

**Charakterisierung des Triggerfaktors - einer ribosomenassoziierten
Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase aus *Escherichia coli***



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Gerlind Stoller

geb. 12.01.1971 in Markranstädt

Halle/S., März 1998

Gutachter: 1. Prof. Dr. G. Fischer
2. Prof. Dr. F. X. Schmid
3. Prof. Dr. K. H. Nierhaus

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

-4-MA	-4-Methoxyanilid
-4-NA	-4-Nitroanilid
70S _{reass}	aus den isolierten 50S und 30S Untereinheiten reassozierte 70S Ribosomen
AS	Aminosäure(n)
AU	Absorptionseinheit
BE	Beschleunigungseinheit
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
Chaps	3-[(3-cholamidopropyl)di-methylammonio]-1-propansulfonat
Ches	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FKBP	FK506-bindendes Protein
hCyp18	humanes cytosolisches Cyclophilin (18 kDa)
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-hydroxypropansulfonsäure
hFKBP12	humanes cytosolisches FKBP (12 kDa)
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
M _r	molekulare Masse
NTA	Nitrilo-tri-essigsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RCM-T1	reduzierte und <i>S</i> -carboxymethylierte Variante der RNase T1 (Ser ⁵⁴ Gly/Pro ⁵⁵ Asn)
RNC	Komplex aus Ribosomen mit naszierenden Proteinketten
RP-HPLC	"Reversed Phase" Hochdruckflüssigkeitschromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
Suc-	Succinyl-
TF	Triggerfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
<i>tig</i>	Bezeichnung des Gens für Triggerfaktor
TOF	Flugzeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
Xaa	proteinogene Aminosäure

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1. Zelluläre Proteinfaltung und ihre Unterstützung	1
1.1.1. <i>de novo</i> Proteinfaltung	1
1.1.2. Translation und Konformation der naszierenden Polypeptidkette	3
1.1.3. Zelluläre Faktoren der Proteinbiogenese	6
1.2. <i>Cis/trans</i> Isomerisierung und ihre Katalyse durch PPIasen	10
1.2.1. Die -Xaa-Pro-Peptidbindung	10
1.2.2. PPIasen	13
1.2.2.1. Einteilung von PPIasen	13
1.2.2.2. Physiologische Funktionen von PPIasen	14
1.3. Problemstellung	16
2. MATERIALIEN UND METHODEN	18
2.1. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien	18
2.2. Verzeichnis der verwendeten <i>E.coli</i> Stämme	19
2.3. Proteinreinigung	19
2.3.1. Isolierung des Triggerfaktors aus <i>E.coli</i>	19
2.3.2. Reinigung der rekombinanten Triggerfaktorfragmente	20
2.3.3. Reinigung von rekombinanten hFKBP12-Varianten	21
2.4. Präparation ribosomaler Partikel aus <i>E.coli</i>	22
2.5. LiCl-Behandlung von ribosomalen 50S Untereinheiten	24
2.6. Immunchemische Methoden	24
2.6.1. Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper	24
2.6.2. Westernblot-Analyse	26
2.6.3. Immunpräzipitation	26
2.7. Proteinchemische Analyse	26
2.7.1. SDS-PAGE	26
2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.7.3. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	27
2.7.3.1. RP-HPLC	27
2.7.3.2. N-terminale Sequenzierung	27
2.7.4. Bestimmung der molekularen Masse	27
2.7.4.1. MALDI-TOF-Massenspektrometrie	28
2.7.4.2. ESI-Massenspektrometrie	28
2.7.5. Fern-UV CD-Spektroskopie	28
2.8. Bestimmung der PPIase-Aktivität	28
2.8.1. Proteasegekoppelter PPIase-Aktivitätstest (Standard)	28
2.8.2. Ungekoppelter PPIase-Aktivitätstest	30
2.8.3. Proteinfaltungstest	31
2.9. Proteolytische Stabilitätsuntersuchungen	32
2.9.1. Limitierte Proteolyse - Stabilitätstest verschiedener PPIase-Varianten	32
2.9.2. Limitierte Proteolyse des Triggerfaktors durch Subtilisin und Isolation eines PPIase-aktiven Fragmentes	32
2.10. Bindungsuntersuchungen von Triggerfaktorvarianten an ribosomale Fraktionen	33

3. ERGEBNISSE	34
3.1. Nachweis der PPIase-Aktivität des <i>E.coli</i> Triggerfaktors	34
3.1.1. Isolierung des Triggerfaktors aus <i>E.coli</i> Zellsat	34
3.1.2. Immunpräzipitation	36
3.2. Untersuchungen zur ribosomenassoziierten PPIase-Aktivität	37
3.2.1. Detektion von PPIase-Aktivität am <i>E.coli</i> Ribosom	37
3.2.2. Identifizierung der ribosomenassoziierten PPIase als Triggerfaktor	39
3.2.2.1. Westernblot-Analyse	39
3.2.2.2. N-terminale Sequenzierung	40
3.2.2.3. Salzvermittelte Dissoziation von 50S Untereinheiten	40
3.3. Untersuchungen zur Ribosomenassoziation des Triggerfaktors	42
3.3.1. Bindung des Triggerfaktors an "tightly coupled" 70S und 70S _{reass} Ribosomen <i>in vitro</i>	42
3.3.2. Stöchiometrieuntersuchung	47
3.3.3. Bindung des Triggerfaktors an die 50S Untereinheit	47
3.4. Untersuchungen zu enzymkinetischen Eigenschaften des <i>E.coli</i> Triggerfaktors	48
3.4.1. Enzymatische Aktivität des Triggerfaktors gegenüber Tetrapeptid-4-Nitroaniliden	48
3.4.2. Enzymatische Aktivität des Triggerfaktors bei der Proteinfaltung	50
3.5. Untersuchungen zur Stabilität des Triggerfaktors mittels limitierter Proteolyse	52
3.5.1. Proteolytische Stabilität des Triggerfaktors gegenüber verschiedenen Serinproteasen	52
3.5.2. Isolierung des PPIase-aktiven Triggerfaktorfragmentes	54
3.6. Überexpression des PPIase-aktiven Fragmentes des Triggerfaktors	57
3.7. Untersuchungen zur Domänenorganisation des Triggerfaktors	58
3.7.1. Katalytische Aktivität der zentralen Domäne TF ¹⁴⁸⁻²⁴⁹	58
3.7.2. Expression und Reinigung verschiedener Domänenkonstrukte des Triggerfaktors	60
3.7.3. Bestimmung der ribosomalen Bindungsdomäne des Triggerfaktors	61
3.8. Analyse der PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors durch ortsspezifische Mutagenese	65
3.8.1. Sequenzanalyse	65
3.8.2. Expression und Reinigung der Proteinvarianten	66
3.8.3. Stabilität und Struktur der Proteinvarianten	68
3.8.4. Enzymatische Eigenschaften der Proteinvarianten	70
4. DISKUSSION	73
4.1. Triggerfaktor als ribosomenassoziierte PPIase	73
4.2. Triggerfaktor als modulares Protein	76
4.3. Triggerfaktor als Katalysator der Proteinfaltung	82
4.4. Triggerfaktor als ein entfernt verwandtes FKBP	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	93
6. LITERATUR	95

1. Einleitung

1.1. Zelluläre Proteinfaltung und ihre Unterstützung

1.1.1. *de novo* Proteinfaltung

Proteine sind als Arbeitsmoleküle der Zelle wahrscheinlich an allen biologischen Prozessen beteiligt. Sie bilden nicht nur die Struktur der Zelle, sondern sind auch die hauptsächlichsten Katalysatoren chemischer Reaktionen, wobei sie mit extrem hoher Effizienz und Spezifität wirken. Diese Biopolymere können jedoch nur funktional aktiv sein, wenn sie gefaltet sind, d.h. eine spezifische dreidimensionale Struktur eingenommen haben. Die Entdeckung des genetischen Codes löste das Rätsel, wie die Information, die in der Sequenz der DNA enthalten ist, in die Primärstruktur der Proteine übersetzt wird. Am Ort der Proteinbiosynthese, dem Ribosom, erfolgt durch das Zusammenspiel von verschiedenen RNA- und Proteinmolekülen unter Energieverbrauch die sukzessive Knüpfung der Peptidbindungen, so daß im Ergebnis die Polypeptidkette entsteht. Die Sequenz der Aminosäuren scheint dabei wie ein zweiter Code zu sein, der die Information für die korrekte räumliche Anordnung der Polypeptidkette enthält, und unter entsprechenden Bedingungen ist die Faltung eines Proteins ein spontaner Prozeß (1, 2).

Während im Verlauf von Rückfaltungsreaktionen *in vitro* jedoch oft Aggregatbildung und damit verbunden eine verringerte Faltungsausbeute beobachtet wurden (3), scheinen Proteinfaltungsereignisse *in vivo* sehr effizient und meistens schnell zu sein (4). Auf zellulärer Ebene wurde für einen *E. coli* Stamm unter definierten Wachstumsbedingungen eine Mindestsyntheserate von 60 000 Polypeptidketten pro Minute abgeleitet (5). Entsprechend der Wachstumsrate und auch *in vitro* wird bezogen auf ein Ribosom die Geschwindigkeit der Translation mit 10 bis 22 Aminosäureresten pro Sekunde angenommen (6-8). Ausgehend von Experimenten zur *de novo* Faltung in verschiedenen Translationssystemen wurde vermutet, daß schon während der vom N- zum C-Terminus gerichteten Verlängerung der Polypeptidkette durch die Peptidyltransferasereaktion am Ribosom die Faltung in die dreidimensionale Struktur beginnt (9-18). Dieser als cotranslationale Faltung bezeichnete Prozeß kann anhand von strukturellen und funktionellen Eigenschaften der wachsenden Peptidkette wie enzymatischer Aktivität, Bildung korrekter Disulfidbrücken, proteolytische Stabilität, Oligomerisierung, Bindung von Liganden bzw. Bildung von korrekten Epitopen für die Bindung strukturspezifischer Antikörper beschrieben werden (4, 9-19). So wurde aus dem Vergleich der Bildung von enzymatisch aktiver bakterieller Luciferase während der Synthese

in einem zellfreien *E. coli* System mit der Renaturierung des Enzyms durch Verdünnung aus einem denaturierenden Agens in Anwesenheit der Komponenten des zellfreien Systems eine Beteiligung cotranslationaler Faltungsprozesse am Ribosom abgeleitet (12). Ebenso wurde die innerhalb von Sekunden erreichte enzymatische Aktivität von Leuchtkäfer-Luciferase nach der *in vitro* Proteinsynthese gegenüber der um zwei Größenordnungen verlangsamten Renaturierung als Beitrag durch cotranslationale Faltung interpretiert (10, 13). Für die Ausbildung von Tertiärstruktur in einer ribosomengebundenen Form der naszierenden Proteinketten sprechen auch Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität der um 44 C-terminale Aminosäurereste verlängerten Leuchtkäfer-Luciferase in einem Weizenkeimtranslationssystem (14) und der C-terminal um 23 Aminosäurereste verlängerten Rhodanese in einem zellfreien *E. coli* Transkriptions/Translationssystem (15). Die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur während der Translation wurde auch anhand der Bindung von Häm an naszierende Ketten von Globin in einem zellfreien Weizenkeimsystem gezeigt (16). Die Bindung des Liganden erfolgte bereits, als das Translationsprodukt erst aus 86 Aminosäureresten der α -Globinkette bestand, obwohl an der Ausbildung des Häm/Globin-Komplexes auch Kontakte von sieben weiteren, mehr C-terminal in der Globinsequenz lokalisierten Aminosäurereste beteiligt sind (16).

Eine andere Studie betrachtet den Aspekt, daß es möglicherweise Unterschiede in Bezug auf den Mechanismus der Faltung neu synthetisierter Proteine zwischen pro- und eukaryotischen Organismen gibt (20). Ausgangspunkt dieser Analyse war die Sicht auf die Evolution der Eukaryoten und der damit verbundenen raschen Veränderung der Diversität und strukturellen Komplexität der Proteine durch Fusion von Genen und Austausch von codierenden DNA-Sequenzen ("Exon-shuffling"). Die daraus resultierenden Domänen vieler eukaryotischer Proteine sollten unabhängig voneinander ihre dreidimensionale Struktur ausbilden können. Während diese Vermutung experimentell durch die sequentielle Faltung des Modellproteins während der Synthese im eukaryotischen System bestätigt werden konnte, wurde für das prokaryotische System ein posttranslationaler Mechanismus postuliert, da die Synthese des gleichen Modellproteins zur Aggregation aufgrund unkorrekt gefalteter Proteinketten führte. Auch die vollständige Ausbildung der nativen Struktur der beiden Domänen des bakteriellen Transkriptionsfaktors OmpR schien im *E. coli* Translationssystem erst nach der Biosynthese zu erfolgen, im Gegensatz zur beobachteten cotranslationalen Faltung im eukaryotischen Retikulozytenlysat (20).

Ausgehend von einer vergleichenden Betrachtung zur Faltung verschiedener Polypeptide

wurde ebenso diskutiert, daß bei der *de novo* Faltung eines Proteins sowohl co- als auch posttranslationale Faltungsmechanismen eine Rolle spielen (18). Diese Hypothese beinhaltet, daß die Faltung der N-terminalen Region ein vektorieller Prozeß ist, der durch die fortlaufende C-terminale Verlängerung beeinflusst wird (18). Daß der Faltungsprozeß eines Proteins möglicherweise erst nach beendeter Elongation am Ribosom abgeschlossen wird, wurde aus Ergebnissen zur Faltung von Ribonuklease A und des C-terminal um sechs Aminosäurereste verkürzten Derivates abgeleitet. Für die Ausbildung der biologisch aktiven Konformation des Enzyms ist das Vorhandensein des intakten C-Terminus erforderlich (18). Analog wurden auch die Ergebnisse zur Faltung von fünf verschiedenen, C-terminal verkürzten Fragmenten der Nuklease R aus *Staphylococcus aureus* interpretiert, wobei mit wachsender Gesamtkettenlänge fast immer eine Zunahme des Gehaltes an geordneter Sekundärstruktur dieser Fragmente beobachtet wurde (21). Jedoch wurde bei der ribosomalen Synthese von Ricin A in einem *E. coli* Translationssystem gezeigt, daß ein C-terminal um fünf Aminosäurereste verkürztes Fragment im Vergleich zum Wildtypprotein keine Unterschiede hinsichtlich der synthetisierten Menge und der biologischen Aktivität aufwies, während eine Verkürzung um 20 N-terminale Aminosäurereste sowohl eine reduzierte Syntheseausbeute als auch den Verlust der Aktivität verursachte (22).

1.1.2. Translation und Konformation der naszierenden Polypeptidkette

Die Ausbildung der speziellen Konformation einer Polypeptidkette resultiert aus der Rotation von - zumindest formal gesehen - Einfachbindungen, die das kovalente Grundgerüst der Peptidkette bilden und durch die Torsionswinkel ϕ (C_{α} -N), ψ (C_{α} -C) und ω (C-N) beschrieben werden (ABB 1-1). Die theoretisch freie Drehbarkeit um die C_{α} -N- und C_{α} -C-Einfachbindungen ist jedoch eingeschränkt, und die erlaubten Werte der Torsionswinkel ϕ und ψ der Hauptkette des Polypeptids sind aus der Ramachandran-Auftragung zugänglich (23). Die Peptidbindung weist aufgrund der Elektronendelokalisation innerhalb der [C(=O)-NH]-Bindung einen partiellen Doppelbindungscharakter auf. Die Rotation um diese Bindung ist daher im Vergleich zu einer einfachen C-N-Bindung eingeschränkt und erlaubt prinzipiell zwei Konformationen. Bezogen auf die Anordnung der benachbarten C_{α} -Atome wird die *cis*-Konformation ($\omega = 0^{\circ}$) von der *trans*-Konformation ($\omega = 180^{\circ}$) unterschieden. Aufgrund der sterischen Hinderung von Substituenten benachbarter C_{α} -Atome in der *cis*-Konformation kommt in Peptiden und Proteinen hauptsächlich das *trans*-Konformer vor, und nur mit einer Häufigkeit von 0.03 % treten sekundäre Amidbindungen von 399 Proteinstrukturen in der *cis*-

Konformation auf (24). Die Energiedifferenz zwischen beiden Konformeren wurde mit $\Delta G_0 > 8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ postuliert (23) und ist z.B. mit $\Delta G_0 = 13.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Ala-Tyr-Isomerisierung in einem Dipeptid bestimmt worden (25).

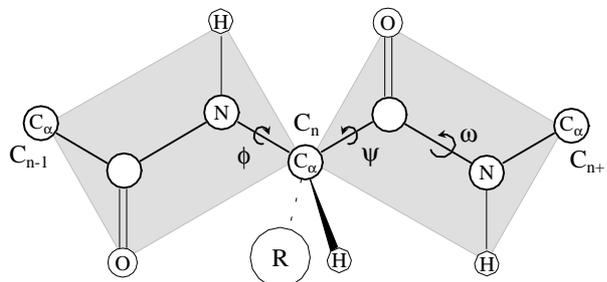


ABB. 1-1. Flexibilität der Bindungen des Peptidrückrates. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einer Polypeptidkette mit den Rotationswinkeln.

Die vorgegebenen lokalen Zwänge (wie die erlaubten Torsionswinkel ϕ und ψ sowie die rigide, planare Struktur der Peptidbindung) auf die Freiheiten der Drehung der formalen Einfachbindungen der Polypeptidkette sind auch bei der Bildung der Peptidbindung im Zuge eines Elongationszyklusses am Ribosom zu betrachten. Über die initiale Konformation der wachsenden Polypeptidkette gibt es in diesem Zusammenhang allerdings nur Vermutungen. Eine theoretische Analyse der ribosomalen Peptidyltransferasereaktion wurde mit dem Ziel durchgeführt, einen einheitlichen Reaktionsmechanismus abzuleiten, der die Reaktion der 20 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren und somit die Bildung der möglichen 400 Dipeptide aus stereochemischer Sicht erlaubt (26). Basierend auf einer solchen Analyse wurde eine einzige theoretisch mögliche Orientierung berechnet, deren Torsionswinkel (mit $\phi = \psi = -60^\circ \pm 30^\circ$) nahe den Werten der idealen Pauling-Corey- α -Helix liegen (26). Darüber hinaus wurde angenommen, daß die rechtsgängige α -Helix aufgrund ihrer Eigenschaften (thermodynamische Stabilität, Packungsdichte, mögliche Anzahl an Wasserstoffbrücken) eine rigide, kompakte und deshalb günstige Konformation der wachsenden Peptidkette ist, die im Verlauf der Kettenverlängerung durch den postulierten internen Tunnel der 50S Untereinheit (27, 28) bewegt wird und somit eine uniforme Ausgangskonformation für die cotranslationale Faltung der Polypeptide bildet (26, 29). In Hinsicht auf die Rate des Faltungsprozesses wurde diskutiert, daß ein höherer Energiegehalt dieser α -helikalen Ausgangskonformation im Vergleich zu einer zufälligen Anordnung der Polypeptidkette Bedeutung haben könnte (29). Aus geometrischen und mechanistischen Gründen wurde ein weiteres stabiles Sekundärstrukturelement von Proteinen, die β -Faltblattstruktur, nahezu ausgeschlossen (29).

Für eine α -helikale bzw. offenkettige, gestreckte Form ($\phi = \psi = 180^\circ$) der naszierenden Polypeptidkette könnten einige experimentelle Daten sprechen, welche aus den Abstandsparametern abgeleitet wurden, die durch lokal definierte enzymkatalysierte (z.B. Proteolyse oder N-Glykosylierung) bzw. chemische Reaktionen (z.B. photochemisches oder bifunktionales Vernetzen der Reaktionspartner) sowie durch kryo-elektronenmikroskopische oder immunchemische Methoden gegeben sind (28, 30-35). Dabei werden im allgemeinen die Werte für die Ausdehnung pro Aminosäurerest mit 3.6 \AA in der gestreckten bzw. 1.5 \AA in einer α -helikalen Konformation angenommen. Die ungeachtet der verwendeten Protease, des Modellsubstrates bzw. Ribosomensystems bekannte proteolytische Unempfindlichkeit eines C-terminalen Segments der naszierenden Ketten bis zu einer Länge von 30 bis 40 Aminosäureresten bildete die Grundlage für die Hypothese, daß dieser Bereich der wachsenden Peptidkette während der Translation durch das Ribosom von der Umgebung abgeschirmt ist (33-35). Basierend auf einem mittels kryo-elektronenmikroskopischen Methoden erstellten Modell des *E. coli* 70S Ribosoms bis zu einer Auflösung von 25 \AA wurde die Länge des vermuteten ribosomalen Tunnels der 50S Untereinheit mit 85 \AA ermittelt (31). Im Zusammenhang mit den erwähnten Untersuchungen zur proteolytischen Stabilität wurde so eine α -helikale Konformation der naszierenden Polypeptidkette als wahrscheinlich angenommen (31).

Bei der ribosomalen Elongation ist die Bewegung der involvierten Komponenten (tRNA-Moleküle, mRNA, ribosomale Untereinheiten und naszierende Proteinkette) substantiell, und das Ribosom wird in der Literatur auch als makromolekulare Maschine betrachtet (36). Während für die Translokation der tRNA gekoppelt *via* Anticodon/Codonpaarung mit der mRNA viele fundamentierte Vermutungen existieren, gibt es über die Art und Weise der Bewegung der naszierenden Peptidkette im Verlauf eines Elongationszyklusses nur sehr wenige, spekulative Anhaltspunkte (26, 29, 36-39). Das Modell zum Translationsmechanismus von Lim und Spirin (26, 29) beinhaltet die simultane Bewegung der naszierenden Kette zusammen mit der tRNA und dem Anticodon/Codonkomplex entlang einer Translokationsachse, die mit der Achse der α -Helix der naszierende Peptidkette übereinstimmt, so daß eine zirkulare Bewegung der Peptidkette und gleichzeitiger Verlängerung um 1.5 \AA resultiert (29). Aus den Ergebnissen von Energietransfermessungen zwischen fluoreszenzmarkierten tRNA-Molekülen und Komponenten der ribosomalen Untereinheiten vor und nach der Transpeptidierung wurde abgeleitet, daß sich im Verlauf der Peptidbindungsknüpfung nicht die naszierende Peptidkette, sondern hauptsächlich die tRNA

bewegt (39). Formal betrachtet könnte das auch bedeuten, daß eine hypothetische α -Helix entlang ihrer Achse sukzessive aus dem Ribosom geschoben wird.

Ein zweiter, interessanter Fakt der theoretischen Betrachtung ist die resultierende Isomerspezifität des ribosomalen Peptidyltransferasezentrums. Unter der konsequenten Anwendung der Theorie der stereoelektronischen Kontrolle nach Deslongchamps (40) wurde für alle 400 möglichen Reaktionsprodukte die *trans*-Konformation der neu geknüpften Peptidbindung abgeleitet (26). Für diese, theoretische Lösung des Konformationsproblems von Lim und Spirin waren eine Reihe von Annahmen und Einschränkungen notwendig (26, 41), und in einem anderen theoretischem Ansatz wurden durch geringfügig veränderte Ausgangsparameter (bzgl. der Esterbindungswinkel an den 3' Riboseringen der beladenen tRNA-Moleküle) alternative, zugelassene Winkelkombinationen erhalten, die ebenfalls ein Translationsprodukt mit α -helikaler Konformation ergaben (42). Allerdings existieren keine Experimente, die auch nur Hinweise über die tatsächliche Initialkonformation der Peptidbindungen während ihrer Synthese am Ribosom enthalten.

Betrachtet man den konformereren Status der Peptidbindung im Kontext zur Biosynthese unter einem energetischen Aspekt, sollte die im Vergleich zur *trans*-Konformation energetisch höhere *cis*-Konformation der Peptidbindung als uniforme Ausgangskonformation günstig sein und würde so, durch Einkopplung von Energie (und prinzipiell wird im Verlauf der Translation ein hohes Energieniveau erzeugt) im Gegensatz zum Faltungsverlauf bei der Renaturierung von Proteinen, den Faltungsprozeß beeinflussen. Unabhängig vom konformereren Ausgangsstatus der Peptidbindungen ("all-*cis*"- ODER "all-*trans*"-Konformation) ist aber in Betracht zu ziehen, daß im gefalteten Protein die Konformation der Peptidbindung, vor allem bei einer Beteiligung von Prolin (siehe Abschn. 1.2.1.), durchaus von der durch die Peptidyltransferasereaktion generierten Initialkonformation abweichen kann.

1.1.3. Zelluläre Faktoren der Proteinbiogenese

Ein weiteres Phänomen der Proteinfaltung *in vivo* im Gegensatz zu der *in vitro* ist die erstaunlich hohe Effizienz mit der dieser Prozeß innerhalb der zellulären Umgebung und damit in Gegenwart hoher Proteinkonzentrationen abläuft. Gerade während der *de novo* Proteinfaltung sollte es bedeutend sein, daß die Bildung von nicht-produktiven Faltungsintermediaten und -aggregaten, vermittelt durch die Interaktion transient exponierter hydrophober Oberflächen angesichts der hohen Konzentration naszierender Proteinketten, verhindert wird (43, 44). Um solche Aggregationen und unkorrekte Faltung von Polypeptiden

in der Zelle zu vermeiden, scheint es spezialisierte Proteine zu geben, die in verschiedener Art und Weise beim Faltungsprozeß assistieren. Dabei haben diese Proteine keinen Einfluß auf die native Struktur, sondern wirken durch Katalyse des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes auf die Zeitdauer der Faltung bzw. durch transiente Bindung von Faltungsintermediaten der entfalteten Kette auf die Ausbeute nativer Proteinmoleküle. Entsprechend ihrer Funktion unterscheidet man Proteinfaltungskatalysatoren wie Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (EC 5.2.1.8.) und Protein-Disulfid-Isomerasen (EC 5.3.4.1.) von Chaperonen (4, 45-48).

In der Nachbarschaft von nascierenden Proteinketten wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die eine mutmaßliche Funktion als Faltungshelfer oder bei der Sortierung und dem Transport der für den Export bestimmten Polypeptide haben. Aus der Vielzahl biochemischer und genetischer Untersuchungen ist es hinreichend etabliert, daß Chaperone mit neu synthetisierten Polypeptidketten interagieren, indem sie entsprechend ihrer Definition an die Polypeptide binden, diese gegenüber der zellulären Umgebung abschirmen und somit die Bildung von Aggregaten verhindern (4, 10, 49-54). Dabei ist der Funktionsmechanismus und das Wechselspiel der Faltungshelferproteine untereinander noch relativ unklar, und es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert (49, 52, 55).

Eine interessante Alternative zur Chaperon-vermittelten Faltung scheint die mögliche faltungsunterstützende Aktivität des Ribosoms selbst bzw. der großen ribosomalen Untereinheit zu sein. So wurde *in vitro* die Reaktivierung von denaturierter Lactatdehydrogenase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase sowie Rhodanese durch Ribosomen bzw. der 23S rRNA der 50S Untereinheit in Abhängigkeit von der Konformation der ribosomalen Komponenten beobachtet (56-58).

Neben Proteinen, die wahrscheinlich die Faltung der synthetisierten Polypeptide unterstützen, gibt es eine Reihe von Faktoren, die bestimmte Muster bzw. Leitsequenzen der nascierenden Ketten von sekretorischen Proteinen erkennen, binden und damit eine Art Sortierung in Bezug auf den Bestimmungsort der Proteine einleiten. In eukaryotischen Zellen spielt vor allem die Interaktion des Signalerkennungspartikels (SRP) mit der Signalsequenz von nascierenden Polypeptiden beim Erkennen von sekretorischen Proteinen und anschließendem cotranslationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) eine Rolle (59, 60). Daneben wurde ein zweiter ribosomenassoziierter Faktor gefunden, der an die nascierenden Polypeptidketten bindet, sofern sie keine vollständige Signalsequenz exponieren (61). Der als NAC ("nascent-polypeptide-associated complex") bezeichnete Proteinkomplex ist ein

Heterodimer bestehend aus den 33 kDa (α NAC) und 21 kDa (β NAC) Untereinheiten (61), der eine zum SRP komplementäre Spezifität zu besitzen scheint (61-63).

In *E. coli* gibt es verschiedene Wege für die Translokation von sekretorischen Proteinen. In Homologie zum eukaryotischen SRP-System sind ein Nukleoproteinkomplex, der aus der 4.5S RNA und dem p48 Protein (auch als Ffh bezeichnet) besteht, sowie ein Rezeptor (FtsY) vorhanden (64-66). Das *E. coli* SRP interagiert bevorzugt mit hydrophoben Signalsequenzen integraler Membranproteine, so daß es wahrscheinlich bei der Translokation und Membraninsertion von diesen Proteinen eine Rolle spielt (67, 68). Neben der SRP-abhängigen Translokation sekretorischer Proteine gibt es in Prokaryoten einen zweiten Exportweg, der in Abhängigkeit vom tetrameren SecB funktioniert. Es wird davon ausgegangen, daß SecB in einer späten cotranslationalen oder frühen posttranslationalen Phase an Polypeptidketten der Vorläuferformen von Proteinen der äußeren Membran sowie des Periplasmas bindet und eine verfrühte Faltung oder Aggregation verhindert (69). Die Bindung von SecB scheint dabei nicht spezifisch an die Signalsequenzen zu erfolgen (70). Vielmehr wurde SecB in Assoziation mit ungefalteten Polypeptidketten während der Elongation am Ribosom oder *in vitro* mit denaturierten Proteinen beobachtet, die eine Mindestlänge von 150 Aminosäureresten haben (70, 71).

Bei der Untersuchung der Interaktion von *E. coli* SRP mit einer Reihe von nascierenden Polypeptidketten verschiedener sekretorischer Proteine in einem *in vitro* Translationssystem wurde zusätzlich zum p48 Protein Triggerfaktor* als Bindungspartner identifiziert (67). Die Erstbeschreibung des Triggerfaktors führt weiter zurück. Bei der Suche nach Komponenten der Exportmaschinerie von *E. coli* wurde ein 60 kDa Protein entdeckt, das die translokationskompetente Form von proOmpA, der Vorläuferform des OmpA (outer membrane protein A) induziert bzw. stabilisiert (72-75). Entsprechend dieser beobachteten Aktivität wurde das Protein als Triggerfaktor bezeichnet. Durch nachfolgende genetische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß Triggerfaktor für die Sekretion von Proteinen nicht essentiell ist (76), obwohl andererseits eine mögliche regulatorische Funktion bei der Proteintranslokation durch Inhibierung des SecB/SecA-abhängigen Exportweges diskutiert wurde (77).

* Innerhalb der vorliegenden Arbeit wird der Ausdruck Triggerfaktor stets für das Protein aus *E. coli* verwendet. Andernfalls wird der Organismus, aus dem das Protein stammt, mit angegeben.

Triggerfaktor gehörte ebenfalls zu den Komponenten, die mit nascierenden Polypeptidketten von β -Galactosidase wechselwirkten (78). Bei solchen Untersuchungen, die auf dem photochemischen Vernetzen der nascierenden Proteinketten mit assoziierten Proteinen beruhen, konnte keine spezifische Affinität des Triggerfaktors für sekretorische oder cytoplasmatische Proteine beobachtet werden (67, 78). Zunächst wurde durch Nutzung eines heterologen Systems, bestehend aus den eukaryotischen Komplexen der Ribosomen mit nascierenden Ketten (RNC) und *E. coli* Cytoplasma, eine Kompetition von Triggerfaktor und SRP beim chemischen Vernetzen mit nascierenden Polypeptidketten beobachtet. Durch die Anwendung eines homologen *E. coli* Translationssystems und bifunktionaler Vernetzungsreagenzien wurde diese jedoch wieder ausgeschlossen (68).

Triggerfaktor wurde erneut "entdeckt", als Goldberg und Mitarbeiter untersuchten, ob Chaperone beim schnellen proteolytischen Abbau von Proteinen eine generelle Rolle spielen (79). Der Abbau eines Modellproteins in *E. coli* durch die proteolytische Komponente des ClpX-Systems, ClpP, wurde durch den oligomeren Doppelringkomplex GroEL stimuliert, wobei die Komplexbildung mit GroEL geschwindigkeitsbestimmend war (79). Im Ergebnis einer Suche nach weiteren beteiligten Komponenten wurde Triggerfaktor identifiziert. Dabei konnte die physische Interaktion von GroEL und Triggerfaktor gezeigt werden, und der isolierte Komplex aus beiden Proteinen wies das Verhältnis von einem Triggerfaktormolekül zu GroEL-14mer auf (80). Durch eine Erhöhung des zellulären Triggerfaktorgehaltes wurde die Geschwindigkeit des Proteinabbaus wesentlich beschleunigt (80). Diese Überexpression des Triggerfaktors bewirkte eine verstärkte Komplexbildung von GroEL mit verschiedenen denaturierten Polypeptiden (81). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für Triggerfaktor eine regulatorische Rolle bei der GroEL-Funktion vorgeschlagen.

Interessanterweise wurde in Untersuchungen zur Regulation des zellulären Triggerfaktorgehaltes bei verschiedenen Temperaturen festgestellt, daß eine verstärkte Expression des Proteins bei geringeren Temperaturen auftritt (82). Die Überlebensfähigkeit von *E. coli* bei tiefen Temperaturen schien dabei sogar abhängig von der zellulären Konzentration des Triggerfaktors zu sein, da ein erhöhter Triggerfaktorgehalt ein verlängertes Überleben von *E. coli* Zellen, die bei 4 °C inkubiert wurden, bewirkte. Eine Rolle des Triggerfaktors beim Schutz gegen tiefere Temperaturen wurde daraus postuliert (82).

1.2. *Cis/trans*-Isomerisierung und ihre Katalyse durch PPIasen

1.2.1. Die -Xaa-Pro-Peptidbindung

Eine Heterogenität in ungefalteten Proteinen wurde 1973 durch Garel und Baldwin (83) beschrieben, die beobachteten, daß bei der Rückfaltung von Ribonuklease A (RNase A) schnell und langsam faltende Moleküle existieren. Als eine molekulare Ursache wurde zwei Jahre später die *cis/trans*-Isomerisierung von -Xaa-Pro-Peptidbindungen vorgeschlagen (84). Die Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Prolyl-Bindung (-Xaa-Pro-) nimmt im Vergleich zu "normalen" Peptidbindungen [-C(=O)-NH-] aus sterischen Gründen eine Sonderstellung ein. Durch den zyklischen Charakter der Iminosäure Prolin kommt es zur Aufhebung der freien Drehbarkeit um die N-C_α-Bindung (beschrieben durch den Torsionswinkel ϕ), so daß sich die Differenz der Energien im Grundzustand zwischen der *cis*- und der *trans*-Konformation verkleinert. Im Gegensatz zur "normalen" Peptidbindung kommt deshalb neben der energetisch günstigeren *trans*-Konformation auch zu einem merklichen Anteil die entsprechende *cis*-Konformation im Gleichgewicht vor (ABB. 1-2).

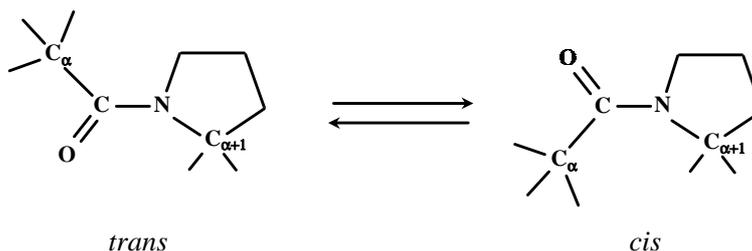


ABB. 1-2. *Cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung.

In Abhängigkeit von der flankierenden Aminosäure N- und C-terminal zum Prolin wurde in Oligopeptiden ein *cis*-Gehalt von 6-38 % gefunden (85-89). Während in einem ungefalteten Protein mit n Prolinresten prinzipiell 2ⁿ Isomere im Gleichgewicht (entsprechend den Verhältnissen in Oligopeptiden) existieren können, wird nach der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur das energetisch günstigere Isomer "eingefroren". Es gibt einige Sonderfälle, bei denen im nativen Zustand der Proteine ein *cis/trans*-Gleichgewicht beobachtet wurde (90-93). Abgesehen von solchen Ausnahmen wurde mit einer Häufigkeit von 4.8 % aller -Xaa-Pro-Peptidbindungen, deren Konformation durch Strukturuntersuchungen bekannt und in einer Datenbank zugänglich ist, das *cis*-Isomer im nativen Zustand der Proteine berechnet (89).

Prolin hat bei der Strukturausbildung von Proteinen eine Sonderstellung. Da das Amidproton

durch eine CH₂-Gruppe ersetzt ist, kann Prolin nicht als Wasserstoffbrückendonator fungieren, und das führt neben der sterischen Hinderung zu dem bekannten Effekt der Unterbrechung von Sekundärstrukturelementen wie der α -Helix ("Helix-Breaker"). Ein relativ hoher Anteil von Prolin kommt jedoch innerhalb von Transmembranhelices vor, und es wurde vermutet, daß dies eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen könnte (94, 95). Diese mögliche Regelfunktion ist verursacht durch *cis/trans*-Isomerisierung von -Xaa-Pro-Peptidbindungen und der resultierenden räumlichen Umordnung von benachbarten Polypeptidkettensegmenten. In ABB. 1-3 ist der Einfluß der *cis/trans*-Isomerisierung auf die Anordnung benachbarter Kettensegmente anhand der β -Kette des humanen Choriogonadotropins illustriert. Für diese Polypeptidkette existieren zwei Kristallstrukturen, die sich vor allem im Konformerzustand der -Leu-Pro⁵⁰-Bindung unterscheiden (ABB. 1-3).

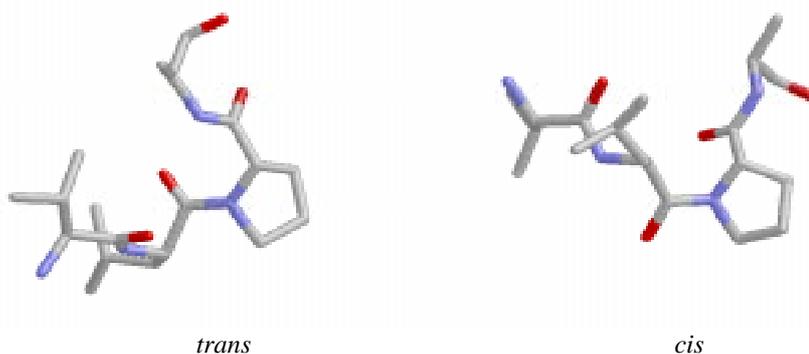


ABB. 1-3. Konformation der -Leu-Pro⁵⁰-Peptidbindung im humanen Choriogonadotropin. Dargestellt ist der Ausschnitt Val⁴⁸-Ala⁵¹ der β -Kette. Verwendet wurden die Daten der Brookhaven-Datenbank (1HCN, 96; 1HRP, 97)

Die für die *cis/trans*-Isomerisierung vorgeschlagene Rolle als molekularer Schalter (46) erlangt dadurch Bedeutung, daß es konformerspezifische Reaktionen gibt, in deren Folge es in der zellulären Umgebung vorübergehend zu einer Abweichung des thermodynamischen *cis/trans*-Gleichgewichts kommen kann. Dabei handelt es sich um fundamentale biochemische Prozesse wie z.B. Proteinbiosynthese, Rezeptor-Ligand-Erkennung, Membrantransport sowie proteolytische Prozessierung. Aus den bereits erwähnten Untersuchungen zur stereoelektronischen Kontrolle der Peptidyltransferasereaktion am Ribosom (Abschn. 1.1.2.) wird für die Peptidbindungen der nascierenden Polypeptidkette eine "all-*trans*"-Konformation diskutiert (26). Ausgehend davon wären bei der *de novo* Faltung *trans* \rightarrow *cis* Umwandlungen für Proteine zu betrachten, die eine *cis*-Xaa-Pro-Bindung in ihrem nativen Zustand aufweisen.

Eine *trans*-Spezifität wurde für den Dipeptidtransporter von Epithelzellen der Dünndarmwand festgestellt (98). Möglicherweise steht diese Konformerspezifität in Verbindung mit anderen Prozessen, bei denen molekulare Erkennung biologischer Partner durch *cis/trans*-Isomerisierung beeinflusst wird. So wurde auch für Proteasen bisher immer eine *trans*-spezifische Hydrolyse der entsprechenden Oligopeptidderivate *in vitro* und *ex vivo* beobachtet (46, 99-101).

Da die aus dem partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung resultierende Rotationsbarriere von 85 kJ/mol relativ hoch ist, sind *cis/trans*-Isomerisierungen der Prolylbindung¹ langsame Reaktionen mit beobachteten Zeitkonstanten von zehn bis mehreren hundert Sekunden bei 25 °C (85-88). Das könnte biologische Bedeutung erlangen, da in den erwähnten konformerspezifischen Prozessen möglicherweise eine Geschwindigkeitslimitierung durch die Prolylisomerisierung² auftritt.

