüfen, ob die durch den gleichzeitigen Caseinabbau entstehenden kurzen Fragmente die proteolytische Aktivität von DegP stimulieren. In der Tat wurde eine 2.5-fache Verstärkung beobachtet, was unsere Hypothese einer zusätzlichen allosterischen Aktivierung untermauert. In einem zweiten Versuch wurde deshalb periplasmatische α -Amylase (MalS), ein natürliches DegP-Substrat, verwendet. Bei diesem Versuch induzierten komplett denaturiertes MalS, aber auch kürzere Fragmente und ein C-terminales Fragment von MalS eine Verstärkung der DegP-Proteolyse (Hintergrundinformationen).

Diese Befunde wiesen eindeutig auf eine durch Oligopeptide bewirkte Aktivierung von DegP hin, mit einem möglicherweise ähnlichen Mechanismus wie bei DegS. Durch Kristallstrukturanalyse eines DegS-Aktivator-Komplexes wurde der Aktivierungsmechanismus aufgeklärt: Die aktiverenden Peptide binden an die PDZ-Domäne, wobei die vorletzte Aminosäure X des C-terminalen YXF-Motivs zusätzlich mit einer Schleife der Proteasedomäne wechselwirkt

und so die Protease aktiviert. Die Aktivierung der Protease hängt dabei von den chemischen Eigenschaften von X ab. Dies sollte in analoger Weise für DegP durch Decapeptiderivate der bekannten Stress-Signalsequenz DNRDGN-VYXF untersucht werden. Durch Festphasenpeptidsynthese wurden zehn Peptide hergestellt, die an Position X unterschiedliche Aminosäuren enthielten. Diese zehn sowie drei zusätzliche Decapeptide, die den C-Termini natürlicher Zellhüllenproteine (z.B. dem Außenmembranporin C (OmpC), periplasmatischer alkalischer Phosphatase A (PhoA) und MalS) entsprechen, wurden bezüglich ihres Einflusses auf die proteolytische Aktivierung von DegP getestet. Das C-terminale Fragment von OmpC ist ein bekannter DegS-Aktivator, während der C-Terminus von PhoA als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die proteolytische Aktivität von DegP in Gegenwart der Decapeptide wurde sowohl mit Substrat **1** (Abbildung 1) als auch mit denatu-

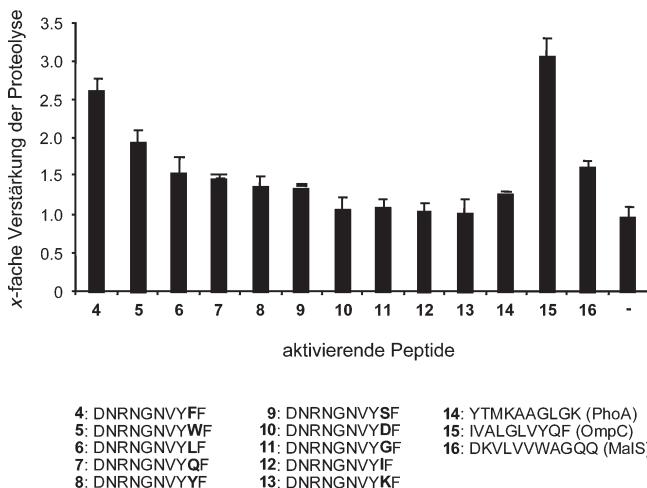


Abbildung 1. Sequenzen der aktivierenden Peptide **4–16** und Säulendiagramm der Proteolyseexperimente unter Verwendung des Substrates **1**. Assay-Bedingungen: 0.5 mM **1**, 50 μM aktivierende Peptide **4–16**, 0.13 μM DegP, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0; die Messergebnisse wurden auf die basale Proteolyseaktivität ohne Zugabe von aktivierenden Peptiden normalisiert. Jede Messung wurde fünfmal mit Doppelproben durchgeführt; die hieraus erhaltenen Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben.

riertem MalS verfolgt, um einen Einfluss des synthetischen Substrates auf die beobachteten Effekte auszuschließen (siehe Hintergrundinformationen). Die Aktivität von DegS wurde unter Verwendung des natürlichen Substrates anti-Sigma-Faktor RseA bestimmt (siehe Hintergrundinformationen). Die Peptide **4** und **5** mit einem C-terminalen YFF- bzw. YWF-Motiv aktivierten DegP ca. 2.5- bzw. 2-fach. Peptid **7** mit der C-terminalen YQF-Sequenz des C-Terminus des natürlichen Stress-Signals OmpC induzierte eine 1.5-fache Aktivierung. Das C-terminale Decapeptid von OmpC (**15**) erwies sich als der beste Aktivator und verstärkte die Proteolyse um den Faktor 3. Die gemessenen Werte deuten auf eine allosterische Aktivierung der Proteaseaktivität von DegP hin. Zusätzlich konnte eine gute Korrelation der Aktivierung von DegP und DegS durch die

Peptide **4–16** festgestellt werden, was für einen auch physiologisch relevanten Regulationsmechanismus spricht.

