

Prolin als molekularer Schalter

Barbara Eckert und Franz-Xaver Schmid

Laboratorium für Biochemie und Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften, Universität Bayreuth

Cis-trans-Isomerisierungen von Prolylpeptidbindungen sind intrinsisch langsame Reaktionen, die die Faltungsraten vieler Proteine bestimmen. Untersuchungen auf zellulärer Ebene deuten an, dass Prolylisomerisierungen zudem als molekulare Schalter verwendet werden, um die Funktion von Proteinen zu regulieren. Filamentöse Bakteriophagen verwenden ein Prolin als molekulare Zeitschaltuhr und steuern damit die Infektion von *E. coli*. Die *cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro₂₁₃ im Gelenk zwischen den beiden aminoterminalen Domänen des Gen-3-Proteins schaltet den infektiösen Zustand der Phagen an; die Lebensdauer dieses Zustands wird durch die Rate der Rückreaktion *trans*→*cis* bestimmt.

► Die Peptidbindungen in Proteinen sind planar, und die flankierenden C^α-Atome sind daher entweder *trans* ($\omega = 180^\circ$) oder *cis* ($\omega = 0^\circ$) zueinander angeordnet. Für alle Peptidbindungen, außer denjenigen vor Prolin, ist der *trans*-Zustand aus sterischen Gründen sehr viel günstiger als der *cis*-Zustand, und dem entsprechend sind Nichtprolyl-*cis*-Peptidbindungen in gefalteten Proteinen äußerst selten.

Im Gegensatz dazu kommen Peptidbindungen vor Prolin (*Prolylpeptidbindungen*, Abb. 1) häufig in *cis* vor. Hier steht das C^α-Atom der Aminosäure vor Prolin in beiden isomeren Formen in *cis* zu einem C-Atom des Prolins (C^α oder C^δ, Abb. 1), und daher unterscheiden sich die freien Enthalpien von *cis*- und *trans*-Isomer nur geringfügig. In kurzen Peptiden treten beide Formen auf, wobei der *cis*-Anteil bei etwa 10 bis 30 % liegt, abhängig von der Aminosäure vor dem Prolin. Da die Aktivierungsenergie für die Drehung um die Peptidbindung aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters sehr hoch ist (etwa 80 kJ/mol), sind Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen ausgesprochen langsame Reaktionen. Bei 25 °C liegen die Zeitkonstanten im Bereich von 10–100 s^[1–3].

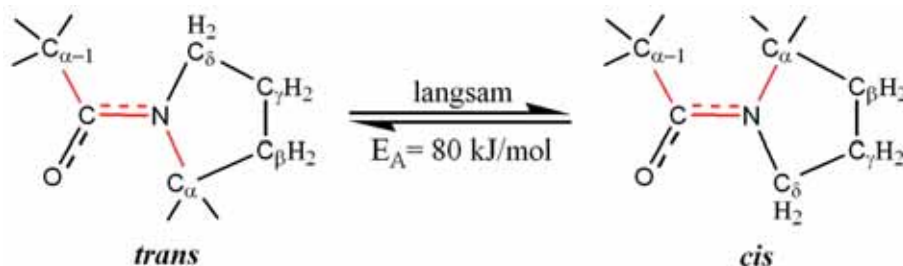


Abb. 1: Isomerisierung zwischen der *cis*- und *trans*-Form einer Prolylpeptidbindung.

Prolylisomerisierung als langsamer Schritt in der Proteinfaltung

In gefalteten Proteinen wird der Konformationszustand der Prolylpeptidbindungen normalerweise durch die native Struktur festgelegt. Er ist also in allen Molekülen gleich, entweder *cis* oder *trans*. Tatsächlich sind etwa 5–7 % aller Prolylpeptidbindungen in gefalteten Proteinen in *cis*, und 43 % von 1435 nicht-redundanten Strukturen in der Proteindatenbank enthalten mindestens ein *cis*-Prolin^[3].

Garel und Baldwin entdeckten 1973, dass entfaltete Ribonuklease A aus einer Mischung von schnell faltenden U_F- und langsam faltenden U_S-Molekülen besteht^[4]. Nur zwei Jahre später schlug Brandts in seiner Prolinhypothese vor, dass sich die U_F- und U_S-Moleküle im Isomerenzustand einer oder mehrerer Prolylpeptidbindungen unterscheiden^[5]. Mittlerweile wurden prolinlimitierte langsame Faltungsreaktionen bei einer Vielzahl von Proteinen gefunden, und es steht außer Frage, dass Prolylisomerisierungen eine überragende Bedeutung als langsame Faltungsschritte haben^[2, 6]. Kleine Proteine können extrem schnell falten, oft innerhalb weniger Millisekunden, wenn die Proline in der nativen Konformation vorliegen. Enthält die Proteinkette jedoch nicht-native Prolinisolomere (insbesondere *trans*-Isomere solcher Proline, die im nativen Zustand *cis* sind), so ist die Faltung durch die Kopplung mit der *trans*→*cis*-Prolylisomerisierung oft bis in den Zeitbereich von Minuten oder gar Stunden verlangsamt^[2].