Die Beteiligung der *cis/trans*-Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist *in vitro* für Faltungsvorgänge inzwischen gut etabliert (102) und eine entsprechende Rolle bei der *in vivo* Faltung (z.B. *de novo*) wurde häufig diskutiert (47, 103-105). Biologisch signifikant könnte die durch diese Konformationsumwandlungen hervorgerufene Bildung von langlebigen Faltungsintermediaten sein (105), die neben der möglichen Gefahr der Aggregation die Geschwindigkeit der Faltung herabsetzt. Da die Rate der zellulären Faltungsreaktionen trotz der scheinbaren Begrenzung durch die unkatalysierte Prolylisomerisierung sehr hoch ist, gibt es wahrscheinlich Faktoren, die die Aktivierungsenergie für diese Konformationsumwandlungen herabsetzen. Zum einen könnte die Umgebung der Prolylbindung eine Rolle spielen, da beim Transfer aus wässriger Lösung in die hydrophobe Membranlipidschicht der weniger polare Übergangszustand der Isomerisierung stabilisiert werden könnte. Simuliert wurde der Effekt durch Bestimmung der Rate von *cis/trans*-Isomerisierungen in nicht-wässrigen Lösungsmitteln (106, 107) sowie nach Zusatz von Mizellen und Phospholipidvesikeln, wobei eine ca. 20-fache Beschleunigung beobachtet wurde (108). Zum anderen könnten strukturelle Zwänge der Polypeptidkettenkonformation die Aktivierungsenergiebarriere der *cis/trans*-Isomerisierung herabsetzen. So konnte z.B. *in vitro* eine Beschleunigung der Rate der -Tyr-Pro⁹³-Isomerisierung in Faltungsintermediaten von RNase A im Vergleich zu unstrukturierten Peptiden beobachtet werden (109). Eine bestimmte räumliche Organisation der

¹ Der Ausdruck Prolylbindung wird verwendet für die -Xaa-Pro-Peptidbindung.

² Prolylisomerisierung bezeichnet die *cis/trans*-Isomerisierung einer -Xaa-Pro-Peptidbindung.

Polypeptidkette kann zu spezifischen Interaktionen von nicht benachbarten Aminosäureresten in der Sequenz und so zur intramolekularen Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung führen (110). Darüber hinaus wurde für den speziellen Fall von -His-Pro-Peptidbindungen unabhängig von jeder Sekundär- oder Tertiärstruktur eine intramolekulare Beschleunigung der Prolylisomerisierung durch allgemeine Säurekatalyse bei physiologischem pH-Wert in wäßriger Lösung gezeigt (89). Es sollte nicht unerwähnt bleiben, daß auf der anderen Seite die Aktivierungsenergie durch strukturelle Zwänge innerhalb der Polypeptidkette auch erhöht werden kann, wie bei der Bildung von bestimmten Intermediaten (111).

1.2.2. PPIasen

Die Entdeckung von ubiquitär im Organismenreich vorkommenden Enzymen, die sehr effektiv die *cis/trans*-Isomerisierung beschleunigen, scheint die besondere biologische Bedeutung dieser Konformationsumwandlung hervorzuheben (112). Entsprechend ihrer enzymatischen Aktivität werden sie als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) bezeichnet. Seit ihrer Erstbeschreibung wurde eine Vielzahl dieser Enzyme bzw. ihrer Gene in allen untersuchten Organismen identifiziert. Neben speziesbedingten Unterschieden gibt es Isoformen in speziellen Gewebe- und Zelltypen sowie Zellkompartimenten.

1.2.2.1. Einteilung von PPIasen

Die bis heute bekannten PPIasen werden in die drei Familien der Cyclophiline, der FK506 bindenden Proteine (FKBP) sowie der Parvuline eingeteilt (46, 113, 114). Den Vertretern dieser Familien ist die Fähigkeit zur Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von -Xaa-Pro-Peptidbindungen sowohl in Oligopeptiden als auch in Proteinen gemeinsam (46, 102, 113, 115, 116). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Primärstruktur, der Substratspezifität und der Inhibierung durch immunsuppressiv wirksame Naturstoffe.

Innerhalb jeder Familie gibt es Kernbereiche hoch konservierter Aminosäuren, die zum einen am Katalysemechanismus und zum anderen an der Ligandbindung beteiligt sind. So geht auch die Benennung der Cyclophiline und der FKBP auf ihre spezifische und hochaffine Bindung an die strukturell differenten Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK506 zurück (117-119). Dabei wird die PPIase-Aktivität der Cyclophiline ausschließlich durch das zyklische Undekapeptid CsA (120, 121) und die der FKBP durch das Makrolid FK506 inhibiert (117, 118). Die PPIase-Aktivität der Parvuline wird weder durch FK506 noch durch CsA inhibiert (113).

Ein weiteres Kriterium, das zur Unterscheidung von PPIasen der verschiedenen Familien benutzt werden kann, ist die Substratspezifität. Diese wird bisher anhand von Oligopeptidsubstraten mit variabler Aminosäure in der N-terminal zum Prolin benachbarten Position bestimmt. Während Cyclophiline eine generell breitere Akzeptanz bezüglich der Seitenkettenfunktion von Aminosäuren in dieser Position aufweisen, zeigen FKBP eine eingeschränkte Spezifität mit einer bevorzugten Katalyse von Substraten, die in dieser Position Aminosäurereste mit hydrophoben Seitenketten enthalten (122, 123). Eine hohe Spezifität für phosphorylierte Aminosäurereste N-terminal zum Prolin (Phosphoserin und -threonin) konnte erst kürzlich für die eukaryotischen Parvuline Pin1 und Ptf1 beobachtet werden (124, 125).

Entsprechend ihrer differentiellen Aminosäuresequenz bilden die Enzyme der drei Familien unterschiedliche dreidimensionale Strukturen aus.

1.2.2.2. Physiologische Funktionen von PPIasen

Die hohe phylogenetische Konservierung (126) und hohe intrazelluläre Konzentrationen der PPIasen (46) deuten auf eine Beteiligung an wesentlichen zellulären Prozessen hin. Obwohl eine enorme Vielzahl genetischer und biochemischer Untersuchungen existiert, ist die physiologische Rolle der PPIasen noch relativ wenig verstanden. Anhand der erst kürzlich gelungenen, umfangreichen genetischen Studie der Hefe-PPIasen wird das Problem verdeutlicht (127). Auf der einen Seite kann die Bäckerhefe auf ihr gesamtes Repertoire an Cyclophilinen (8 Isoformen) und FKBP (4 Isoformen) unter optimalen Wachstumsbedingungen gleichzeitig verzichten, und auf der anderen Seite ist die Deletion nur eines einzigen Parvulins (Ptf1) letal (127-129). Geht man von einer wichtigen Funktion der PPIasen im zellulären Geschehen aus, so kann man nur vermuten, daß entweder ein unter normalen physiologischen Bedingungen nicht vorhandenes "Sicherheitssystem" anderer PPIasen exprimiert wird und/oder, daß bisher aufgrund fehlender Sequenzhomologie nicht als PPIase identifizierte Proteine diese Funktionen übernehmen.

Neben der vorgeschlagenen Funktion bei der Proteinfaltung (130-134) sind PPIasen an vielen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Von hoher biologischer Bedeutung sind z.B. die für die HIV-Replikation essentielle Interaktion von cytosolischem humanen Cyclophilin (hCyp18) mit dem Gag-Polyprotein (135-138) sowie die vermutete Implikation von FKBP in das Nervenwachstum (139-141). Darüber hinaus wurden FKBP als Bindungspartner des TGF β -Typ-1-Rezeptors (142-145) und von Ca²⁺-Kanälen (146-153) sowie als Bestandteil von

inaktiven heterooligomeren Steroidhormonrezeptoren (154-156) identifiziert. Am Aufbau solcher Komplexe ist neben den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 auch Cyp40 beteiligt (157, 158), für das auch eine Interaktion mit dem zellulären Protoonkogen c-Myb *in vitro* nachgewiesen wurde (159). Cyclophilin-verwandte Proteine sind auch beteiligt an Prozessen wie z.B. der Biogenese von rot/grün Opsin (160) und der funktionalen Expression von homo-oligomeren $\alpha 7$ neuronalen nikotinergen und dem Typ 3 Serotoninrezeptoren in *Xenopus* Oozyten (161).

Es gibt bisher allerdings nur wenige Beispiele für die Notwendigkeit der PPIase-Aktivität *in vivo*. Für das humane Pin1, dem Homologen des Ptf1 aus Hefe, konnte eine essentielle Beteiligung bei der Regulation der Mitose festgestellt werden (162). Pin1, jedoch nicht enzymatisch inaktive Varianten des Pin1, konnten den letalen Effekt von mutiertem Ptf1 in *Saccharomyces cerevisiae* wieder aufheben, woraus eine essentielle Rolle der PPIase-Aktivität für die Pin1-Funktion abgeleitet wurde (162).

Die in Gegenwart sowohl von CsA als auch FK506 beeinträchtigte Biogenese von heterodimerer bakterieller Luciferase nach ihrer Synthese in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat wurde auf die Beteiligung von PPIasen an der *de novo* Faltung zurückgeführt (133, 163).

Weiterhin konnte in Untersuchungen zur zellulären Proteinfaltung die Beteiligung der PPIase-Aktivität von Cyclophilinen demonstriert werden (130-134). Bei der Oligomerisierung von Kollagen-Monomeren zur Tripelhelix im ER kommt es zu sukzessiven *cis* \rightarrow *trans* Isomerisierungen von Prolyl- bzw. Hydroxyprolylbindungen, die *in vitro* und *in vivo* geschwindigkeitsbestimmend sind (132, 164). So konnte zum einen gezeigt werden, daß die Ausbildung der Tripelhelix *in vitro* durch Zugabe von Cyclophilin beschleunigt wird (164), zum anderen war in Anwesenheit von CsA die Reifung von Kollagen in Fibroblasten aus Hühnerembryonen verzögert (132). Daraus wurde auf die Beteiligung von PPIasen aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität bei der Biogenese von Kollagen geschlossen.

In zwei anderen, unabhängigen Studien über den mitochondrialen Import eines artifiziellen Fusionsproteins konnte ebenfalls überzeugend die Beschleunigung der Faltung des neu importierten Proteins durch das mitochondriale Cyclophilin (Cyp20) nachgewiesen werden (130, 131). Da Proteine beim Import in die mitochondriale Matrix eine entfaltete Konformation einnehmen, müssen sie nach dem Transport wieder ihre native dreidimensionale Struktur ausbilden. Der Faltungsprozeß konnte im Fall des verwendeten Modellproteins anhand der steigenden Proteasestabilität verfolgt werden, da im Gegensatz zur

nicht-nativen Form die native Struktur proteaseresistent war. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine etwa fünffache Reduzierung der *in vivo* Faltungsrate in Gegenwart von CsA beobachtet werden (130, 131). Ein ähnlicher Verzögerungsfaktor wurde festgestellt, wenn die Importmaschinerie von Cyp20-defizienten Mitochondrien verwendet wurde. Eine Zugabe von CsA zu diesem System erbrachte keine zusätzliche Reduktion der Faltungsrate, so daß die Beteiligung von Cyp20 als Enzym an zellulären Faltungsreaktionen abgeleitet wurde (130, 131).

1.3. Problemstellung

Die erwähnten möglichen zellulären Funktionen der PPIasen stellen nur einen Bruchteil der immensen Daten dar, die bereits über diese Enzyme existieren. Trotzdem ist für die meisten Ereignisse, für die eine Beteiligung der PPIasen vorgeschlagen wird, der genaue Mechanismus der Funktionsausübung unklar. PPIasen scheinen aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität prädestiniert zu sein für eine Funktion als Faltungskatalysatoren der Zelle. Die Untersuchung dieser möglichen Funktion *in vivo* gestaltet sich jedoch recht schwierig. *In vitro* konnte hingegen mehrfach gezeigt werden, daß PPIasen in der Lage, sind die Geschwindigkeit der Faltung von Proteinen durch Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung zu erhöhen. Vorausgesetzt, daß diese Konformationsumwandlung *in vivo* tatsächlich retardierend für den Proteinfaltungsprozeß ist - und das Vorhandensein der PPIasen scheint das zu unterstützen - dann sollten diese Enzyme genau dort lokalisiert sein, wo Proteinfaltung eine Rolle spielt. Für zwei solcher zellulärer Ereignisse, der Ausbildung der Kollagentripelhelix im ER und dem Import von Proteinen in die Matrix von Mitochondrien, konnte die Beteiligung der PPIasen dieser Zellkompartimente nachgewiesen werden (130-132). Es erhebt sich die Frage, ob auch die *de novo* Proteinfaltung am Ribosom durch PPIasen beeinflusst wird. Geht man von der postulierten uniformen *trans*-Konformation der Peptidbindungen einer naszierenden Proteinkette aus (26) und beginnt deren Faltung sehr schnell, d.h. cotranslational, so muß es zumindest zur *trans* → *cis* Isomerisierung der Prolylbindungen kommen, die im nativen Zustand der Proteine eine *cis*-Konformation aufweisen. Andernfalls könnte es während einer verzögerten oder posttranslationalen Faltung, wobei möglicherweise molekulare Chaperone einen "faltungskompetenten" Zustand der naszierenden Proteinkette erhalten, zur Isomerisierung von Prolylbindungen kommen, so daß es im Ergebnis zu einer Verteilung von *cis*- und *trans*-Konformeren kommt, die vergleichbar mit der in ungefalteten Proteinketten *in vitro* ist. Bei der Proteinfaltung käme dann neben der *trans* → *cis* Isomerisierung auch die

cis → *trans* Isomerisierung von -Xaa-Pro-Peptidbindungen in Betracht. Unter der Annahme, daß solche Konformationsumwandlungen die Geschwindigkeit der *de novo* Proteinfaltung beeinflussen, sollte die Beteiligung von Katalysatoren, wie PPIasen sinnvoll sein.

Eine Voraussetzung für die Katalyse der *de novo* Faltung am Ribosom ist die räumliche Nähe zum Substrat, der naszierenden Proteinkette. Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine PPIase in Assoziation mit *E. coli* Ribosomen, deren Zusammensetzung und Morphologie am besten untersucht ist, vorkommt. Aus vorangegangenen Untersuchungen wurde vermutet, daß proteolytische Fragmente des *E. coli* Triggerfaktors, dessen ribosomale Lokalisation beschrieben worden war (165), möglicherweise PPIase-Aktivität besitzen (166). Damit bildete der Triggerfaktor einen potentiellen Kandidaten für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich einer Ribosomenassoziation von PPIasen. Die PPIase-Aktivität des intakten Triggerfaktors sollte verifiziert und mit ribosomenassoziiertes Enzymaktivität verglichen werden. Die parallel zur vorliegenden Arbeit beschriebene Assoziation von Triggerfaktor an naszierende Proteinketten (67, 78) warf die Frage auf, ob es eine intrinsische Bindungsaffinität für Ribosomen (oder ribosomale Untereinheiten) gibt, oder ob in Abhängigkeit vom funktionellen Status (z.B. während der Translation) der Ribosomen und der Präsenz von naszierenden Proteinketten die Assoziation des Triggerfaktors an das bakterielle Ribosom erfolgt. In Hinblick auf eine mögliche Funktion bei der *de novo* Proteinfaltung war die Frage nach der Fähigkeit des Triggerfaktors zur Proteinfaltungskatalyse wichtig. In Voraussetzung zu Untersuchungen der biologischen Funktion und basierend auf der postulierten Zugehörigkeit zur PPIase-Familie der FKBP (167) erschien auch die Fragestellung nach der Möglichkeit der Erzeugung enzymatisch inaktiver Proteinvarianten interessant.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

ALDRICH (Steinheim): Lithiumchlorid, TFE, Wasserstoffperoxid

BACHEM (Heidelberg): Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NA (Xaa = Ala, Leu, Ile, Lys, Trp, Val, His, Glu, Gly), Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-4-NA

BIOMOL (Hamburg): IPTG

BOEHRINGER MANNHEIM (Mannheim): Ampicillin, Chloramphenicol, molekularer Massestandard für die Gelfiltration (BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, Cytochrom *c*)

CALBIOCHEM (Bad Soden): HEPES

FINK GMBH (Herrenberg): Instant-Magermilchpulver

GIBCO BRL (Eggenstein): Saccharose (RNase-frei)

MERCK (Darmstadt): α -Chymotrypsin (Rinderpankreas), Amidoschwarz B10, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, DMSO, Eisessig, Ethanol, Formaldehyd, Fraktogel EMD DEAE-650(M), Fraktogel TSK AF-Blue, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumthiosulfat, Phosphorsäure, Silbernitrat

PHARMACIA BIOTECH (Freiburg): Chelating Sepharose, Phenyl Sepharose CL-4B, Protein A-Sepharose CL-4B

ROTH (Karlsruhe): Chaps, Dithiothreitol, Ethylendiamintetraacetat, Glycerin, Glycin, Imidazol, Rotiphorese™ (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)

SERVA (Heidelberg): 2-Mercaptoethanol, Coomassie Brilliant Blau G250, Coomassie Brilliant Blau R250, HEPES, MES, molekularer Massestandard für die SDS-PAGE, Natriumdodecylsulfat, Phenylmethylsulfonylfluorid, Tris, Trypsin, Tween 20

SIGMA (Deisenhofen): 4-Chloro-1-naphtol, Anti-Kaninchen-IgG (Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase) aus Ziegen, Subtilisin Carlsberg (Typ VIII, Lot 72H0115, bakteriell aus *Bacillus licheniformis*), Thrombin aus Rinderplasma (Lot 36F9472)

QUIAGEN (Hilden): Ni²⁺-NTA Agarose

Die Substrate Suc-Ala-Xaa-Pro-Gln-4-NA (Xaa = Phe, Tyr), Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-MA wurden von M. Schutkowski (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt.

2.2. Verzeichnis der verwendeten *E. coli* Stämme

Die *E. coli* Stämme zur Überexpression bzw. Regulation des Triggerfaktors, K12 DH5 α (pTIG2) und BG87, wurden von W. Wickner (Dartmouth Medical School, Hanover, USA) zur Verfügung gestellt (76). Die verwendeten *E. coli* Stämme (M15) zur Überexpression von Triggerfaktor-fragmenten, verschiedenen TF¹⁴⁵⁻²⁵¹-Varianten sowie hFKBP12-Varianten wurden durch T. Tradler (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt.

2.3. Proteinreinigung

2.3.1. Isolierung des Triggerfaktors aus *E. coli*

Für die Isolierung des Triggerfaktors aus *E. coli* wurden die Zellen einer 3 Liter Übernachtkultur des Stammes BL21 verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 6 000 \times g) in einer J2-HC Beckman-Zentrifuge (Palo Alto, USA) geerntet. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 300 ml 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.0), 150 mM NaCl, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Das erhaltene Zellpellet (10 g Feuchtgewicht) wurde in 80 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Alle folgenden Schritte zur Proteinreinigung wurden bei 4 °C durchgeführt. Der mechanische Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe einer French-Druckzelle (1 100 psi) der Firma SLM Aminco (Büttelborn). Unlösliches Material wurde durch Ultrazentrifugation (40 min, 95 800 \times g) in einer L8-60M Beckman Ultrazentrifuge (Palo Alto, USA) sedimentiert. Der Überstand wurde 1:1 mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.0) verdünnt und über eine Fractogel EMD DEAE-650(M)-Säule (2.5 \times 14 cm) getrennt, die mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.0) äquilibriert war. Durch einen linearen NaCl-Gradienten (0-1 M NaCl, 200 ml) wurde Triggerfaktor bei einer NaCl-Konzentration von ca. 250 mM zusammen mit Cyp18 und FKBP22 eluiert. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereint und auf eine Chelating Sepharose-Säule (1.6 \times 16 cm, äquilibriert mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.0), 0.3 M NaCl, Beladung durch Ni²⁺-Ionen) aufgetragen. Dem Permeat, das sowohl Triggerfaktor als auch Cyp18 enthielt, wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Gesamtkonzentration von 20 % (w/v) zugesetzt und die Lösung anschließend 1 h unter Rühren inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Fraktion auf eine mit 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 0.15 M KCl, 20 % Ammoniumsulfat (w/v), äquilibrierte Phenyl Sepharose CL-4B-Säule (1 \times 8 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten verschiedener Komponenten (0-20 % Glycerin, 0-0.5 % Chaps, 20-0 % Ammoniumsulfat, 100 ml). Die Fraktionen, deren PPIase-Aktivität nicht durch CsA

inhibierbar war, wurden vereint und 2×2 h gegen je 3 Liter 10 mM MES-Puffer (pH 5.8) dialysiert. Im Anschluß erfolgte eine Farbstoffligandaffinitätschromatographie an Fractogel TSK AF-Blue (1×4 cm), das im gleichen Puffer äquilibriert war. Durch einen linearen Gradienten (0-1.5 M KCl, 80 ml) wurde Triggerfaktor eluiert. Die Homogenität wurde durch SDS-PAGE und anschließende Färbung des Gels durch Silbernitrat geprüft. Die Proteinfractionen wurden bei -80 °C gelagert.

Nach dieser Vorschrift erfolgte auch die Reinigung von rekombinantem Triggerfaktor aus dem *E. coli* Stamm K12 DH5 α /pTIG2 (76).

2.3.2. Reinigung der rekombinanten Triggerfaktorfragmente

Triggerfaktor und die verschiedenen Varianten [TF, TF¹⁻¹⁴⁵, TF¹⁻²⁵¹, TF¹⁴⁰⁻²⁵⁰, TF¹⁴⁵⁻²⁵¹, TF¹⁴⁵⁻⁴³², TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Val), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Asp), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Lys), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe¹⁹⁸His), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe¹⁹⁸Trp), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe²³³Tyr) sowie TF (Phe²³³Tyr)] wurden jeweils aus 1 Liter Kulturen der entsprechenden *E. coli* Stämme isoliert. Mit Ausnahme der TF¹⁴⁰⁻²⁵⁰-Variante enthielten alle exprimierten Proteine eine N-terminale Sequenzerweiterung, die eine Hexahistidinsequenz und Enterokinasespaltstelle (MRGSHHHHHHGSDDDDK-) enthielt. Die N-terminale Extension von TF¹⁴⁰⁻²⁵⁰ enthielt nur eine histidinreiche Sequenz, so daß sich die entsprechende Sequenz zu MRGSHHHHHHGIR- verkürzte. C-terminal wurde das TF¹⁴⁰⁻²⁵⁰-Fragment von der Tetrapeptidsequenz -AKLN flankiert. Die durch Metallchelataffinitätschromatographie bereits angereicherten Proteinfractionen von TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Val, Glu¹⁷⁸Asp) sowie TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe¹⁹⁸His, Phe¹⁹⁸Trp) und Triggerfaktor (Phe²³³Tyr) wurden von T. Tradler (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt.

Nach dem Impfen des $2 \times$ YT-Mediums [16 g/Liter Pepton, 10 g/Liter Hefeextrakt, 5 g/Liter NaCl (pH 7.0)] mit den Zellen einer Übernachtskultur (50 ml) wurde die Kultur bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von ca. 0.7 inkubiert. Durch Zugabe von 2 mM IPTG wurde die Expression der entsprechenden Proteinvariante induziert. Die Zellen wurden nach weiteren 5 h Wachstum durch Zentrifugation in einer J2-HC Beckman-Zentrifuge ($6\,000 \times g$, 15 min, 4 °C) geerntet. Nach Resuspendieren in 50 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0), 0.15 M NaCl, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und das so erhaltene Zellsediment in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0), 0.3 M NaCl, 1 mM PMSF, resuspendiert. Der Zellaufschluß und die nachfolgende Ultrazentrifugation erfolgte wie unter Abschn. 2.3.1. beschrieben. Der erhaltene Überstand wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule (1×2 cm), die mit 50 mM Natriumphosphatpuffer

(pH 7.0), 0.3 M NaCl, äquilibriert war, aufgetragen. Durch Waschen mit 5 mM Imidazol, gelöst im gleichen Puffer, wurden weniger spezifisch gebundene Proteine eluiert. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch einen Gradienten [5-500 mM Imidazol in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0), 40 ml]. Die weitere Reinigung erfolgte durch Gelfiltration. Jeweils 1 ml der konzentrierten Proteinfractionen wurde auf eine Superdex75 16/60 HiLoad FPLC-Säule der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg), die mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 150 mM KCl, äquilibriert war, mit einer Flußrate von 0.8 ml/min aufgetragen. Nach der Elution erwiesen sich mit Ausnahme von TF¹⁻¹⁴⁵, TF¹⁻²⁵¹ und TF¹⁴⁵⁻²⁵¹(Phe¹⁹⁸His und Phe¹⁹⁸Trp) alle Proteine zu über 95 % als homogen, was durch Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE verifiziert wurde. Die beiden Phe¹⁹⁸ → Xaa Varianten (Xaa = His, Trp) waren z.T. proteolysiert (siehe Abschn. 3.8.2.). Für die weitere Reinigung der beiden N-terminalen Fragmente des Triggerfaktors sowie der Phe²³³Tyr-Variante wurde nach Dialyse gegen 2 × 3 Liter 10 mM MES-Puffer (pH 6.0) eine Affinitätschromatographie an Fractogel TSK AF-Blue, das im gleichen Puffer äquilibriert war, durchgeführt. Die nach der Elution durch einen linearen Salzgradienten (0-1.5 M KCl, 80 ml) mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysierten Triggerfaktorvarianten erwiesen sich zu über 95 % homogen. Die Lagerung aller Proteine erfolgte nach der Entsalzung durch Dialyse gegen 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.5) bei -80 °C.

2.3.3. Reinigung von rekombinanten hFKBP12-Varianten

Die Reinigung der hFKBP12-Varianten erfolgte ebenfalls ausgehend von 1 Liter Bakterienkulturen, die in beschriebener Weise (Abschn. 2.3.2.) angezogen wurden. Das Wildtypenzym und die hFKBP12 (Asp³⁷Leu)-Variante enthielten N-terminal eine histidinreiche Sequenzerweiterung (MTMITNSMHHHHDDDDK-), aufgrund derer die Reinigung wie für die Triggerfaktorvarianten beschrieben durch Metallchelataffinitätschromatographie und Gelfiltration durchgeführt wurde. Die exprimierte Phe⁹⁹Tyr-Variante enthielt keine N-terminale Extension. Deshalb war der erste Schritt zur Isolierung aus dem *E. coli*-Lysat eine Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DEAE-650(M)-Säule (1.6 × 9 cm), die mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.3) äquilibriert war. Das Permeat enthielt die FKBP-Variante und wurde anschließend auf eine Fractogel EMD SO₃⁻-650(M)-Säule (1 × 8 cm), die mit 20 mM MES-Puffer (pH 6.3) äquilibriert war, aufgetragen. Durch einen linearen Salzgradienten (0-1 M KCl, 100 ml) wurde das Protein eluiert und durch Gelfiltration (analog zu Abschn. 2.3.2.) bis zu über 98 % Homogenität gereinigt.

2.4. Präparation ribosomaler Partikel aus *E. coli*

Die Präparation der Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten erfolgte nach einem Protokoll von Rheinberger *et al.* (168). Der *E. coli* Stamm BG87, dessen chromosomales *tig*-Gen unter Kontrolle des *AraB'*-Promoters steht (76), wurde zweimal in einem 100 Liter Fermentor bei 37 °C angezogen. Entsprechend der gewünschten Regulation des zellulären Triggerfaktorgehaltes wurden zum Nährmedium (1 kg Bacto-Trypton, 0.5 kg Hefeextrakt, 0.5 kg NaCl) einmal 0.2 % Glukose und beim zweiten Mal 0.2 % Arabinose zugesetzt. Die Anzucht der Zellen erfolgte mit einer Vorkultur (25 ml) im gleichen Medium unter 25 µg/ml Ampicilin. Damit wurde eine 2.5 Liter Übernachtkultur überimpft, die als Inokulum für die Fermentation diente. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messen der optischen Dichte bei 650 nm kontrolliert und beim Erreichen der frühen logarithmischen Phase ($OD_{650} = 0.39$ bzw. 0.33) durch Kühlung und sofortige Ernte mittels Durchflußzentrifugation gestoppt. Die Zellmasse (82 g bzw. 78 g) wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bis zum Zellaufschluß bei -80 °C gelagert. Die Puffersysteme für die Isolierung der ribosomalen Fraktionen waren folgendermaßen zusammengesetzt:

- A 20 mM HEPES (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 30 mM NH₄Cl, 4 mM 2-Mercaptoethanol
- B 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 200 mM NH₄Cl, 4 mM 2-Mercaptoethanol
- C 20 mM HEPES (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 30 mM NH₄Cl, 4 mM 2-Mercaptoethanol

Nachfolgend ist die Präparation von Ribosomen aus den Zellen beschrieben, deren Wachstum durch Glukose supplementiert wurde. Analog erfolgte die Präparation der Ribosomen aus der Arabinosekultur. Alle verwendeten Materialien wurden durch Autoklavieren oder Erhitzen auf 180 °C sterilisiert. Soweit nicht extra vermerkt, wurden alle Arbeiten bei 0-4 °C ausgeführt. Das Zellmaterial (82 g Feuchtgewicht) wurde in 164 ml Puffer A resuspendiert, in einer Sorvall RC-2D Zentrifuge (8 000 rpm, 15 min) sedimentiert und anschließend mit der 1.5-fachen Masse Aluminiumoxid vermischt. Der mechanische Zellaufschluß erfolgte durch Zerreiben der Masse in einer Retsch-Mühle für 20 min. Nach Zugabe von 150 ml Puffer A wurde das Aluminiumoxid durch Zentrifugation (10 min, 10 000 rpm) entfernt. Der erhaltene Überstand wurde dann durch Zentrifugation (1 h bei 13 000 rpm) geklärt. Durch anschließende Ultrazentrifugation in einem 45Ti Rotor der Beckman L8-65 Zentrifuge (17 h, 25 000 rpm) wurde die Ribosomenfraktion ("crude" Ribosomen) sedimentiert. Zur Isolierung von "tightly coupled" 70S Ribosomen (Ribosomen, die während der Zentrifugation nicht in

die Untereinheiten dissoziieren (183)) wurden ein Drittel dieser Fraktion mit 20 ml Puffer A, und zur Präparation von Untereinheiten bzw. reassozierten 70S Ribosomen die verbleibenden zwei Drittel mit 40 ml Puffer B versetzt. Nach dem vorsichtigen Resuspendieren unter ständigem Schütteln wurden die erhaltenen Fraktionen durch Zentrifugation geklärt (10 000 rpm, 10 min) und ihre Konzentration durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm abgeschätzt. Ein Teil der Proben ($2 \times 7\,875$ A_{260} -Einheiten dissoziierte 70S Ribosomen in Puffer B, $1 \times 8\,200$ A_{260} -Einheiten 70S Ribosomen in Puffer A) wurde anschließend für eine Zonalzentrifugation in einem Beckman-Zonalrotor BTi-XV (0-40 % Saccharosegradient in dem entsprechendem Puffer, 16 h, 21 000 rpm für 70S Ribosomen bzw. 24 000 rpm für ribosomale Untereinheiten) verwendet. Nach Bestimmung der Absorption bei 290 nm wurden die 70S Fraktionen vereint (140 ml) und die Ribosomen aus der Saccharoselösung durch Ultrazentrifugation in einem Beckman 45Ti-Rotor (24 h, 24 000 rpm) sedimentiert. Entsprechend wurden die 50S (400 ml) und 30S Fraktionen (300 ml) isoliert und durch Ultrazentrifugation (20 h, 35 000 rpm) pelletiert. Nach dem vorsichtigen Resuspendieren aller Proben in Puffer A und Zentrifugation (10 min, 10 000 rpm) wurde die Konzentration durch Messen der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die nicht weiter verwendeten 70S (3 ml, 430 A_{260} Einheiten/ml) und 50S Fraktionen (1.5 ml, 507 A_{260} Einheiten/ml) wurden aliquotiert und nach dem raschen Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Präparation von reassozierten 70S Monosomen wurden 50S Untereinheiten und 30S Untereinheiten im molaren Verhältnis 1:2 vereint und nach Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration auf 20 mM 40 min bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Isolierung der reassozierten 70S Monosomen erfolgte nach einer Zonalzentrifugation des inkubierten 50S/30S-Gemisches (5 570 A_{260} Einheiten bzw. 2 700 A_{260} Einheiten) in Puffer C (0-40 % Saccharose, 16 h, 21 000 rpm). Anschließend erfolgte eine Sedimentierung der reassozierten 70S Monosomen durch Ultrazentrifugation (24 h, 24 000 rpm). Die ribosomalen Fraktionen wurden unter vorsichtigem Schütteln in Puffer A resuspendiert und ihre Konzentration im Anschluß an eine Zentrifugation (10 min, 10 000 rpm) bestimmt. Die Lagerung der reassozierten 70S Ribosomen (4.7 ml, 600 A_{260} Einheiten/ml) erfolgte nach dem Aliquotieren und raschem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5. LiCl-Behandlung von ribosomalen 50S Untereinheiten

Die stufenweise Dissoziation von 50S Untereinheiten erfolgte nach einer Methode von Homann und Nierhaus (169). Die 50S Untereinheiten (Endkonzentration 2 μM) wurden mit der entsprechenden LiCl-Konzentration (0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 und 4.0 M) versetzt und 5 h in 10 mM Tris-Puffer (pH 7.5), 10 mM Magnesiumacetat, 0.5 mM EDTA, bei 0 °C unter Schütteln inkubiert. In einer anschließenden Ultrazentrifugation in einem Beckman 70Ti-Rotor (40 000 rpm, 4 °C) wurden die ribosomalen Bestandteile sedimentiert. Die Überstände (10 ml) wurden separiert und je 3 ml in Vorbereitung auf PPIase-Aktivitätsbestimmung mit Hilfe eines Centrikon-Konzentrators konzentriert und in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5) 4 mM MgCl_2 , 400 mM NH_4Cl , überführt. Die ribosomalen Fraktionen wurden in je 0.5 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Alle Proben wurden nach raschem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung von PPIase-Aktivität im Anschluß an eine Gelfiltration erfolgte nach einer Behandlung von 50S Untereinheiten in ähnlicher Weise. Die 50S Untereinheiten wurden mit Puffer [20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5) 2 M LiCl, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT] auf eine Endkonzentration von 773 A_{260} Einheiten/ml verdünnt und 5 h bei 0 °C inkubiert. Die anschließende Gelfiltration wurde im gleichen Puffersystem bei einer Flußrate von 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ am SMART™-System von Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Eine 50 μl Probe der inkubierten 50S Fraktion wurde auf eine Superdex75 PC 3.2/30 Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen (je 30 μl) wurden hinsichtlich ihrer PPIase-Aktivität im Standard-PPIase-Aktivitätstest (siehe Abschn. 2.8.1.) untersucht. Die Eichung der Gelfiltrationssäule erfolgte unter identischen Bedingungen mit BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Cytchrom *c* (12.5 kDa).

2.6. Immunchemische Methoden

2.6.1. Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

Das von der Firma Pab Productions (Herbertshausen) erhaltene Serum (mit Spezifität gegen N-terminal verkürzte Fragmente des Triggerfaktors (166)) wurde nach 30 min Inkubation bei 56 °C und Zentrifugation (20 min, 13 000 rpm) für eine Affinitätschromatographie mittels Protein A-Sepharose CL-4B verwendet. Die Reinigung erfolgte nach den Instruktionen der Hersteller. Die so erhaltene IgG-Fraktion wurde weiter durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Triggerfaktor gereinigt. Dazu wurde 1 mg Triggerfaktor mittels RP-HPLC

gereinigt und nach Entfernen des Lösungsmittels (durch einen Stickstoffstrom) in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.5) überführt. Die Kupplung an die Matrix von Affi-15 Gel der Firma Bio-Rad (München) erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt: ca. 1 ml der in Wasser vorgequollenen Gelsuspension wurde mit der 1.5 ml Triggerfaktorlösung versetzt und unter ständigem Schütteln bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Bestimmung der PPIase-Aktivität im Überstand nach jeweiligem Absetzen des Gels verfolgt. Nach 3 h Kupplung konnte im Überstand keine PPIase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Reaktion durch Amidierung aller noch vorhandenen Bindungsstellen an der Gelmatrix für 1 h mit 1 M Ethanolamin (pH 8.5) abgestoppt. Nach mehrmaligem Waschen des Gels mit 50 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 1 M KCl, 0.5 % Tween 20, erfolgte die Äquilibrierung in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.5). Die IgG-Fraktion (15 ml) des Anti-Triggerfaktor-Antiserums wurde mit einer Flußrate von 0.4 ml/min aufgetragen. Um eine möglichst hohe Bindungsausbeute zu erreichen, wurde das Permeat in drei Wiederholungen auf die Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift [50 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 1 M KCl, 0.5 % Tween 20] erfolgte die Elution durch 0.1 M Citratpuffer (pH 2.8) unter sofortiger Neutralisierung der erhaltenen Fraktionen mit 0.85 M Ches-Puffer (pH 8.4). Die Spezifität der erhaltenen polyklonalen Antikörper wurde durch Westernblot-Analyse überprüft (ABB. 2-1). Dazu wurde *E. coli* Zellmaterial aus einem Expressionsstamm für die Triggerfaktor-PPIase-Domäne verwendet.

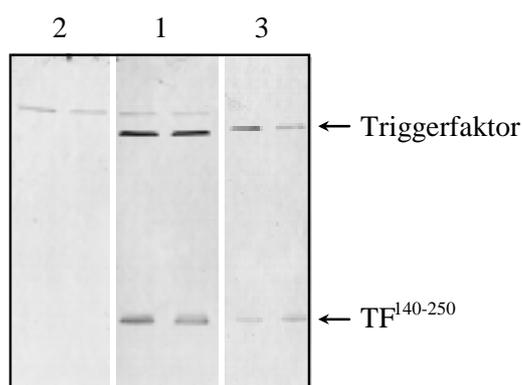


ABB. 2-1. Westernblot-Analyse nach Affinitätschromatographie. In allen Bahnen wurde Zellmaterial aus einem *E. coli* Expressionsstamm der PPIase-aktiven Domäne TF¹⁴⁰⁻²⁵⁰ des Triggerfaktors aufgetragen. Die IgG-Fraktion eines polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Serums wurde durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Triggerfaktor (siehe Text) gereinigt. Die Fraktionen, IgG vor der Chromatographie (1), Permeat (2) sowie durch pH-Sprung eluierte IgG (3) wurden für den ersten Inkubationsschritt (Verdünnung 1:250) des Westernblot-Verfahrens verwendet.

2.6.2. Westernblot-Analyse

Das Westernblot-Verfahren erfolgte wie beschrieben (166). Die IgG-Fraktion des polyklonalen Triggerfaktor-Antiserums aus Kaninchen (Pab Productions, Herbertshausen) wurde in einer Verdünnung 1:500 für den ersten Inkubationsschritt verwendet. Die Entwicklung des Blots erfolgte nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper, einer polyklonalen Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Fraktion der Ziege durch Oxidation des eingesetzten Substrates 4-Chloro-1-naphtol.

2.6.3. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation von nativem Triggerfaktor wurde die durch Affinitätschromatographie gereinigte Anti-Triggerfaktor-IgG-Fraktion in verschiedenen Konzentrationen mit Triggerfaktor 2 h bei 4 °C inkubiert, so daß nach der anschließenden Zugabe einer Suspension aus immobilisierten Protein A die Verhältnisse Triggerfaktor : IgG wie 1 : 7, 1 : 3.5 und 1 : 1.7 erreicht wurden. Für jede Triggerfaktorkonzentration wurde eine entsprechende Kontrollprobe ohne Zusatz von Antikörpern in gleicher Weise behandelt. Nach weiterer Inkubation für 1.5 h bei 4 °C unter Schütteln wurde die Protein A-Sepharose-Matrix durch Zentrifugation (15 s, 10 000 × g) von den löslichen Bestandteilen getrennt. Die Analyse der Überstände erfolgte durch SDS-PAGE, Westernblot-Verfahren und Messung der PPIase-Aktivität. Es sei vermerkt, daß unter den verwendeten Bedingungen die PPIase-Aktivität des Triggerfaktors durch Inkubation mit der Antikörperfraktion bis zu 2 h nicht beeinflusst wird.

2.7. Proteinchemische Analyse

2.7.1. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (170) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration ist den jeweiligen Abbildungsbezeichnungen zu entnehmen. Die Coomassie- bzw. Silberfärbung wurden wie beschrieben durchgeführt (166).

2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford (171) mit BSA als Standard verwendet.

Die Ermittlung der Konzentration isolierter Proteine erfolgte spektrophotometrisch unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) bei 280 nm (TAB. 2-1). Die molaren

Extinktionskoeffizienten wurden aus der Aminosäuresequenz nach Gill und von Hippel abgeleitet (172).

