

VAAM-Promotionspreisträger 2004

Strukturelle und funktionelle Analyse des Trigger Faktors, eines ribosomenassoziierten Chaperons in *Escherichia coli*

Holger Patzelt, EXIST-HighTEPP, Universität Bamberg

► Nach ihrer Synthese am Ribosom müssen Proteine in ihre native dreidimensionale Struktur falten, um ihre zelluläre Funktion erfüllen zu können. Dieser komplizierte Prozess wird in vielen Fällen von molekularen Chaperonen unterstützt, die die Gefahr einer Proteinmissfaltung und -aggregation reduzieren.

In *Escherichia coli* schützt das ribosomenassoziierte Chaperon Trigger Faktor (TF) neusynthetisierte Polypeptide vor Missfaltung. Dabei kooperiert TF mit dem zytosolischen Hsp70-Chaperon DnaK. Während *E. coli*-Zellen auf eines der beiden Chaperone verzichten können, führt ihr simultaner Verlust zu massiver Proteinaggregation und zum Zelltod. Neben seiner Chaperon-Aktivität katalysiert TF *in vitro* die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung, den ratenlimitierenden Faltungsschritt mancher Proteine (PPIase-Aktivität).

Unterschiedliche experimentelle Ansätze zeigten, dass TF *in vitro* einem Drei-Zustands-Gleichgewicht folgt. Monomerer TF bindet mit einer Dissoziationskonstante von 1,2 μM an Ribosomen. In nicht-komplexierter Form liegt TF in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor (Dissoziationskonstante 18 μM). Unter zellulären Konzentrationen (TF 50 μM , Ribosomen 20 μM) sind somit circa 39 Prozent des TF ein Dimer, 26 Prozent freies Monomer und 35 Prozent ribosomenassoziiertes Monomer. Neun von zehn Ribosomen enthalten TF^[1].

Die Lokalisierung des TF an der großen ribosomalen Untereinheit wurde mit Quervernetzungsexperimenten untersucht.

Mittels Massenspektrometrie wurden die ribosomalen Proteine L23 und L29 als Quervernetzungspartner des TF identifiziert. Beide liegen in unmittelbarer Nachbarschaft des ribosomalen Tunnelausgangs und positionieren TF optimal für die Interaktion mit Polypeptiden *in statu nascendi*. TF's Ribosomenassoziation wird hauptsächlich über ein konserviertes Glutamat in L23 vermittelt und ist essentiell für seine Chaperon-Aktivität *in vivo* (Abb. 1A)^[2].

Zentral für ein erweitertes Verständnis der TF-Funktion war die Bestimmung seines Substraterkennungsmotivs. Eine statistische Analyse der Bindeeigenschaften von über 2800 membrangebundenen Peptiden zeigte, dass TF in Substraten acht aufeinanderfolgende Aminosäuren, die vor allem aromatische und positiv geladene Reste enthalten, bindet. Interessanterweise erkennt TF keine Proline, obwohl er eine PPIase ist. Dennoch vermittelt seine PPIase-Domäne die Bindspezifität. Ein Homologie-Modell der Domäne erklärt dieses Phänomen: Das katalytische Zentrum besteht aus einem Kranz aromatischer Aminosäuren, der von negativ geladenen Aminosäuren flankiert wird (Abb. 1B). Diese Oberfläche ermöglicht die Bindung aromatenreicher, positiv geladener Aminosäuresequenzen in Substraten^[3]. Neue Studien zeigen, dass die enzymatische PPIase-Aktivität des TF für seine Funktion als naszierende Polypeptide bindendes Chaperon in *E. coli* nicht erforderlich ist. Ein Vergleich der Bindspezifitäten von TF und DnaK gibt darüber Aufschluss, warum sich beide Chaperone bei der Faltung

neu synthetisierter Polypeptide ergänzen können: Sie besitzen ähnliche Bindemotive und deshalb eine überlappende Substratpopulation.

Künftige Forschungsarbeiten werden sich vor allem auf den molekularen Mechanismus konzentrieren, mittels dessen TF die Faltung neu synthetisierter Proteine unterstützt. Zentral wird hierbei die Bestimmung seiner atomaren Struktur sein. Noch ist unklar, wie die TF-vermittelte Proteinfaltung mit anderen an die Proteinsynthese gekoppelten Prozessen, zum Beispiel dem ko-translationalen Proteinexport, koordiniert ist.

Literatur

- [1] Patzelt, H., Kramer, G., Rauch, T., Schönfeld, H. J., Bukau, B. & Deuerling, E. (2002) *Biol. Chem.* 383, 1611–1619.
- [2] Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwülbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E. & Bukau, B. (2002) *Nature* 419, 171–174.
- [3] Patzelt, H., Rudiger, S., Brehmer, D., Kramer, G., Vorderwülbecke, S., Schaffitzel, E., Waitz, A., Hesterkamp, T., Dong, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. & Deuerling, E. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14244–14249.

Korrespondenzadresse:

Dr. Holger Patzelt
EXIST-HighTEPP – Universität Bamberg
Jäckstr. 3
D-96052 Bamberg
Tel: 0951-863-2799
Fax: 0951-863-1198
holger.patzelt@exist-hightepp.de



Holger Patzelt

(Jahrgang 1974) studierte an der Technischen Universität München (1994–96) und an der Universität Karlsruhe (1996–99) Chemie mit Schwerpunkt Physikalische und Theoretische Chemie. Im Rahmen der Diplomarbeit arbeitete er am Lehrstuhl für Theoretische

Chemie (Prof. Reinhard Ahlrichs) über Dichtefunktionaltheorie. Seine Promotionsarbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Bukau an der Universität Freiburg i. Br. und am Zentrum für molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH). Zur Zeit arbeitet Dr. Holger Patzelt an einem interdisziplinären Forschungsprojekt (EXIST-HighTEPP) der Universität Bamberg über die Fusion risikokapitalfinanzierter Biotechnologieunternehmen.

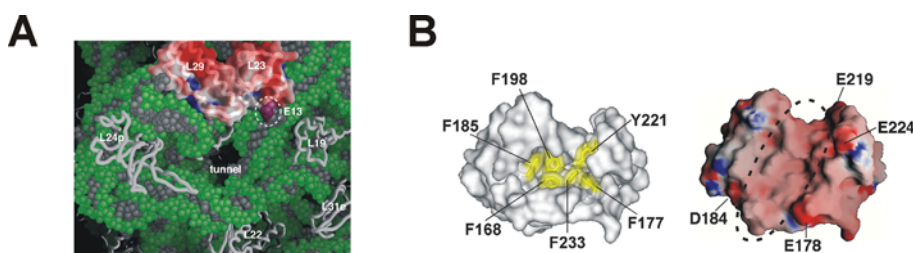


Abb. 1: (A) Lokalisation der ribosomalen Proteine L23 und L29 am ribosomalen Exit-Tunnel für Polypeptide. Der Kreis markiert den für die Trigger Faktor-Bindung essentiellen Glutamat-Rest. (B) Homologiemodell der PPIase-Domäne. Aromatische Reste sind Gelb dargestellt (links), negative geladene Rot und positiv geladene Blau (rechts). Die gestrichelte Linie markiert die Substratbindestelle.