Brandts hatte ursprünglich angenommen, dass Proline im nicht-nativen Isomerenzustand die Faltung zu Beginn blockieren. Heute ist klar, dass Faltung und Prolyli-

merisierung eng miteinander gekoppelt sind, und die konformationelle Faltung kann schon beginnen wenn einzelne Proline noch in ihrem nicht-nativen Isomerenzustand vorliegen. Für eine erfolgreiche Faltung in die native Konformation sind allerdings die korrekten Prolinisolomere notwendig. Daher werden insbesondere die letzten Schritte der Faltung durch die Kopplung mit der Prolylisomerisierung verlangsamt.

Prolylisomerasen

Schon bald nachdem Brandts die Prolinhypothese zur Erklärung langsamer Faltungsreaktionen vorgeschlagen hatte, wurde spekuliert, ob es Enzyme geben könnte, die die Prolylisomerisierung katalysieren. Die Suche nach einer derartigen Prolylisomeraseaktivität war allerdings zunächst an fehlenden Enzymtests gescheitert. Dies änderte sich als es Gunter Fischer und seinen Mitarbeitern 1984 gelang, einen Prolylisomerase-Test zu entwickeln, der auf der Konformationsspezifität von Chymotrypsin beruht^[7]. Chymotrypsin spaltet die chromogene Reportergruppe des Tetrapeptids Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid nur ab, wenn die Ala-Pro-Bindung *trans* ist. Mit einem auf diesem Prinzip beruhenden gekoppelten Enzymtest konnten sie aus Schweinenieren die erste Prolylisomerase isolieren. 1989 stellte sich nach der Sequenzierung heraus, dass diese mit Cyclophilin identisch ist. Dieses Protein war ebenfalls 1984 entdeckt worden, und zwar als Bindungsprotein für das Immunsuppressivum Cyclosporin A^[8].

Mit FKBP12, dem Bindungsprotein für das Immunsuppressivum FK-506, wurde 1989 der erste Vertreter der zweiten Familie

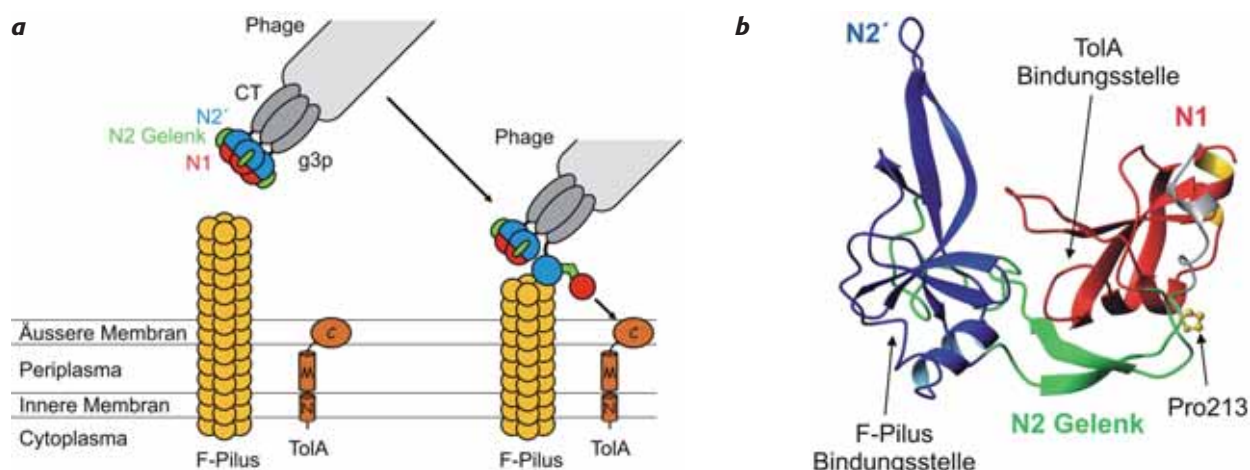


Abb. 2: Die Rolle des Gen-3-Proteins (g3p) bei der Infektion von *E. coli* durch den Phagen fd. (a) Die ersten Schritte der Infektion: Nachdem die N2-Domäne an die Spitze des F-Pilus gebunden hat, löst sich die Interaktion zwischen N1 und N2. Die N1-Domäne kann nun an die C-terminale Domäne des TolA-Rezeptors binden. (b) Raumstruktur der N1-N2 Domänen des Gen-3-Proteins: Domäne N1 (rot), Domäne N2 (blau), N2 Gelenk (grün) und Pro₂₁₃ (gelb). Die Abbildung wurde unter Verwendung des PDB-Eintrags 2G3P erstellt.