Die Bestimmung der Konzentration von ribosomalen Partikeln erfolgte spektrophotometrisch durch Detektion der Absorption bei 260 nm. Dabei entspricht 1 A₂₆₀ Einheit 24 pmol 70S Ribosomen, 36 pmol 50S bzw. 72 pmol 30S Untereinheiten.

TAB. 2-1. Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteinvarianten

Proteinvariante	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Proteinvariante	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)
TF	15 930	TF ¹⁴⁵⁻²⁵¹ (a)	6 970
TF (Phe ²³³ Tyr)	17 210	TF ¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe ¹⁹⁸ Trp)	12 660
TF ¹⁻¹⁴⁵	6 400	TF ¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe ²³³ Tyr)	8 250
TF ¹⁻²⁵¹	13 370	hFKBP12 (a)	9 530
TF ¹⁴⁵⁻⁴³²	9 530	hFKBP12 (Phe ⁹⁹ Tyr)	10 810

^a nicht mit angegeben sind Varianten von TF¹⁴⁵⁻²⁵¹, bei denen die ersetzten Aminosäurereste keine Veränderung von ϵ hervorrufen (Glu¹⁷⁸Val, Glu¹⁷⁸Asp, Glu¹⁷⁸Lys, Phe¹⁹⁸His), TF¹⁴⁰⁻²⁵⁰ sowie hFKBP12 (Asp³⁷Leu).

2.7.3. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

2.7.3.1. RP-HPLC

Die Entsalzung von Proteinen erfolgte an einem LC-10A RP-HPLC-System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) mit einer Nucleosil 500-5 C₃-PPN-Säule (125 × 4 mm, Vorsäule 11 × 4 mm) der Firma Marcherey-Nagel (Düren). Die Säule war äquilibriert mit 0.09 % Trifluoressigsäure in 1 % Acetonitril (v/v). Die Proteine wurden mit einem Acetonitrilgradienten (wenn nicht anders vermerkt 25-60 % Acetonitril in 0.08 % wäßriger Trifluoressigsäure innerhalb von 25 min) bei einer Flußrate von 1 ml/min und 40 °C eluiert. Die Absorption bei 215 nm und 280 nm wurde detektiert.

2.7.3.2. N-terminale Sequenzierung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde an einem 476 A Gasphasen-Sequenzier der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) freundlicherweise von P. Rücknagel (MPG, Halle) durchgeführt.

2.7.4. Bestimmung der molekularen Masse

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von A. Schierhorn (MLU, Halle) durchgeführt.

2.7.4.1. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem REFLEX Spektrometer der Firma Bruker-Franzen Analytik (Bremen) aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte bei 337 nm durch Laser-Desorption und die Ionen wurden linear bei einer Spannung von 28.4 kV beschleunigt. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in einem Acetonitril:Methanol:Wasser Verhältnis von 3:2:5 (v/v/v). Die Kalibrierung erfolgte mit humanem Angiotensin II, Rinder-Insulin sowie Cytochrom *c* (Pferdeherz) als externe Standards und mit Cytochrom *c* als internem Standard.

2.7.4.2. ESI-Massenspektrometrie

Die ESI-Massenspektren wurden an einem VG Bio-Q Tripel-Quadrupol Massenspektrometer der Firma Fisons Instruments (Manchester, GB) aufgenommen. Dazu wurden 4 µl Probenvolumen direkt in die Elektrosprayquelle mit einer Flußrate von 4 µl/min injiziert. Als Lösungsmittel diente ein Acetonitril:Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v) in 1 % Ameisensäure. Pferdeherzmyoglobin wurde zur Kalibrierung eingesetzt.

2.7.5. Fern-UV CD-Spektroskopie

Für die Aufnahme der Fern-UV CD-Spektren wurde ein J-710 Spektropolarimeter der Firma JASCO (Tokyo, Japan) verwendet. Die Messungen wurden in einer temperierten Quatzküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) bei 25 °C durchgeführt. Die Daten wurden in dem Wellenlängenbereich von 185 bis 250 nm 20 mal aufgenommen, gemittelt und mit der vom Hersteller JASCO bereitgestellten Software analysiert.

2.8. Bestimmung der PPIase-Aktivität

2.8.1. Proteasegekoppelter PPIase-Aktivitätstest (Standard)

Die PPIase-Aktivität wurde mit geringen Modifikationen nach Fischer *et al.*, 1984 (112, 173) unter Ausnutzung der bekannten Isomer(*trans*)spezifität (46, 99) vieler Proteasen bestimmt. Die Messungen erfolgten an einem 8452A Diodenarray-Spektrophotometer der Firma Hewlett Packard (Waldbronn), das mit einer temperierbaren Küvettenhalterung ausgestattet war und kontinuierliches Rühren des Meßansatzes erlaubte. Bei diesem Aktivitätstest kann die *cis* → *trans* Isomerisierung der Xaa-Pro-Peptidbindung eines Tetrapeptid-4-Nitroanilids

spektrophotometrisch verfolgt werden. Die mathematische Analyse der Progreßkurven liefert die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der unkatalysierten *cis* → *trans* Isomerisierung (k_0). Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der PPIase-katalysierten Reaktion (k_{obs}) setzt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der enzymkatalysierten (k_{enz}) und der unkatalysierten Reaktion zusammen:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{enz}} \quad (1)$$

Unter der Bedingung $[S]_0 \ll K_M$ gilt:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [S]^{\text{cis}} \quad (2)$$

wobei $[S]^{\text{cis}}$ der Anfangskonzentration des Substrates entspricht, dessen Xaa-Pro-Peptidbindung in der *cis*-Konformation ist. Die Geschwindigkeit (v) enzymkatalysierter Reaktionen läßt sich mathematisch durch die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3) ausdrücken:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad (3)$$

Unter der Voraussetzung $[S]_0 \ll K_M$ kann Gleichung 3 mit Hilfe von Gleichung 2 zu Gleichung 4 vereinfacht werden, so daß durch Umstellen der Gleichung 4 k_{cat}/K_M aus k_{enz} bei einer definierten Enzymkonzentration $[E]_0$ berechnet werden kann (Gleichung 5):

$$k_{\text{enz}} = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_0}{K_M} \quad (4)$$

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{enz}}}{[E]_0} \quad (5)$$

Zum Vergleich von PPIase-Aktivitäten in biologischen Proben wurde die willkürlichen Beschleunigungseinheit (BE), die sich aus $(k_{\text{obs}}/k_0)-1$ berechnen läßt, verwendet.

Alle Messungen wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei 10 °C durchgeführt. Als Meßsignal diente das durch die Protease freigesetzte 4-Nitroanilin ($\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$). Die Aufnahme der Daten erfolgte über einen Zeitraum von 2 bis 10 min nach einer Temperaturäquilibrierung von 5 min. Die PPIase-Probe wurde erst kurz vor dem Starten der Reaktion durch die Substratinjektion zugegeben. Ein typischer Meßansatz enthielt folgende Komponenten:

1200 - (x + y) µl	35 mM HEPES-Puffer (pH 7.8)
x µl	Proteasestammlösung
y µl	PPIase-Probe
3 µl	Substratlösung.

Die Substrate der allgemeinen Struktur Suc-Ala-Xaa-Pro-Yaa-4-NA waren, wenn nicht anders vermerkt, in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, so daß sich daraus für den Meßansatz Konzentrationen von $40 \pm 5 \mu\text{M}$ ergaben. Der Aminosäurerest Yaa variierte entsprechend der Substratspezifität der eingesetzten Protease (TAB. 2-2). Der Aminosäurerest Xaa wurde zur Ermittlung der Substratspezifitäten von PPIasen durch eine Reihe proteinogener Aminosäurereste ersetzt. Die Auswertung der Progreßkurven erfolgte wie beschrieben (112).

TAB. 2-2. Verwendete Proteasen und Substrate zur isomerspezifischen Proteolyse

Yaa ^a	Protease	Proteasekonzentration (μM)
Phe	α -Chymotrypsin	35
	Subtilisin Carlsberg	2.3
Gln	Subtilisin	14
Arg	Trypsin	0.4
	Thrombin ^b	210

^a in Suc-Ala-Xaa-Pro-Yaa-4-NA

^b Da die Proteinfraction recht heterogen war, sollte die Angabe der enzymatischen Aktivität (466 NIH Einheiten/ml Meßansatz) nach den Angaben des Herstellers genauer sein.

Die Inhibierung der PPIase-Aktivität durch FK506 oder CsA wurde mit obigem Meßansatz erprobt. Die PPIase wurde mit dem jeweiligen Inhibitor 10 min vorinkubiert. In diesem Fall erfolgte die Zugabe der Proteaselösung erst nach der Inkubationszeit, um eine proteolytische Inaktivierung der PPIase während der Inkubationszeit auszuschließen. Da die Inhibitoren in Ethanol gelöst waren, wurde der Kontrollwert ohne Inhibitor in Gegenwart entsprechender Volumina Ethanol durchgeführt. Die Daten zur Inhibierung wurden nach einem Modell für kompetitive hochaffine Inhibition analysiert (174).

2.8.2. Ungekoppelter PPIase-Aktivitätstest

Die teilweise hohe Proteasekonzentration im Standard-Aktivitätstest kann zu unerwünschter Inaktivierung der PPIase durch Proteolyse führen. Deshalb wurde bei verschiedenen Problemstellungen ein proteasefreier Aktivitätstest angewendet (175, 176), der prinzipiell mit den gleichen Peptidsubstraten durchgeführt werden kann. In diesem Fall wird durch einen Lösungsmittelsprung das vorliegende *cis/trans*-Gleichgewicht der Prolylbindung in den Tetrapeptidderivaten (Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA und Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-MA) gestört und die Neueinstellung unter Ausnutzung der differentiellen Absorption der *cis* und *trans* Konformere spektrophotometrisch verfolgt. In Abhängigkeit vom Substituenten (-4-Nitroanilid bzw. -4-Methoxyanilid) wurde die Absorption bei 330 nm (Referenzwellenlänge

510 nm) bzw. 285 nm (Referenzwellenlänge 300 nm) verfolgt. Die erhaltene Progreßkurve läßt sich nach einer Reaktion erster Ordnung auswerten und liefert die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} , die sich jedoch additiv aus den Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion dieser Gleichgewichtseinstellung zusammensetzt. Die Messungen wurden wie für den proteasegeloppelten Test beschrieben durchgeführt, jedoch wurde keine Protease zugesetzt. Die Substrate waren in 0.55 M LiCl/Trifluorethanol gelöst. In diesem Lösungsmittel lagen die beobachteten *cis*-Gehalte bei ca. 60 % , während im wäßrigen System *cis*-Gehalte von 11 % (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-MA) und 20 % (Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA) vorlagen. Die Konzentration von Substrat im Meßansatz betrug 75 μM .

2.8.3. Proteinfaltungstest

Als Substrat für die Bestimmung der PPIase-Aktivität bei der Proteinfaltung diene eine modifizierte Variante der Ribonuklease (RNase) T1 (177). Die Wildtyp-RNase T1 enthält in ihrer nativen Struktur zwei *cis*-Prolylbindungen (-Tyr-Pro³⁹- und -Ser-Pro⁵⁵-) sowie zwei Disulfidbrücken. Nach Reduktion und Carboxymethylierung der Cysteinylseitenketten liegt eine RNase T1-Variante vor, deren reversible Faltung durch Variation der NaCl-Konzentration induziert werden kann. Die Doppelvariante (Ser⁵⁴Gly/Pro⁵⁵Asn) enthält nur noch eine *cis*-Prolylbindung, deren *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung bei der Rückfaltung geschwindigkeitsbestimmend ist (177). Die Rückfaltung der *S*-carboxymethylierten, (Ser⁵⁴Gly/Pro⁵⁵Asn)-Variante der RNase T1 (RCM-T1) wurde initiiert durch die 40-fache Verdünnung der entfalteten Form [28.5 μM RCM-T1 in 100 mM Tris/HCl (pH 8.0)] in den Meßansatz, der 100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 2 M NaCl sowie die entsprechende PPIase-Konzentration enthielt. Als Meßsignal diene die Fluoreszenzänderung bei 320 nm (10 nm Spaltbreite) nach Anregung bei 268 nm (1.5 nm Spaltbreite). Die Aufnahme der Daten erfolgte an einem F-3010 Fluoreszenzspektrophotometer der Firma Hitachi (Tokyo, Japan) bei 15 °C unter kontinuierlichem Rühren des Meßansatzes (1 ml Volumen). Die langsame Phase der Rückfaltung ist durch die *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung der -Tyr-Pro³⁹-Peptidbindung bestimmt und kann an eine monoexponentielle Funktion angepaßt werden.

2.9. Proteolytische Stabilitätsuntersuchungen

2.9.1. Limitierte Proteolyse - Stabilitätstest verschiedener PPIase-Varianten

Die Stabilität verschiedener PPIase-Varianten wurde gegenüber verschiedenen isomerspezifischen Proteasen getestet. Dazu erfolgte eine Inkubation der jeweiligen Protease mit dem zu untersuchenden Protein für eine definierte Zeit (0-4 min) bei 0 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe des entsprechenden Proteaseinhibitors abgestoppt, und die proteolytischen Produkte wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder Westernblot-Analyse visualisiert. Als Proteaseinhibitoren wurden PMSF (1 mM) für Subtilisin und Thrombin, Eglin c für α -Chymotrypsin, sowie Trypsininhibitor (aus Sojabohne oder Hühnerei) für Trypsin verwendet. Eglin c wurde im fünffachen molaren Überschuß zu α -Chymotrypsin bei pH 5.2 eingesetzt, und Trypsininhibitor wurde im zweifachen molaren Überschuß zur entsprechenden Trypsinkonzentration verwendet. Die Konzentrationen der Proteasen entsprachen, sofern nicht anders vermerkt, der jeweiligen Konzentration im PPIase-Aktivitätstest (vgl. TAB. 2-2).

2.9.2. Limitierte Proteolyse des Triggerfaktors durch Subtilisin und Isolation eines PPIase-aktiven Fragmentes

Zur Isolierung des vermuteten PPIase-aktiven Fragmente des Triggerfaktors nach Proteolyse wurde 1 ml des nativen Wildtypenzym (4 μ M) mit Subtilisin Carlsberg (0.17 μ M) für 8 h bei 0 °C inkubiert. Die Proteolyse wurde durch PMSF (1 mM) abgestoppt und 50 μ l der Probe auf eine äquilibrierte [10 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 150 mM KCl] Superdex75TM PC3.2/30 Säule des SMARTTM-Systems der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) aufgetragen. Mit einer Flußrate von 40 μ l/min wurden die proteolysierten Fragmente eluiert und in 40 μ l Fraktionen gesammelt. Die PPIase-Aktivität wurde mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA im Subtilisin-gekoppelten Aktivitätstest bestimmt. Während der analytischen Gelfiltrationsläufe betrug die Temperatur 25 °C. Als Eichproteine wurden Rinderserumalbumin (67 kDa), Albumin aus Hühnerei (45 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Cytochrom *c* (12.5 kDa) unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Die PPIase-aktive Fraktion mit der geringsten molekularen Masse wurde anschließend durch RP-HPLC entsalzt und durch automatisierten Edman-Abbau und MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert.

2.10. Bindungsuntersuchungen von Triggerfaktorvarianten an ribosomale Fraktionen

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit des Triggerfaktors bzw. anderer Proteine *in vitro* an verschiedene ribosomale Partikel wurden die isolierten "tightly coupled" Ribosomen, 70S_{reass} Ribosomen und 50S Untereinheiten der unter Glukosezusatz fermentierten Zellen verwendet. Die entsprechenden Proteine wurden in den jeweils angegebenen Konzentrationen mit 4 µM 70S Ribosomen oder 5.1 µM 50S Untereinheiten 15 min bei 37 °C in 50 µl 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 30 mM NH₄Cl, 4 mM 2-Mercaptoethanol (Puffer A), oder 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 150 mM NH₄Cl, 4 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM Spermidin, 0.05 mM Spermin (Puffer D), inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Ultrazentrifugation (3 h, 67 000 × g, 4 °C) durch ein Saccharosekissen [300 µl, 15 % Saccharose in dem jeweils verwendeten Puffersystem (w/v)] in einer TL100 Ultrazentrifuge mit TLA120.1 Rotor der Firma Beckman (Palo Alto, USA). Die Überstände wurden entnommen und aufbewahrt. Die ribosomalen Sedimente wurden in 15 µl Puffer A resuspendiert und ihre Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Jeweils 24 pmol wurden für die Analyse durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung der Gele oder Westernblot-Verfahren verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch Auswertung der Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgele nach Digitalisierung mittels Sharp JX-330 Scanners mit Hilfe der Software ImageMaster 1D der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg). Dabei diente das ribosomale Protein L2 als Standard für die Eichung von 70S Ribosomen bzw. 50S Untereinheiten. Für den isolierten Triggerfaktor und die Proteinvariante TF¹⁻²⁵¹ wurden ebenfalls Eichreihen erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der PPIase-Aktivität des *E. coli* Triggerfaktors

3.1.1. Isolierung des Triggerfaktors aus *E. coli* Zellysat

Basierend auf der Bestimmung von PPIase-Aktivität während der Präparation von Proteinen aus *E. coli* konnte Triggerfaktor isoliert werden. Aus vorangegangenen Untersuchungen zur Identifizierung neuer Vertreter der Enzymklasse der PPIasen lagen bereits erste Hinweise vor, daß eine Proteinfraction, die zu über 90 % aus proteolytischen Fragmenten des Triggerfaktors bestand, eine solche enzymatische Aktivität enthält (166). Um eindeutig die PPIase-Aktivität des Triggerfaktor nachzuweisen, war es notwendig, das intakte Protein zu isolieren. Die Isolierung des vollständigen Proteins erfolgte anhand eines verkürzten Reinigungsprotokolls aus einer 3 Liter Übernachtkultur des *E. coli* Stammes BL21 (TAB. 3-1). Nach diesem Reinigungsschema konnten zwischen 0.5 und 1 mg zu über 95 % homogenes Protein erhalten werden (ABB. 3-1).

TAB. 3-1. Schema zur Reinigung des Triggerfaktors aus *E. coli*

Schritt	Gesamtprotein (mg)	PPIase-Aktivität ^a (BE)	Spezifische PPIase-Aktivität ^a (BE/mg)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
I Zellextrakt	930	225 000	242	1.0	100.0
II Anionenaustauschchromatographie	205	25 400	124	0.5	11.3
III Metallchelataffinitätschromatographie	90	16 500	183	0.8	7.3
IV Hydrophobe Interaktionschromatographie	4.1	12 500	3 050	12.6	5.5
V Farbstoffligandaffinitätschromatographie	1.1	6 270	5 700	23.5	2.8

^a Die PPIase-Aktivität wurde im α -Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat bestimmt. (II) Fractogel EMD DEAE-650(M), (III) Chelating Sepharose, (IV) Phenyl Sepharose CL-4B, (V) Fractogel TSK AF-Blue.

Durch die gewählten Reinigungsschritte wurden einige der bekannten *E. coli* PPIasen bereits nach der ersten Anionenaustauschchromatographie (Cyp21, FKBP26 und Parvulin) und der folgenden Metallchelataffinitätschromatographie (FKBP22) vollständig aus dem Proteingemisch entfernt. Da diese Proteine prinzipiell eine gleichartige enzymatische Aktivität besitzen, ist damit auch der Reinigungsfaktor (< 1) nach beiden Verfahren erklärbar (TAB. 3-1). Das cytosolische Cyp18, das mit über 80 % den Hauptteil der meßbaren PPIase-Aktivität von *E. coli* bildet (179), konnte jedoch mit diesen Chromatographiearten nur zum

Teil eliminiert werden, da es ein Triggerfaktor-ähnliches Elutionsverhalten zeigte. Die relativ ähnlichen pI-Werte, 4.6 für Triggerfaktor und 4.8 für *E. coli* Cyp18, erklären das partiell überlappende Eluieren beider Proteine während der Ionenaustauschchromatographie. Weiterhin zeigten das Cyp18 sowie der Triggerfaktor keine Affinität zu immobilisierten Ni²⁺-Ionen (TAB. 3-1, Schritt III), so daß erst durch die hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose eine Trennung der beiden enzymatisch aktiven Proteinfractionen gelang. Die nicht durch CsA inhibierbare Enzymfraktion erwies sich nach der anschließenden Farbstoffligandchromatographie als homogenes Protein mit einer scheinbaren molekularen Masse von 62 kDa im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (ABB. 3-1). Durch N-terminale Sequenzierung wurde die Sequenz MQVSVETTQGLG bestimmt, die identisch zur N-terminalen Aminosäuresequenz des Triggerfaktors ist.

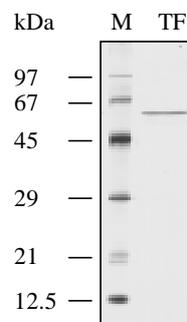


ABB. 3-1. SDS-Polyacrylamidgel (12.5 %, Silberfärbung) von gereinigtem *E. coli* Triggerfaktor. (*M*) molekularer Massestandard, (*TF*) Triggerfaktor (0.4 µg).

Die molekulare Masse des isolierten Proteins wurde mit ESI-Massenspektrometrie bestimmt (ABB. 3-2). Der experimentelle Wert von $48\,209.96 \pm 9.6$ Da, der mit verschiedenen Proteinchargen reproduziert werden konnte, wich um 178 Da von der theoretisch berechneten Masse von $48\,022.79$ Da ab. Davon ausgehend lag die Vermutung nahe, daß das Protein posttranslational modifiziert wird. Durch Kombination von tryptischem Verdau, N-terminaler Sequenzierung und Massenspektrometrie konnte jedoch keine Modifizierung des Proteins nachgewiesen werden (180). Hingegen führten solche Untersuchungen zur Identifizierung einer alternativen Aminosäuresequenz des Triggerfaktors im Bereich 279-287 (P. Rücknagel, persönliche Mitteilung). Parallel dazu wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit die Genomanalyse von *E. coli* beendet (181) und die Nukleinsäuresequenz des *tig*-Gens (76) korrigiert. Basierend auf dieser Sequenz berechnet sich die molekulare Masse des Triggerfaktors mit $48\,191.97$ Da und stimmt gut mit der experimentell ermittelten überein.

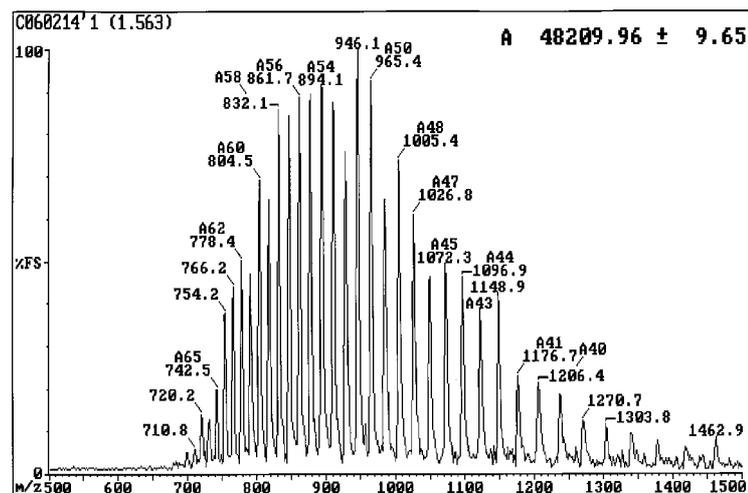


ABB. 3-2. ESI-Massenspektrum des gereinigten *E. coli* Triggerfaktors.

Für viele biochemische Untersuchungen wurden größere Mengen Triggerfaktor benötigt. Dazu wurde Triggerfaktor nach obigem Reinigungsschema aus einem Überexpressionsstamm (76) isoliert. Aus einer 3 Liter Bakterienkultur (19 g Feuchtwicht) konnten dabei 30-50 mg homogenes Protein gewonnen werden, dessen Eigenschaften (molekulare Masse (bestimmt durch SDS-PAGE, Gelfiltration und Massenspektrometrie), enzymatische Aktivität gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten) mit denen des authentischen Proteins vergleichbar waren.

3.1.2. Immunpräzipitation

Die PPIase-Aktivität der homogenen Proteinfraction des Triggerfaktors wurde durch Inkubation mit dem vorhandenen polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Antiserum nicht beeinflusst. Um dennoch zu zeigen, daß die beobachtete PPIase-Aktivität durch Triggerfaktor vermittelt werden kann, wurde eine Immunpräzipitation mit dem isolierten Protein durchgeführt. Als Antikörper diente die polyklonale IgG-Fraktion des erwähnten Antiserums (166), die zusätzlich durch Affinitätschromatographie (siehe Abschn. 2.6.1.) gereinigt worden war. Zur Immunpräzipitation wurden verschiedene Konzentrationen Triggerfaktor und Antikörper 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach Bindung der Antikörper an Protein A-Sepharose (1.5 h) und Sedimentation des Gelmaterials wurde der Überstand zur Messung der PPIase-Aktivität, SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung oder Westernblot-Analyse verwendet (ABB. 3-3). Kontrollproben wurden entsprechend ohne Zusatz von Antikörpern behandelt. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der PPIase-Aktivität nach der Inkubation mit den Antikörpern in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Antikörper. Übereinstimmend damit verringerte sich auch die Intensität der Triggerfaktorbande im SDS-Gel sowie im Westernblot.

Ausgehend davon wurde angenommen, daß die beobachtete PPIase-Aktivität durch Triggerfaktor verursacht wird.

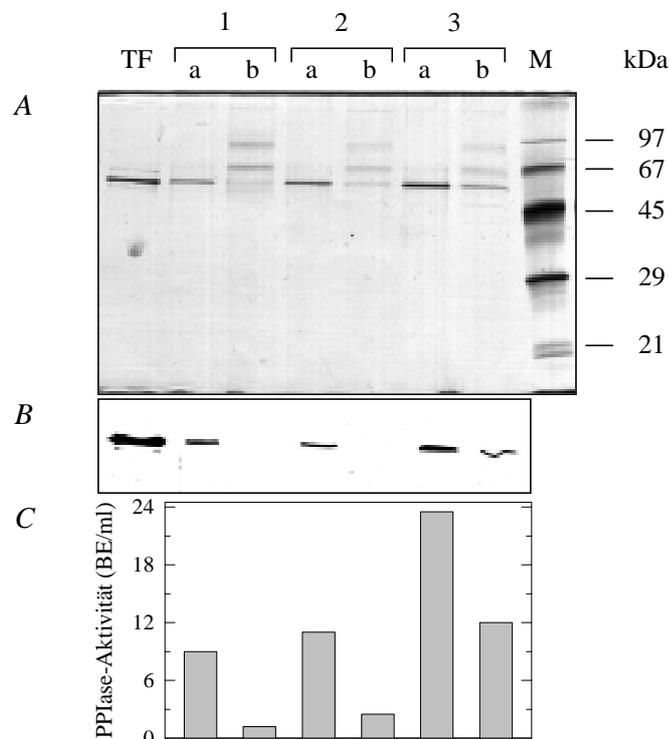


ABB. 3-3. Immunpräzipitation von Triggerfaktor mit der polyklonalen, affinitätsgereinigten Anti-Triggerfaktor-IgG-Fraktion. Nach Inkubation der Antikörper mit dem gereinigten Protein [(1b) 34 nM Triggerfaktor und 240 nM IgG-Fraktion, (2b) 45 nM Triggerfaktor und 160 nM IgG, (3b) 87 nM Triggerfaktor und 150 nM IgG] für 2 h wurde vorgequollene Protein A-Sepharose zugesetzt und nach weiteren 1.5 h zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde durch SDS-PAGE (12.5 % Acrylamid, Silberfärbung) (A), Westernblot-Verfahren (B) bzw. durch Bestimmung der PPIase-Aktivität (C) analysiert. Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgte im α -Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat. Eine Kontrollprobe (jeweils mit a gekennzeichnet) wurde ohne Antikörper in der gleichen Weise behandelt. (TF) gereinigten Triggerfaktor (M) molekularer Massestandard.

3.2. Untersuchungen zur ribosomenassoziierten PPIase-Aktivität

3.2.1. Detektion von PPIase-Aktivität am *E. coli* Ribosom

In Hinsicht auf die biologisch interessante Fragestellung nach einer ribosomenassoziierten PPIase wurden verschiedene ribosomale Fraktionen im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA auf das Vorkommen von PPIasen getestet. Dazu wurden die "crude" 70S Fraktion, "tightly coupled" 70S Ribosomen sowie die ribosomalen 50S und 30S Untereinheiten verwendet (zur Terminologie und Isolierung siehe Abschn. 2.4.). Im Ergebnis konnte in allen verwendeten Proben mit Ausnahme der 30S Fraktion PPIase-Aktivität detektiert werden.

Für diese enzymatische Aktivität wurde bezogen auf die Konzentration der entsprechenden ribosomalen Partikel eine klare Abstufung beobachtet, wobei die höchste Aktivität in der Fraktion der "crude" Ribosomen detektiert wurde. Die gemessene PPIase-Aktivität in dieser "crude" 70S Fraktion war ca. 2.5-fach höher als in der "tightly coupled" 70S Fraktion (90 BE/nmol 70S Ribosomen). Die 50S Untereinheiten wiesen im Vergleich zu den "tightly coupled" 70S Ribosomen eine um den Faktor 50 verringerte PPIase-Aktivität auf.

Zur weiteren Charakterisierung dieser ribosomenassoziierten PPIase-Aktivität wurden verschiedene Substrate des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NA im PPIase-Aktivitätstest verwendet und mit den Daten bekannter *E. coli* PPIasen verglichen (TAB. 3-2). Die beobachtete Substratspezifität der ribosomenassoziierten PPIase stimmte nur mit der des isolierten Triggerfaktors überein.

TAB. 3-2. Vergleich der relativen Substratspezifitäten der ribosomenassoziierten PPIase (PPIase^{ribo}) und anderer *E. coli* PPIasen gegenüber Substraten des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NA.

Xaa	PPIase ^{ribo} 50S	PPIase ^{ribo} 70S	Trigger- faktor	Cyp18 ^a	Cyp21 ^a	Parvulin ^b	FKBP22 ^c	FKBP16 ^d
Phe	100	100	100	100	100	100	100	100
Ala	22	21	20	400	345	60	6	37
Leu	64	58	56	120	192	120	205	83
Trp	n.b.	11	11	n.b.	n.b.	44	21	25
Lys	n.b.	13	16	17	39	30	53	38
Ile	n.b.	3	3	n.b.	n.b.	40	12	43
His	n.b.	27	26	55	28	34	19	21
Val	n.b.	9	8	n.b.	n.b.	32	7	n.b.
Gln	n.b.	5	4	n.b.	n.b.	n.b.	9	6

Die Messungen erfolgten im Subtilisin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.8), 30 mM NH₄Cl, 6 mM MgCl₂, 2 mM 2-Mercaptoethanol, bei 10 °C. Der k_{cat}/K_M -Wert für das Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA wurde 100 % gesetzt. Die Werte der *E. coli* PPIasen wurden der Literatur entnommen (^a 179, ^b 113, ^c 178, ^d 182). n.b. nicht bestimmt.

Zur Einteilung von PPIasen in die bekannten PPIase-Familien kann die Inhibierbarkeit der Enzymaktivität durch die Immunsuppressiva CsA und FK506 mit herangezogen werden. Während eine Konzentration von 25 µM FK506 keinen Einfluß auf die ribosomenassoziierte enzymatische Aktivität hatte, wurde in Gegenwart von 40 µM CsA die Enzymaktivität der "crude" 70S Ribosomen um ca. 60 % inhibiert. Dagegen war die PPIase-Aktivität der "tightly coupled" 70S Ribosomen und der 50S Untereinheiten weder durch FK506 noch durch CsA inhibierbar. Es konnte folglich angenommen werden, daß Cyp18 bzw. FKBP, wie z.B. FKBP22 oder FKBP26, nicht in diesen ribosomalen Fraktionen vorhanden sind. In Hinblick auf die Substratspezifität und die Unempfindlichkeit gegenüber den verwendeten Inhibitoren

glichen sich die Enzymaktivitäten der "tightly coupled" 70S Monosomen und der 50S Untereinheiten.

3.2.2. Identifizierung der ribosomenassoziierten PPIase als Triggerfaktor

3.2.2.1. Westernblot-Analyse

Es erhoben sich die Fragen, ob die ribosomenassoziierte PPIase-Aktivität auf Triggerfaktor zurückführbar ist und wenn ja, ob es sich um die einzige PPIase handelt, die mit ribosomalen Fraktionen assoziiert vorliegt. Um festzustellen, ob Triggerfaktor überhaupt in den präparierten ribosomalen Fraktionen vorhanden ist, wurde ein Westernblot mit verschiedenen zellulären Subfraktionen, wie *E. coli* Zellextrakt, dem postribosomalen S100 Überstand, der "crude" 70S Fraktion, "tightly coupled" 70S Monosomen sowie 50S und 30S Untereinheiten durchgeführt (ABB. 3-4). Als Antikörper diente die gegen die Triggerfaktorfragmente hergestellte polyklonale IgG-Fraktion (166). Im Ergebnis konnte bei einer molekularen Masse von 62 kDa eine Bande mit Ausnahme der Fraktionen des S100-Überstandes und der 30S Untereinheiten beobachtet werden. In der S100-Fraktion wurde nur eine verkürzte Variante des Triggerfaktors mit einer scheinbaren molekularen Masse von 54 kDa sichtbar. Das Vorhandensein des Triggerfaktors in den ribosomalen Fraktionen korrelierte mit dem Verhältnis der meßbaren PPIase-Aktivität.

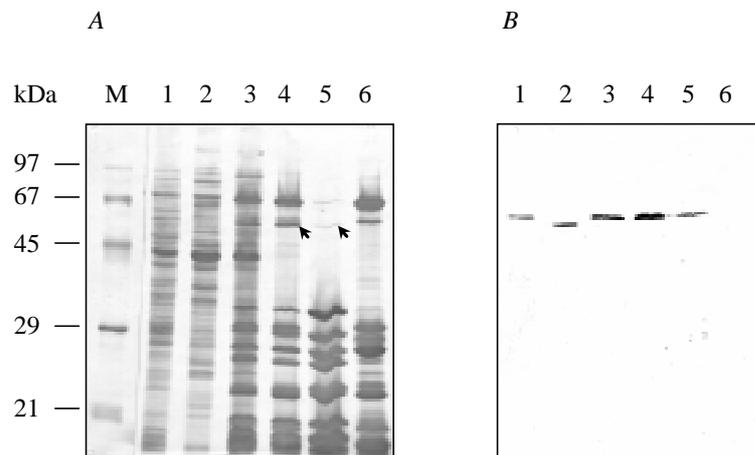


ABB. 3-4. Westernblot-Analyse verschiedener zellulärer Fraktionen aus *E. coli* mit polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Antikörpern. Die Auftragung der Proben erfolgte äquivalent für (A) Amidoschwarzfärbung der Nitrozellulosemembran und (B) Immunoblot. (M) molekularer Massestandard, (1) Zellextrakt, (2) Proteine der S100-Fraktion (postribosomaler Überstand beim Sedimentieren der "crude" Ribosomen), (3) "crude" Ribosomen, (4) "tightly coupled" 70S Ribosomen, (5) 50S und (6) 30S Untereinheiten. Die Pfeile markieren Triggerfaktor der "tightly coupled" 70S und der 50S Fraktionen (A, 4 und 5).

Um die Menge des ribosomenassoziierten Triggerfaktors abzuschätzen, wurde ein Westernblot unter paralleler Erstellung einer Eichreihe mit gereinigtem Triggerfaktor durchgeführt (ABB. 3-5). Die Auswertung ergab die molaren Verhältnisse von Triggerfaktor zu 70S Ribosomen wie 1:9 und Triggerfaktor zu 50S Untereinheiten wie 1:100. Prinzipiell könnte diese Reduzierung des Triggerfaktorgehaltes beim Dissoziieren des 70S Ribosoms in die Untereinheiten die ebenfalls stark verringerte PPIase-Aktivität der 50S Untereinheiten im Vergleich zu den 70S Monosomen widerspiegeln.

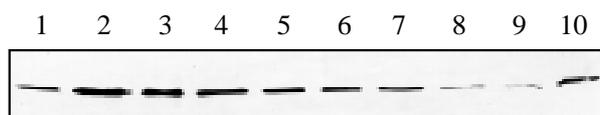


ABB. 3-5. Westernblot-Analyse zur Ermittlung der ribosomalen Triggerfaktorkonzentration. (1) 13.3 pmol "tightly coupled" 70S Ribosomen, (10) 93 pmol 50S Untereinheiten und verschiedene Mengen des gereinigten Triggerfaktors (2-9), (2) 16 pmol, (3) 8.6 pmol, (4) 5.4 pmol, (5) 2.8 pmol, (6) 1.44 pmol, (7) 0.9 pmol, (8) 0.54 pmol und (9) 0.29 pmol. Polyklonale Anti-Triggerfaktor-Antikörper wurden im ersten Inkubationsschritt verwendet. Die quantitative Auswertung nach Digitalisierung ergab für die 70S Fraktion 1.5 pmol und für die 50S Fraktion 0.8 pmol Triggerfaktor.

3.2.2.2. N-terminale Sequenzierung

Die Identität des 62 kDa Proteins wurde zusätzlich durch N-terminale Sequenzierung überprüft. Dazu wurden die ribosomalen Proteine der 70S Ribosomen im Anschluß an eine SDS-PAGE und Transfer auf eine Selex20-Membran durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die der molekularen Masse von 62 kDa entsprechende Proteinbande wurde ausgeschnitten und nach Entfärbung direkt zur Sequenzierung mittels automatisierten Edman-Abbaus verwendet. Die erhaltene Sequenz (MQVSVETTQQLGRRVTITIA) ist identisch mit den 20 N-terminalen Aminosäureresten des Triggerfaktors. Im Zusammenhang mit der nachgewiesenen PPIase-Aktivität des isolierten Proteins wurde damit deutlich, daß sich die ribosomenassoziierte Enzymaktivität prinzipiell auf Triggerfaktor zurückführen läßt.

3.2.2.3. Salzvermittelte Dissoziation von 50S Untereinheiten

Es bestand weiterhin die Frage, ob Triggerfaktor das einzige Protein am Ribosom ist, das PPIase-Aktivität besitzt. Ein sukzessives Ablösen von Proteinen entsprechend ihrer Bindungsaffinität von der 50S Untereinheit durch steigende Konzentrationen LiCl sollte in dieser Hinsicht aufschlußreich sein. Nach der Inkubation der 50S Untereinheiten mit 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 und 4.0 M LiCl wurden die löslichen Bestandteile durch Ultrazentrifugation von der verbleibenden ribosomalen Fraktion getrennt. Die Sedimente wurden in je 0.5 ml 20 mM

HEPES-Puffer (pH 7.5), 400 mM NH_4Cl , 4 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 4 mM 2-Mercaptoethanol, resuspendiert. Von den Überstandsfractionen wurden je 3 ml 10-fach konzentriert und in das gleiche Puffersystem überführt. Aus allen Fraktionen wurde eine Probe entnommen, um die PPIase-Aktivität mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA zu bestimmen. Wie aus ABB. 3-6 ersichtlich ist, nimmt die PPIase-Aktivität mit steigender LiCl-Konzentration in den Überstandsfractionen bis zu einer LiCl-Konzentration von 1.5 M zu und verringert sich in entgegengesetzter Weise in den ribosomalen Fraktionen. Die bekannte Dissoziation des Triggerfaktors vom 70S Ribosom bei einer Konzentration von 1.5 M LiCl (165) wurde damit auch für das PPIase-aktive Enzym der isolierten 50S Untereinheiten gefunden.

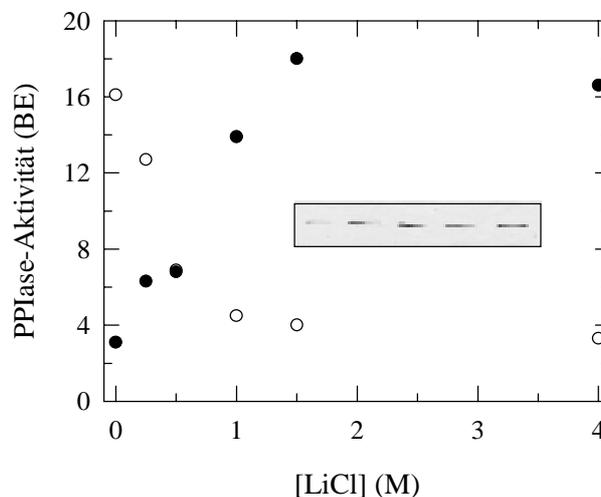


ABB. 3-6. Dissoziation der 50S Untereinheiten durch steigende Konzentrationen an LiCl. Die PPIase-Aktivität wurde im α -Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat bestimmt. Die 50S Untereinheiten (2.5 μM , 10 ml) wurden in 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, sowie der entsprechenden LiCl Konzentration 5 h bei 0 °C inkubiert und anschließend 5 h bei 4 °C ultrazentrifugiert. Die enzymatische Aktivität bezieht sich auf die Gesamtfraction der Überstände (●) bzw. der Sedimentfraktionen (○) nach dem Resuspendieren. Die eingefügte Grafik zeigt einen Westernblot, für den Anti-Triggerfaktor-Antikörper verwendet wurden. Dazu wurden je 200 μl der Überstandsfractionen dialysiert und lyophilisiert. Von *links* nach *rechts* 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 M LiCl.