In einem weiteren Experiment wurden die thermodynamischen Bindungsaaffinitäten des Peptides **4** mit einem aktivierenden YFF-Motiv und des Peptides **6** mit dem schwächer aktivierenden YLF-Motiv durch isotherme Titrationskalorimetrie bestimmt. An die experimentellen Daten ließ sich ein sequenzielles Drei-Bindestellen-Modell anpassen, was eine kooperative Bindung belegt. Für alle drei Bindestellen konnten nur geringe Unterschiede in der Dissoziationskonstante K_d gefunden werden, was die besondere Rolle der chemischen Natur der vorletzten Aminosäure bei der Aktivierung bestätigt (siehe Hintergrundinformationen).

Zwei DegP-Mutanten mit Punktmutationen in der PDZ-Domäne 1 wurden zur Untersuchung der Bindungsstelle der aktivierenden Peptide exprimiert. In der ersten Mutante wurde Arg262, das mit der C-terminalen Carboxygruppe des aktivierenden Peptides wechselwirkt, durch Alanin ersetzt. In der zweiten Mutante wurde Val328 durch Serin ersetzt, wodurch die räumliche Struktur der Bindungsstelle verändert wird.^[8] Durch diese Mutationen wurde jegliche Aktivierung durch aktivierende Peptide inklusive des am stärksten aktivierenden Peptides **15** unterdrückt, sodass die allosterische Aktivierungsstelle eindeutig der PDZ-Domäne 1 zugeordnet werden konnte (Abbildung 2 und Hintergrundinformatio-

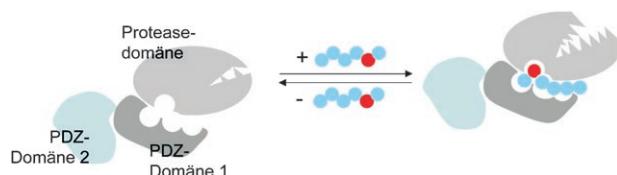


Abbildung 2. Allosterische Aktivierung von DegP. Aktivierende Peptide (blau) binden an die PDZ-Domäne 1. Das Ausmaß der Aktivierung wird von den chemischen Eigenschaften der vorletzten Aminosäure (rot) bestimmt.

nen). Auch durch isotherme Titrationskalorimetrie konnte keinerlei Bindung von **4** an DegP mehr nachgewiesen werden. Zwar bestätigen diese Experimente, dass die PDZ-Domäne 1 eine Aktivierung an die Proteasedomäne vermittelt, allerdings machen die strukturellen Unterschiede zwischen DegS und DegP (z. B. unterschiedliche Oligomerisierungszustände, Aktivierungsdomänen und Sensorschleifen) noch weitere Studien zum besseren Verständnis des Aktivierungsmechanismus notwendig. Des Weiteren zeigen **7** und **15**, die beide das C-terminale YQF-Motiv von OmpC tragen, einen großen Unterschied in ihrem Aktivierungspotenzial. Dies impliziert, dass zwar die letzten drei C-terminalen Aminosäuren essentiell für die Aktivierung sind, dass aber auch weitere Wechselwirkungen innerhalb der Aktivierungssequenz zur Aktivierung beitragen. Die strukturellen Grundlagen dieses Effektes sind zurzeit noch unklar.

In einem abschließenden Experiment wurde der Einfluss aktivierender Peptide auf die bei niedrigen Temperaturen vorliegende Chaperonaktivität untersucht. Hierzu wurden Rückfaltungsexperimente mit MalS und dem aktivierenden Peptid **4** durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen). In

Gegenwart von **4** findet ein erhöhter Abbau bei nur sehr geringer Rückfaltung von MalS statt, was belegt, dass aktivierende Peptide DegP von der Chaperon- in die Proteaseaktivität überführen können; das heißt, dass eine chemisch induzierte Aktivierung einen stärkeren Einfluss auf die Regulation der DegP-Enzymaktivitäten hat als die Temperatur.