von Prolylisomerasen gefunden^[9], 1994 gefolgt von der dritten Familie, den Parvulinen^[10]. Prolylisomerasen sind weit verbreitet, als einzelne Proteine und als Domänen größerer Proteine.

Falls die *de novo*-Faltung in der Zelle durch Prolylisomerasen katalysiert wird, sollten diese idealerweise am Ort der Proteinsynthese vorkommen. Tatsächlich wurde 1995 der Triggerfaktor als ribosomenassoziierte Prolylisomerase identifiziert^[11]. Er katalysiert prolinlimitierte Faltungsreaktionen *in vitro* sehr gut, weil er zusätzlich zu seiner Prolylisomeraseaktivität als Chaperon aktiv ist und so mit hoher Affinität an nicht gefaltete bzw. nicht vollständig gefaltete Proteine binden kann^[12]. Der Triggerfaktor bindet am Ribosom unmittelbar an der Austrittsstelle für die naszierende Proteinkette und ist damit für eine Aufgabe bei der *de novo*-Proteinfaltung optimal positioniert^[13].

Prolylisomerisierung in gefalteten Proteinen

Wie schon ausgeführt, liegen in gefalteten Proteinen die Prolylpeptidbindungen in einer einheitlichen Konformation vor, *cis* oder *trans*. Von dieser Regel gibt es jedoch Ausnahmen. Mit hochauflösender NMR-Spektroskopie konnte für einige Proteine gezeigt werden, dass sie konformationell heterogen sind und als Mischung von Prolylisomeren vorliegen^[2]. Die einfachste Annahme ist, dass Proline mit einer *cis/trans*-Heterogenität in flexiblen oder lokal entfaltenen Bereichen liegen, sodass die Kopplung mit der konformationellen Faltung zu schwach ist, um einen der beiden Isomerenzustände eindeutig zu fixieren. Eine Heterogenität an Prolylresten könnte aber auch auf eine funktionell wichtige Isomerisierung hindeuten, die

z. B. als langsamer molekularer Schalter funktioniert und möglicherweise durch Prolylisomerasen in der Schaltfrequenz gesteuert wird. Allerdings gibt es bislang keine auf molekularer Ebene charakterisierten Prolin-schalter.

Ein derartiger Schalter wird für die SH2-Domäne der Tyrosinkinase Itk diskutiert. Diese Domäne liegt in zwei Konformationen vor, die sich im *cis/trans*-Zustand von Pro₂₈₇ unterscheiden. Die Isomerisierung an Pro₂₈₇ ist durch Cyclophilin katalysierbar, und sie verändert die Affinität für ein phosphotyrosinreiches Peptid^[14].

Die Prolylisomerase Pin1 katalysiert die Isomerisierung von Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Prolyl-Bindungen, und es gibt Evidenz auf zellulärer Ebene, dass Pin1 phosphorylierungsabhängige Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung als Regulationsprinzip verwendet^[15]. Pin1 scheint katalytisch zu wirken, und daher kann die essenzielle Funktion des Pin1-Homologen in Hefe selbst durch wenige Kopien dieses Proteins aufrecht erhalten werden^[16].

Prolin als molekulare Zeitschaltuhr bei der Phageninfektion

Bei der Infektion von *E. coli* durch den filamentösen Phagen fd wirkt ein Prolin im Gen-3-Protein des Phagen als molekulare Zeitschaltuhr^[17]. Das Gen-3-Protein kommt in drei bis fünf Kopien an der Spitze des Phagen vor und spielt eine zentrale Rolle bei der Infektion (Abb. 2a). Mit seiner C-terminalen Domäne ist es in der Phagenhülle verankert, die Domänen N1 und N2 ragen nach außen und sind im Ruhezustand des Phagen fest miteinander assoziiert. In diesem Zustand ist das Gen-3-Protein sehr stabil, aber der Phage ist nicht infektiös. Im Verlauf der In-