Die Verteilung der PPIase-Aktivität nach einer salzvermittelten Dissoziation der 50S Untereinheiten durch 1.5 M LiCl wurde weiterhin mittels Gelfiltration untersucht. Während die ribosomale Fraktion im Ausschlußvolumen der Säule eluierte, konnte die PPIase-Aktivität in Form eines einfachen Aktivitätsgipfels separat in Fraktionen detektiert werden, die einer molekularen Masse von ca. 67 kDa entsprachen (ABB. 3-7). Es ergab sich daraus kein Hinweis auf die Anwesenheit einer zweiten PPIase in der Fraktion der 50S Untereinheiten. Zum Vergleich wurde eine Gelfiltration unter identischen Bedingungen mit gereinigtem Triggerfaktor als Probe durchgeführt. Die Detektion erfolgte über die Messung der Absorption

bei 280 nm. Die so bestimmte molekulare Masse von ca. 67 kDa stimmte gut überein mit dem Elutionsverhalten der PPIase nach der LiCl vermittelten Dissoziation von der 50S Untereinheit.

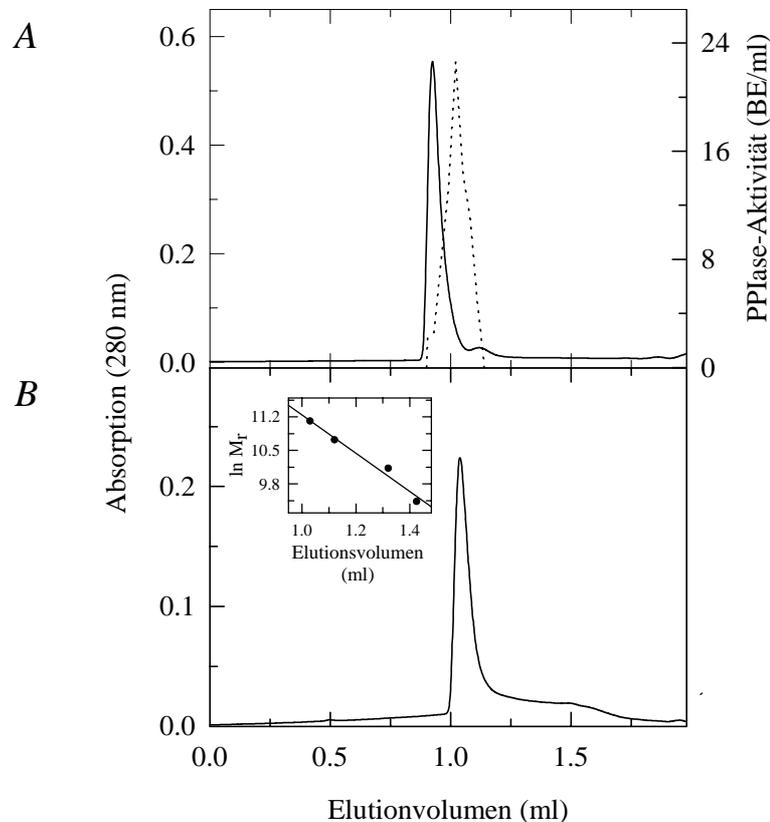


ABB. 3-7. Analytische Gelfiltration von 50S Untereinheiten (**A**) und Triggerfaktor (**B**) in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 2 M LiCl, 30 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, bei 4 °C. Die Proben wurden vor der Trennung 5 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Je 50 µl der Proben (50S, 1:200 verdünnt, 240 nM bzw. Triggerfaktor, 0.7 µM) wurden bei einer Flußrate von 40 µl auf die Superdex75TM PC3.2/30-Säule aufgetragen. Die PPIase-Aktivität (·····) ist berechnet für die unverdünnte 50S Probe und wurde im α-Chymotrypsin-gekoppelten Aktivitätstest mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat bestimmt. Die in (**B**) eingefügte Graphik zeigt das Ergebnis der Eichung, die unter gleichen Bedingungen mit BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), α-Chymotrypsinogen (25 kDa) und Cytochrom *c* (12.5 kDa) durchgeführt wurde.

3.3. Untersuchungen zur Ribosomenassoziation des Triggerfaktors

3.3.1. Bindung des Triggerfaktors an "tightly coupled" 70S und reassozierte 70S Ribosomen *in vitro*

Triggerfaktor wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als ribosomenassoziiertes Protein beschrieben, das in Puromycin-sensitiver Weise während der Translation an naszierende Proteinketten bindet (67, 68, 78). Es bestand die Frage, ob Triggerfaktor prinzipiell eine Erkennungs- bzw. Bindungsstelle am Ribosom hat oder nur im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese, d.h. während der Translation zum Ribosom dirigiert wird. Die Fähigkeit zur Bindung an *E. coli* Ribosomen sollte deshalb *in vitro* untersucht werden. Für diese

Untersuchungen wurden in Hinsicht auf Triggerfaktorgehalt und funktionellen Status verschiedene ribosomale Fraktionen benötigt, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von K. H. Nierhaus (MPI für Molekulare Genetik, Berlin) präpariert wurden. Der *E. coli* Stamm BG87 enthielt das *tig*-Gen unter Regulation des Arabinose-Promoters, so daß durch Wachstum unter Arabinose ein wildtypähnlicher Gehalt an Triggerfaktor in den Zellen vorhanden ist (76). Wird für das Wachstum dieser Zellen Glukose als Kohlenhydratquelle verwendet, kommt es zu einer Reduzierung des Triggerfaktorgehaltes um ca. 90 % (76). Aus den zwei entsprechenden Fermentationen dieses Stammes wurden zunächst die "crude" 70S Ribosomen präpariert. Daran schloß sich die Isolierung von "tightly coupled" 70S Ribosomen bzw. der 50S und 30S Untereinheiten an. Durch die Reassoziaton der gereinigten Untereinheiten und die anschließende Isolation mittels Zonalzentrifugation wurden 70S Partikel erhalten, die frei von Bestandteilen der Translation (wie z.B. kurze Proteinketten, mRNA oder andere Effektoren) sind (183). Diese werden im folgenden als 70S_{reass} Ribosomen bezeichnet.

Die verschiedenen Zellfraktionen sowie die präparierten ribosomalen Partikel wurden durch Westernblot-Analyse auf ihren Gehalt an Triggerfaktor überprüft (ABB. 3-8).

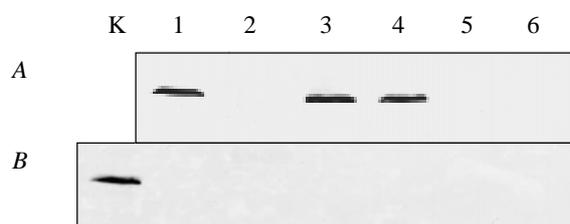


ABB. 3-8. Westernblot-Analyse von zellulären Fraktionen nach Fermentation des *E. coli* BG87 Stammes unter Zusatz von Arabinose (A) oder Glukose (B). Polyklonale Anti-Triggerfaktor-Antikörper wurden für den ersten Inkubationsschritt verwendet. (1) Zellextrakt, (2) S100-Fraktion, (3) "crude" Ribosomen, (4) "tightly coupled" 70S Ribosomen, (5) 50S Untereinheiten, (6) aus Untereinheiten reassozierte 70S Ribosomen, (K) Kontrollprobe (entspricht Probe A 1).

Während in allen Fraktionen der unter Glukose gewachsenen Zellen Triggerfaktor nicht nachweisbar war, konnte nach der Arabinose-unterstützten Fermentation des *E. coli* Stammes eine klare Co-Fraktionierung des Triggerfaktors mit 70S Partikeln beobachtet werden. Beim Dissoziieren der 70S Ribosomen in die Untereinheiten unter geringer Magnesiumionenkonzentration (1 mM) und gleichzeitig erhöhter Ammoniumionenkonzentration (200 mM) dissoziierte Triggerfaktor offenbar vom Ribosom, denn nur ein geringer Teil verblieb an der großen ribosomalen Untereinheit. Die aus den Untereinheiten reassozierten 70S Ribosomen enthielten keinen Triggerfaktor. Auch die sehr sensitive Entwicklung eines ähnlichen Westernblots mit I^{25} -markierten Antikörpern, die freundlicherweise durch O. Kandror

(Harvard Medical School, Boston, USA) durchgeführt wurde, ergab keine zusätzliche Information. Die Triggerfaktor-freien Ribosomen wurden weiterhin sowohl im Subtilisin-gekoppelten als auch im nicht-proteolytischen PPIase-Aktivitätstest mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA eingesetzt. Dabei konnte jedoch bis zu der eingesetzten Ribosomenkonzentration von 250 nM im PPIase-Aktivitätstest keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Die Fähigkeit zur Bindung an die verschiedenen, Triggerfaktor-freien 70S Partikel *in vitro* wurde zunächst durch 1:1 Inkubation von gereinigtem Triggerfaktor mit der entsprechenden Ribosomenfraktion und anschließender Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen untersucht (ABB. 3-9). Eine Triggerfaktorprobe wurde ohne die Zugabe von Ribosomen in gleicher Weise behandelt. Die resuspendierten Sedimentfraktionen wurden für einen Westernblot verwendet, der mit polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Antikörpern inkubiert wurde. In jeder dieser ribosomalen Fraktionen konnte Triggerfaktor in ähnlicher Menge detektiert werden. Außerdem war ersichtlich, daß der aus Zellen isolierte Triggerfaktor/Ribosomenkomplex unter diesen experimentellen Bedingungen nicht dissoziierte (ABB. 3-9, Bahn 3).



ABB. 3-9. Westernblot-Analyse nach Bindung von Triggerfaktor an 70S Ribosomen. Gereinigter Triggerfaktor (4 μM) wurde im molaren Verhältnis 1:1 mit "tightly coupled" 70S und 70S_{reass} Ribosomen (Glukosefermentation) sowie mit 70S_{reass} Ribosomen (Arabinosefermentation) in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 30 mM NH₄Cl, 6 mM MgCl₂, 4 mM 2-Mercaptoethanol, (Puffer A) inkubiert und anschließend durch ein Saccharosekissen ultrazentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Ribosomen in Puffer A wurden jeweils 64.8 pmol für die SDS-PAGE und Westernblot-Verfahren verwendet. In gleicher Weise wurde mit einer Probe Triggerfaktor sowie "tightly coupled" 70S Ribosomen (Arabinosefermentation) verfahren. (1) "tightly coupled" 70S Ribosomen (Glukosefermentation), (2) 70S_{reass} Ribosomen (Glukosefermentation), (3) "tightly coupled" 70S Ribosomen (Arabinosefermentation) ohne Zugabe von externem Triggerfaktor, (4) 70S_{reass} Ribosomen (Arabinosefermentation), (5) Triggerfaktor.

Die Bestimmung der PPIase-Aktivität im Verlauf eines weiteren, gleichartigen Experimentes zeigte weiterhin, daß Triggerfaktor sowohl an "tightly coupled" 70S als auch an reassozierte 70S Ribosomen mit ähnlicher Affinität bindet (ABB. 3-10). Zum Vergleich wurden auch zwei andere PPIasen, hCyp18 und humanes cytosolisches FKBP12 (hFKBP12), mit 70S_{reass} Ribosomen inkubiert und anschließend die ribosomale Fraktion von der löslichen durch Ultrazentrifugation getrennt. Im Gegensatz zu den isolierten Triggerfaktor/Ribosomenkomplexen war die PPIase-Aktivität in der ribosomalen Fraktion nur sehr gering bzw. nicht detektierbar (ABB. 3-10). Das deutet darauf hin, daß die ribosomale Assoziation spezifisch für die PPIase Triggerfaktor ist.

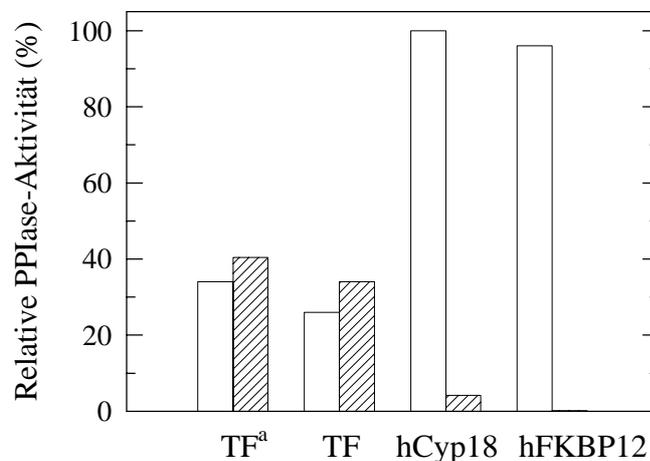


ABB 3-10. Affinität verschiedener PPIasen für 70 Ribosomen. Triggerfaktor, hCyp18 und hFKBP12 wurden jeweils im molaren Verhältnis von 1:1 mit 70S_{reass} Ribosomen in Puffer A inkubiert. ^a Außerdem wurde Triggerfaktor mit "tightly coupled" 70S Ribosomen (isoliert aus *E. coli* BG87 Zellen nach Fermentation mit Glukose) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die ribosomalen Partikel wurden von nicht-assoziierten Bestandteilen durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen getrennt und anschließend in Puffer A resuspendiert. Die PPIase-Aktivität wurde im α -Chymotrypsin-gekoppelten Aktivitätstest mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative PPIase-Aktivität, wobei der Wert der Ausgangsaktivität vor der Ultrazentrifugation 100 % gesetzt wurde. Die weißen Balken bezeichnen die PPIase-Aktivität der Überstände, die quergestreiften Balken die der ribosomalen Fraktionen.

Zum Vergleich und zur Kontrolle dieser sich abzeichnenden Spezifität des Triggerfaktors hinsichtlich einer ribosomalen Bindung wurden weitere Proteine in die Untersuchungen mit einbezogen. Zum einen wurde BSA verwendet, das dabei als Negativkontrolle dienen sollte. Zum anderen erschien eine mögliche *in vitro* Bindungsaffinität des Chaperons GroEL für Ribosomen interessant, da dieses Protein mit ribosomalen Partikeln bei deren Isolierung cofraktioniert wird (78), und auch prinzipiell die Möglichkeit in Betracht gezogen werden mußte, daß die ribosomale Assoziation des Triggerfaktors durch eine GroEL-Bindung

vermittelt wird. Eine Triggerfaktor/GroEL-Interaktion wurde beim Abbau von Polypeptiden durch das proteolytische ClpX-System von *E. coli* vermutet (80, 81).

Im Gegensatz zu Triggerfaktor (ABB. 3-11) zeigten die isolierten Proteine BSA und GroEL keine bzw. nur eine sehr schwache ribosomale Bindungsfähigkeit unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen. So war eine geringe Menge GroEL in der ribosomalen Fraktion nach der Trennung der nicht-assoziierten Bestandteile durch Ultrazentrifugation über ein Saccharosekissen detektierbar. Die Intensität der Bande des Doppelringkomplexes GroEL im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ist jedoch im Vergleich zu der von monomeren Proteinen mit molekularen Massen um 60 kDa bei gleichen Proteinkonzentrationen zusätzlich verstärkt, da ein GroEL-Molekül aus 14 Untereinheiten zusammengesetzt ist. Es läßt sich folglich aus diesen Kontrollexperimenten ableiten, daß es sich bei der Triggerfaktor/Ribosomen-Assoziation um eine direkte Interaktion handelt, die spezifisch für Triggerfaktor ist.

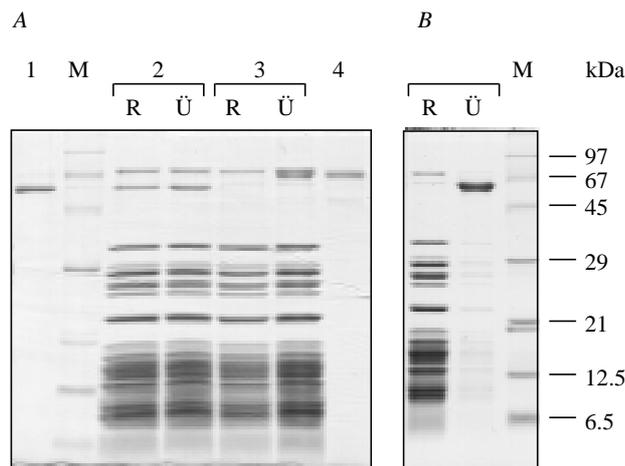


ABB. 3-11. Vergleich der Bindungsfähigkeit von Triggerfaktor, BSA und GroEL an 70S Ribosomen. Die 70S_{reass} Ribosomen wurden 1:1 mit Triggerfaktor (1.8 µM), BSA (1.8 µM) (**A**) oder GroEL (4 µM) (**B**) in Puffer A inkubiert und anschließend von nicht-assoziierten Proteinen durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen separiert. Nach dem Resuspendieren der Ribosomen (*R*) in Puffer A wurden je 24 pmol für die SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) verwendet. (*M*) molekularer Massestandard, (*Ü*) Überstandsfraktionen (je 40 µl (**A**) bzw. 8 µl (**B**)); (**A**) (*1*) Triggerfaktor (30 pmol), (*2*) 70S Ribosomen nach Bindung von Triggerfaktor, (*3*) 70S Ribosomen nach Inkubation mit BSA, (*4*) BSA (11 pmol), (**B**) 70S Ribosomen nach Inkubation mit GroEL.

3.3.2. Stöchiometrieuntersuchung

Um einzuschätzen, ob die beobachtete Assoziation von Triggerfaktor an 70S Partikel einem stöchiometrischen Verhältnis folgt, wurden $4 \mu\text{M}$ 70S_{reass} Ribosomen mit steigenden Konzentrationen an Triggerfaktor inkubiert und anschließend die ribosomale Fraktion von der löslichen, nicht gebundenen Proteinfraction durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen getrennt. Die resuspendierten ribosomalen Sedimente wurden für eine SDS-PAGE verwendet. Die quantitative Analyse des Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgels ergab, daß die ribosomale Bindung von Triggerfaktor der Form einer Sättigungskurve folgt (ABB. 3-12), aus der sich wahrscheinlich eine 1:1 Stöchiometrie für die Bindung zwischen Triggerfaktor und nicht-translatierenden Ribosomen *in vitro* ableiten läßt.

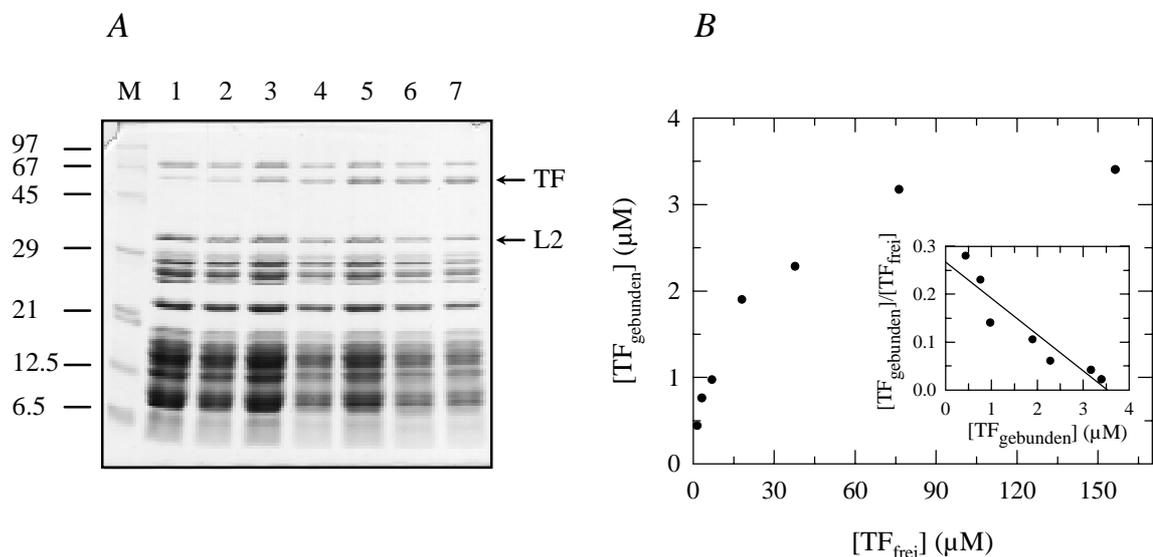


ABB. 3-12. Bestimmung der Bindungskapazität von 70S_{reass} Ribosomen für Triggerfaktor. Die Ribosomen ($4 \mu\text{M}$) wurden mit steigenden Konzentrationen an Triggerfaktor in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 6 mM MgCl_2 , 150 mM NH_4Cl , 4 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM Spermidin, 0.05 mM Spermin, (Puffer D) inkubiert und durch ein Saccharosekissen ultrazentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Ribosomen in Puffer A wurden 24 pmol für die SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) verwendet (A). Die Menge an gebundenem Triggerfaktor im Vergleich zum L2-Protein wurde quantifiziert. Die Ausgangskonzentrationen von Triggerfaktor waren (1) $2 \mu\text{M}$, (2) $4 \mu\text{M}$, (3) $8 \mu\text{M}$, (4) $20 \mu\text{M}$, (5) $40 \mu\text{M}$, (6) $79.5 \mu\text{M}$ und (7) $159.8 \mu\text{M}$. (B) Sättigungskurve der Triggerfaktorbindung an 70S_{reass}. Die eingefügte Grafik illustriert die Daten in Form einer Scatchard-Auftragung.

3.3.3. Bindung des Triggerfaktors an die 50S Untereinheit

Die enge Nachbarschaft von Triggerfaktor zu naszierenden Proteinketten während der Translation (67, 68, 78) deutet auf eine Lokalisation an der 50S Untereinheit hin, da die 50S Untereinheit den Austrittsbereich der neu synthetisierten Proteinkette enthält (28). Wie bereits gezeigt, bleibt nach einer Isolierung der ribosomalen Untereinheiten aus *E. coli* Zellmaterial

eine geringe Menge Triggerfaktor an der 50S Untereinheit assoziiert, während an der 30S Untereinheit Triggerfaktor nicht detektiert werden konnte (siehe Abschn. 3.2.2.1.) (165).

Werden *in vitro* isolierte, Triggerfaktor-freie 50S Untereinheiten mit steigenden Konzentrationen Triggerfaktor inkubiert und anschließend die ribosomalen Komplexe isoliert und für eine Analyse mittels SDS-PAGE verwendet, ist wie im Fall von 70S Partikeln eine Sättigung der 50S Fraktion durch Triggerfaktor zu beobachten (ABB. 3-13). Aus der Analyse der Daten läßt sich ebenfalls eine 1:1 Stöchiometrie ableiten.

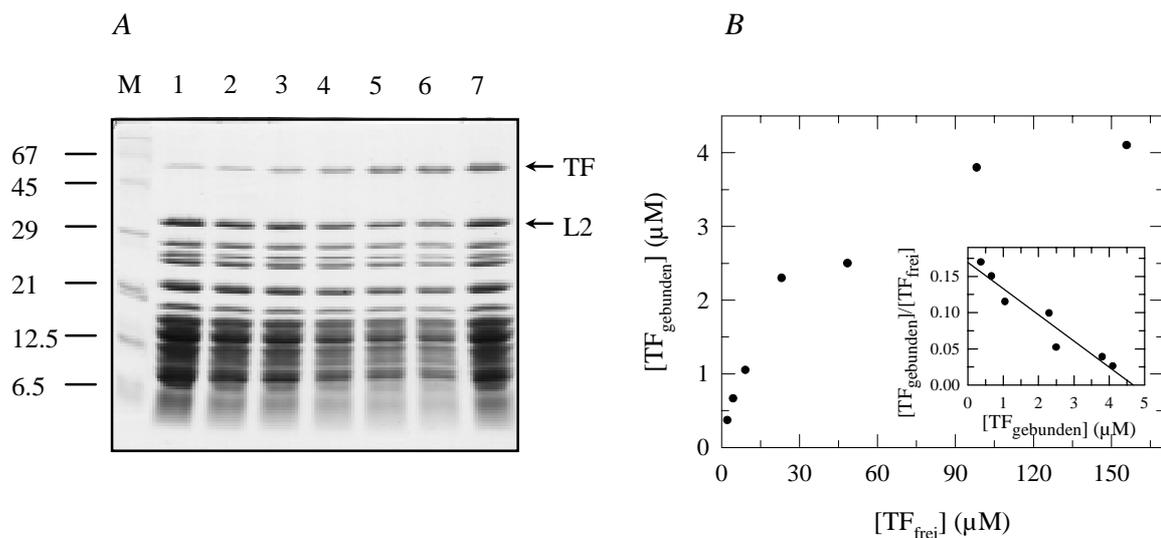


ABB. 3-13. Sättigung der 50S Untereinheiten mit Triggerfaktor. Die 50S Untereinheiten (5.1 μM, isoliert aus dem *E. coli* BG87-Stamm nach Wachstum unter Glukose) wurden mit steigenden Konzentrationen Triggerfaktor in Puffer D inkubiert und anschließend ultrazentrifugiert. Die resuspendierten Untereinheiten wurden für die SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) verwendet (A). Es erfolgte eine Quantifizierung der Triggerfaktor- und L2-Banden nach Digitalisierung. Die Ausgangskonzentrationen von Triggerfaktor waren (1) 2.6 μM, (2) 5.1 μM, (3) 10.2 μM, (4) 25.5 μM, (5) 102 μM, (6) 160 μM und (7) 51 μM, (M) molekularer Massstandard. (B) Sättigungskurve der Triggerfaktorbindung an 50S Untereinheiten. Die eingefügte Grafik illustriert die Daten in Form einer Scatchard-Auftragung.

3.4. Untersuchungen zu enzymkinetischen Eigenschaften des *E. coli* Triggerfaktors

3.4.1. Enzymatische Aktivität des Triggerfaktors gegenüber Tetratpeptid-4-Nitroaniliden

Die enzymatische Aktivität von PPIasen kann sowohl gegenüber Oligopeptid- als auch Polypeptidsubstraten bestimmt werden. Während über die Spezifität bezüglich der Proteinsubstrate noch recht wenig bekannt, weisen die Enzyme verschiedener PPIase-Familien eine charakteristische Substratspezifität gegenüber Tetrapeptid-4-Nitroaniliden auf

(122). Die Rolle der P₁-Position* bei der Katalyse durch Triggerfaktor wurde anhand von neun Tetrapeptid-4-Nitroaniliden der Sequenz Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NA untersucht (vgl. TAB. 3-2). Eine solche Substratspezifität bzw. die Verhältnisse der Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M können genutzt werden, um eine Einteilung der PPIasen in bestimmte Familien vorzunehmen. So ist z.B. das Verhältnis der Spezifitätskonstanten zweier Substrate wie Xaa = Phe zu Xaa = Ala für *E. coli* Cyp18 0.3, für Parvulin 1.6, für *E. coli* FKBP22 16.6 und für Triggerfaktor 5.0. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei den eukaryotischen Vertretern der jeweiligen PPIase-Familie, wie z.B. cytosolischem Rinder-Cyp18 (bCyp18) und hFKBP12 (185), vor. Die Substratspezifität des Triggerfaktors ähnelt dabei am meisten der von FKBP-verwandten Enzymen. Substrate, die Aminosäurereste mit hydrophoben Seitenketten in der P₁-Position enthalten, scheinen bevorzugt katalysiert zu werden.

Die enzymatische Aktivität des isolierten Triggerfaktors ließ sich nicht durch hohe Konzentrationen FK506 (25 μM) inhibieren. Ebenso erfolgte keine Inhibierung der enzymatischen Aktivität durch CsA (30 μM). Da bisher auch kein anderer Inhibitor der PPIase-Aktivität des Triggerfaktors gefunden werden konnte, war es nicht möglich, durch Titration des aktiven Zentrums die Anzahl der enzymatisch aktiven Proteinmoleküle in einer gereinigten Enzymcharge genauer zu bestimmen. Der im α -Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest bestimmte k_{cat}/K_M -Wert von $0.74 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für authentischen *E. coli* Triggerfaktor für das Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA spiegelt daher den unteren Grenzwert der Enzymaktivität wider.

Der Wert der Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M für rekombinanten Triggerfaktor wurde im gleichen Meßsystem mit $1.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt. Das rekombinante Enzym wies im Vergleich zum authentischen Protein keine veränderte Substratspezifität auf. Der ermittelte k_{cat}/K_M -Wert wird gut durch die Einzelparameter, $K_M = 376 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 264 \text{s}^{-1}$ reflektiert, die im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest für das *cis*-Konformer des Substrats Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA ermittelt werden konnten (ABB. 3-14).

Um auch die kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung der -Phe-Pro-Peptidbindung im Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA zu bestimmen, wurde ein ungekoppelter, proteasefreier PPIase-Aktivitätstest (176) angewandt. Bedingt durch die Einstellung eines neuen *cis/trans*-Gleichgewichtes, die bei diesem Test durch einen Lösungsmittelsprung induziert wird, sind prinzipiell die enzymkinetischen Parameter der

* Die Nomenklatur nach Schechter und Berger (184) für die Aminosäurepositionen in Proteasesubstraten wurde analog für PPIase-Substrate verwendet, d.h. die Aminosäure N-terminal zum Prolin wird als P₁-Position betrachtet.

Katalyse für beide Reaktionen, der *cis* → *trans* und der *trans* → *cis* Isomerisierung, zugänglich. Da im verwendeten Substratkonzentrationsbereich (bis 1.2 mM) keine Sättigung des Triggerfaktors erreicht wurde, und mit steigenden Konzentrationen des Substrates das Signal/Rauschverhältnis erheblich reduziert wurde, konnte keine gesicherte Auswertung der Daten erfolgen.

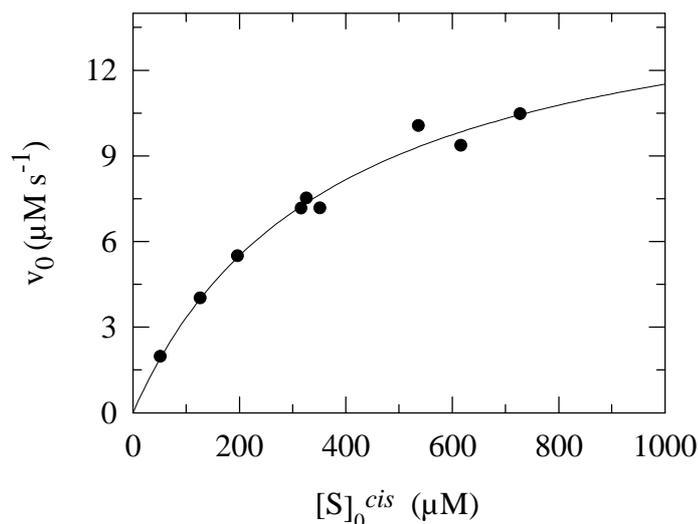


ABB. 3-14. Michaelis-Menten-Auftragung der Triggerfaktor-katalysierten *cis* → *trans* Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA. Die Messungen erfolgten im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7.8) bei 10 °C in Gegenwart von 53 nM Triggerfaktor. Als Lösungsmittel für das Substrat diente 0.47 M LiCl/TFE. Aus der Anpassung der Daten (durchgezogene Linie) ergaben sich ein K_M -Wert von 376 μM und ein k_{cat} -Wert von 264 s^{-1} . Die Daten wurden freundlicherweise von S. Wöllner (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt.

3.4.2. Enzymatische Aktivität des Triggerfaktors bei der Proteinfaltung

Es wird angenommen, daß die PPIase-Funktion für Proteinfaltungsvorgänge bedeutsam ist. Daher sollte die Bestimmung der PPIase-Aktivität gegenüber Proteinsubstraten, deren Faltungsrates durch die Reaktion der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen limitiert ist, eine bessere Aussage über die katalytische Effizienz dieser Enzyme zulassen.

Die katalytischen Eigenschaften des Triggerfaktors bei der Rückfaltung einer modifizierten Variante der RNase T1 (Ser⁵⁴Gly/Pro⁵⁵Asn) (177), hier als RCM-T1 bezeichnet, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von F.X. Schmid (Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth) untersucht. Dabei zeigte sich, daß Triggerfaktor ungewöhnlich wirksam die Rückfaltung der RCM-T1 katalysiert (ABB. 3-15).

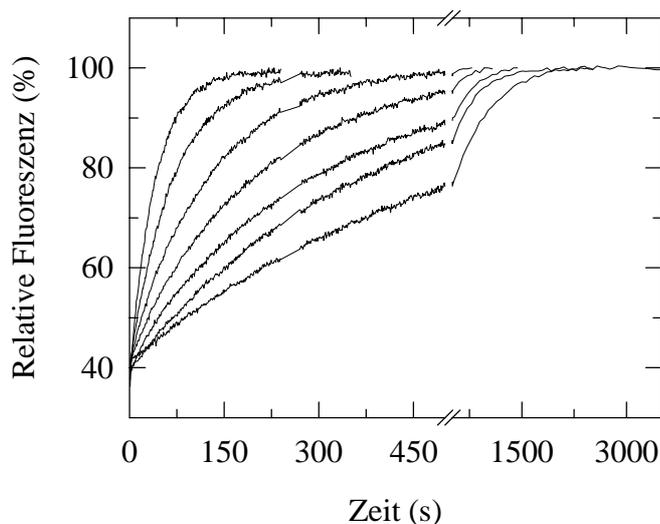


ABB. 3-15. Katalyse der Rückfaltung der RCM-T1 durch steigende Konzentrationen des Triggerfaktors bei 15 °C. Die Zunahme der Fluoreszenz bei 320 nm (nach Anregung bei 268 nm) wurde detektiert und der Maximalwert auf 100 % normiert. Die Rückfaltung der entfalteten RCM-T1 (in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) wurde durch 40-fache Verdünnung in 0.1 M Tris/HCl (pH 8.0), 2 M NaCl, initiiert, so daß die Endkonzentration 0.7 µM betrug. Von unten nach oben waren folgende Konzentrationen Triggerfaktor zugegen: 0, 0.7, 1.3, 2.6, 5.2, 10.5 und 21 nM. In der gleichen Reihenfolge wurden die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten mit 1.77, 2.74, 3.56, 5.02, 7.80, 14.40 und 25.60 × 10⁻³ s⁻¹ bestimmt. Mit freundlicher Genehmigung von Ch. Scholz und F.X. Schmid (Universität, Bayreuth).

Die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Ch. Scholz, Universität Bayreuth) liegt dabei in der Größenordnung von k_{cat}/K_M -Werten, die in proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstests mit Tetrapeptidderivaten für Triggerfaktor bestimmt wurden. In Hinsicht auf die lokale Sequenz der RCM-T1 (-Tyr-Pro³⁹-His-) wurden für die vergleichenden Messungen Peptidderivate der Sequenz Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA, Suc-Ala-Phe-Pro-Gln-4-NA sowie Suc-Ala-Tyr-Pro-Gln-4-NA verwendet (TAB. 3-3).

TAB. 3-3. Vergleich der katalytischen Effizienz [k_{cat}/K_M (µM⁻¹s⁻¹)] von hCyp18 und Triggerfaktor gegenüber Tetrapeptidderivaten und der RCM-T1.

Substrat	Triggerfaktor ^a	hCyp18 ^a	Triggerfaktor ^b	hCyp18 ^b
Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA	0.85	6.90	2.70	10.80
Suc-Ala-Phe-Pro-Gln-4-NA	0.42	5.50	1.60	8.00
Suc-Ala-Tyr-Pro-Gln-4-NA	0.12	4.90	0.50	6.30
RCM-T1			1.10 ^c	0.049 ^d

Die Messungen wurden in ^a 0.035 M HEPES (pH 7.8) bei 10 °C oder ^b 0.1 M Tris/HCl (pH 8.0), 2 M NaCl, bei 15 °C im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest durchgeführt. ^c (186), ^d (187).

Im Gegensatz zu hCyp18 hat Triggerfaktor eine ausgeprägte Substratspezifität, die z.B. in der fünffachen Verringerung der Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M sichtbar wird, wenn Phe gegen das ähnliche Tyr in der P₁-Position ausgetauscht ist. Während die Katalyseeffizienz des hCyp18

unter identischen experimentellen Bedingungen gegenüber dem Peptidsubstrat Suc-Ala-Tyr-Pro-Gln-4-NA ca. 100-fach höher war als gegenüber dem Proteinsubstrat, war die katalytische Effizienz des Triggerfaktors gegenüber beiden Substraten vergleichbar hoch.

3.5. Untersuchungen zur Stabilität des Triggerfaktors mittels limitierter Proteolyse

3.5.1. Proteolytische Stabilität des Triggerfaktors gegenüber verschiedenen Serinproteasen

In Hinblick auf ihre molekulare Masse sind die Vertreter der verschiedenen PPIase-Familien heterogen. Die in einem üblichen PPIase-Aktivitätstest mit derivatisierten Oligopeptidsubstraten meßbare enzymatische Aktivität wird schon durch Proteine im Bereich von 10 kDa (z.B. *E. coli* Parvulin) bis 18 kDa (z.B. *E. coli* Cyp18) effizient vermittelt. Es hat sich gezeigt, daß die Proteine mit einer höheren molekularen Masse aus mehreren Domänen bestehen und mindestens eine PPIase-homologe Domäne besitzen.

Triggerfaktor hat im Vergleich zu vielen anderen PPIasen eine relativ hohe molekulare Masse von ca. 48 kDa. Bei den ersten Versuchen zur Isolierung des Proteins anhand seiner PPIase-Aktivität konnten nur N-terminal verkürzte Fragmente erhalten werden (166), was auf eine hohe Empfindlichkeit des Proteins gegenüber Proteasen hinwies. Zu diesem Zeitpunkt gab es keine Information über die Existenz einer PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors. Auch in Hinsicht auf die hohen Proteasekonzentrationen im benutzten Meßsystem war es daher aufschlußreich, Triggerfaktor mittels limitierter Proteolyse zu untersuchen. Dazu wurden die Proteasen α -Chymotrypsin, Subtilisin, Trypsin und Thrombin eingesetzt, die alternativ im PPIase-Aktivitätstest verwendbar sind. Die Stabilität des Triggerfaktors gegenüber diesen Proteasen wurde anhand von Westernblot-Analysen und Messung der PPIase-Aktivität verglichen. In ABB. 3-16 sind die Ergebnisse der limitierten Proteolyse des Triggerfaktors durch verschiedene Proteasen zusammengefaßt. Dabei wurde die jeweilige Protease in der Konzentration eingesetzt, die im gekoppelten PPIase-Aktivitätstest verwendet wird (vgl. TAB. 2-2). Die Konzentration des Triggerfaktors war ca. 10-fach höher als in einem Meßansatz zur PPIase-Aktivitätsbestimmung, um die Nachweisgrenze für eventuelle Spaltprodukte durch die Westernblot-Analyse zu erhöhen.

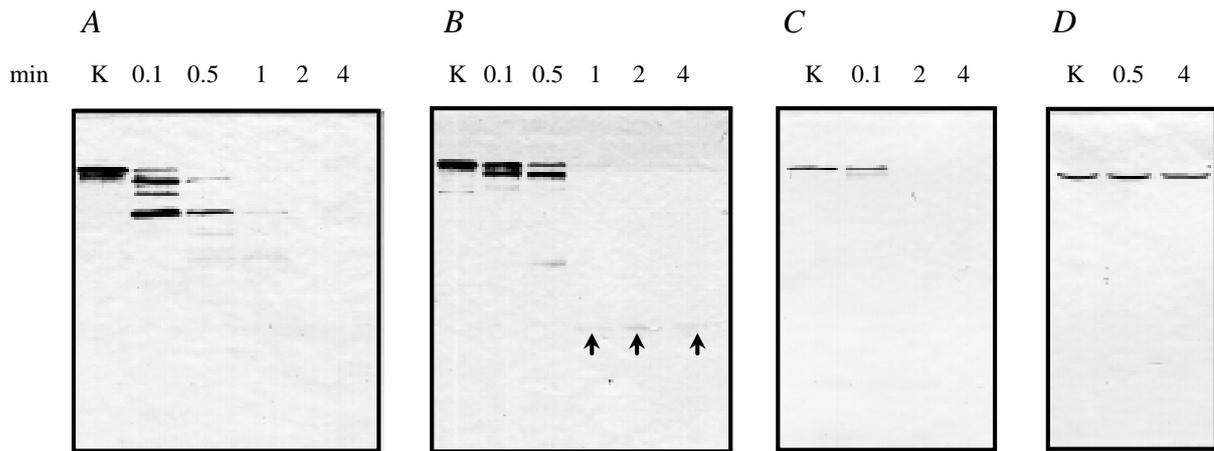


ABB. 3-16. Proteolytische Stabilität des Triggerfaktors. Triggerfaktor wurde die angegebenen Zeiten mit α -Chymotrypsin (**A**), Subtilisin (**B**), Trypsin (**C**) und Thrombin (**D**) inkubiert (30 μ l) und die Reaktion anschließend durch Zugabe des entsprechenden Proteaseinhibitors gestoppt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Westernblot-Verfahren mit polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Antikörpern. In jeder Versuchsreihe wurde eine Kontrollprobe (*K*) Triggerfaktor mit bereits inaktivierter Protease inkubiert. (**A**) Verdau von Triggerfaktor (1 μ M) durch α -Chymotrypsin (36 μ M). Die proteolytische Reaktion wurde durch Zugabe von Eglin c im fünffachen molaren Überschuß (pH 5.5) gestoppt. (**B**) Verdau von Triggerfaktor (0.4 μ M) mit Subtilisin (2.3 μ M). Die Protease wurde durch PMSF (1 mM) inaktiviert. Die Pfeile markieren ein 13 kDa Spaltprodukt. (**C**) Verdau von Triggerfaktor (0.3 μ M) mit Trypsin (0.4 μ M). Die Inaktivierung von Trypsin erfolgte durch Zugabe von 0.8 μ M Trypsininhibitor (Sojabohne). (**D**) Proteolyse von Triggerfaktor (0.3 μ M) durch Thrombin (56 μ M). Die Inaktivierung von Thrombin erfolgte durch Zugabe von PMSF (1 mM).