Der bakterielle PQK-Faktor DegP wird allosterisch durch Modellpeptide zellulärer Stress-Signale reguliert. Damit wird der bekannte Aktivierung von DegP durch erhöhte Expression aufgrund induzierter Transkription eine zusätzliche allosterische Aktivierung hinzugefügt. Die gleichzeitige allosterische Aktivierung von DegP und DegS trägt im biologischen System zu einer schnellen und robusten Stressantwort bei und ergibt somit eine fein abgestimmte Verstärkung des ursprünglichen Stress-Signals (Abbildung 3). Deshalb sollten

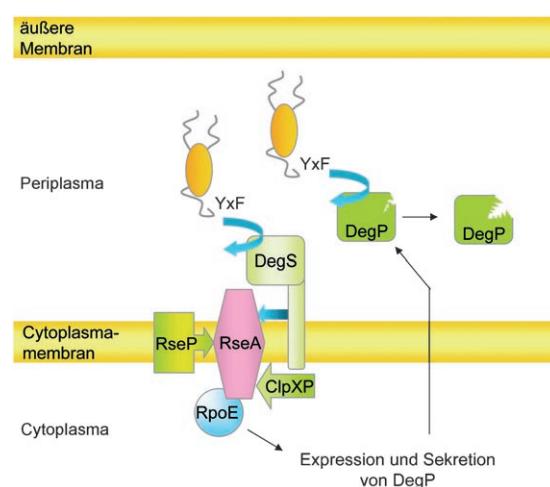


Abbildung 3. Verstärkung der bakteriellen Stressantwort durch die allosterische Aktivierung. DegS detektiert ungefaltete Proteine und initiiert eine proteolytische Signalkaskade, die zur erhöhten Expression von DegP führt. Zusätzlich aktivieren die fehlgefalteten Proteine allosterisch DegP, wodurch eine Verstärkung des ursprünglichen Stress-Signals auftritt.

nichtaktivierende Peptidmimetika, die die allosterische Aktivierungsbindestelle blockieren, eine schwerwiegende Störung der bakteriellen PQK bewirken und somit eine neue Möglichkeit zur Entwicklung von antimikrobiellen Wirkstoffen bieten. Darüber hinaus postulieren wir, dass sämtliche HtrA-Proteasen über einen allosterischen Aktivierungsmechanismus verfügen, in Einklang mit Peptidbindungsstudien an den humanen HtrA-Proteasen HtrA1 und HtrA2.^[9] Bisher wurden noch keine peptidischen Stress-Signale für humane HtrA-Proteasen identifiziert, allerdings könnte dieser konservierte Aktivierungsmechanismus für ein besseres Verständnis von Proteinfaltungskrankheiten relevant sein, da HtrA1 als ein Risikofaktor für amyloide Erkrankungen, z. B. der altersbedingten Makuladegeneration, beschrieben wurde.^[10]

Eingegangen am 21. Juli 2007,
veränderte Fassung am 19. September 2007
Online veröffentlicht am 3. Januar 2008

Stichwörter: Allosterie · Proteasen · Proteine · Proteinqualitätskontrolle · Stress-Signale

- [1] B. Bukau, J. Weissman, A. Horwich, *Cell* **2006**, *125*, 443–451.
- [2] D. J. Selkoe, *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 1054–1061.
- [3] T. L. Raivio, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 1119–1128.
- [4] T. Clausen, C. Southan, M. Ehrmann, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 443–455.
- [5] a) H. Hasselblatt, R. Kurzbauer, C. Wilken, T. Krojer, J. Sawa, J. Kurt, R. Kirk, S. Hasenbein, M. Ehrmann, T. Clausen, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2659–2670; b) C. Wilken, K. Kitzing, R. Kurzbauer, M. Ehrmann, T. Clausen, *Cell* **2004**, *117*, 483–494; c) N. P. Walsh, B. M. Alba, B. Bose, C. A. Gross, R. T. Sauer, *Cell* **2003**, *113*, 61–71.
- [6] S. Hasenbein, M. Merdanovic, M. Ehrmann, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 6–10.
- [7] C. Spiess, A. Beil, M. Ehrmann, *Cell* **1999**, *97*, 339–347.
- [8] T. Krojer, M. Garrido-Franco, R. Huber, M. Ehrmann, T. Clausen, *Nature* **2002**, *416*, 455–459.
- [9] a) Murwantoko, M. Yano, Y. Ueta, A. Murasaki, H. Kanda, C. Oka, M. Kawaichi, *Biochem. J.* **2004**, *381*, 895–904; b) S. Gupta, R. Singh, P. Datta, Z. Zhang, C. Orr, Z. Lu, G. DuBois, A. S. Zervos, M. H. Meisler, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45844–45854; c) L. M. Martins, B. E. Turk, V. Cowling, A. Borg, E. T. Jarrell, L. C. Cantley, J. Downward, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49417–49427.
- [10] a) Z. Yang, N. J. Camp, H. Sun, Z. Tong, D. Gibbs, D. J. Cameron, H. Chen, Y. Zhao, E. Pearson, X. Li, J. Chien, A. Dewan, J. Harmon, P. S. Bernstein, V. Shridhar, N. A. Zabriskie, J. Hoh, K. Howes, K. Zhang, *Science* **2006**, *314*, 992–993; b) A. Dewan, M. Liu, S. Hartman, S. S. Zhang, D. T. Liu, C. Zhao, P. O. Tam, W. M. Chan, D. S. Lam, M. Snyder, C. Barnstable, C. P. Pang, J. Hoh, *Science* **2006**, *314*, 989–992.