fektion interagieren die Domänen N2 und N1 nacheinander mit der Zielzelle. Zunächst bindet die N2-Domäne mit ihrer Außenseite an die Spitze des bakteriellen F-Pilus (Abb. 2b). Diese Bindung aktiviert das Gen-3-Protein, indem es die feste Domänenassoziation löst und so die Bindungsstelle für TolA zugänglich macht, den eigentlichen Phagenrezeptor an der Zelloberfläche. Diese Bindungsstelle für TolA ist auf der N1-Domäne lokalisiert, und zwar an der Interaktionsfläche zwischen N1 und N2. Sie ist daher in der geschlossenen Ruheform des Gen-3-Proteins unzugänglich^[18]. Im Verlauf der Phageninfektion muss die geöffnete, bindungsaktive Form so lange erhalten bleiben, bis die N1-Domäne mit TolA interagieren kann. Dies wird durch ein *cis*-Prolin des Gen-3-Proteins gewährleistet.

Im Verlauf der *in vitro*-Rückfaltung des Gen-3-Proteins falten die einzelnen Domänen N1 und N2 sehr schnell, ihre Assoziation im letzten Schritt ist hingegen mit einer Zeitkonstante von 6.200 s (bei 25° C) äußerst langsam. Die Geschwindigkeit dieser Domänenassoziation wird durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung an Pro₂₁₃ bestimmt, das im Gelenkbereich zwischen den Domänen N1 und N2 lokalisiert ist^[19].

Diese außergewöhnlich langsame, prolinlimitierte Domänenassoziation ist nicht nur eine interessante *in vitro*-Beobachtung, sondern sie steuert auch die Funktion des Gen-3-Proteins bei der Phageninfektion. Die Isomerisierung von Pro₂₁₃ wirkt dabei als Schalter und als Timer. Mit einem *cis*-Pro₂₁₃ steht der Schalter auf „aus“, und in diesem Zustand sind die Domänen N1 und N2 des Gen-3-Proteins fest aneinander gebunden. Der Phage ist so robust und stabil, aber nicht infektiös (Abb. 3). Die initiale Bindung der N2-Domäne an den Pilus vermittelt über ei-

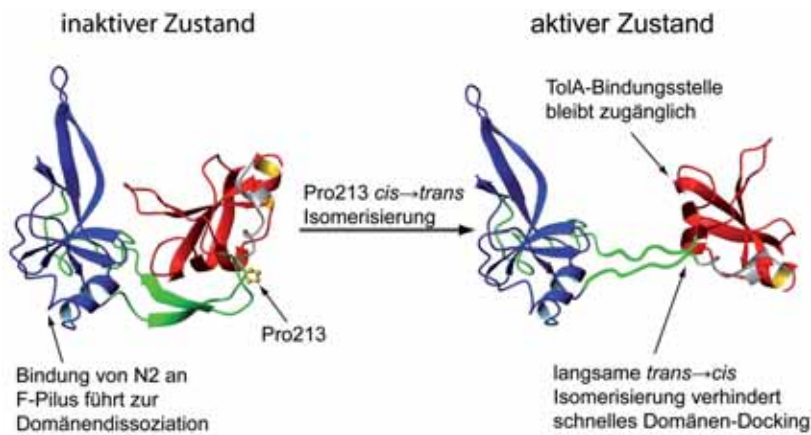


Abb. 3: Modell für die Rolle der cis→trans-Isomerisierung an Pro₂₁₃ und einer lokalen Entfaltung im Gelenkbereich bei der Aktivierung des Gen-3-Proteins. Die Farbgebung ist wie in Abbildung 2.

nen bislang noch unbekanntem Weg ein Signal zur Domänengrenzfläche und schwächt so die Interaktion zwischen N1 und N2. Als Folge dieser partiellen Entfaltung springt Pro₂₁₃ im Gelenkbereich wie eine Feder aus dem gespannten *cis*-Zustand in den stabileren *trans*-Zustand (Abb. 3). Der Schalter ist so zum aktiven, infektiösen Zustand hin umgelegt, und jetzt fungiert das *trans*-Pro₂₁₃ als Timer. Die Rückisomerisierung von *trans* nach *cis* ist mit einer Zeitkonstante von 6.200 s sehr langsam. Damit wird gewährleistet, dass das Gen-3-Protein so lange geöffnet und partiell entfaltet bleibt, bis die N1-Domäne ihren Interaktionspartner ToIA gefunden hat.