Wie aus ABB. 3-16 ersichtlich ist, wird Triggerfaktor durch alle Proteasen mit Ausnahme von Thrombin hydrolysiert. Dabei ist schon innerhalb weniger Sekunden kein intaktes Protein mehr nachweisbar. Im Widerspruch dazu stand die unveränderte PPIase-Aktivität, auch nach Inkubationszeiten bis zu 30 min mit α -Chymotrypsin und Subtilisin im Vergleich zu einer Probe, die ohne Protease inkubiert wurde. Ebenso unterschieden sich die bestimmten k_{cat}/K_M -Werte von $1.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $1.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-4-NA als Substrat im Trypsin- bzw. Thrombin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest nicht. Es gelang zwar, in manchen Experimenten nach Subtilisin- oder α -Chymotrypsinbehandlung des Triggerfaktors ein Produkt mit einer molekularen Masse von etwa 13 kDa auf der Nitrozellulosemembran eines Westernblots zu erkennen, die Intensität der entsprechenden Bande war jedoch sehr schwach (vgl. ABB. 3-16, **B**, Bahnen 4-6). Möglicherweise war die Reaktivität der verwendeten Antikörper für dieses Fragment nicht sehr hoch. In weiteren Versuchen erfolgte deshalb die Analyse durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels. Da die beobachtete Bande nach chymotryptischem Verdau und SDS-PAGE im 1D-Gel durch ein Proteasefragment überlagert war, wurden die folgenden Experimente mit Subtilisin durchgeführt. Zur besseren Kontrolle der proteolytischen Reaktion wurde das Verhältnis von

Substrat (Triggerfaktor) zu Protease (Subtilisin) erhöht und der Fortschritt der Hydrolyse über einen längeren Zeitraum verfolgt. Dazu wurde Triggerfaktor ($0.6 \mu\text{M}$) mit Subtilisin (50 nM) 13 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde eine Probe aus dem Ansatz entnommen, mit PMSF versetzt und für eine SDS-PAGE verwendet (ABB. 3-17, A). Nach 2 h konnte eine Bande bei ca. 13 kDa beobachtet werden, die auch nach 13 h Inkubation in nur leicht verminderter Intensität noch sichtbar war. Zur Bestimmung der PPIase-Aktivität wurden in einem ähnlichen Experiment Triggerfaktor und Subtilisin in gleichen Konzentrationsverhältnissen inkubiert (ABB. 3-17, B). Ein entsprechender Kontrollansatz ohne Protease wurde ebenso behandelt. Die über den Zeitraum nahezu erhaltene katalytische Aktivität scheint dabei mit der Intensität der beobachteten 13 kDa Bande im SDS-Polyacrylamidgel etwa übereinzustimmen, woraus die Existenz eines enzymatisch aktiven Fragmentes vermutet wurde.

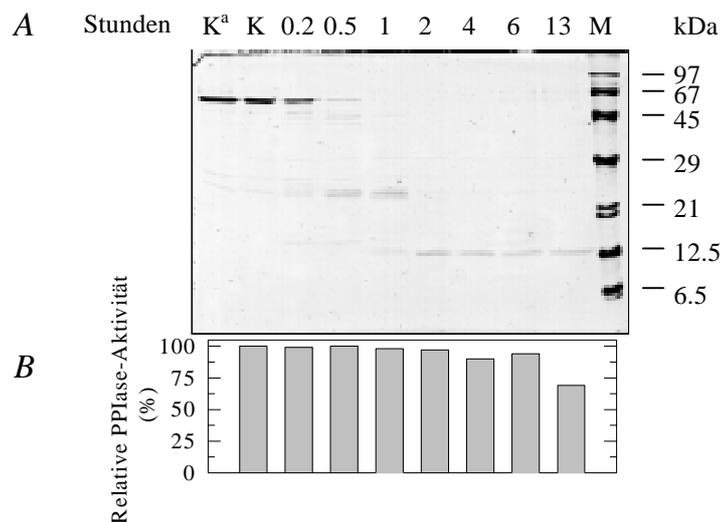


ABB. 3-17. Proteolyse des Triggerfaktors durch Subtilisin. Triggerfaktor wurde im Verhältnis 12:1 mit Subtilisin die angegebenen Zeiten inkubiert, und die Reaktion anschließend durch PMSF (1 mM) abgestoppt. Der Fortschritt der Proteolyse wurde durch SDS-PAGE ($15 \text{ } \%$ Acrylamid, Coomassie-Färbung) (A) oder Messung der PPIase-Aktivität (B) analysiert. (K) Kontrollprobe, in der Triggerfaktor mit bereits inaktivierter Protease (durch 1 mM PMSF) inkubiert wurde, (K^a) Triggerfaktor, der ohne Subtilisin unter gleichen Bedingungen behandelt wurde, (M) molekularer Massestandard.

3.5.2. Isolierung des PPIase-aktiven Triggerfaktorfragmentes

Die Isolierung und Identifizierung des PPIase-aktiven Fragmentes gelang durch Proteolyse des Triggerfaktors mit Subtilisin. Dazu wurden Triggerfaktor und Subtilisin im Verhältnis 25:1 für 8 h bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und nach Inhibierung der Proteaseaktivität durch PMSF mittels Gelfiltration getrennt (ABB. 3-18). Die mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA bestimmte PPIase-Aktivität wurde in den Proteinfractionen detektiert, die molekularen

Massen von 56 und 29 kDa entsprachen, wobei in der letzteren Fraktion (29 kDa) eine ca. vierfach höhere Aktivität zu verzeichnen war. Die nicht zur PPIase-Aktivitätsbestimmung verwendete, noch verfügbare Probe dieser zweiten Fraktion wurde mit Hilfe von RP-HPLC analysiert. Ein einziges Produkt wurde eluiert (ABB. 3-19), dessen N-terminale Sequenz durch automatischen Edman-Abbau mit RKQQATWKEKDGAVEAEDRVTIDFTGSVDG bestimmt werden konnte. Die molekulare Masse dieses Fragmentes wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit 11 846 Da ermittelt (ABB. 3-20). Aus diesen Daten ließ sich ein PPIase-aktives Teilfragment bestehend aus den Aminosäureresten Arg¹⁴⁵-Glu²⁵¹ des Triggerfaktors ableiten, dessen theoretische molekulare Masse mit 11 846.6 Da berechnet wurde.

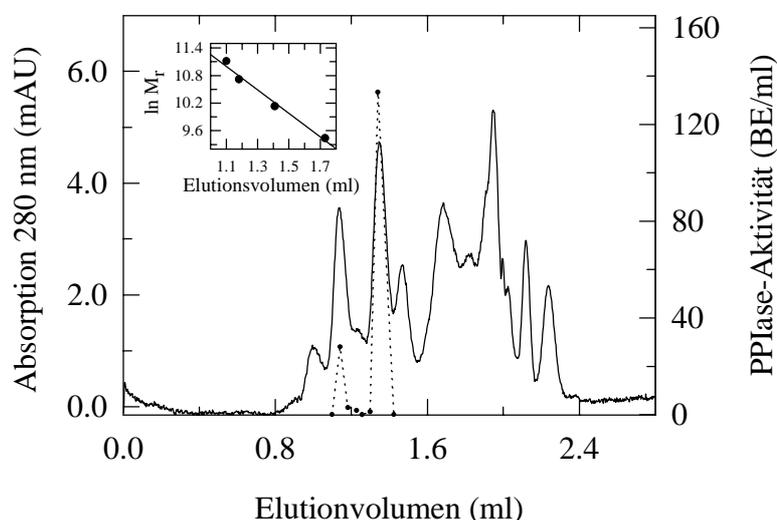


ABB. 3-18. Elutionsschema der Gelfiltration nach Proteolyse des Triggerfaktors mit Subtilisin. Triggerfaktor (4 μ M) wurde mit Subtilisin (0.15 μ M) 8 h bei 0 °C inkubiert. Eine 50 μ l Probe wurde anschließend auf die Superdex75TM PC3.2/30 Säule mit einer Flußrate von 40 μ l/min aufgetragen (10 mM HEPES-Puffer (pH 7.5), 150 mM KCl). Von den fraktionierten 40 μ l Proben wurden 20 μ l zur Bestimmung der PPIase-Aktivität verwendet. Die Messungen erfolgten im Subtilisin-gekoppelten PPIase-Aktivitätstest. Als Substrat diente Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA. Dargestellt sind die Absorption bei 280 nm (—) sowie die enzymatische Aktivität (·····). Die Eichung wurde unter identischen Bedingungen mit BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), α -Chymotrypsinogen (25 kDa) und Cytochrom *c* (12.5 kDa) durchgeführt. Die Eichkurve ist in der eingefügten Grafik abgebildet.

Zur weiteren Analyse von Spaltprodukten des Triggerfaktors wurde eine Probe des proteolytischen Gemisches durch RP-HPLC getrennt. Dabei konnten hauptsächlich fünf Produkte separat eluiert werden, die anschließend durch SDS-PAGE analysiert wurden (ABB. 3-21). Neben einigen höhermolekularen Produkten und dem katalytischen Fragment, das durch die Elutionszeit und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert wurde, fiel vor allem ein weiteres Fragment mit einer molekularen Masse von ca. 14 kDa auf (ABB. 3-21,

Produkt 4). Die N-terminale Sequenz dieses Spaltproduktes (MQVSVE) ist identisch mit der N-terminalen Sequenz des vollständigen Triggerfaktors.

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, daß Triggerfaktor wahrscheinlich in Form mehrerer Domänen organisiert ist.

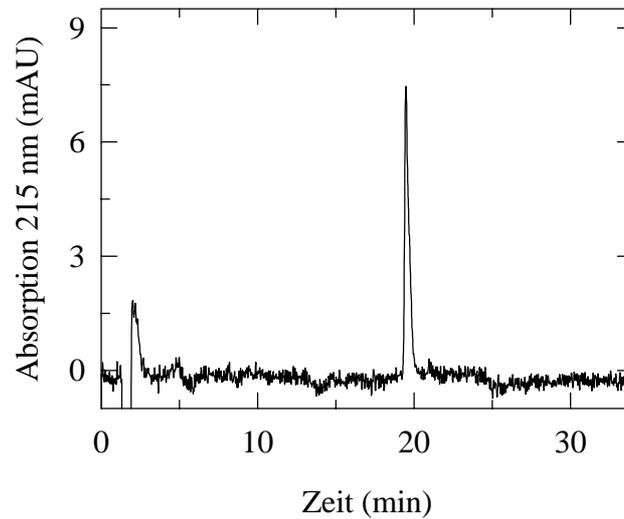


ABB. 3-19. RP-HPLC der 29 kDa Proteinfraction nach Hydrolyse des Triggerfaktors mit Subtilisin und Trennung der Proteolyseprodukte durch Gelfiltration. Die Elution erfolgte bei 40 °C und einer Flußrate von 1 ml/min mit einem Acetonitrilgradienten von 20-60 % (v/v) in 0.09 % wäßriger Trifluoressigsäure innerhalb von 40 min.

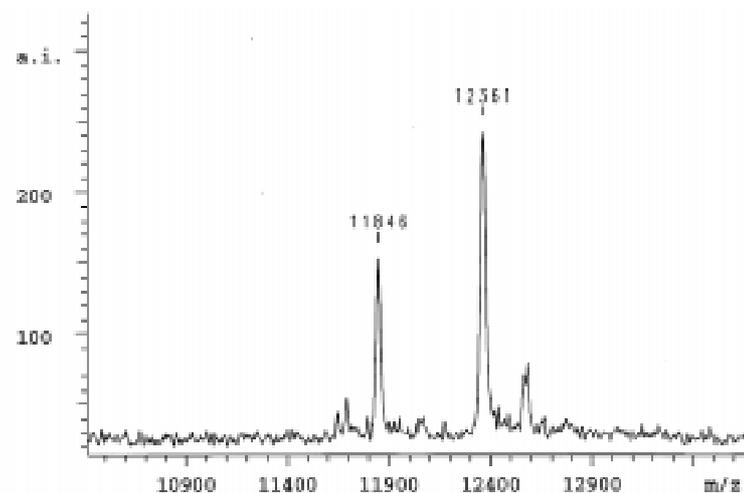


ABB. 3-20. MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten, PPIase-aktiven Fragmentes nach Proteolyse des nativen Triggerfaktors durch Subtilisin. Die Kalibrierung erfolgte durch den internen Standard Cytochrom *c* (12 361 Da).

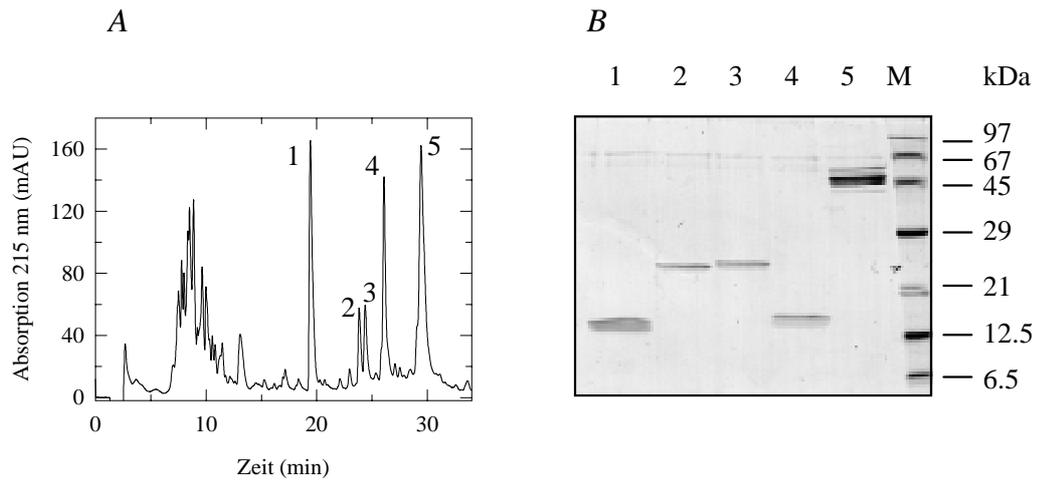


ABB. 3-21. Analyse der proteolytischen Fragmente des Triggerfaktors durch RP-HPLC (A) und SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) (B). 500 µl des Spaltansatzes (4 µM Triggerfaktor, 0.15 µM Subtilisin, 8 h, 0 °C) wurden bei einer Flußrate von 1 ml/min und 40 °C durch RP-HPLC getrennt. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 20-60 % Acetonitril (v/v) in 0.09 % wäßriger Trifluoressigsäure innerhalb von 40 min. Die separierten Spaltprodukte (1, 2, 3, 4 und 5) (A) wurden anschließend per SDS-PAGE (B) analysiert und die N-terminalen Sequenzen der Fragmente 1 und 4 durch automatischen Edman-Abbau ermittelt. Die Sequenzen der entsprechenden Fragmente sind identisch mit der internen Sequenz (RKQQA¹⁴⁹) (1) und der N-terminalen Aminosäuresequenz (MQVSVE) (4) des intakten Triggerfaktors. (M) molekularer Massestandard.

3.6. Überexpression des PPIase-aktiven Fragmentes des Triggerfaktors

Das PPIase-aktive Teilfragment bestehend aus den Aminosäureresten Met¹⁴⁰-Ala²⁵⁰ des Triggerfaktors sowie N- und C-terminalen Erweiterungen (ABB. 3-22) wurde freundlicherweise von T. Tradler (MPG, Halle) kloniert und in *E. coli* exprimiert (ABB. 3-23, A).

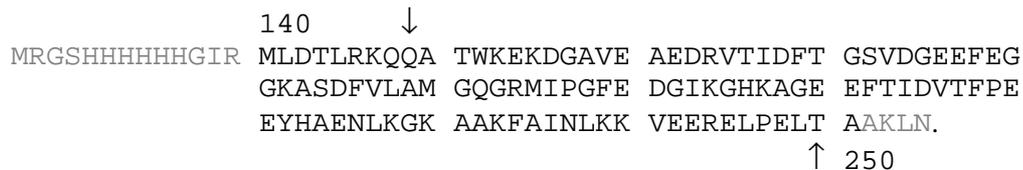


ABB. 3-22. Aminosäuresequenz des exprimierten Triggerfaktorfragmentes. Zusätzliche Sequenzbereiche sind grau dargestellt. Die Pfeile grenzen ein Sequenzsegment ein, das nach der Hydrolyse durch Subtilisin als kleinstes PPIase-aktives Fragment des Triggerfaktors identifiziert wurde.

Die N-terminal fusionierte histidinreiche Sequenz ermöglichte eine Anreicherung des Fragmentes durch Metallchelataffinitätschromatographie, in deren Anschluß eine Gelfiltration erfolgte. Das so erhaltene Protein war über 95 % homogen was durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels verifiziert wurde (ABB. 3-23, B).

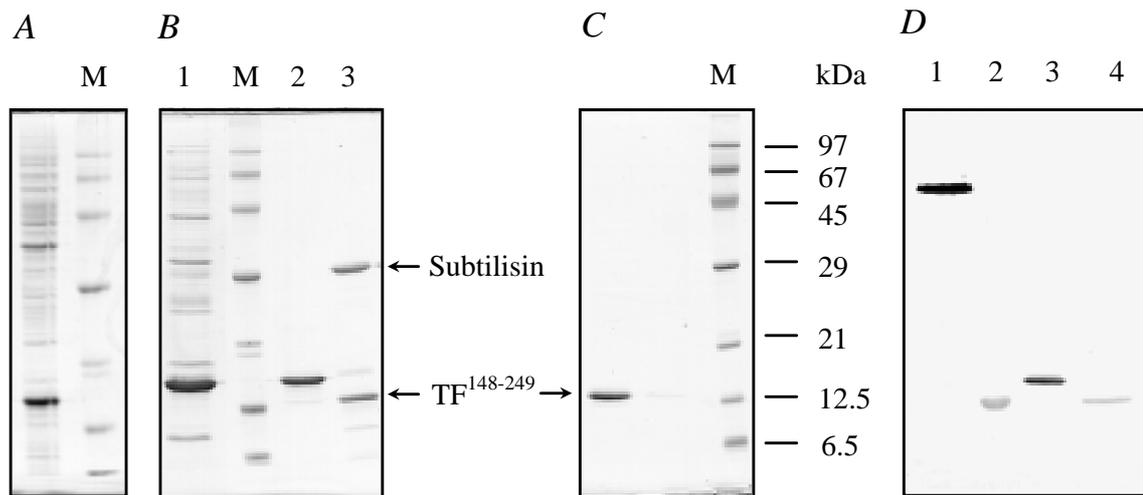


ABB. 3-23. Isolierung des rekombinanten PPIase-aktiven Fragmentes des Triggerfaktors. SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) (A-C) nach (A) Expression des Triggerfaktorfragmentes (Met¹⁴⁰-Ala²⁵⁰) in *E. coli*, (B) Reinigung und Hydrolyse des Fusionsproteins durch Subtilisin (1 min, 23 μ M); Fraktionen der (1) Metallchelataffinitätschromatographie, (2) Gelfiltration und (3) des Proteolyseansatzes sowie (C) Trennung des Spaltproduktes von der Protease durch Anionenaustauschchromatographie. (M) molekularer Massestandard. (D) Westernblot-Analyse mit polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Antikörpern, (1) Triggerfaktor, (2) authentisches proteolytisches Fragment (Arg¹⁴⁵-Glu²⁵¹) nach Subtilisinbehandlung des vollständigen Triggerfaktors, (3) rekombinantes Triggerfaktorfragment mit N-terminaler Sequenzextension (Met¹⁴⁰-Ala²⁵⁰) und (4) Produkt nach Hydrolyse durch Subtilisin (Gln¹⁴⁸-Thr²⁴⁹).

Die ursprünglich für Subtilisin gefundene Spaltstelle (-Leu-Arg¹⁴⁵- der Triggerfaktorsequenz) war in dem gereinigten Fragment noch enthalten. Um die N-terminale Extension abzuspalten, wurde das rekombinante Protein mit Subtilisin 1 min verdaut. Nach dem Stoppen der Proteolyse durch Zugabe von PMSF (1 mM) wurde das Spaltprodukt durch Anionenaustauschchromatographie von der Protease getrennt. Das erhaltene Fragment erschien homogen nach der SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (ABB. 3-23, C). Die N-terminale Sequenz wurde mit QATWKEKDG ermittelt. Ausgehend von dieser Sequenz und der durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmten molekularen Masse von 11 235.4 Da ließ sich ein Fragment bestehend aus der Teilsequenz Gln¹⁴⁸-Thr²⁴⁹ des Triggerfaktors ableiten (ABB. 3-22), dessen theoretische molekulare Masse mit 11 233.6 Da berechnet wurde.

3.7. Untersuchungen zur Domänenorganisation des Triggerfaktors

3.7.1. Katalytische Aktivität der zentralen Domäne TF¹⁴⁸⁻²⁴⁹

Für das rekombinante Triggerfaktorfragment wurde im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest ein k_{cat}/K_M -Wert von 1.2 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA bestimmt. Für den Vergleich der katalytischen Aktivitäten des Fragments mit der des

vollständigen Triggerfaktors wurde ein alternativer, ungekoppelter PPIase-Aktivitätstest mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-MA als Substrat angewandt (vgl. TAB. 3-4) (175, 176). Mit diesem Testsystem wurde der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert mit $3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sowohl für rekombinanten Triggerfaktor als auch für das Triggerfaktorfragment Gln¹⁴⁸-Thr²⁴⁹ ermittelt. Damit scheint das Fragment das kleinste, enzymatisch aktive Modul des Triggerfaktors zu sein, welches die katalytische Effizienz des kompletten Proteins gegenüber Tetrapeptidsubstraten bewahrt.

Im Gegensatz dazu ist die katalytische Effizienz des PPIase-aktiven Fragmentes bei der Rückfaltung der RCM-T1 im Vergleich zum vollständigen Triggerfaktor etwa 600-fach verringert und ist vergleichbar mit der Faltungseffizienz von Eindomänen-PPIasen wie z.B. hFKBP12 (ABB. 3-24). Daraus geht hervor, daß die PPIase-Katalyse durch das zentrale Triggerfaktorfragment Gln¹⁴⁸-Thr²⁴⁹ vermittelt wird, die hohe Katalysestärke des Triggerfaktors gegenüber einem Proteinsubstrat jedoch aus zusätzlichen Bindungsstellen der N- und C-terminalen Bereiche resultiert.

Die zusätzliche Bindung des Substrates RCM-T1 durch die flankierenden Bereiche der Triggerfaktor-PPIase-Domäne und die dadurch erreichte Erhöhung der Katalyseeffizienz wird möglicherweise auch durch die relativ hohe Restaktivität der Phe²³³Tyr-Variante des Triggerfaktors während der Rückfaltung der RCM-T1 reflektiert. Diese Proteinvariante erreichte im PPIase-Aktivitätstest mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA nur noch 1 % der katalytischen Effizienz des Wildtypenzym (vgl. auch Abschn. 3.8.4.). Dagegen konnte der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert aus der Rückfaltungsreaktion mit $3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ abgeschätzt werden, was einer Restaktivität von ca. 30 % im Vergleich zum Wildtypenzym entspricht (ABB. 3-24).

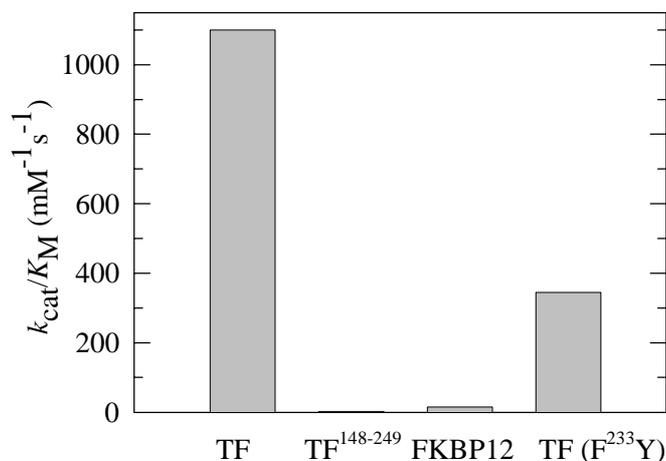


ABB. 3-24. Vergleich der katalytischen Effizienz von Triggerfaktor, der PPIase-aktiven Domäne (TF¹⁴⁸⁻²⁴⁹), des hFKBP12 und der Triggerfaktor (Phe²³³Tyr)-Variante bei der Rückfaltung der RCM-T1. Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte wurden mit $1100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Triggerfaktor^a, $1.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für TF^{148-249 (a)} und $15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für hFKBP12^a (^a Ch. Scholz, Universität Bayreuth) sowie mit $345 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Triggerfaktor (Phe²³³Tyr)-Variante bestimmt.

3.7.2. Expression und Reinigung verschiedener Domänenkonstrukte des Triggerfaktors

Ausgehend von den Ergebnissen der limitierten Proteolyse erfolgte die Unterteilung des Triggerfaktors in einen N-terminalen (TF^{1-145}), einen zentralen PPIase-aktiven ($\text{TF}^{145-251}$) sowie einen C-terminalen ($\text{TF}^{251-432}$) Bereich (ABB. 3-25). Die entsprechenden Proteinvarianten sowie die überlappenden Fragmente, TF^{1-251} und $\text{TF}^{145-432}$, wurden rekombinant hergestellt. Die dafür benötigten Expressionsstämme wurden freundlicherweise von T. Tradler (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt.

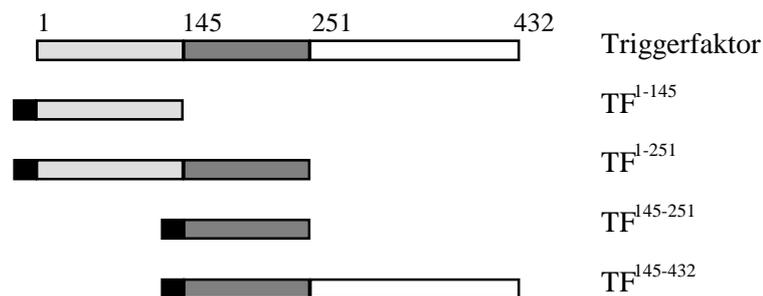


ABB. 3-25. Schematische Darstellung der verwendeten Domänenkonstrukte des *E. coli* Triggerfaktors. Die Numerierung der Aminosäurereste entspricht den Positionen im intakten Protein. Der schwarze Balken kennzeichnet die N-terminale Sequenzextension, die sechs Histidinreste enthält (siehe Abschn. 2.3.2.).

Die genannten Proteinvarianten wurden durch Metallchelataffinitätschromatographie isoliert. Die Fragmente, die die N-terminale Domäne enthielten (TF^{1-145} , TF^{1-251}), wurden weiter durch Gelfiltration und Farbstoffligandaffinitätschromatographie gereinigt. Für das Fusionsfragment $\text{TF}^{145-432}$ wurde durch den Schritt der Metallchelataffinitätschromatographie bereits über 95 % Homogenität erreicht, was durch Coomassie-Färbung nach einer SDS-PAGE verifiziert wurde. Mit Ausnahme der C-terminalen Domäne konnten die Proteinvarianten bis zu mindestens 95 % Homogenität gereinigt werden (ABB. 3-26).

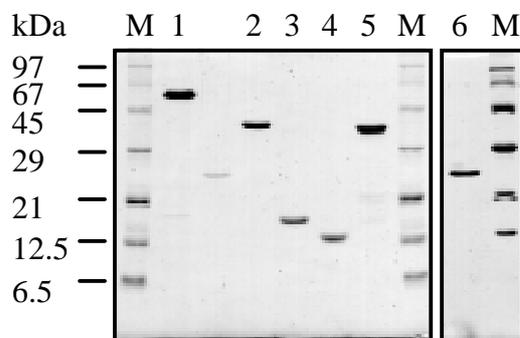


ABB. 3-26. SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) der gereinigten Triggerfaktorderivate. (M) molekularer Massestandard, (1) Triggerfaktor, (2) TF^{1-251} , (3) $\text{TF}^{145-251}$, (4) $\text{TF}^{145-251}$ ohne N-terminale Sequenzerweiterung, (5) $\text{TF}^{145-432}$, (6) TF^{1-145} .

Der C-terminale Bereich erwies sich in isolierter Form als proteolytisch instabil und wurde deshalb nicht für weitere Untersuchungen verwendet. Eine ausreichende Stabilität dieses Bereichs war jedoch in der mit der PPIase-Domäne fusionierten Form gegeben.

Die katalytische Aktivität der Fragmente wurde im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest mit dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-MA verglichen (TAB. 3-4). Mit diesem Substrat wurde im erwähnten Meßtest im Vergleich zu Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht, so daß sich die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M genauer bestimmen ließ. Alle rekombinanten Fragmente, die die PPIase-Domäne enthielten, zeigten in vergleichbarem Maße enzymatische Aktivität. Die etwas verringerte katalytische Aktivität im Fall der TF¹⁻²⁵¹-Variante könnte möglicherweise durch eine Beeinflussung durch die N-terminale histidinhaltige Sequenzerweiterung erklärt werden. Vergleichsweise zeigte auch rekombinant hergestellter Triggerfaktor mit dieser N-terminalen Fusion eine verringerte enzymatische Aktivität (TAB. 3-4).

TAB. 3-4. Katalytische Aktivität verschiedener Triggerfaktororderivate im ungekoppelten PPIase-Aktivitätstest gegenüber Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-MA als Substrat.

Proteinvariante	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Triggerfaktor	320
TF ¹⁻²⁵¹ (a)	140
TF ¹⁴⁸⁻²⁴⁹	320
TF ¹⁴⁵⁻⁴³² (a)	240
Triggerfaktor ^(a)	170

Die Messungen wurden bei 10 °C in 0.035 M HEPES-Puffer (pH 7.8) in Gegenwart von 300 nM BSA durchgeführt. Die mit ^(a) gekennzeichneten Proteinvarianten enthielten eine N-terminale Sequenzerweiterung, die u.a. aus sechs Histidinresten bestand (vgl. Abschn. 2.3.2.).

3.7.3. Bestimmung der ribosomalen Bindungsdomäne des Triggerfaktors

Die Zugänglichkeit zu den isolierten Fragmenten des Triggerfaktors konnte ausgenutzt werden, um einen eventuell vorhandenen Bereich einzugrenzen, der für die ribosomale Bindung notwendig ist. Die verschiedenen Triggerfaktorfragmente wurden deshalb in Hinsicht auf eine mögliche Ribosomenbindung untersucht. Die Proteinvarianten TF¹⁻²⁵¹, TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ sowie TF¹⁴⁵⁻⁴³² wurden in fünffachem Überschuß mit 70S_{reass} Ribosomen inkubiert, und anschließend die ribosomale Fraktion von nicht-assoziierten Bestandteilen durch Ultrazentrifugation über ein Saccharosekissen getrennt. Die Analyse erfolgte durch ein Westernblot-Verfahren (ABB. 3-27, A), bei dem Anti-Triggerfaktor-Antikörper im Fall der TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ und der TF¹⁴⁵⁻⁴³² Konstrukte verwendet wurden. Da diese Antikörper mit dem N-terminalen Bereich des Triggerfaktors kaum und darüber hinaus auch mit der PPIase-Domäne

relativ schwach wechselwirkten, wurde für TF¹⁻²⁵¹ ein gegen die N-terminale Domäne (TF¹⁻¹⁴⁵) entwickeltes, polyklonales Antiserum verwendet. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde festgestellt, daß mit der ribosomalen Fraktion nur das Fragment TF¹⁻²⁵¹ co-sedimentiert wurde. Bei der Betrachtung der entwickelten Nitrozellulosemembran fällt in dieser Fraktion (ABB. 3-27, A, Bahn 1) jedoch auch eine Proteinbande bei ca. 16 kDa auf, die möglicherweise ein proteolytisches Fragment darstellt. Dabei konnte ausgeschlossen werden, daß es sich um die PPIase-aktive Domäne handelt, da die verwendeten Antikörper spezifisch für die N-terminale Domäne sind. Die Triggerfaktorvarianten TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ und TF¹⁴⁵⁻⁴³² wurden nicht in der 70S Fraktion detektiert (ABB. 3-27, A, Bahnen 2 und 3). Es schien somit wahrscheinlich, daß die ribosomale Bindung des Triggerfaktors durch die N-terminale Domäne vermittelt wird. Um das zu verifizieren, wurden in einem ähnlichen Experiment steigende Konzentrationen TF¹⁻¹⁴⁵ mit 70S_{reass} Ribosomen (in den Verhältnissen 5:1, 10:1 und 20:1) inkubiert, und anschließend die ribosomale Fraktion sedimentiert. Die Analyse erfolgte erneut durch einen Westernblot, bei dem Anti-TF¹⁻¹⁴⁵-Antikörper verwendet wurden. Es zeigte sich hierbei, daß auch die isolierte N-terminale Domäne des Triggerfaktors zur Ribosomenbindung fähig ist. Die Intensität der Bande in den drei Sedimentfraktionen (ABB. 3-27, A, Bahnen 4-6 R) scheint dabei vergleichbar hoch zu sein im Gegensatz zur steigenden Intensität in den Überstandsfraktionen (Abb. 3-27, A, Bahnen 4-6, Ü). Das könnte auf eine Sättigung des Ribosoms mit TF¹⁻¹⁴⁵ hindeuten.

Die Fähigkeit des Triggerfaktors zur ribosomalen Bindung scheint darüber hinaus von einem intakten N-Terminus abhängig zu sein, da ein um mindestens 46 N-terminale Aminosäurereste verkürztes, proteolytisches Fragment (166) nicht mehr in der Lage war, Ribosomenbindung zu vermitteln (ABB. 3-27, B). Fragmente mit ähnlich verringerten molekularen Massen, sichtbar in der SDS-PAGE als Bande bei 54 kDa, wurden in der *E. coli* S100 (postribosomalen)-Fraktion beobachtet (vgl. ABB. 3-4, B, Bahn 2). Eine mögliche Interpretation wäre der Verlust der Bindungsaffinität zum Ribosom durch proteolytischen Verdau während des Zellaufschlusses.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß der N-terminale Bereich des Triggerfaktors eine Domäne bildet, die die Bindung des Triggerfaktors an das *E. coli* Ribosom vermittelt.

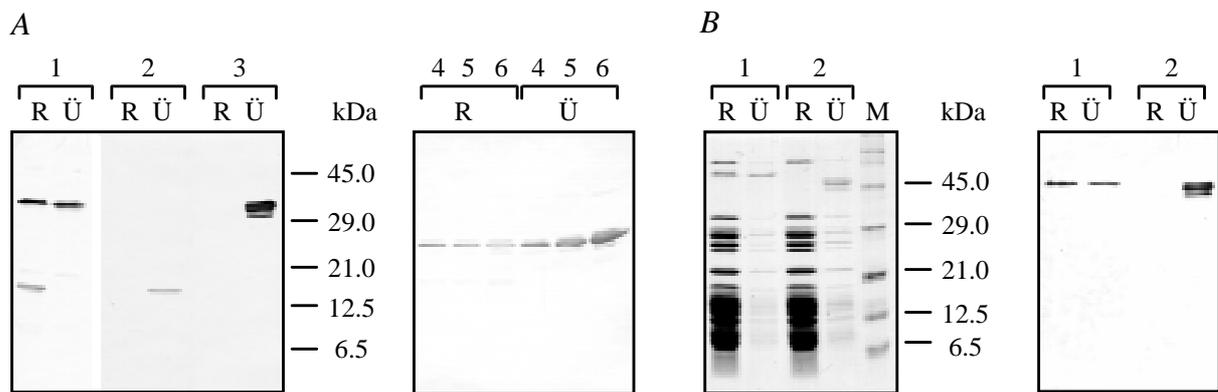


ABB. 3-27. Ribosomale Bindung des Triggerfaktors durch die N-terminale Domäne (TF^{1-145}). (A) Die Triggerfaktorvarianten wurden im fünffachen molaren Überschuß mit $70\text{S}_{\text{reass}}$ Ribosomen ($4 \mu\text{M}$) in Puffer D inkubiert. Zusätzlich wurde die N-terminale Domäne (TF^{1-145}) in den Verhältnissen 10:1 und 20:1 mit $70\text{S}_{\text{reass}}$ Ribosomen unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Ribosomen wurden von nicht-assoziierten Proteinen durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen getrennt und in Puffer A resuspendiert. Je 24 pmol wurden für einen Westernblot verwendet, der mit polyklonalen Anti-Triggerfaktor-Antikörpern (2-3) oder Anti- TF^{1-145} -Antiserum (1, 4-6) inkubiert wurde. (R) Ribosomale Fraktion und (Ü) Überstand nach Inkubation der Ribosomen mit (1) TF^{1-251} , (2) $\text{TF}^{145-251}$, (3) $\text{TF}^{145-432}$, (4-6) TF^{1-145} in den Verhältnissen 1:5 (1-4), 1:10 (5) und 1:20 (6). (B) Im Vergleich wurden Triggerfaktor und N-terminal proteolysierter Triggerfaktor (mindestens 46 Aminosäurereste) mit $70\text{S}_{\text{reass}}$ Ribosomen im Verhältnis 2:1 inkubiert und dann wie unter (A) beschrieben behandelt. Die Analyse erfolgte durch ein Westernblot-Verfahren mit Anti-Triggerfaktor-Antikörpern (rechts) oder SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) (links). (1) Triggerfaktor, (2) N-terminal um mindestens 46 Aminosäurereste verkürzter Triggerfaktor.

Vorausgesetzt, daß die strukturelle Integrität der N-terminalen Domäne in der konstruierten Proteinvariante (TF^{1-145}) erhalten ist, sollte die ribosomale Assoziation dieser isolierten Domäne der gleichen Stöchiometrie folgen, die für das vollständige Protein beobachtet wurde. Die Untersuchungen hierzu konnten jedoch nur mit dem erweiterten Fragment (TF^{1-251}) durchgeführt werden, da eine quantitative Auswertung nach eindimensionaler SDS-PAGE im Fall von TF^{1-145} nicht möglich war. In ABB. 3-28 ist dargestellt, daß auch die Bindung von TF^{1-251} an $70\text{S}_{\text{reass}}$ Ribosomen einer Sättigungskurve folgt, die auf eine 1:1 Assoziation der beiden Bindungspartner in den gebildeten Komplexen schließen läßt.

Unter der Annahme, daß die ribosomale Interaktion spezifisch ist, sollte eine Verdrängung des intakten Proteins vom Ribosom durch Co-Inkubation mit der N-terminalen Domäne möglich sein. Um das zu prüfen, wurden Triggerfaktor und TF^{1-251} in den Verhältnissen 1:1 und 1:4 zusammen mit $70\text{S}_{\text{reass}}$ Ribosomen inkubiert. Im Anschluß an die Trennung der ribosomalen Fraktion von nicht-assoziierten Proteinen durch Ultrazentrifugation wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (ABB. 3-29). Anhand der Verminderung der Intensität der Triggerfaktorbande im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel mit steigender Menge TF^{1-251} wird ersichtlich, daß eine Verdrängung des Triggerfaktors vom Ribosom erfolgte. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung der spezifischen Ribosomen/Triggerfaktorinteraktion.

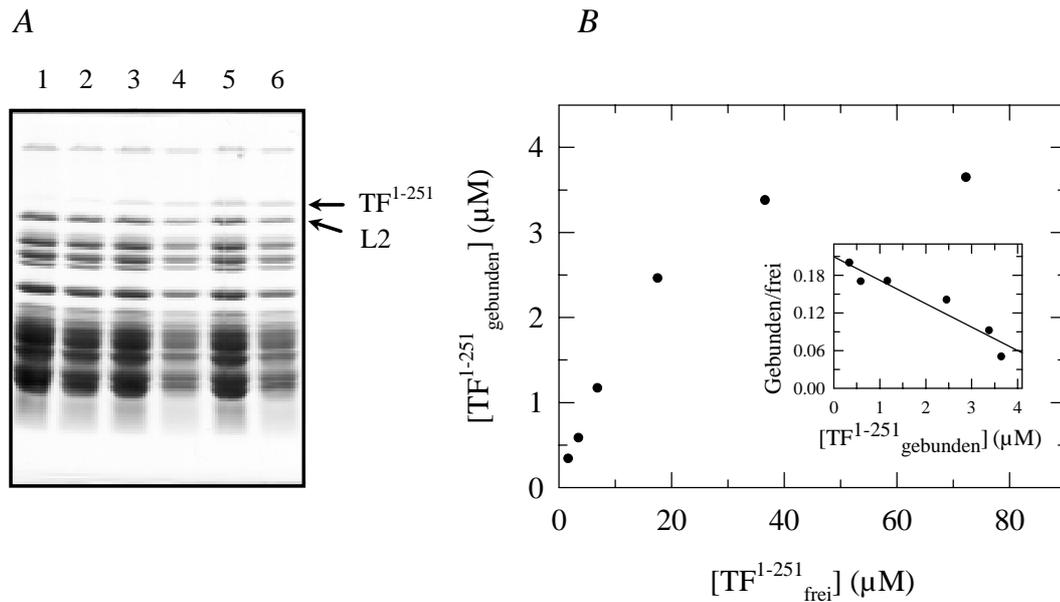


ABB. 3-28. Bindung von TF¹⁻²⁵¹ an 70S_{reass} Ribosomen. Die Triggerfaktorvariante wurde in steigenden Konzentrationen mit den Ribosomen (4 μM) in Puffer D inkubiert. (A) SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) der ribosomalen Fraktionen (24 pmol) nach Ultrazentrifugation und Resuspendieren der Ribosomen in Puffer A. Die Verhältnisse während der Inkubation der Ribosomen mit TF¹⁻²⁵¹ waren (1) 2:1, (2) 1:1, (3) 1:2, (4) 1:5, (5) 1:10 und (6) 1:20. (B) Quantitative Auswertung des Coomassie-gefärbten Gels (Triggerfaktor- und L2-Banden) ergibt die Form einer Sättigungskurve. Die eingefügte Grafik illustriert die Daten in Form eines Scatchard-Plots.

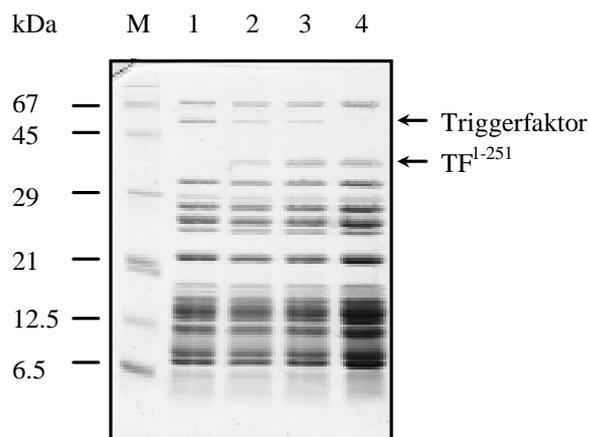


ABB. 3-29. Verdrängung von Triggerfaktor durch TF¹⁻²⁵¹ von 70S_{reass} Ribosomen. Die Ribosomen (4 μM) wurden in den Verhältnissen 1:5:5 und 1:5:20 mit Triggerfaktor und der N-terminalen Domäne TF¹⁻²⁵¹ sowie zum Vergleich jeweils 1:5 mit den Einzelproteinen in Puffer D inkubiert und anschließend durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Nach dem Resuspendieren der Ribosomen in Puffer A wurden 24 pmol für die SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) verwendet. Die Verhältnisse vor der Zentrifugation von 70S_{reass} : Triggerfaktor : TF¹⁻²⁵¹ entsprachen (1) 1:5:0, (2) 1:5:5, (3) 1:5:20, (4) 1:0:5. (M) molekularer Massestandard.

3.8. Analyse der PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors durch ortsspezifische Mutagenese

3.8.1. Sequenzanalyse

Die durch limitierte Proteolyse erhaltene PPIase-aktive Domäne entspricht dem Bereich der Triggerfaktorsequenz, für den ein gewisser Grad an Homologie zu FKBP festgestellt wurde (167) (ABB. 3-30). Die entsprechende Sequenz (Arg¹⁴⁵⁻²⁵¹) des Triggerfaktors ist dabei zu 25.3 % identisch mit der Sequenz des hFKBP12. Durch Anwendung einer speziellen Methode (Hydrophobe-Cluster-Analyse) wurde eine hydrophobe Bindungstasche vorhergesagt, die dem FK506-Bindungsbereich der FKBP ähnelt (167). Am Aufbau dieses Bindungsbereiches (im hFKBP12) sind vor allem 14 Aminosäurereste beteiligt, die innerhalb der FKBP-Familie relativ hoch konserviert sind (188). In der *E. coli* Triggerfaktor-PPIase-Domäne sind fünf dieser Reste konserviert, vier weitere sind konservativ ausgetauscht, und fünf Reste (Arg⁴², Glu⁵⁴, His⁸⁷, Ala⁸¹, Ile⁹¹ des hFKBP12) sind nicht konserviert (ABB. 3-30). Die Sequenzen der PPIase-Domänen von Triggerfaktoren aus verschiedenen Organismen zeigen untereinander einen recht hohen Grad der Konservierung (ABB. 3-30), so sind z.B. die PPIase-Domänen der Triggerfaktoren aus *E. coli* und *Campylobacter jejunii* zu 45 % identisch.

EcTig	145	RKQQATWKEKD	GAV--EAEDRVTIDFT	GSV-DGEEF	EGGKA--SDFVLAM	QGGRM	IPGFE	199
HiTig	145	RKQQATWAESQ	DVV--KADDRVTIDFV	GSV-DGEEF	EGGKA--TDFVLFM	QGGRM	IPGFE	199
CjTig	147	LKRFBATPEA	IKTKRALKEGDFAK	DFEGFV-DDKA	FEGGKA--ENYVLEI	IGSKQF	IPGFE	203
MgTig	153	AKTKSTMVDV	SDKK-LANGDIAIIDFT	GIV-DNKKLAS	ASA--QNYELTI	GSNSFI	KGFE	208
MpTig	153	EKNKGKLV	DVSDKA-LANNDIAVIDFV	GKV-DGKVL	ESATA--KQYELTI	GSNSFI	DGFE	208
HpTig	147	AKDYAKFVD	TNTQRKAQNDDKLTIDF	EGFI-DNAP	FEGGKA--ENFNLI	LIGSKQ	MLED	203
BsTig	146	QERQAE	LVVKEEGA-VEEGNTVVLD	FEGFV-DGEA	FEGGKA--ENYSLEV	GSGSFI	IPGFE	201
hFKBP12	3	VETISPGD	GRTFP.--KRGQTCVVHY	TGMLEDG	KKFDSS	RRDRNK	PFKFMLG	KQEVIRGWE 60
				*	**	*	*	*** *
EcTig	200	DGIKGHKAGEE	FTIDVTFPEEY	HAENL-----	KGKA	AKFAINL	LKKVEER	ELPELTAE 251
HiTig	200	EGIVGHKAGE	QFDIDVTFPAEY	HAENL-----	KGKA	AKFAITL	LKKIENM	VLPELTDE 251
CjTig	204	DGMVGMKIG	EEDIKVTFPKE	YGARHL-----	AGKDA	VFKVKL	LHEIQEL	KIPELDDE 255
MgTig	209	TGLIAMKVN	QKKTALTFPSDY	HVKEL-----	QSKPV	TFEVVL	LKAIKKL	EFTPMDET 260
MpTig	209	SGLIGMKV	GDKRQLKLFPKD	YHAEEL-----	KGKP	VEFDIE	LKAIKQL	EITPMDET 260
HpTig	204	KALLGMQAG	EKEFPLTFPSKY	HAEHL-----	AGKEA	FFKVKL	LHQIQAR	EMLEINDE 255
BsTig	202	DQLVGL	EAGAEKDVEVTF	PPEEY	HAEDL-----	AGKPA	VFKVKI	HEIKAKELPELDDE 253
hFKBP12	61	EGVAQMSV	GQRAKLTISPDY	AYGATG	HGPGI	IIPPHAT	LVFDV	ELLKLE 107
				**	*	*	*	

ABB. 3-30. Sequenzvergleich der PPIase-Domänen von Triggerfaktoren verschiedener Eubakterien mit hFKBP12. Die Sterne kennzeichnen Aminosäurereste des hFKBP12, die innerhalb eines Abstandes von 4 Å zu FK506 Atome lokalisiert haben (188). In der hFKBP12-Sequenz sind alle Aminosäurereste fettgedruckt, die innerhalb der Familie der FKBP zu über 70 % identisch sind. Diese Angabe basiert auf einem Vergleich von 156 FKBP-Sequenzen, der freundlicherweise von T. Tradler (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt wurde. Grau unterlegt sind die zu über 60 % konservierten Aminosäurereste innerhalb der bisher bekannten Triggerfaktorsequenzen. Als Quellen für die Aminosäuresequenzen der Triggerfaktoren dienten die in Datenbanken zugänglichen Sequenzen (*E. coli* P22257, *Haemophilus influenzae* P44837, *Campylobacter jejunii* X85954, *Mycoplasma genitalium* P47480, *Mycoplasma pneumoniae* G1674199, *Heliobacter pylori* gi 2313924, *Bacillus subtilis* Z75208).

Durch ortsspezifische Mutagenese wurde für hFKBP12 die Rolle verschiedener Aminosäurereste für die Bindung von FK506 sowie bei der Substratkatalyse untersucht (189-193). Während viele der Proteinvarianten wildtypähnliche FK506-Affinität zeigten, schien vor allem beim Austausch von Asp³⁷, Trp⁵⁹ oder Phe⁹⁹ sowohl die FK506-Bindung als auch die Ausprägung der enzymatischen Aktivität beeinflusst zu sein. In der Triggerfaktorsequenz ist von diesen Aminosäureresten nur Phe²³³ (entsprechend zu Phe⁹⁹ im hFKBP12) konserviert. Die beiden entsprechenden Positionen zu Asp³⁷ und Trp⁵⁹ sind durch die chemisch jeweils ähnlichen Glu¹⁷⁸ und Phe¹⁹⁸ besetzt. Alle drei Positionen der PPIase-aktiven Domäne (Glu¹⁷⁸, Phe¹⁹⁸ und Phe²³³) wurden durch ortsspezifische Mutagenese variiert und die enzymatischen Eigenschaften der resultierenden Proteinvarianten hinsichtlich funktioneller Verwandtschaft zum hFKBP12 untersucht.

3.8.2. Expression und Reinigung der Proteinvarianten

Die Mutagenese und Konstruktion der *E. coli* Expressionsstämme wurden durch T. Tradler (MPG, Halle) durchgeführt. Die exprimierten Varianten der PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors enthielten N-terminal eine Sequenzextension gefolgt von der Aminosäuresequenz Arg¹⁴⁵-Glu²⁵¹, die die entsprechende Punktmutation enthielt (TAB. 3-5). Die Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Ni²⁺-Ionen und anschließender Gelfiltration. Dabei konnten aus einer 1 Liter Überexpressionskultur ca. 50 mg rekombinantes Protein erhalten werden. Die Homogenität (> 95 % mit Ausnahme der Phe¹⁹⁸His- und Phe¹⁹⁸Trp-Varianten) wurde durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (ABB. 3-31).

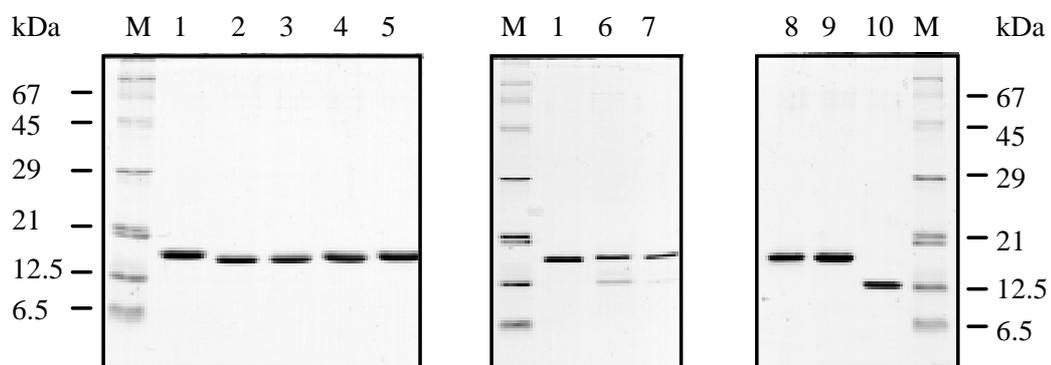


ABB. 3-31. SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) von Varianten der Triggerfaktor-PPIase-Domäne und des hFKBP12. (M) molekularer Massestandard, (1) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (WT), (2) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Val), (3) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Lys), (4) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Asp), (5) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe²³³Tyr), (6) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe¹⁹⁸His), (7) TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe¹⁹⁸Trp), (8) hFKBP12 (WT), (9) hFKBP12 (Asp³⁷Leu), (10) hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr).

Die Punktmutation an Position Phe¹⁹⁸ der Triggerfaktor-PPIase-Domäne führte zu instabilen Proteinvarianten. So enthielten die entsprechenden Proteinfractionen nach dem ersten Reinigungsschritt zu ungefähr 20 % (Phe¹⁹⁸His-Variante) bzw. 5 % (Phe¹⁹⁸Trp-Variante) ein verkürztes Fragment (ABB. 3-31). Durch RP-HPLC konnten die jeweiligen Fragmente von der Hauptproteinfraktion separiert werden. Die Position der Spaltstelle konnte durch die Ermittlung der N-terminalen Sequenz und der molekularen Masse mittels ESI-Massenspektrometrie mit -Lys-Phe²³³- ermittelt werden. Es gelang nicht, durch Trennverfahren, die zu nativen Proteinen führen würden, die verkürzten Enzymfragmente abzutrennen.

TAB. 3-5. Verwendete Proteinvarianten der PPIase-Domäne des Triggerfaktors und des hFKBP12.

Protein-variante	Theoretische molekulare Masse (Da) ^b	Experimentell ermittelte molekulare Masse (Da)	Aus experimentellen Daten abgeleitete Sequenz der vorliegenden Proteinvariante
Triggerfaktor, PPIase-aktive Domäne (TF¹⁴⁵⁻²⁵¹)			
Wildtyp	13 833.7	13 834.3 ± 7.1	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹
Glu ¹⁷⁸ Asp	13 819.7	13 820.6 ± 4.4	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹ (E ¹⁷⁸ D)
Glu ¹⁷⁸ Val	13 804.7	13 812.2 ± 11.0	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹ (E ¹⁷⁸ V)
Glu ¹⁷⁸ Lys	13 832.8	13 833.0 ± 3.3	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹ (E ¹⁷⁸ K)
Phe ¹⁹⁸ Trp	13 872.7	13 873.3 ± 3.3	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹ (F ¹⁹⁸ W)
	11 661.5	11 668.3 ± 10.0	----- R ¹⁴⁵ -K ²³² (F ¹⁹⁸ W)
Phe ¹⁹⁸ His	13 823.7	13 834.8 ± 7.4	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹ (F ¹⁹⁸ H)
	11 612.5	11 615.5 ± 9.3	----- R ¹⁴⁵ -K ²³² (F ¹⁹⁸ H)
Phe ²³³ Tyr	13 849.7	13 856.6 ± 4.9	----- R ¹⁴⁵ -E ²⁵¹ (F ²³³ Y)
hFKBP12			
Wildtyp	13 865.89	13 867.6 ^a	==== G ¹ -E ¹⁰⁷
Asp ³⁷ Leu	13 863.94	13 864.7 ± 5.7	==== G ¹ -E ¹⁰⁷ (D ³⁷ L)
Phe ⁹⁹ Tyr	11 835.06	11 834.0 ^a	G ¹ -E ¹⁰⁷ (F ⁹⁹ Y)
		11 834.1 ± 3.8	

Die Ermittlung der molekularen Massen erfolgte durch ESI- bzw. ^a MALDI-Massenspektrometrie. (-----) MRGSHHHHHHGSDDDDK, (====) TMITNSMHHHHDDDDKM, ^b monoisotopische molekulare Masse berechnet aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz.

Zum direkten Vergleich des Einflusses einer bestimmten Punktmutation hinsichtlich der PPIase-Aktivität unter gleichen experimentellen Bedingungen wurden die hFKBP12-Varianten Asp³⁷Val und Phe⁹⁹Tyr sowie das rekombinante Wildtypenzym verwendet (TAB. 3-5). Die 107 Aminosäurereste der Wildtypform und der Asp³⁷Leu-Variante enthielten N-terminal eine histidinreiche Sequenzextension, wodurch die Reinigung wie schon für die Triggerfaktorvarianten beschrieben erfolgen konnte. Da die hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr)-Variante keine zusätzliche Sequenzextension enthielt, wurden zur Isolierung Anionenaustausch-

chromatographie, Kationenaustauschchromatographie sowie Gelfiltration eingesetzt. Alle hFKBP12-Varianten konnten bis zu über 98 % Homogenität gereinigt werden, was durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung verifiziert wurde (ABB. 3-31).

Für hFKBP12 konnte bereits gezeigt werden, daß die N-terminale Extension keinen Einfluß auf die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest hatte (194). Im gleichen Meßsystem konnte auch für die PPIase-Aktivität der Triggerfaktor-PPIase-Domäne kein Einfluß der zusätzlichen N-terminalen Sequenzerweiterung festgestellt werden. Die Aminosäuresequenz aller verwendeten Proteinvarianten wurde durch N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Untersuchungen verifiziert (TAB. 3-5). Es sei darauf hingewiesen, daß die Numerierung der Aminosäurereste des hFKBP12 entsprechend der Form, die in eukaryotischen Zellen gefunden wurde, d.h. ohne N-terminales Methionin, erfolgte. Die Aminosäuresequenz der hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr)-Variante wurde zusätzlich durch tryptischen Verdau und anschließende MALDI-TOF-Massenspektrometrie verifiziert. Die ermittelten molekularen Massen der proteolytischen Peptide stimmten mit den theoretischen Werten überein.

3.8.3. Stabilität und Struktur der Proteinvarianten

Im Vorfeld der enzymatischen Untersuchungen wurde die Stabilität aller verwendeten Proteinvarianten gegenüber Subtilisin untersucht. Mit Ausnahme der Phe¹⁹⁸Xaa-Varianten der Triggerfaktor-PPIase-Domäne (Xaa = His, Trp) gab es keinen Hinweis auf proteolytische Inaktivierung während der Inkubationszeit, die mindestens der Meßzeit der PPIase-Aktivitätsbestimmung (2-3 min) entsprach. Das wurde überprüft, indem die entsprechenden Proteinvarianten 4 min in der Küvette zusammen mit der Protease (Subtilisin oder α -Chymotrypsin) inkubiert wurden und anschließend die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet wurde. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten folgten einer Reaktion erster Ordnung und lieferten die gleichen Werte, die für eine analoge Probe ohne Vorinkubation mit Protease erhalten wurden. Die gelelektrophoretische Analyse nach limitierter Proteolyse durch Subtilisin ergab prinzipiell das gleiche Ergebnis, jedoch waren alle Varianten, die eine zusätzliche N-terminale Extension enthielten, teilweise proteolysiert (ABB. 3-32). Die beobachtete molekulare Masse der Produkte lag dabei scheinbar nicht unter der des entsprechenden Enzyms ohne eine N-terminale Erweiterung. In Hinsicht auf die unveränderte PPIase-Aktivität dieser Proteinvarianten innerhalb des untersuchten Zeitraums und der scheinbaren Stabilität sowohl des rekombinanten Triggerfaktorfragmentes Gln¹⁴⁸-Thr²⁴⁹ als

auch der hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr)-Variante ist denkbar, daß die Protease möglicherweise im zugänglichen N-terminalen Fusionsbereich spaltet, und die Primärstrukturen der entsprechenden Proteinvarianten des hFKBP12 bzw. der Triggerfaktor-PPIase-Domänen zumindest während der Aktivitätsbestimmung (2-3 min) intakt bleiben. Übereinstimmend mit dem Verlust der PPIase-Aktivität im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest zeigte die gelelektrophoretische Analyse den Abbau der TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe¹⁹⁸His)-Variante nach Inkubation mit Subtilisin (ABB. 3-32).

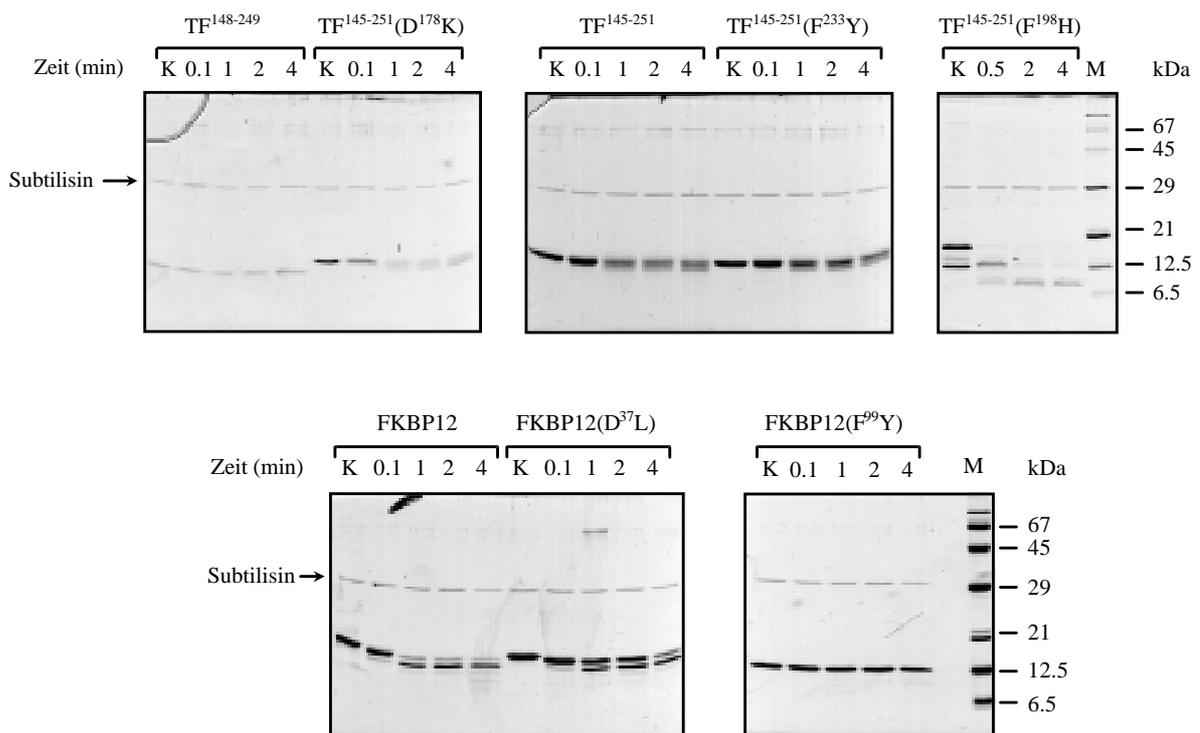


ABB. 3-32. Proteolytische Stabilität der gereinigten Varianten der Triggerfaktor-PPIase-Domäne und des hFKBP12 gegenüber Subtilisin. Alle Proteinvarianten wurden die angegebenen Zeiten mit Subtilisin inkubiert. Die Proteasereaktion wurde dann durch Zugabe von PMSF (1 mM) gestoppt und die Proben für eine SDS-PAGE (15 % Acrylamid, Coomassie-Färbung) verwendet. Die Proteolysemuster der Varianten TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Asp) und TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Val) waren identisch mit dem der TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Lys)-Variante und sind nicht dargestellt. (M) molekularer Massestandard.

Die vorliegenden Proteinvarianten wurden weiterhin durch Fern-UV CD-Spektroskopie charakterisiert. Das Fehlen der für ungeordnete Strukturen typischen negativen Bande bei 200 nm in allen Fern-UV CD-Spektren verdeutlichte, daß alle Proteine eine geordnete Struktur besitzen (ABB. 3-33). Darüber hinaus weist die prinzipiell erhaltene Form der Fern-UV CD-Spektren der Proteinvarianten im Vergleich zu dem des jeweiligen Wildtypenzym nicht auf wesentliche strukturelle Änderungen hin.

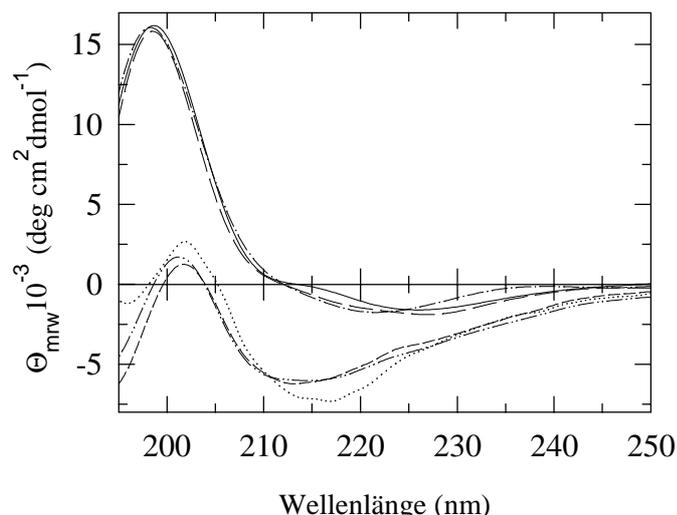


ABB. 3-33. Fern-UV CD-Spektren der Proteinvarianten der Triggerfaktor-PPIase-Domäne und des hFKBP12. Die Spektren wurden bei 25 °C in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) aufgenommen. Die individuellen Proteinvarianten sind wie folgt gekennzeichnet: TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (—), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Glu¹⁷⁸Lys) (— —), TF¹⁴⁵⁻²⁵¹ (Phe²³³Tyr) (- · -), hFKBP12 (- - -), hFKBP12 (Asp³⁷Leu) (- · · -) und hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr) (·····). Die Fern-UV CD-Spektren der beiden Triggerfaktorvarianten TF¹⁴⁵⁻²⁵¹(Glu¹⁷⁸ Asp) und TF¹⁴⁵⁻²⁵¹(Glu¹⁷⁸Val) waren identisch zum Spektrum der TF¹⁴⁵⁻²⁵¹(Glu¹⁷⁸Lys)-Variante.

3.8.4. Enzymatische Eigenschaften der Proteinvarianten

Die katalytische Effizienz der verschiedenen FKBP- sowie Triggerfaktorvarianten sollte im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest verglichen werden. Anhand einer Reihe von Tetrapeptidsubstraten mit variiertem Aminosäurerest in der P₁-Position wurde der Einfluß der jeweiligen Punktmutation auf die Substratspezifität dieser Proteinvarianten untersucht (TAB. 3-6).

TAB. 3-6. Substratspezifität [k_{cat}/K_M (mM⁻¹s⁻¹)] verschiedener Varianten der Triggerfaktor-PPIase-Domäne und des hFKBP12 im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest gegenüber Substraten des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NA.

Xaa	TF ¹⁴⁵⁻²⁵¹					hFKBP12		
	WT	E ¹⁷⁸ K	E ¹⁷⁸ V	E ¹⁷⁸ D	F ²³³ Y	WT	D ³⁷ L	F ⁹⁹ Y
Phe	1 060	2 520	1 720	950	14	780	48	64
Leu	650	1 500	970	620	10	1 240	66	64
Ala	240	470	350	230	19	100	32	37
Lys	250	89	130	220	16	58	1.8	6.9
Glu	6.9	42	16	9.5	< 0.1 ^a	1.5	1.2	7.2

Die Messungen wurden im Subtilisin-gekoppelten Aktivitätstest in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7.8) bei 10 °C durchgeführt. ^a Es konnte bis zu einer Enzymkonzentration von 5 µM keine PPIase-Aktivität detektiert werden.

Alle verwendeten Proteinevarianten zeigten PPIase-Aktivität, wobei für die hFKBP12-Varianten stets eine Verminderung der katalytischen Effizienz durch Einführung einer Punktmutation beobachtet wurde. Eine Ausnahme bildete die Phe⁹⁹Tyr-Variante, da ein

4.8-facher Anstieg der Aktivität im Vergleich zur Wildtypaktivität gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-4-NA zu beobachten war. Dabei war jedoch die katalytische Effizienz gegenüber Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-4-NA generell nur gering (TAB. 3-6).

Der Aminosäurerest Glu¹⁷⁸ des Triggerfaktors entspricht der Position von Asp³⁷ im hFKBP12. Die Mutation zum sehr ähnlichen Asp in der Triggerfaktor-PPIase-Domäne hatte nur einen geringen Einfluß auf die katalytische Aktivität, die wie beim Wildtyp, nicht durch FK506 inhibierbar war. Dagegen zeigten die Glu¹⁷⁸Val- und Glu¹⁷⁸Lys-Varianten eine erhöhte enzymatische Aktivität gegenüber den meisten der eingesetzten Peptidsubstrate. So konnte z.B. eine 2.4-fache Erhöhung der spezifischen PPIase-Aktivität mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat im Fall der Glu¹⁷⁸Lys-Variante beobachtet werden. Die Entfernung der negativen Ladung an Position 178 wirkte sich nicht auf die Substratspezifität der beiden Varianten im Vergleich zum Wildtyp gegenüber ungeladenen Aminosäureseitenketten in der P₁-Position des Substrates aus. Ein Einfluß konnte jedoch auf die Katalyseeffizienz festgestellt werden, wenn Substrate mit geladenen Seitenketten in der P₁-Position verwendet wurden (TAB. 3-6). So wurde die Prolylisomerisierung des Substrates mit Lys in der P₁-Position im Vergleich zu Phe durch die Glu¹⁷⁸Lys-Variante ungefähr sechsfach schlechter katalysiert als durch das Wildtypenzym. Verbesserte katalytische Effizienz konnte gleichzeitig für das Glu-enthaltende Substrat beobachtet werden, wenn auch die absolute katalytische Aktivität gegenüber diesem Substrat mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $4.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ relativ gering ist.

Die Auswirkung der Punktmutation Glu¹⁷⁸Val auf die katalytische Aktivität der Triggerfaktor-PPIase-Domäne unterscheidet sich beträchtlich von der einer entsprechenden Mutation im hFKBP12. Die Asp³⁷Leu Variante des hFKBP12 zeigte eine verringerte PPIase-Aktivität. Mit Ausnahme der Substrate Xaa = Ala bzw. Glu (TAB. 3-6) besitzt diese Proteinvariante noch ca. 3-6 % der Wildtypaktivität. Der Austausch von Glu gegen Leu an Position 37 im hFKBP12 führte weiterhin zu einer 700-fach verringerten Affinität für FK506 (ABB. 3-34).

Um zu versuchen, ob durch Erhöhung der Hydrophobizität der vermuteten Bindungstasche der Triggerfaktor-PPIase-Domäne möglicherweise FK506-Bindung erzeugt werden kann, wurde der Aminosäurerest Phe¹⁹⁸ durch Trp ersetzt. Für das entsprechende Trp⁵⁹ im hFKBP12 wurde gezeigt, daß der Trp → His Austausch sowohl eine starke Verringerung der FK506-Affinität als auch der PPIase-Aktivität hervorruft (192). Die Mutation an Position 198 der PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors schien jedoch zu einer Destabilisierung des Proteins führte, da die resultierende Proteinvariante eine erhöhte proteolytische Anfälligkeit

zeigte und nicht in homogener Form zu isolieren war (vgl. Abschn. 3.8.2.). Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität wurden deshalb die vorliegenden Gemische verwendet. Durch Anwendung des proteasefreien PPIase-Aktivitätstests wurden mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA im Vergleich zum Wildtypenzym Restaktivitäten von ca. 56 % für die Phe¹⁹⁸Trp-Variante und < 0.1 % für die Phe¹⁹⁸His-Variante bestimmt.

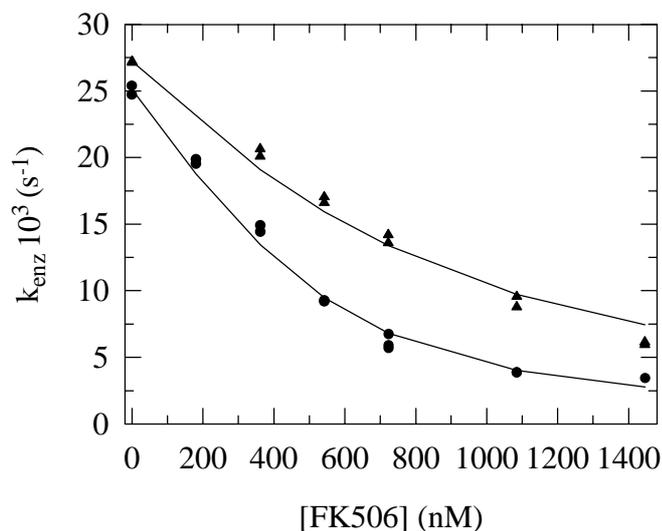


ABB. 3-34. Inhibierung der hFKBP12-Varianten Asp³⁷Leu (▲) und Phe⁹⁹Tyr (●) durch FK506. Die PPIase-Aktivitätsbestimmung erfolgte im Subtilisin-gekoppelten Aktivitätstest in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7.8) mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat in Gegenwart von 705 nM der Asp³⁷Leu-Variante oder 558 nM der Phe⁹⁹Tyr-Variante bei 10 °C. Die jeweils durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung der Daten nach einem Modell zur kompetitiven hochaffinen Inhibition (174), aus der die K_I -Werte der Proteinvarianten mit 349 ± 26 nM (Asp³⁷Leu) und 118 ± 9 nM (Phe⁹⁹Tyr) bestimmt wurden.

Die Position 99 im hFKBP12 ist durch Phe besetzt, das innerhalb der Familie der FKBP und auch in allen Triggerfaktoren konserviert ist. Die Substitution von Phe⁹⁹ und entsprechend in der Triggerfaktor-PPIase-Domäne Phe²³³ durch Tyr beeinflusste die PPIase-Aktivität beider Enzyme stark, jedoch in Bezug auf die Substratspezifität in unterschiedlicher Weise. Gegenüber einer Reihe von Tetrapeptid-4-Nitroaniliden mit variiertem Aminosäurerest in der P₁-Position konnte für die Phe²³³Tyr-Variante der Triggerfaktor-PPIase-Domäne nur 1.1 ± 0.4 % der Wildtypaktivität beobachtet werden. Eine Ausnahme hiervon ist die scheinbare Inaktivität des Enzyms gegenüber Glu in der P₁-Position, da selbst in Gegenwart von 5 µM der Proteinvariante keine PPIase-Aktivität detektiert werden konnte. Im Gegensatz zu der generell verringerten katalytischen Aktivität dieser Variante der Triggerfaktor-PPIase-Domäne besaß die entsprechende hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr)-Variante eine veränderte Substratspezifität mit 5 % (Leu-Substrat) bis 480 % (Glu-Substrat) der Wildtypenzymaktivität (TAB. 3-6). Die Mutation führte außerdem zu einer 240-fach verringerten Bindungsaffinität für FK506 im Vergleich zum Wildtypprotein (ABB. 3-34).

4. Diskussion

4.1. Triggerfaktor als ribosomenassoziierte PPIase

Die Enzymklasse der PPIasen wird in drei Familien unterteilt, die ubiquitär im Organismenreich vorkommen. Es wird angenommen, daß ihre katalytische Aktivität, die Beschleunigung relativ langsamer Konformationsumwandlungen innerhalb der Polypeptidkette, eine wesentliche Rolle bei der Ausübung ihrer Funktion spielt. Dafür spricht unter anderem die hohe Konservierung von Kernbereichen in der Primärstruktur innerhalb jeder PPIase-Familie (46, 114, 126).

Da die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindung ein relativ langsamer und oft der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei Faltungsreaktionen *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* sein kann, lag die Vermutung nahe, daß am Ort der Proteinbiosynthese ein Katalysator dieser Reaktion lokalisiert ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben Hinweise auf die Existenz einer ribosomenassoziierten PPIase und somit eines potentiellen Kandidaten für eine Funktion als Katalysator der *de novo* Proteinfaltung. Für die "tightly coupled" 70S Ribosomen aus *E. coli* konnte PPIase-Aktivität gegenüber Tetrapeptidsubstraten nachgewiesen werden. Darüber hinaus enthielten ebenso die 50S Untereinheiten der Ribosomen PPIase-Aktivität. Das ist in Hinsicht auf die vermutete Funktion einer PPIase am Ribosom interessant, da die große ribosomale Untereinheit die Öffnung für den Austritt der neu synthetisierten Polypeptidkette enthält (28, 195). Die PPIase-Aktivitäten der 70S Ribosomen und der 50S Untereinheiten waren bezüglich Substratspezifität und Unempfindlichkeit gegenüber mikromolaren Konzentrationen von PPIase-Inhibitoren wie FK506 und CsA vergleichbar. Das spricht entweder für eine identische Subfraktionierung verschiedener Enzyme oder ist ein Hinweis auf die Existenz nur einer ribosomenassoziierten PPIase. Außerdem wurde dadurch deutlich, daß die betrachtete Enzymaktivität nicht durch die CsA-inhibierbaren *E. coli* PPIasen wie Cyp18 (196, 197) oder die durch FK506 inhibierbaren Enzyme wie FKBP22 und FKBP26 (178, 198) vermittelt wird. Die Analyse der Substratspezifität schloß auch andere *E. coli* PPIasen wie z.B. Parvulin (113) als potentielle Kandidaten aus. Dagegen konnte für Triggerfaktor eine gute Übereinstimmung mit der Substratspezifität der ribosomenassoziierten PPIase gefunden werden (vgl. TAB. 3-2). Für den Triggerfaktor war neben der Beteiligung am Export von sekretorischen Proteinen (72-75) die Lokalisation am *E. coli* Ribosom bzw. der 50S Untereinheit bereits beschrieben worden (165). Somit bestätigt der Nachweis dieses Proteins in diesen ribosomalen Fraktionen durch Westernblot-Analyse und N-terminale Sequenzierung die bekannte Lokalisation.

Darüber hinaus schien die beobachtete PPIase-Aktivität mit der Verteilung und der Konzentration des Triggerfaktors in den ribosomalen Proben zu korrelieren. Die Experimente zur LiCl-vermittelten Dissoziation der 50S Untereinheit spiegelten zum einen das bekannte Verhalten des Triggerfaktors wider (165), zum anderen stützten diese Ergebnisse die Annahme, daß Triggerfaktor die PPIase-Aktivität-vermittelnde Komponente des bakteriellen Ribosoms ist. Zusätzlich spricht dafür das Fehlen von PPIase-Aktivität an ribosomalen Partikeln, die aus einem Triggerfaktor-defizienten *E. coli* Stamm isoliert worden waren. Auf dieser Grundlage scheint Triggerfaktor die einzige PPIase am *E. coli* Ribosom zu sein.

Zum Verständnis eines möglichen Funktionsmechanismus des Triggerfaktors ist die Art und Weise der Interaktion mit dem Ribosom bzw. mit den naszierenden Polypeptidketten wichtig. Durch Zugabe von *E. coli* Extrakten zu eukaryotischen Weizenkeim-RNC und anschließendem chemischen Vernetzen konnte die enge Nachbarschaft von Triggerfaktor zu naszierenden Ketten verschiedener sowohl sekretorischer als auch nicht-sekretorischer Proteine demonstriert werden (67, 78). Diese Wechselwirkung bestand nicht, wenn die translatierenden Ribosomen vorher mit Puromycin behandelt wurden, was zum Abbruch der Translation und zum Freisetzen der naszierenden Ketten aus der ribosomalen Umgebung führte (67, 78). Das spricht für eine ribosomengekoppelte Funktion des Triggerfaktors und wird verstärkt dadurch, daß die chemische Vernetzung mit naszierenden Polypeptiden ab einer Länge von 57 Aminosäureresten im homogenen *E. coli* Translationssystem möglich war (68). Außerdem gibt es Untersuchungen zur Syntheserate des Triggerfaktors im Vergleich zu der ribosomaler Proteine wie dem S1, die darauf hindeuten, daß möglicherweise eine Korrelation zur Translationsaktivität besteht (199). So wurde in Antwort auf die Überproduktion eines Fibroblasten-Wachstumsfaktors in *E. coli* unter Hitzeschockbedingungen die Repression der Synthese von verschiedenen ribosomalen Proteinen und Triggerfaktor beschrieben (199).