Die Schaltrate und damit die Lebensdauer des angeschalteten Zustands ist direkt in der lokalen Aminosäuresequenz um Pro₂₁₃ (Gln₂₁₂-Pro₂₁₃-Pro₂₁₄) kodiert. Ein Peptid mit dieser Sequenz zeigt die gleiche langsame Isomerisierung wie Pro₂₁₃ im intakten Gen-3-Protein.

Dieses einfache Beispiel zeigt, dass die intrinsisch langsame Prolylisomerisierung nicht nur ein wichtiges Phänomen bei der Faltung von Proteinen ist. Sie kann vielmehr als Zeitgeber eingesetzt werden, um Prozesse zu steuern, die im Zeitbereich von Sekunden bis Stunden ablaufen. Der sehr einfache Aufbau der Prolin-Zeitschaltuhr der filamentösen Phagen reflektiert vermutlich die sehr eingeschränkten Möglichkeiten für die Regulation von Vorgängen außerhalb der Zelle. Die Schaltraten von potenziellen intrazellulären Prolin-Timern könnten durch Wechselwirkungen mit anderen Molekülen, durch kovalente Modifikationen, und natürlich durch Prolylisomerasen zusätzlich reguliert werden.

Danksagung

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danken wir für Hilfe und Diskussionen, der

Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

Literatur

[1] Fischer, G. (2000): Chemical aspects of peptide bond isomerisation. *Chemical Society Reviews* 29: 119–127.
 [2] Balbach, J., and Schmid, F. X. (2000): Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding. In: Pain, R. H. (Hrsg.) *Mechanisms of Protein Folding*. Oxford University Press, Oxford: 212–237.
 [3] Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M., and Fischer, G. (1998): Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J. Mol. Biol.* 279: 449–460.
 [4] Garel, J. R., and Baldwin, R. L. (1973): Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3347–3351.
 [5] Brandts, J. F., Halvorson, H. R., and Brennan, M. (1975): Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* 14: 4953–4963.
 [6] Schmid, F. X. (2002): Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* 59: 243–282.
 [7] Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984): Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed. Biochim. Acta* 43: 1101–1111.
 [8] Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337: 476–478.
 [9] Siekierka, J. J., Hung, S. H. Y., Poe, M., Lin, C. S., and Sigal, N. H. (1989): A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341: 755–757.
 [10] Rahfeld, J.-U., Schierhorn, A., Mann, K.-H., and Fischer, G. (1994b): A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 343: 65–69.
 [11] Stoller, G., Rücknagel, K. P., Nierhaus, K., Schmid, F. X., Fischer, G., and Rahfeld, J.-U. (1995): Identification of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase bound to the *Escherichia coli* ribosome as the trigger factor. *EMBO J.* 14: 4939–4948.
 [12] Scholz, C., Stoller, G., Zarnit, T., Fischer, G., and Schmid, F. X. (1997): Cooperation of enzymatic

and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO J.* 16: 54–58.

[13] Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E., and Ban, N. (2004): Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* 431: 590–596.
 [14] Andreotti, A. H. (2003): Native state proline isomerization: An intrinsic molecular switch. *Biochemistry* 42: 9515–9524.
 [15] Lu, K. P., Liou, Y. C., and Zhou, X. Z. (2002): Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* 12: 164–172.
 [16] Gemmill, T. R., Wu, X., and Hanes, S. D. (2005): Vanishingly low levels of Ess1 prolyl-isomerase activity are sufficient for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280: 15510–15517.
 [17] Eckert, B., Martin, A., Balbach, J., and Schmid, F. X. (2005): Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 619–623.
 [18] Lubkowsky, J., Hennecke, F., Plückthun, A., and Wlodawer, A. (1999): Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of ToIA. *Structure* 7: 711–722.
 [19] Martin, A., and Schmid, F. X. (2003): A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd. *J. Mol. Biol.* 331: 1131–1140.

Korrespondenzadresse:

Prof. Franz-Xaver Schmid
Laboratorium für Biochemie
Universität Bayreuth
D-95440 Bayreuth
Tel.: 0921-553660
Fax: 0921-553661
fx.schmid@uni-bayreuth.de



Franz-Xaver Schmid

1969–1974 Studium der Chemie in Berlin und Regensburg; 1977 Dissertation in Biochemie



Barbara Eckert

an der Universität Regensburg (Prof. R. Jaenicke); 1977–1978 Post-Doc an der Stanford University (Prof. R. L. Baldwin); 1984 Habilitation an der Universität Regensburg; seit 1988 Professor für Biochemie an der Universität Bayreuth; Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina.

1997–2002 Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth, seit 2002 Doktorandin im Laboratorium für Biochemie (Arbeitsgruppe F. X. Schmid) an der Universität Bayreuth.