Das Verhältnis von 70S Ribosomen zu Triggerfaktor in isolierten Ribosomen/Triggerfaktor-komplexen aus einem *E. coli* Wildtypstamm konnte mit 9:1 abgeschätzt werden und ergibt die Frage, ob *in vivo* 1:1 Komplexe vorliegen. Es ist denkbar, daß während der Präparation der Ribosomen ein peripheres Protein wie Triggerfaktor entfernt wird. Darüber hinaus war eine 50-fache Reduktion der PPIase-Aktivität der 50S Untereinheiten im Vergleich zu den "tightly coupled" 70S Ribosomen zu beobachten. Möglicherweise kommt es während der Entkopplung der Untereinheiten durch Verringerung der Magnesiumionenkonzentration und Erhöhung der Ammoniumionenkonzentration zur Dissoziation des Triggerfaktors. In diesem Zusammenhang wurde auch diskutiert, daß der funktionelle Status der Ribosomen einen

Einfluß auf die Bindungsaffinität von Triggerfaktor hat (200). Es konnte gezeigt werden, daß die Affinität von Triggerfaktor zu translatierenden Ribosomen im Gegensatz zu nicht-translatierenden Ribosomen in Gegenwart von 500 mM KCl kaum beeinflußt ist (78).

Bei entsprechenden Untersuchungen zum Bindungsverhalten des Triggerfaktors *in vitro* wurde eine ähnliche Affinität zu isolierten "tightly coupled" und den aus den Untereinheiten reassozierten 70S Ribosomen beobachtet. Die aus der Datenanalyse abgeleitete 1:1 Stöchiometrie dieser Interaktion wurde auch für 50S Untereinheiten festgestellt und unterstützt die Vermutung der spezifischen Wechselwirkung zwischen Triggerfaktor und diesen ribosomalen Partikeln. Daneben wurde unter den gleichen experimentellen Bedingungen eine um mindestens den Faktor 10 schwächere Assoziation des Triggerfaktors an 30S Untereinheiten beobachtet, die bisher nicht vorgefunden wurde (165, 201). Indirekt wurde gezeigt, daß der Triggerfaktor an nicht-translatierende, eukaryotische Weizenkeimribosomen bindet (78). Es ist dabei unklar, ob ein entsprechender Bindungsort in diesen Ribosomen, für die trotz taxonomischer Divergenz eine morphologische Homologie zu den *E. coli* 70S Ribosomen durch kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen beschrieben wurde (202), vorhanden ist, oder ob eine generelle und möglicherweise *in vivo* modulierte Affinität zu ribosomalen Partikeln vorliegen könnte. Eine Modulation der Affinität zu Ribosomen während der Translation wurde z.B. für den Funktionsmechanismus von SRP in einem Modell vorgeschlagen (203). Dabei bildet die ribosomale Interaktion von SRP, das in Bezug auf die zelluläre Konzentration im Unterschuß zu Ribosomen vorliegt, während definierter Stadien der Elongation die Voraussetzung für die Wechselwirkung mit naszierenden Proteinketten, die eine Signalsequenz enthalten. Durch Erkennung einer solchen naszierenden Polypeptidkette kommt es zur Erhöhung der Affinität zum RNC und damit zur Selektion dieser Proteinketten für den Transport in das ER (203).

In diesem Sinne könnte die ribosomale Assoziation des Triggerfaktors die lokale Voraussetzung für eine Interaktion mit naszierenden Ketten bilden. Neben SRP gibt es auch für weitere Proteinkomplexe, die nachweislich bei der Sortierung und Translokation der naszierenden Proteinketten eine Rolle spielen, wie NAC und Sec61p, Hinweise, daß eine Bindungsaffinität zu Ribosomen vorhanden ist (67, 68, 78, 204). So konnte für den heterotrimeren Sec61p-Komplex, der eine Hauptkomponente des heterooligomeren Transportkanals der ER-Membran bildet, die Bindung an isolierte monomere Hefe-Ribosomen in Form einer Sättigung demonstriert werden (204). Mehrere dieser ringförmigen Moleküle scheinen in Verlängerung des "Ausgangstunnels" der naszierenden Proteinkette an

die 50S Untereinheit assoziiert zu sein, so daß eine direkte Verbindung vom Ribosom zur Transportmaschinerie des ERs geschaffen wird. Für die größte Untereinheit, Sec61 α , konnte durch photochemisches Vernetzen die enge Nachbarschaft zu naszierenden Proteinketten demonstriert werden, und zwar bereits, nachdem nur 30 Peptidbindungen durch die Peptidyltransferasereaktion geknüpft worden sind (205).

In seiner Eigenschaft, an naszierende Proteinketten unabhängig von ihrem zellulären Zielort zu binden (67, 68, 78), erinnert Triggerfaktor an den eukaryotischen heterodimeren Proteinkomplex NAC (61-63). Für NAC wurde eine regulatorische Rolle bei der Interaktion von SRP mit naszierenden Proteinketten postuliert. Ebenso scheint NAC die intrinsische Bindung des eukaryotischen Ribosoms an Sec61p zu verhindern, so daß Fehltransport von cytosolischen Proteinen ausgeschlossen wird (62). Während Triggerfaktor erst ab einer Kettenlänge von 57 Aminosäureresten mit naszierenden Proteinketten interagiert (68), wurde für NAC eine Wechselwirkung mit naszierenden Polypeptiden ab einer Länge von 17 Aminosäureresten beobachtet (63). Hinsichtlich der zum Triggerfaktor ähnlichen Eigenschaften erscheint NAC in Bezug auf die Fragestellung nach einer eukaryotischen ribosomenassoziierten PPIase interessant. Es ist jedoch nicht bekannt, ob NAC eine entsprechende enzymatische Aktivität besitzt. Bisher wurde auch nicht über eine Lokalisation von PPIasen am eukaryotischen Ribosom berichtet. Es gibt aber Hinweise, daß PPIasen im eukaryotischen Cytosol an der *de novo* Proteinfaltung beteiligt sein könnten, da die Biogenese von zwei bakteriellen Luciferasen in einem Retikulozytenlysat durch die Anwesenheit von CsA oder FK506 retardiert wurde (133).

4.2. Triggerfaktor als modulares Protein

Im Gegensatz zu den erwähnten RNC-assoziierten heterooligomeren Protein- bzw. Nukleoproteinkomplexen scheint Triggerfaktor ein monomeres Protein zu sein. Es erwies sich jedoch als modulares Protein, das mindestens aus drei verschiedenen Strukturbereichen besteht (187). Die durch Hydrophobe-Cluster-Analyse vorgeschlagene Organisation des Triggerfaktors in Form von drei Domänen (167) konnte durch limitierte Proteolyse, Expression rekombinanter Fragmente sowie Untersuchungen zur Faltung bzw. Entfaltung experimentell bestätigt werden. In Abb. 4-1 ist illustriert, daß sich basierend auf der Primärstruktur prinzipiell eine ähnliche modulare Organisation für die Triggerfaktoren anderer Organismen ableiten läßt.

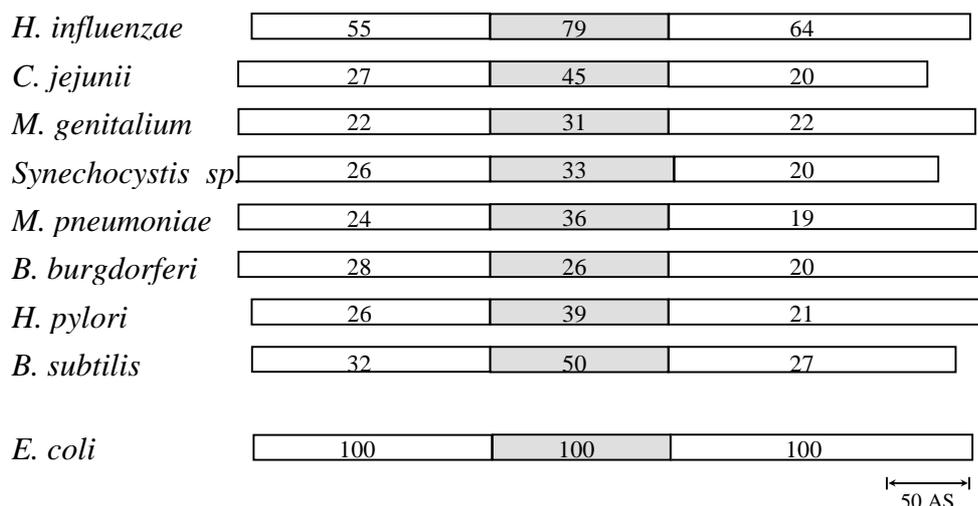


ABB. 4-1. Domänenorganisation der Triggerfaktoren. Verglichen wurden die Sequenzen der Einzeldomänen der Triggerfaktoren der angegebenen Organismen mit denen der *E. coli* Triggerfaktorsequenz. Die Domänengrenzen wurden entsprechend zur *E. coli* Sequenz aus dem multiplen Sequenzvergleich (siehe ABB. 4-2) abgeleitet. Dabei stellen die grauen Balken die homologen Bereiche zur PPIase-aktiven Domäne des *E. coli* Triggerfaktors (Arg¹⁴⁵-Glu²⁵¹) dar. Angegeben sind die Werte der Identität in Prozent des paarweisen globalen Sequenzvergleiches der Einzeldomänen nach dem FASTA-Algorithmus.

Als Proteindomänen werden Bereiche der Polypeptidkette betrachtet, die kompakte Substrukturen bilden und eine erhöhte Anzahl von Interaktionen innerhalb dieser Einheiten als zu anderen Abschnitten der Proteinkette aufweisen (206). Eine klassische Methode zur Bestimmung von Proteindomänen im Sinne von stabilen Einheiten bildet die limitierte Proteolyse, durch die erstmals die Antigenbindungsdomäne von Immunglobulinen identifiziert wurde (207). So konnte auch die zentrale, PPIase-aktive Domäne des Triggerfaktors nach limitierter Proteolyse mit Subtilisin isoliert werden (208). Bestätigt wurde die Existenz dieser Domäne durch ein rekombinant hergestelltes, aus 102 Aminosäureresten bestehendes Fragment des Triggerfaktors (Gln¹⁴⁸-Thr²⁴⁹), das sich neben einer bemerkenswert hohen Proteasestabilität als ausreichend erwies, um die vollständige katalytische Effizienz des Triggerfaktors in einem nicht-proteolytischen PPIase-Aktivitätstest gegenüber Tetrapeptidsubstraten zu erhalten (208). Ein ähnliches proteolytisches Fragment des Triggerfaktors (Val¹³²-Glu²⁴⁷) entstand bei der Hydrolyse mit Endoproteinase Glu-C (V8), einer Protease mit hoher Primärspezifität im Gegensatz zu Subtilisin bzw. α -Chymotrypsin (209). Die Expression der zentralen und PPIase-aktiven Domäne des *B. subtilis* Triggerfaktors weist auf eine ähnliche domänenartige Organisation der Triggerfaktoren anderer Organismen hin (210).

Die Annahme eines modularen Aufbaus der Polypeptidkette des Triggerfaktors wird weiterhin unterstützt durch die Existenz eines zweiten proteolytischen Fragments, das mit der N-

terminalen Aminosäuresequenz des Triggerfaktors beginnt und dessen molekulare Masse mit 14 kDa aus der SDS-PAGE abgeschätzt wurde. Darüber hinaus bildete das rekombinante N-terminale Fragment (TF¹⁻¹⁴⁵) - wie auch die PPIase-aktive Domäne - eine autonome Faltungseinheit und zeigte einen einphasigen Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergang, wie er für kleine Eindomänenproteine beobachtet wurde (187). Aus Sekundärstrukturanalysen durch Fern-UV CD-Spektroskopie ging auch hervor, daß die Einzeldomänen wahrscheinlich die gleiche Sekundärstruktur annehmen, wie im intakten Triggerfaktor (187). Aus diesen Gründen wurde davon ausgegangen, daß die gewählten Grenzen für die Einzeldomänen die Domänenorganisation des Triggerfaktors recht gut widerspiegeln.

Während für die zentrale und sehr stabile PPIase-Domäne (TF¹⁴⁵⁻²⁵¹) die Beteiligung am Katalysemechanismus gezeigt wurde (208, 209), war für die flankierenden N- und C-terminalen Bereiche keine Information über eine mögliche Funktion vorhanden. Dazu kam auch, daß die Suche in Proteindatenbanken nur geringe Sequenzhomologien zu anderen Proteinsequenzen lieferte (167, 201). Der aus Sekundärstrukturanalyse (167) und Fern-UV CD-Spektroskopie (187) abgeleitete hohe Gehalt an α -Helix in der N-terminalen Domäne erinnert an den N-terminalen, 106 Aminosäurereste umfassenden Bereich des *Legionella pneumophila* FKBP25 (Mip-Protein). Für dieses homodimere FKBP wurde gezeigt, daß die Dimerisierung über den N-terminalen Bereich erfolgt (211). In diesem Sinne scheint auch die N-terminale Domäne des Triggerfaktors eine Funktion bei der intermolekularen Wechselwirkung zu besitzen, da sie die Bindung des Triggerfaktors an das Ribosom vermittelt. Weder für die PPIase-aktive Domäne, noch für die Fusion aus PPIase-Domäne mit der C-terminalen Region konnte eine Affinität für 70S Ribosomen festgestellt werden. Zusätzliche Informationen über den N-terminalen Ribosomenbindungsbereich kommen aus weiteren Untersuchungen mit verkürzten Fragmenten. Wird ein rekombinant hergestelltes, N-terminales Fragment (TF¹⁻¹⁴⁴) proteolytisch C-terminal um 26 Aminosäurereste verkürzt, so ist das verbleibende N-terminale, aus 118 Aminosäureresten bestehende Fragment noch immer ausreichend für die Ribosomenbindung (201). Dagegen wird durch das Fehlen von mindestens 46 N-terminalen Aminosäureresten die Co-Sedimentierung des Triggerfaktors mit Ribosomen verhindert. Es gibt innerhalb des N-terminalen Bereiches der Triggerfaktoren verschiedener Organismen eine Region hoher Sequenzkonservierung (Gly⁴³-Pro⁵⁰ der *E. coli* Sequenz) (ABB. 4-2). Die daraus abgeleitete Consensus-Sequenz (GFRXGXXP) kommt ebenfalls in den Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine L37 der großen 60S Untereinheiten von *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* bzw. eines putativen L37 Proteins

E. coli	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
H. influenzae												408
C. jejunii												408
M. genitalium												405
Synechocystis sp.												422
M. pneumoniae												427
B. burgdorferi												422
H. pylori												418
B. subtilis												418
												404
E. coli	451	465	466	480	481	495	496					
H. influenzae												
C. jejunii												
M. genitalium												
Synechocystis sp.												
M. pneumoniae												
B. burgdorferi												
H. pylori												
B. subtilis												

ABB. 4-2. Multipler Sequenzvergleich von Triggerfaktoren. Die Anordnung der Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des ClustalW-Algorithmus. Aminosäurereste, die innerhalb der bekanntesten Triggerfaktorsequenzen zu über 60 % identisch sind, wurden fettgedruckt dargestellt. Als Quellen dienen die in Datenbanken zugänglichen Sequenzen (*E. coli* P22257, *H. influenzae* P44837, *C. jejunii* X85954, *M. genitalium* P47480, *Synechocystis* sp. (PCC6803) D64006, *M. pneumoniae* G1674199, *Borrelia burgdorferi* gi 2688533, *H. pylori* gi 2313924, *B. subtilis* Z75208).

aus *Caenorhabditis elegans* vor (P. Rücknagel, persönliche Mitteilung). Es ist vorstellbar, daß dieses Sequenzmotiv an der Vermittlung der Ribosomenbindung der Triggerfaktoren beteiligt ist. Damit wäre auch die fehlende Interaktion des N-terminal verkürzten Triggerfaktors erklärbar. Bisher durchgeführte Untersuchungen anhand eines synthetischen Oktadekapeptids der *E. coli* Triggerfaktorsequenz Ala³⁶-Ile⁵³ zeigten jedoch, daß dieses Peptid *per se* wahrscheinlich nicht zur Bindung an *E. coli* Ribosomen fähig ist (G. Stoller, unveröffentlicht). Möglicherweise ist die ribosomale Bindung nicht nur durch die eindimensionale Sequenz determiniert, sondern erfordert die spezifische dreidimensionale Struktur des Bindungsbereiches innerhalb der N-terminalen Domäne.

Nur relativ wenig Information gibt es bisher über den 180 Aminosäurereste umfassenden C-terminalen Bereich des Triggerfaktors. Aus den Untersuchungen zur proteolytischen Stabilität ergab sich kein Hinweis auf ein proteasestabiles C-terminales Fragment (208, 209). Während das rekombinante Fragment TF²⁵¹⁻⁴³² im isolierten Zustand ebenfalls proteolytisch instabil war, erfolgte offenbar schon durch die Fusion an die katalytische Domäne im Fragment TF¹⁴⁵⁻⁴³² eine Stabilisierung. Neben dieser kovalenten Verbindung zur PPIase-aktiven Domäne wird auch die nicht-kovalente Interaktion beider terminaler Domänen im intakten Protein diskutiert (187).

In Hinsicht auf die Domänenstruktur ist Triggerfaktor innerhalb der Enzymklasse der PPIasen keine Ausnahme (ABB. 4-3). Neben der ubiquitären Verbreitung sowie Zell- und Gewebespezifität ist die strukturelle Vielgestaltigkeit dieser Proteine ein weiteres Phänomen (46). So gibt es innerhalb jeder der drei etablierten PPIase-Familien sowohl Enzyme, die allein aus der konservierten und PPIase-Aktivität-vermittelnden Domäne bestehen, als auch solche Proteine, deren PPIase-Domäne flankiert wird durch eine oder mehrere funktionell differente Domänen. Bekannt sind z.B. hFKBP52 (auch als HSP56, p59 oder HBI bekannt) (212) und hCyp40, die als Bestandteile der hochmolekularen Steroidrezeptorkomplexe identifiziert wurden (156, 157). Für das verwandte Protein HSP56 aus Thymusextrakt vom Huhn konnte nach limitierter Proteolyse eine stabile 17 kDa FK506-bindende Domäne isoliert werden (213). In der Sequenz von Kaninchen FKBP52 (p59) wurden drei strukturell verwandte Domänen zum hFKBP12 detektiert (214) zusätzlich zu einer Calmodulin-Bindungsdomäne und einem Sequenzbereich, der auch im C-terminalen Bereich von Cyp40 konserviert ist (157). Dieser Sequenzbereich enthält wiederholt ein aus 34 Aminosäureresten bestehendes Sequenzmotiv (TPR, "tetratricopeptide repeat"), das eine Rolle bei Protein/Protein-Interaktionen spielt (157, 159, 215, 216). Interessanterweise findet man ein weiteres

Protein/Protein-Erkennungsmotiv, die WW-Domäne, in Verbindung mit eukaryotischen Parvulinen, wie z.B. dem *S. cerevisiae* Ptf1, hPin1 bzw. *Drosophila melanogaster* Dodo-Protein (128, 162, 217, 218).

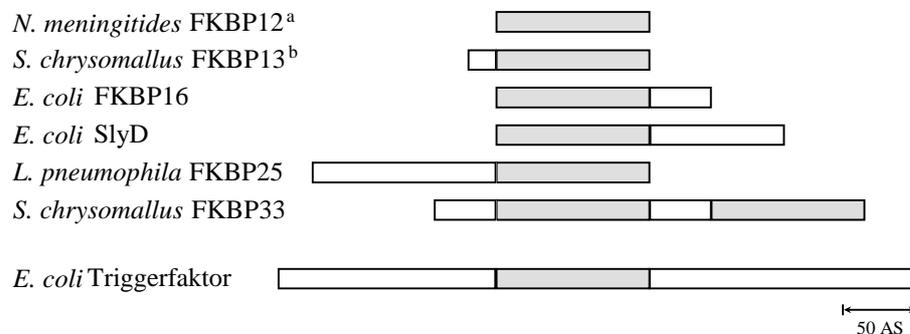


ABB. 4-3. Schematische Darstellung des modularen Aufbaus des *E. coli* Triggerfaktors im Vergleich zu anderen prokaryotischen FKBP. Die FKBP-Domänen sind als graue Boxen dargestellt. ^a *Neisseria meningitides*, ^b *Streptomyces chrysomallus*.

Weniger häufig sind Multi-Domänen-PPIasen im Reich der Prokaryoten. Es gibt die bereits erwähnten Mip-Proteine, die neben der C-terminalen FKBP-homologen Domäne eine N-terminale Domäne mit relativ hohem Anteil α -helikaler Struktur enthalten. In *E. coli* wurde das *slyD*-Genprodukt (WHP, SlyD) identifiziert, das neben der N-terminalen FKBP-homologen Domäne eine Metallionenbindungsdomäne aufweist (219, 220). Die bekannten Cyclophiline der Prokaryoten bestehen abgesehen von Signalsequenzen meist nur aus der PPIase-aktiven Domäne, wohingegen einige Parvuline neben der katalytischen Domäne zusätzliche Sequenzbereiche aufweisen, die wie im Fall des *E. coli* SurA, auch eine duplizierte PPIase-Domäne sein kann (114). In Hinsicht auf die zentrale Position der PPIase-aktiven Domäne sind Triggerfaktoren innerhalb der Familie der FKBP bisher einzigartig (ABB. 4-3). Darüber hinaus wurden Triggerfaktoren bzw. PPIase-verwandte Proteine mit einer vergleichbaren funktionalen Domänenorganisation bisher nur in prokaryotischen Organismen identifiziert (181, 221-223).

4.3. Triggerfaktor als Katalysator der Proteinfaltung

In Hinsicht auf eine mögliche *in vivo* Funktion von PPIasen als Proteinfaltungskatalysatoren sollte es aufschlußreich sein, die PPIase-Aktivität gegenüber Proteinsubstraten zu bestimmen. Mit RCM-T1 war ein geeignetes Modellsubstrat vorhanden, das im gefalteten Zustand eine *cis*-Prolylbindung (-Tyr-Pro³⁹-) enthält, und deren *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung im Verlauf der

Rückfaltung durch eine Reihe von PPIasen katalysiert wird (47, 102, 115, 116, 224, 225). Im Vergleich zu anderen FKBP, Cyclophilinen und *E. coli* Parvulin zeigte der *E. coli* Triggerfaktor eine ungewöhnlich wirksame Katalyse (173). Eine Konzentration von 10 nM Triggerfaktor verursachte eine neunfache Beschleunigung der Rückfaltung von 0.7 μM RCM-T1. Dagegen würden z.B. 290 nM hCyp18 oder 470 nM Parvulin benötigt werden, um den gleichen Beschleunigungsfaktor zu erzielen. Die Katalyseeffizienz des Triggerfaktors ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (186) ist dabei in der Größenordnung der katalytischen Effizienz des Proteins gegenüber Tetrapeptid-4-Nitroaniliden. Damit unterscheidet sich der Triggerfaktor von allen PPIasen, die unter gleichen Bedingungen analysiert worden waren (102). So zeigt z.B. das hCyp18 eine ca. 150-fach reduzierte katalytische Effizienz gegenüber dem Proteinsubstrat RCM-T1 im Vergleich zu einem Tetrapeptidsubstrat. Während durch die schwache Substratbindung von PPIasen wie hFKBP12, hCyp18 oder Parvulin an RCM-T1 die Ermittlung der kinetischen Parameter (k_{cat} , K_{M}) erschwert ist, waren diese Einzelkonstanten für die durch Triggerfaktor katalysierte Rückfaltungsreaktion zugänglich (186). Die ermittelten Werte ($K_{\text{M}} = 0.7 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$) (186) verdeutlichen, daß die hohe Katalyseeffizienz des Triggerfaktors wahrscheinlich aus der erhöhten Affinität zum Proteinsubstrat resultiert. Das scheint bei der Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung eines Tetrapeptidsubstrat anders zu sein. Die enzymkinetischen Parameter ($K_{\text{M}} = 376 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 264 \text{ s}^{-1}$) der durch Triggerfaktor (bzw. der PPIase-aktiven Domäne) katalysierten *cis* \rightarrow *trans* Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA liegen dabei in der Größenordnung der Einzelkonstanten anderer PPIasen wie z.B. von hFKBP12 ($K_{\text{M}} = 370 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 267 \text{ s}^{-1}$), wenn das gleiche Substrat verwendet wurde (190). Darüber hinaus scheinen auch die kinetischen Parameter der PPIase-katalysierten *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung in Tetrapeptidsubstraten in der gleichen Größenordnung zu liegen, wie aus Untersuchungen zur Katalyse von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA durch hCyp18 unter reversiblen Bedingungen durch NMR (226) oder durch Anwendung eines direkten, proteasefreien PPIase-Aktivitätstests hervorgeht (176). Der so für das *trans*-Konformer des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA mit 500 μM bestimmte K_{M} -Wert ist dabei ca. um das 4-fache größer als der entsprechende Wert für das *cis*-Konformer (176). Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Katalyse der *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung der Prolylbindung in Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA durch Triggerfaktor im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest nach Janowski *et al.* (176) war allerdings nicht möglich, da die nicht erreichte Substratsättigung keine sichere Auswertung der Daten zuließ. Indirekt könnte aus diesen Daten abgeleitet werden, daß die

Michaeliskonstante für das *trans*-Konformer von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA im Enzym/Substratkomplex um mindestens zwei Größenordnungen höher ist als die des Triggerfaktor/RCM-T1-Komplexes.

Aus mechanistischer Sicht und in Bezug auf die modulare Organisation des Triggerfaktors erscheint interessant, ob an der Substratbindung neben der katalytisch aktiven Domäne auch die terminalen Bereiche beteiligt sind. Dies ist für die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung in einem Peptidsubstrat wahrscheinlich auszuschließen, da die PPIase-aktive Domäne die katalytische Effizienz und auch die Substratspezifität des intakten Proteins erhält. Im Gegensatz dazu sind beide terminale Domänen des Triggerfaktors essentiell für die beobachtete hohe Katalyseeffizienz bei der Rückfaltung der RCM-T1 (186, 187). So ist die PPIase-aktive Domäne (TF¹⁴⁸⁻²⁴⁹) gegenüber dem Proteinsubstrat nur noch schwach katalytisch wirksam und ist hinsichtlich der Katalyseeffizienz ($1.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) vergleichbar mit Eindomänenproteinen wie z.B. dem hFKBP12 ($12.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (186, 187). Für eine Beteiligung der N- und C-terminalen Domänen an der Substratbindung spricht auch die scheinbar kompetitive Inhibition durch ein entfaltetes Proteinderivat während der durch Triggerfaktor katalysierten Rückfaltung der RCM-T1, wobei die Dissoziationskonstante von $0.4 \text{ }\mu\text{M}$ für den Enzym/Inhibitor-Komplex in der Größenordnung des K_M -Wertes liegt (186). Diese Inhibierung konnte weder für die Katalyse der Rückfaltung durch die PPIase-Domäne noch für die Triggerfaktor-katalysierte Isomerisierung in einem prolinhaltigen Tetrapeptid gefunden werden (186). Der mögliche Bindungsbereich für ein entfaltetes Protein im Triggerfaktor ist dabei noch relativ unklar. Obwohl die N-terminale Domäne des Triggerfaktors für die Lokalisierung des Enzyms am Ribosom notwendig ist, scheint sie dabei gleichzeitig eine Funktion in der Substratbindung zu besitzen, da das Triggerfaktorfragment TF¹⁴⁵⁻⁴³² nicht ausreicht, um die effektive Katalyse des vollständigen Proteins zu erhalten (187). Aus den Untersuchungen zur funktionellen Komplementation mit den rekombinanten Einzeldomänen geht klar hervor, daß das Vorhandensein aller Domänen des Triggerfaktors für die hohe Katalyseeffizienz gegenüber der RCM-T1 notwendig ist, und darüber hinaus die richtige Anordnung der Domänen zueinander eine Rolle spielt (187).

Für die Analyse der zellulären Funktion des Triggerfaktors als PPIase wäre es sinnvoll, durch genetische oder enzymologische Methoden die PPIase-Aktivität zu regulieren. Da bisher kein Inhibitor der enzymatischen Aktivität bekannt ist, wurde versucht, durch ortsspezifische Mutagenese PPIase-inaktive Varianten des Triggerfaktors zu erhalten. Die Substitution von Phe²³³ → Tyr in der Triggerfaktor-PPIase-Domäne führte zu einer drastischen Reduzierung

der PPIase-Aktivität (ca. 1 % Restaktivität) gegenüber Tetrapeptidsubstraten und schien damit einen geeigneten Kandidaten für funktionelle Studien zu liefern. Die zunächst in einem Proteinfaltungsexperiment *in vitro* ermittelte katalytische Potenz der konstruierten Variante des vollständigen Triggerfaktors mit RCM-T1 als Substrat war überraschend hoch, da im Gegensatz zu den schlechten Katalyseeigenschaften gegenüber Peptidsubstraten eine relativ hohe Restaktivität von ca. 30 % im Vergleich zum Wildtypenzym detektiert wurde. Es ist denkbar, daß ein Beitrag zu dieser verbesserten Katalyse im Vergleich zum Peptidsubstrat aus der eventuell unveränderten Bindung des Proteinsubstrates durch die zusätzlichen Kontakte der N- und C-terminalen Domäne resultiert. Da auf zellulärer Ebene wahrscheinlich Polypeptidketten als Substrate zu betrachten sind, ist die Triggerfaktor (Phe²³³Tyr)-Variante aufgrund der relativ hohen Restaktivität nicht geeignet für entsprechende biologische Untersuchungen. Ein ähnliches Verhalten von punktmutierten PPIase-Varianten bei der Katalyse von Protein- bzw. Peptidsubstraten wurde für FKBP12 und mitochondriales Cyp20 aus Hefe beschrieben (227, 228). Das Ausbleiben eines Effekts bei der Untersuchung von PPIase-inaktiven Varianten dieser Hefe-Enzyme *in vivo* veranlaßte die Autoren zu einer Analyse der mutierten Proteinvarianten *in vitro*. Dabei wurde für alle FKBP12-Varianten festgestellt, daß sie in proteaseunabhängigen Aktivitätstests gegenüber Tetrapeptidsubstraten PPIase-Aktivität besitzen und gegenüber einem Proteinsubstrat nahezu wildtypähnliche Katalyseeffizienz besitzen (228). In Übereinstimmung mit der erhaltenen *in vivo* Funktion und analog zur entsprechenden Triggerfaktor (Phe²³³Tyr)-Variante wurde für die *S. cerevisiae* FKBP12 (Phe¹⁰⁶Tyr)-Variante gezeigt, daß gegenüber der RCM-T1 als Substrat noch 60 % der Wildtypenzymaktivität erhalten sind, während gegenüber Tetrapeptidsubstraten nur ca. 10 % Restaktivität beobachtet wurden (228).

Die Identifizierung des *E. coli* Triggerfaktors als ribosomenassoziierte PPIase mit einer hohen katalytischen Effizienz während der *in vitro* Proteinfaltung läßt vermuten, daß auch *in vivo* die Proteinfaltung ein aktiv katalysierter Prozeß ist. Für bestimmte zelluläre Proteinfaltungsvorgänge konnte eine Beteiligung von PPIasen überzeugend demonstriert werden. So kam es durch fehlende PPIase-Aktivität zu Verzögerungen von Proteinfaltungsprozessen bei der Biogenese mitochondrialer Proteine und der Kollagentripelhelix im ER (130-132). Sowohl die hohe Faltungseffizienz *in vitro* (Ch. Scholz und F.X. Schmid, persönliche Mitteilung) als auch die Affinität zu *E. coli* Ribosomen (G. Stoller, unveröffentlicht) scheinen unter den Triggerfaktoren verschiedener Organismen konserviert zu sein. Zumindest unterschieden sich die dahingehend untersuchten Triggerfaktoren aus *M. genitalium* und *B. subtilis* nicht vom

entsprechenden *E. coli* Protein. Die Bedeutung von Triggerfaktor scheint auch hervorgehoben zu werden durch das "Fehlen" anderer bekannter PPIasen in *M. genitalium* (223) sowie in *B. burgdorferi* (222), deren Genome bereits sequenziert sind. Beim Vergleich der Primärstrukturen der Triggerfaktoren fallen Bereiche relativ hoher Sequenzhomologie auf, die neben Abschnitten der N-terminalen Domäne vor allem in der katalytischen Domäne lokalisiert sind (vgl. ABB. 4-2). Das könnte auf die Bedeutung der PPIase-aktiven Domäne für eine mögliche zelluläre Funktion hinweisen. Dagegen könnte allerdings der Fakt sprechen, daß die Deletion des *tig*-Gens unter Normalbedingungen keinen Effekt auf das Zellwachstum bzw. Morphologie von *E. coli* hat (T. Tradler, persönliche Mitteilung). Es wird jedoch diskutiert, daß unter bestimmten Wachstumsbedingungen, vor allem bei tiefen Temperaturen (4 °C), die Lebensfähigkeit der *E. coli* Zellen mit dem zellulären Gehalt des Triggerfaktors korreliert und Triggerfaktor eine Rolle bei der Überlebensfähigkeit der Bakterien unter diesen Bedingungen spielt (82). Bisher bleibt unklar, ob bei normalen Wachstumsbedingungen von *E. coli* auf die Funktion des Triggerfaktors verzichtet werden kann, oder ob die Funktion durch andere Proteine ersetzt wird. Dafür kommen die weiteren acht *E. coli* PPIasen mit etablierter PPIase-Aktivität (113, 178, 179, 182, 198, 229) allerdings kaum in Frage, da für die 70S Ribosomen der Triggerfaktor-defizienten *E. coli* Zellen auch im proteasefreien PPIase-Aktivitätstests keine PPIase-Aktivität gegenüber Tetrapeptidsubstraten im verwendeten Konzentrationsbereich der Ribosomen (bis 250 nM) nachgewiesen werden konnte.

Das scheinbar ungestörte Zellwachstum von *E. coli* Zellen nach Entfernen einer PPIase wurde nicht nur im Fall von Triggerfaktor beobachtet. So waren *E. coli* Zellen auch nach der Deletion des *rotA* Gens (230), das für periplasmatisches Cyp21 codiert, oder des *fkfA*-Gens (231), das für FKBP26 codiert, weiterhin unter normalen Wachstumsbedingungen lebensfähig. Die Deletion des Gens eines anderen periplasmatischen Enzyms, des Parvulin-homologen SurA, verursachte dagegen eine veränderte Zusammensetzung der äußeren Membran, da der Gehalt von einigen integralen Membranproteinen reduziert war (229). Auf molekularer Ebene wurde die Beteiligung von SurA an einem frühen Schritt der Reifung von LamB, eines trimeren Membranporins, vorgeschlagen, da die Oligomerisierung zum Trimer in Abwesenheit von SurA blockiert war, und es zu einer Akkumulation von ungefalteten Monomeren kam. Während das Parvulin-homologe Ptf1 sogar essentiell für das Wachstum der Hefe ist (128, 129), war eine Hefemutante in Abwesenheit aller anderen PPIasen, d.h. der acht Cyclophiline und der vier FKBP unter Optimalbedingungen noch lebensfähig (127). In diesem Zusammenhang ist denkbar, daß möglicherweise neben den bekannten PPIase-Typen

noch weitere existieren, die aufgrund fehlender Sequenzhomologie oder veränderter Substratspezifität, sowohl in Hinsicht auf die zum Prolinrest benachbarte Sequenz als auch die Länge der Substratkette, bisher nicht als PPIasen identifiziert werden konnten. So wurde bereits für die Parvulin-homologen PPIasen, Pin1 und Ptf1, eine hohe Spezifität für phosphorylierte Aminosäureseitenketten von Threonin- und Serinresten in der N-terminal zum Prolin liegenden Position identifiziert (124, 125). Auf der anderen Seite wird aus der um den Faktor 200 erhöhten katalytischen Effizienz von *M. genitalium* Triggerfaktor gegenüber einem Proteinsubstrat im Vergleich zu einem Tetrapeptid (G. Stoller, unveröffentlicht und H. Bang, persönliche Mitteilung) deutlich, daß auch die Kettenlänge des Substrates eine Rolle spielen kann. Außerdem wäre denkbar, daß es zelluläre Faktoren für eine Modulation der PPIase-Aktivität gibt, die nach der Isolation von Komponenten (wie z.B. Ribosomen) eventuell nicht mehr vorhanden sind. Die diskutierte Regulation der PPIase-Aktivität des *E. coli* SlyD durch die reversible Bindung von Ni²⁺-Ionen an die C-terminale Metallionenbindungsdomäne könnte ein Hinweis für die Existenz solcher regulierter PPIasen sein (182).

4.4. Triggerfaktor als ein entfernt verwandtes FKBP

Die beobachtete enzymatische Aktivität des Triggerfaktors bzw. seiner PPIase-aktiven Domäne in Bezug auf die P₁-Position in einer Reihe prolinhaltiger Tetrapeptidderivate ähnelt der für FKBP gefundenen Substratspezifität. So konnte eine Präferenz für Aminosäurereste mit hydrophoben Seitenketten in dieser Position festgestellt werden. Die für Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA bestimmte Spezifitätskonstante ($k_{\text{cat}}/K_M = 1.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) liegt in der Größenordnung, die für die Katalyse von Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-4-NA durch hFKBP12 beobachtet wurde. Aufgrund der fehlenden Affinität zu FK506 konnte die katalytisch aktive Konzentration von Triggerfaktor durch Titration des aktiven Zentrums nicht genau bestimmt werden. Die durch mikromolare Konzentrationen an FK506 nicht beeinflussbare PPIase-Aktivität des Triggerfaktors führte zunächst zu der Annahme, daß *E. coli* Triggerfaktor den ersten Vertreter einer differenten PPIase-Familie darstellt (173). Durch Hydrophobe-Cluster-Analyse wurde jedoch ein interner hydrophober Bereich der Triggerfaktorsequenz vorhergesagt, welcher der FK506-Bindungstasche der FKBP ähnelt (167). Der Sequenzbereich, der deckungsgleich mit der durch limitierte Proteolyse erhaltenen PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors ist, zeigt hinsichtlich der an der Ligandbindung beteiligten Aminosäurereste eine gewisse Homologie zu FKBP (vgl. ABB. 3-30) (78, 167).

In der *E. coli* Triggerfaktorsequenz sind jedoch nur fünf von 14 Aminosäureresten konserviert, die innerhalb der FKBP-Familie hoch konserviert und hauptsächlich an der Ausbildung der hydrophoben Bindungstasche des hFKBP12 beteiligt sind (ABB. 4-4) (188, 232). Werden die PPIase-Domänen der Triggerfaktoren aus verschiedenen Organismen jedoch untereinander verglichen, so ist ein erhöhter Grad an Homologie zu verzeichnen (siehe ABB. 3-30 und ABB. 4-1). So zeigen die Sequenzen der PPIase-Domänen der Triggerfaktoren aus *B. subtilis* und *E. coli* 50 % Identität (ABB. 4-1), während sie mit der Sequenz des hFKBP12 nur zu 20 % bzw. 25 % identisch sind (210, 233). Die Homologie der Sequenz der *E. coli* Triggerfaktor-PPIase-Domäne erscheint auch im Vergleich zu den Sequenzen von Vertretern prokaryotischer FKBP wie SlyD und FKBP16 nur relativ gering (21.3 bzw. 17.4 % Identität) (182, 233). Basierend auf diesen globalen Sequenzvergleichen läßt sich folglich die Zugehörigkeit der Triggerfaktoren zur Familie der FKBP nicht eindeutig etablieren. Hinzu kommt, daß die PPIase-Aktivität des Triggerfaktors offenbar nicht durch FK506 inhibiert wurde. Die zunächst im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest beobachtete, schwache Inhibierung des *B. subtilis* Triggerfaktors durch FK506 ($IC_{50} = 500$ nM) (210), konnte in einem proteasefreien Aktivitätstest bis zu einer Konzentration von 23 μ M FK506 nicht reproduziert werden (G. Stoller, unveröffentlicht). Die im gleichen Aktivitätstest zwar meßbare, jedoch nur schwache katalytische Aktivität des *M. genitalium* Triggerfaktors (k_{cat}/K_M -Wert 6.5×10^4 M⁻¹s⁻¹) ließ sich ebenfalls nicht durch 23 μ M FK506 inhibieren (G. Stoller, unveröffentlicht). Andererseits wurde kürzlich für zwei *E. coli* FKBP, SlyD und FKBP16, gezeigt, daß sie PPIase-Aktivität besitzen, die jedoch nicht durch 25 μ M FK506 beeinflußt wurde (182).

Für die Untersuchung von möglichen zellulären Funktionen der PPIasen ist die Anwendung von enzymatisch inaktiven Proteinvarianten aufschlußreich. Zur Erzeugung solcher Enzymvarianten kommt neben der Methode der ortsspezifischen Mutagenese auch die Inaktivierung durch die Inhibitoren in Betracht, die bereits z.B. durch Anwendung von CsA für die Beteiligung von Cyclophilinen an der zellulären Proteinfaltung erfolgreich demonstriert wurde (130-132). Vor diesem Hintergrund und in Hinsicht auf die vermutete funktionelle Verwandtschaft des Triggerfaktors zu FKBP wurde deshalb versucht, basierend auf der Sequenzhomologie zum hFKBP12 enzymatisch inaktive bzw. FK506-inhibierbare Proteinvarianten der PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors zu erzeugen.

Durch ortsspezifische Mutagenese waren im hFKBP12 bereits mehrere Aminosäurereste bezüglich ihrer möglichen Beteiligung am Katalysemechanismus sowie der FK506-Bindung

untersucht worden (189-193). Dabei wurde beobachtet, daß sowohl PPIase-Aktivität als auch Ligandbindung sich relativ resistent gegenüber den entsprechenden Punktmutationen zeigten (190). So wurde bisher auch keine enzymatisch inaktive Variante mit nachgewiesener struktureller Integrität beobachtet.

Der Aminosäurerest Asp³⁷ des hFKBP12 ist innerhalb der Familie der FKBP hoch konserviert und wurde als wichtige Komponente für die Bindung von FK506 identifiziert (188, 191). Dabei spricht die nur 10-fache Reduzierung der katalytischen Aktivität durch Mutation von Asp³⁷ → Val im hFKBP12 im Vergleich zu einer 600-fachen Verringerung der Affinität zu FK506 für eine Entkopplung von Katalysemechanismus und Ligandbindung (191). Ein Austausch des Asp-Restes kommt relativ selten in anderen FKBP-Sequenzen vor. Nur in den Sequenzen der Triggerfaktors sowie der FKBP-Domäne III von FKBP52 aus Kaninchen, Mensch bzw. Maus und im *E. coli* FKBP16 ist der Asp-Rest durch ein Glu-Rest an der entsprechenden Position ersetzt (232). Bei der Suche nach möglichen Erklärungen für die fehlende FK506-Affinität des Triggerfaktors wurde deshalb die Ersetzung von Glu¹⁷⁸ durch Asp (entspricht der Position 37 im hFKBP12) in Betracht gezogen. Die entsprechende Mutation (Glu¹⁷⁸Asp) in der Triggerfaktor-PPIase-Domäne bewirkte weder eine Änderung der katalytischen Eigenschaften, noch konnte FK506-Bindung beobachtet werden. Allerdings konnte bei Ersetzung von Glu¹⁷⁸ gegen Val oder Lys ein Anstieg der katalytischen Effizienz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Das steht im Gegensatz zur Reduzierung der katalytischen Aktivität des Wildtyps auf 9 % bzw. 3-6 % im Fall der hFKBP12 (Asp³⁷Val)-Variante (191) sowie der vergleichbaren hFKBP12 (Asp³⁷Leu)-Variante. Die für FKBP vorgeschlagene Beteiligung der Carboxylgruppe vom Asp³⁷ am Katalysemechanismus (234) scheint somit für die katalytische Aktivität der Triggerfaktor-PPIase-Domäne entbehrlich zu sein.

In der Kristallstruktur des hFKBP12/FK506-Komplexes ist eine enge Nachbarschaft der aromatischen Aminosäurereste Tyr²⁶, Phe⁴⁶, Trp⁵⁹ und Phe⁹⁹ zu einer Region von FK506, die den Pipecolinyling, die α -Dicarbonyleinheit sowie den Hemiketalring enthält, zu beobachten (ABB. 4-4). Der Aminosäurerest Tyr²⁶ scheint gleichermaßen an der Ligandbindung und am Katalysemechanismus beteiligt zu sein, da ein Tyr²⁶Phe Austausch im hFKBP12 eine Reduzierung der PPIase-Aktivität um 70 % und eine Verminderung der FK506-Affinität um 80 % hervorruft (192). Alle bisher bekannten Triggerfaktorsequenzen enthalten an dieser Position einen Phe-Rest (Phe¹⁶⁸ in der *E. coli* Triggerfaktorsequenz). Das hat offensichtlich für die enzymatische Aktivität des Triggerfaktors keine Folgen, da die im Standard-PPIase-

Aktivitätstest gegenüber Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA bestimmte katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_M = 1.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) mit der des hFKBP12 ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) vergleichbar ist.

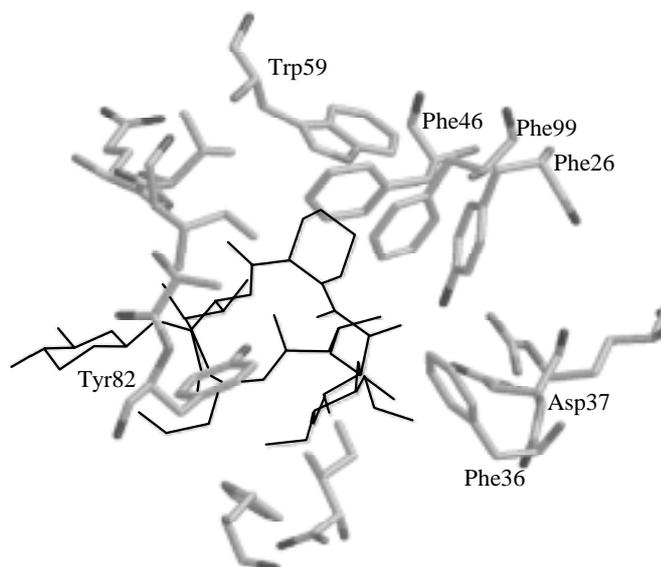


ABB. 4-4. Hydrophobe Bindungstasche des hFKBP12. Zur Vereinfachung sind nur die Aminosäurereste dargestellt, die im Abstand $< 4 \text{ \AA}$ zum FK506 (als dünne schwarze Linie dargestellt) Atome lokalisiert haben. Als Quelle diente die in der Brookhaven Datenbank zugängliche Kristallstruktur des hFKBP12/FK506-Komplexes (1FKF, 188)

Eine drastische Reduzierung der PPIase-Aktivität bei gleichzeitig geringem Effekt auf die FK506-Bindungsaffinität wurde für die hFKBP12 (Phe³⁶Tyr)-Variante beschrieben (235). Dieser Phe-Rest (Position 177 im *E. coli* Triggerfaktor) ist auch in den meisten Triggerfaktoren konserviert. Ausnahmen bilden die Sequenzen der verwandten Eubakterien *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *B. burgdorferi* sowie *Synechocystis sp.*, die an der entsprechenden Position Leu bzw. Ile enthalten (vgl. ABB. 4-2). Für die Phe³⁶Leu-Variante des hFKBP12 wurde jedoch nur ein geringer Effekt auf die PPIase-Aktivität beobachtet (190), so daß sich die erwähnte geringe enzymatische Aktivität des *M. genitalium* Triggerfaktors und seiner PPIase-Domäne im Standard-PPIase-Aktivitätstest wahrscheinlich nicht durch die Phe \rightarrow Leu Substitution erklären läßt.

Die Kohlenstoffatome 3 und 4 des Pipecolinrings des FK506-Moleküls stehen in enger räumlicher Nachbarschaft ($< 3.9 \text{ \AA}$) zum Trp⁵⁹ im hFKBP12/FK506-Komplex. So ist es vorstellbar, daß ein Trp \rightarrow Phe Austausch die Bindungsaffinität zum Peptidomakrolid schwächen könnte. Die Mutation des Trp⁵⁹ \rightarrow His im hFKBP12 wirkte sich drastisch sowohl auf die Bindungsaffinität zu FK816, einem Strukturanalogen des FK506, als auch auf die

PPIase-Aktivität aus (192). Ebenso sind die K_I -Werte für die Trp⁵⁹Ala- und Trp⁵⁹Leu-Varianten des hFKBP12 ca. 80-fach erhöht (190). Ein natürlicher Trp → Phe Ersatz liegt bereits in der Sequenz des Rinder-FKBP12.6 vor. Die Phenylalaninseitenkette scheint jedoch für die Erhaltung der hydrophoben Kontakte zum FK506 ausreichend zu sein, da die Bindungsaffinität des FKBP12.6 im Vergleich zum hFKBP12 nur wenig beeinflusst ist (236). Ausgehend davon ist möglicherweise erklärbar, daß auch nach Ersetzung des Phe¹⁹⁸ in der Triggerfaktor-PPIase-Domäne durch Trp keine kompetitive Inhibierung der PPIase-Aktivität durch FK506 meßbar war. Die Einführung eines Histidins an dieser Position geht neben der erhöhten proteolytischen Sensitivität zusätzlich mit der nahezu vollständigen enzymatischen Inaktivität des Proteins einher. Da demzufolge die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums wahrscheinlich nicht erhalten ist, können diese Daten nicht zur funktionellen Charakterisierung des Triggerfaktors als FKBP dienen, und durch die hohe proteolytische Sensitivität können diese Proteinvarianten nicht für biologische Untersuchungen verwendet werden.

Zur hydrophoben Bindungstasche des hFKBP12 zählt ebenso das hoch konservierte Phe⁹⁹, dessen C^ε-Wasserstoffatom in enger Nachbarschaft zum C9-Carbonylsauerstoff (2.74 Å) des FK506-Moleküls steht (188). Der völlige Verlust der Bindungsaffinität für FK506 sowie die Inaktivität im PPIase-Aktivitätstest durch den Phe⁹⁹Tyr-Austausch im hFKBP12 (192) konnten nicht bestätigt werden. Es wurde jedoch eine ca. 200-fache Reduzierung der Affinität zu FK506 festgestellt. Die PPIase-Aktivität war gegenüber einer Reihe von Tetrapeptidsubstraten unterschiedlich verändert, wobei mit Ausnahme des Glu-Restes in der P₁-Position des Substrates, eine Reduzierung der katalytischen Effizienz mit einer Restaktivität von ca. 5 % zu beobachten war. Betrachtet man die entsprechende Phe²³³Tyr-Variante der Triggerfaktor-PPIase-Domäne, fällt die ebenfalls starke Reduktion der enzymatischen Aktivität auf. Im Gegensatz zur hFKBP12 (Phe⁹⁹Tyr)-Variante wird auch die katalytische Aktivität gegenüber Aminosäureresten mit geladener Seitenkette in der P₁-Position des Substrats drastisch verringert, so daß trotz hoher Enzymkonzentration im Meßansatz keine PPIase-Aktivität nachweisbar war. Das spricht nicht gegen eine unveränderte Substratspezifität. Unter der Annahme, daß das Verhältnis der Spezifitätskonstanten für die einzelnen Substrate unverändert ist, wäre theoretisch ein k_{cat}/K_M -Wert von ca. 80 M⁻¹s⁻¹ für das Substrat Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-4-NA zu erwarten. Der sich daraus ableitende Wert für die beobachtete Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung in Anwesenheit von 5 µM der Enzymvariante ist mit dem verwendeten Aktivitätstest nicht mehr sicher bestimmbar. Auf der

Grundlage der geringen Restaktivität könnte diese Proteinvariante prinzipiell für funktionelle Untersuchungen des Triggerfaktors dienen. Wie bereits ausgeführt, ist die enzymatische Aktivität der entsprechenden Variante des vollständigen Triggerfaktors (Phe²³³Tyr) bei der Katalyse der Rückfaltung eines Proteinsubstrates relativ hoch und damit ist diese Proteinvariante ungeeignet für die Untersuchung der Funktion in biologischen Systemen.

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß nur eine entfernte Verwandtschaft zwischen den aktiven Zentren des Triggerfaktors und des FK506-hemmbareren hFKBP12 besteht. Möglicherweise sind Triggerfaktoren eine spezialisierte Unterfamilie der FKBP. Dafür spricht auch das bisher gefundene, auf prokaryotische Organismen begrenzte Vorkommen.

5. Zusammenfassung

PPIasen sind in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung von -Xaa-Pro-Peptidbindungen zu katalysieren. Entsprechend ihrer spezifischen Funktion gibt es verschiedene Vertreter dieser Enzymklasse in nahezu allen zellulären Kompartimenten. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifizierung des *E. coli* Triggerfaktors als ribosomenassoziierte PPIase. Diese subzelluläre Lokalisation ist bisher einzigartig unter den bekannten PPIasen und läßt eine Funktion als Katalysator der Proteinbiogenese vermuten. Die ribosomale Assoziation des Triggerfaktors ist dabei nicht nur auf translatierende Ribosomen bzw. RNC beschränkt, sondern kann auch mit isolierten 50S Untereinheiten bzw. reassozierten 70S Ribosomen beobachtet werden. Dabei scheint die Bindung von Triggerfaktor an die ribosomalen Partikel einer 1:1 Stöchiometrie zu folgen. Untersuchungen zur LiCl-vermittelten Dissoziation von 50S Untereinheiten sowie die fehlende PPIase-Aktivität in Fraktionen der "tightly coupled" Ribosomen eines Triggerfaktor-defizienten *E. coli* Stammes lassen vermuten, daß Triggerfaktor die einzige PPIase am isolierten *E. coli* Ribosom ist.

Triggerfaktor konnte bis zur Homogenität aus *E. coli* Zellen gereinigt werden. Die katalytischen Eigenschaften des gereinigten authentischen und des rekombinanten Proteins sind identisch und ähneln denen der FKBP. Im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest wurde ein k_{cat}/K_M -Wert von $1.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA bestimmt. Die Bevorzugung von Aminosäureresten mit hydrophoben Seitenketten in der P₁-Position der Substratkette ähnelt dem Substraterkennungsmuster von FKBP. Die PPIase-Aktivität des Triggerfaktors ließ sich jedoch nicht durch mikromolare Konzentrationen von FK506 oder CsA inhibieren. Im Gegensatz zum hFKBP12 ist die katalytische Effizienz des Triggerfaktors in der durch Prolylisomerisierung limitierten Rückfaltung der RCM-T1 außergewöhnlich hoch.

Triggerfaktor ist ein modulares Protein. Durch limitierte Proteolyse des Triggerfaktors konnte der zentrale Sequenzbereich (Arg¹⁴⁵-Glu²⁵¹) als PPIase-aktive Domäne identifiziert werden. Diese Domäne erhält die katalytischen Eigenschaften des intakten Triggerfaktors gegenüber Tetrapeptidsubstraten. Für die hohe Effizienz bei der Katalyse der Proteinfaltung ist die intakte Form des Triggerfaktors notwendig. Basierend auf den Ergebnissen der limitierten Proteolyse erfolgte die Einteilung des Triggerfaktors in drei modulare Bereiche. Die entsprechenden Proteinvarianten (TF¹⁻¹⁴⁵, TF¹⁻²⁵¹, TF¹⁴⁵⁻²⁵¹, TF¹⁴⁵⁻⁴³²) wurden aus *E. coli*

Überexpressionskulturen bis zur Homogenität gereinigt. Durch Anwendung dieser Proteinvarianten in Ribosomenbindungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die ribosomale Assoziation des Triggerfaktors durch die N-terminale Domäne (TF¹⁻¹⁴⁵) vermittelt wird.

Die Aminosäuresequenz der PPIase-aktiven Domäne des Triggerfaktors teilt einen gewissen Grad an Sequenzhomologie mit der PPIase-Familie der FKBP. In einer vergleichenden Untersuchung wurden die durch ortsspezifische Mutagenese erzeugten Varianten der Triggerfaktor-PPIase-Domäne (Glu¹⁷⁸Val, Glu¹⁷⁸Asp, Glu¹⁷⁸Lys, Phe¹⁹⁸His, Phe¹⁹⁸Trp, Phe²³³Tyr) und des hFKBP12 (Asp³⁷Leu und Phe⁹⁹Tyr) hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften im proteasegekoppelten Aktivitätstest untersucht. Der Einfluß der eingeführten Punktmutationen war auf die enzymatische Aktivität beider Proteine z.T. unterschiedlich. Während die Entfernung der negativen Ladung an Position 37 durch einen Asp → Leu Austausch im hFKBP12 zur Reduzierung der PPIase-Aktivität führte, wurde durch einen entsprechenden Austausch in der Triggerfaktor-PPIase-Domäne (Glu¹⁷⁸Val oder Lys) eine Steigerung der katalytischen Effizienz gegenüber Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA als Substrat beobachtet. Die Einführung eines Phe → Tyr Austausches in der Position 99 im hFKBP12 bzw. in der Position 233 der Triggerfaktor-PPIase-Domäne führte zwar zur starken Reduzierung der katalytischen Aktivität beider Proteinvarianten, jedoch blieb im Gegensatz zum hFKBP12 die Substratspezifität der Triggerfaktor-PPIase-Domäne unverändert. Der Grad der Verwandtschaft, die aufgrund von Sequenzanalysen zwischen beiden Enzymen postuliert wurde, ist demzufolge relativ gering. Möglicherweise bilden die neun bekannten und in ihrer Sequenz konservierten Triggerfaktoren aus verschiedenen Eubakterien eine Unterfamilie der FKBP, deren spezielle Lokalisation das Ribosom ist.

6. Literatur

- 1 ANSON, M.L. (1945) Protein denaturation and the properties of protein groups. *Adv. Prot. Chem.*, **2**, 361-386.
- 2 ANFINSON, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- 3 FREEDMAN, R.L. (1992) Protein folding in the cell. In Creighton, T.E. (ed), *Protein folding*. Freeman, New York, pp. 455-539
- 4 GETHING, M.J., SAMBROOK, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33-45.
- 5 LORIMER, G.H. (1996) A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo*. *FASEB J.*, **10**, 5-9.
- 6 BREMER, H., DENNIS, P.P. (1996) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In Neidhardt, F.C. (ed) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington D.C., pp 1553-1569.
- 7 PAVLOV, M.Y., EHRENBERG, M. (1996) Rate of translation of natural mRNAs in an optimized *in vitro* system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **328**, 9-16.
- 8 PEDERSEN, S. (1984) *Escherichia coli* ribosomes translate *in vivo* with variable rate. *EMBO J.*, **3**, 2895-2898.
- 9 KOLB, V.A., MAKEYEV, E.V., KOMMER, A., SPIRIN, A.S. (1995) Cotranslational folding of proteins. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 1217-1220.
- 10 FRYDMAN, J., NIMMESGERN, E., OHTSUKA, K., HARTL, F.U. (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, **370**, 111-117.
- 11 TOKATLIDIS, K., FRIGUET, B., DEVILLE-BONNE, D., BALEUX, F., FEDOROV, A.N., NAVON, A., DJAVADI-OHANIAN, L., GOLDBERG, M.E. (1995) Nascent chains: folding and chaperone interaction during elongation on ribosomes. *Philos. Trans. R. Soc. London Biol.*, **348**, 89-95.
- 12 FEDOROV, A.N., BALDWIN, T.O. (1995) Contribution of cotranslational folding to the rate of formation of native protein structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 1227-1231.
- 13 KOLB, V.A., MAKEYEV, E.V., SPIRIN, A.S. (1994) Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.*, **13**, 3631-3637.
- 14 YANG, F., JING, G.Z., ZHOU, J.M., ZHENG, Y.Z. (1997) Free luciferase may acquire a more favorable conformation than ribosome-associated luciferase for its activity expression. *FEBS Lett.*, **417**, 329-332.
- 15 KUDLICKI, W., CHIRGWIN, J., KRAMER, G., HARDESTY, B. (1995) Folding of an enzyme into an active conformation while bound as peptidyl-tRNA to the ribosome. *Biochemistry*, **34**, 14284-14287.
- 16 KOMAR, A.A., KOMMER, A., KRASHENINNIKOV, I.A., SPIRIN, A.S. (1997) Cotranslational folding of globin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10646-10651.
- 17 GILMORE, R., COFFEY, M.C., LEONE, G., MCLURE, K., LEE, P.W.K. (1996) Co-translational trimerization of the reovirus cell attachment protein. *EMBO J.*, **15**, 2651-2658.
- 18 TSOU, C.L. (1988) Folding of the nascent peptide chain into a biologically active protein. *Biochemistry*, **27**, 1809-1812.
- 19 FREEDMAN, R.B., HIRST, T.R., TUTE, M.F. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 331-336.
- 20 NETZER, W.J., HARTL, F.U. (1997) Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature*, **388**, 343-349.
- 21 JING, G.Z., ZHOU, B., XIE, L., LIU, L.J., LIU, Z.G. (1995) Comparative studies of the conformation of the N-terminal fragments of staphylococcal nuclease R in solution. *Biochim. Biophys. Acta*, **1250**, 189-196.
- 22 KUDLICKI, W., KITAOKA, Y., ODOM, O.W., KRAMER, G., HARDESTY, B. (1995) Elongation and folding of nascent ricin chains as peptidyl-tRNA on ribosomes: the effect of amino acid deletions on these processes. *J. Mol. Biol.*, **252**, 203-212.
- 23 RAMACHANDRAN, G.N., SASISIKHARAN, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, **23**, 282-438.

- 24 HOBBOHM, U., SANDER, C. (1994) Enlarged representative set of protein structures. *Protein Sci.*, **3**, 522-524.
- 25 SCHERER, G., KRAMER, M.L., SCHUTKOWSKI, M., REIMER, U., FISCHER, G. (1998) Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, submitted.
- 26 LIM, V.I., SPIRIN, A.S. (1986) Stereochemical analysis of ribosomal transpeptidation. Conformation of nascent peptide. *J. Mol. Biol.*, **188**, 565-574.
- 27 YONATH, A., LEONARD, K.R., WITTMANN, H.G. (1987) A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstitution. *Science*, **236**, 813-816.
- 28 BERNABEU, C., LAKE, J.A. (1982) Nascent polypeptide chains emerge from the exit domain of the large ribosomal subunit: immune mapping of the nascent chain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**, 3111-3115.
- 29 SPIRIN, A.S., LIM, V.I. (1986) Stereochemical analysis of ribosomal transpeptidation, translocation, and nascent peptide folding. In Hardesty, B., Kramer, G. (eds) *Structure, Function and Genetics of Ribosomes*. Springer-Verlag, New York, pp. 556-572.
- 30 WHITLEY, P., NILSSON, I.M., VON HEIJNET, G. (1996) A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6241-6244.
- 31 FRANK, J., ZHU, J., PENCZEK, P., LI, Y., SRIVASTAVA, S., VERSCHOOR, A., RADERMACHER, M., GRASSUCCI, R., LATA, R.K., AGRAWAL, R.K. (1995) A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome. *Nature*, **376**, 441-444.
- 32 STARK, H., MUELLER, F., ORLOVA, E.V., SCHATZ, M., DUBE, P., ERDEMIR, T., ZEMLIN, F., BRIMACOMBE, R., VAN HEEL, M. (1995) The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure*, **3**, 815-821.
- 33 MALKIN, L.I., RICH, A. (1967) Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J. Mol. Biol.*, **26**, 329-346.
- 34 BLOBEL, G., SABATINI, D.D. (1970) Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J. Cell Biol.*, **45**, 130-145.
- 35 SMITH, W.P., TAI, P.C., DAVIS, B.D. (1978) Interaction of secreted nascent chains with surrounding membrane in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 5922-5925.
- 36 WILSON, K.S., NOLLER, H.F. (1998) Molecular movement inside the translational engine. *Cell*, **92**, 337-349.
- 37 NIERHAUS, K.H., BEYER, D., DABROWSKI, M., SCHÄFER, M.A., SPAHN, C.M., WADZACK, J., BITTNER, J.U., BURKHARDT, N., DIEDRICH, G., JÜNEMANN, R., KAMP, D., VOSS, H., STUHRMANN, H.B. (1995) The elongating ribosome: structural and functional aspects. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 1011-1021.
- 38 PORSE, B.T., RODRIGUEZ-FONSECA, C., LEVIEV, I., GARRETT, R.A. (1995) Antibiotic inhibition of the movement of tRNA substrates through a peptidyl transferase cavity. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 877-885.
- 39 ODOM, O.W., PICKING, W.D., HARDESTY, B. (1990) Movement of tRNA but not the nascent peptide during peptide bond formation on ribosomes. *Biochemistry*, **29**, 10734-10744.
- 40 DESLONGCHAMPS, P. (1975) Stereoelectronic control in the cleavage of tetrahedral intermediates in the hydrolysis of esters and amides. *Tetrahedron*, **31**, 2463-2490.
- 41 LIM, V.I. (1986) Disallowed conformations of the tetrahedral intermediate. *J. Mol. Biol.*, **188**, 575-577.
- 42 NAGANO, K., TAKAGI, H., HAREL, M. (1991) The side-by-side model of two tRNA molecules allowing the alpha-helical conformation of the nascent polypeptide during the ribosomal transpeptidation. *Biochimie*, **73**, 947-960.
- 43 HENDRICK, J.P., HARTL, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 349-384.
- 44 JAENICKE, R. (1991) Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry*, **30**, 3147-3161.
- 45 GILBERT, H.F. (1997) Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29399-29402.

- 46 FISCHER, G. (1994) Über Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angew. Chem.*, **106**, 1479-1501.
- 47 SCHMID, F.X. (1993) Prolyl isomerase: Enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 123-143.
- 48 BUKAU, B., HORWICH, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- 49 HARTL, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- 50 FRYDMAN, J., HARTL, F.U. (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between *in vitro* and *in vivo* mechanisms. *Science*, **272**, 1497-1502.
- 51 REID, B.G., FLYNN, G.C. (1996) GroEL binds to and unfolds rhodanese posttranslationally. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7212-7217.
- 52 BUKAU, B., HESTERKAMP, T., LUIRINK, J. (1996) Growing up in a dangerous environment: a network of multiple targeting and folding pathways for nascent polypeptides in the cytosol. *Trends Cell Biol.*, **6**, 480-486.
- 53 EGGERS, D.K., WELCH, W.J., HANSEN, W.J. (1997) Complexes between nascent polypeptides and their molecular chaperones in the cytosol of mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1559-1573.
- 54 NETZER, W.J., HARTL, F.U. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 68-73.
- 55 FENTON, W.A., HORWICH, A.L. (1997) GroEL-mediated protein folding. *Prot. Science*, **6**, 743-760.
- 56 CHATTOPADHYAY, S., DAS, B., DASGUPTA, C. (1996) Reactivation of denatured proteins by 23S ribosomal RNA: role of domain V. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8284-8287.
- 57 DAS, B., CHATTOPADHYAY, S., BERA, A.K., DASGUPTA, C. (1996) *In vitro* protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA. *Eur. J. Biochem.*, **235**, 613-621.
- 58 KUDLICKI, W., COFFMAN, A., KRAMER, G., HARDESTY, B. (1997) Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins. *Folding Design*, **2**, 101-108.
- 59 WALTER, P., JOHNSON, A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 87-119.
- 60 LÜTCKE, H. (1995) Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.*, **228**, 531-550.
- 61 WIEDMANN, B., SAKAI, H., DAVIS, T.A., WIEDMANN, M. (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, **370**, 434-440.
- 62 LAURING, B., SAKAI, H., KREIBICH, G., WIEDMANN, M. (1995) Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 5411-5415.
- 63 WANG, S., SAKAI, H., WIEDMANN, M. (1995) NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J. Cell Biol.*, **130**, 519-528.
- 64 LUIRINK, J., DOBBERSTEIN, B. (1994) Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. *Mol. Microbiol.*, **11**, 9-13.
- 65 WOLIN, S.L. (1994) From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell*, **77**, 787-790.
- 66 POWERS, T., WALTER, P. (1997) Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J.*, **16**, 4880-4886.
- 67 VALENT, Q.A., KENDALL, D.A., HIGH, S., KUSTERS, R., OUDEGA, B., LUIRINK, J. (1995) Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.*, **14**, 5494-5505.
- 68 VALENT, Q.A., DEGIER, J.W.L., VONHEIJNE, G., KENDALL, D.A., TENHAGENJONGMAN, C.M., OUDEGA, B., LUIRINK, J. (1997) Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Mol. Microbiol.*, **25**, 53-64.

- 69 KUMAMOTO, C.A., FRANCETIC, O. (1993) Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein *in vivo*. *J. Bacteriol.*, **175**, 2184-2188.
- 70 RANDALL, L.L., TOPPING, T.B., HARDY, S.J., PAVLOV, M.Y., FREISTROFFER, D.V., EHRENBERG, M. (1997) Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 802-807.
- 71 HARDY, S.J., RANDALL, L.L. (1991) A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science*, **251**, 439-443.
- 72 CROOKE, E., WICKNER, W. (1987) Trigger factor: a soluble protein that folds pro-OmpA into a membrane-assembly-competent form. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**, 5216-5220.
- 73 CROOKE, E., GUTHRIE, B., LECKER, S., LILL, R., WICKNER, W. (1988) ProOmpA is stabilized for membrane translocation by either purified *E. coli* trigger factor or canine signal recognition particle. *Cell*, **54**, 1003-1011.
- 74 CROOKE, E., BRUNDAGE, L., RICE, M., WICKNER, W. (1988) ProOmpA spontaneously folds in a membrane assembly competent state which trigger factor stabilizes. *EMBO J.*, **7**, 1831-1835.
- 75 LECKER, S., LILL, R., ZIEGELHOFFER, T., GEORGOPOULOS, C., BASSFORD JR., P.J., KUMAMOTO, C.A., WICKNER, W. (1989) Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*—SecB, trigger factor and GroEL—form soluble complexes with precursor proteins *in vitro*. *EMBO J.*, **8**, 2703-2709.
- 76 GUTHRIE, B., WICKNER, W. (1990) Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export. *J. Bacteriol.*, **172**, 5555-5562.
- 77 TAI, P.C., LIAN, J., YU, N.J., FANDL, J., XU, H., VIDUGIRIENE, J. (1992) On protein translocation across bacterial cytoplasmic membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **61**, 105-109.
- 78 HESTERKAMP, T., HAUSER, S., LÜTCKE, H., BUKAU, B. (1996) *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 4437-4441.
- 79 KANDROR, O., BUSCONI, L., SHERMAN, M., GOLDBERG, A.L. (1994) Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23575-23582.
- 80 KANDROR, O., SHERMAN, M., RHODE, M., GOLDBERG, A.L. (1995) Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in *Escherichia coli* and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. *EMBO J.*, **14**, 6021-6027.
- 81 KANDROR, O., SHERMAN, M., MOERSCHHELL, R., GOLDBERG, A.L. (1997) Trigger factor associates with GroEL *in vivo* and promotes its binding to certain polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1730-1734.
- 82 KANDROR, O., GOLDBERG, A.L. (1997) Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 4978-4981.
- 83 GAREL, J.R., BALDWIN, R.L. (1973) Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **70**, 3347-3351.
- 84 BRANDTS, J.F., HALVORSON, H.R., 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.
- 85 CHENG, H.N., BOVEY, F.A. (1977) *Cis-trans* equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers*, **16**, 1465-1472.
- 86 GRATHWOHL, C., WÜTHRICH, K. (1976) NMR studies of the molecular conformations in the linear oligopeptides H-(L-Ala)_n-L-Pro-OH. *Biopolymers*, **15**, 2043-2057.
- 87 GRATHWOHL, C., WÜTHRICH, K. (1976) The X-Pro peptide bond as an NMR probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers*, **15**, 2025-2041.
- 88 GRATHWOHL, C., WÜTHRICH, K. (1981) NMR-studies of the rates of proline *cis/trans* isomerization. *Biopolymers*, **20**, 2623-2633.

- 89 REIMER, U., SCHERER, G., DREWELLO, M., KRUBER, S., SCHUTKOWSKI, M., FISCHER, G. (1998) Side chain effects on peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerization. *J. Mol. Biol.*, in press.
- 90 EVANS, P.A., DOBSON, C.M., KAUTZ, R.A., HATFULL, G., FOX, R.O. (1987) Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature*, **329**, 266-268.
- 91 CHAZIN, W.J., KORDEL, J., DRAKENBERG, T., THULIN, E., BRODIN, P., GRUNDSTROM, T., FORSEN, S. (1989) Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional ¹H NMR spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 2195-2198.
- 92 O'KEEFE, M.P., NEDELKOV, D., BIEBER, A.L., NIEMAN, R.A. (1996) Evidence for isomerization in myotoxin a from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicol.*, **34**, 417-434.
- 93 HIGGINS, K.A., CRAIK, D.J., HALL, J.G., ANDREWS, P.R. (1988) *Cis-trans* isomerization of the proline residue in insulin studied by ¹³C NMR spectroscopy. *Drug Design Delivery*, **3**, 159-170.
- 94 WILLIAMS, K.A., DEBER, C.M. (1991) Proline residues in transmembrane helices: structural or dynamic role? *Biochemistry*, **30**, 8919-8923.
- 95 SANKARARAMAKRISHNAN, R., VISHVESHWARA, S. (1993) Characterization of proline-containing alpha-helix (helix F model of bacteriorhodopsin) by molecular dynamics studies. *Proteins*, **15**, 26-41.
- 96 WU, H., LUSTBADER, J.W., LIU, Y., CANFIELD, R.E., HENDRICKSON, W.A. (1994) Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure*, **2**, 545-558.
- 97 LAPHORN, A.J., HARRIS, D.C., LITTLEJOHN, A., LUSTBADER, J.W., CANFIELD, R.E., MACHIN, K.J., MORGAN, F.J., ISAACS, N.W. (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*, **369**, 455-461.
- 98 BRANDSCH, M., THUNECKE, F., KÜLLERTZ, G., SCHUTKOWSKI, M., FISCHER, G., NEUBERT, K. (1998) Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter (PEPT1). *J. Biol. Chem.*, **273**, 3861-3864.
- 99 LIN, L.N., BRANDTS, J.F. (1979) Role of *cis-trans* isomerism of the peptide bond in protease specificity. Kinetic studies on small proline-containing peptides and on polyproline. *Biochemistry*, **18**, 5037-5042.
- 100 MERKER, M.P., DAWSON, C.A. (1995) Cyclophilin-facilitated bradykinin inactivation in the perfused rat lung. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 2085-2091.
- 101 MERKER, M.P., DAWSON, C.A., BONGARD, R.D., ROERIG, D.L., HAWORTH, S.T., LINEHAN, J.H. (1993) Angiotensin-converting enzyme preferentially hydrolyzes *trans* isomer of proline-containing substrate. *J. Appl. Physiol.*, **75**, 1519-1524.
- 102 SCHMID, F.X., MAYR, L.M., MÜCKE, M., SCHÖNBRUNNER, E.R. (1993) Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv. Protein Chem.*, **44**, 25-66.
- 103 WETLAUFER, D.B. (1985) Prolyl isomerization: how significant for *in vivo* protein folding. *Biopolymers*, **24**, 251-255.
- 104 FISCHER, G., SCHMID, F.X. (1990) The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for *de novo* protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, **29**, 2205-2212.
- 105 JAENICKE, R. (1993) What does protein refolding *in vitro* tell us about protein folding in the cell? *Philos. Trans. R. Soc. London Biol.*, **339**, 287-294.
- 106 RADZICKA, A., ACHESON, S.A., WOLFENDEN, R. (1992) *Cis-trans*-isomerization at proline - desolvation and its consequences for protein folding. *Bioorg. Chem.*, **20**, 382-386.
- 107 EBERHARDT, E.S., LOH, S.N., HINCK, A.P., RAINES, R.T. (1992) Solvent effects on the energetics of prolyl peptide bond isomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5437-5439.
- 108 KRAMER, M.L., FISCHER, G. (1997) FKBP-like catalysis of peptidyl-prolyl bond isomerization by micelles and membranes. *Biopolymers*, **42**, 49-60.
- 109 SCHMID, F.X. (1986) Proline isomerization during refolding of ribonuclease A is accelerated by the presence of folding intermediates. *FEBS Lett.*, **198**, 217-220.

- 110 TEXTER, F.L., SPENCER, D.B., ROSENSTEIN, R., MATTHEWS, C.R. (1992) Intramolecular catalysis of a proline isomerization reaction in the folding of dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, **31**, 5687-5691
- 111 KIEFHABER, T., GRUNERT, H.P., HAHN, U., SCHMID, F.X. (1992) Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate. *Protein-Struct. Funct. Genet.*, **12**, 171-179.
- 112 FISCHER, G., BANG, H., MECH, C. (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed. Biochim. Acta*, **43**, 1101-1111.
- 113 RAHFELD, J.-U., SCHIERHORN, A., MANN, K., FISCHER, G. (1994) A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **343**, 65-69.
- 114 RUDD, K.E., SOFIA, H.J., KOONIN, E.V., PLUNKETT, G., LAZAR, S., ROUVIERE, P.E. (1995) A new family of peptidyl prolyl isomerases. *TIBS*, **20**, 12-14.
- 115 TROPSCHUG, M., WACHTER, E., MAYER, S., SCHÖNBRUNNER, E.R., SCHMID, F.X. (1990) Isolation and sequence of an FK506-binding protein from *N. crassa* which catalyses protein folding. *Nature*, **346**, 674-677.
- 116 SCHOLZ, C., RAHFELD, J., FISCHER, G., SCHMID, F.X. (1997) Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol. Biol.*, **273**, 752-762.
- 117 HARDING, M.W., GALAT, A., UEHLING, D.E., SCHREIBER, S.L. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, **341**, 758-760.
- 118 SIEKIERKA, J.J., HUNG, S.H., POE, M., LIN, C.S., 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.
- 119 HANDSCHUMACHER, R.E., HARDING, M.W., RICE, J., DRUGGE, R.J., SPEICHER, D.W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, **226**, 544-547.
- 120 FISCHER, G., WITTMANN-LIEBOLD, B., LANG, K., KIEFHABER, T., SCHMID, F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins *Nature*, **337**, 476-478.
- 121 TAKAHASHI, N., HAYANO, T., SUZUKI, M. (1989) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, **337**, 473-475.
- 122 HARRISON, R.K. AND STEIN, R.L. (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, **29**, 3813-3816.
- 123 STEIN, R.L. (1993) Mechanism of enzymic and non-enzymic prolyl *cis/trans* isomerization. *Adv. Protein Chem.*, **44**, 1-24.
- 124 RANGANATHAN, R., LU, K.P., HUNTER, T., NOEL, J.P. (1997) Structural and functional analysis of the mitotic rotamase pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell*, **89**, 875-886.
- 125 YAFFE, M.B., SCHUTKOWSKI, M., SHEN, M.H., ZHOU, X.Z., STUKENBERG, P.T., RAHFELD, J.U., XU, J., KUANG, J., KIRSCHNER, M.W., FISCHER, G., CANTLEY, L.C., LU, K.P. (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization - a potential mitotic regulatory mechanism. *Science*, **278**, 1957-1960.
- 126 TRANDINH, C.C., PAO, G.M., SAIER JR., M.H. (1992) Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *FASEB J.*, **6**, 3410-3420.
- 127 DOLINSKI, K., MUIR, S., CARDENAS, M., HEITMAN, J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 13093-13098.
- 128 HANI, J., STUMPF, G., DOMDEY, H. (1995) Ptf1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Lett.*, **365**, 198-202.
- 129 HANES, S.D., SHANK, P.R., BOSTIAN, K.A. (1989) Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **5**, 55-72.

- 130 RASSOW, J., MOHRS, K., KOIDL, S., BARTHELMESS, I.B., PFANNER, N., TROPSCHUG, M. (1995) Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones hsp70 and hsp60. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2654-2662.
- 131 MATOUSCHEK, A., ROSPERT, S., SCHMID, K., GLICK, B.S., SCHATZ, G. (1995) Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 6319-6323.
- 132 STEINMANN, B., BRUCKNER, P., SUPERTI-FURGA, A. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1299-1303.
- 133 KRUSE, M., BRUNKE, M., ESCHER, A., SZALAY, A.A., TROPSCHUG, M., ZIMMERMANN, R. (1995) Enzyme assembly after *de novo* synthesis in rabbit reticulocyte lysate involves molecular chaperones and immunophilins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2588-2594.
- 134 ROSPERT, S., LOOSER, R., DUBAQUIE, Y., MATOUSCHEK, A., GLICK, B.S., SCHATZ, G. (1996) Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J.*, **15**, 764-774.
- 135 FRANKE, E.K., YUAN, H.E., LUBAN, J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, **372**, 359-362.
- 136 THALI, M., BUKOVSKY, A., KONDO, E., ROSENWIRTH, B., WALSH, C.T., SODROSKI, J., GOTTLINGER, H.G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, **372**, 363-365.
- 137 FRANKE, E.K., LUBAN, J. (1996) Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology*, **222**, 279-282.
- 138 LUBAN, J. (1996) Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell*, **87**, 1157-9.
- 139 STEINER, J.P., HAMILTON, G.S., ROSS, D.T., VALENTINE, H.L., GUO, H., CONNOLLY, M.A., LIANG, S., RAMSEY, C., LI, J.H., HUANG, W., HOWORTH, P., SONI, R., FULLER, M., SAUER, H., NOWOTNIK, A.C., SUZDAK, P.D. (1997) Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 2019-2024.
- 140 LYONS, W.E., STEINER, J.P., SNYDER, S.H., DAWSON, T.M. (1995) Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *J. Neuroscience*, **15**, 2985-2994.
- 141 GOLD, B.G. (1997) FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.*, **15**, 285-306.
- 142 WANG, T., DONAHOE, P.K., ZERVOS, A.S. (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science*, **265**, 674-676.
- 143 WANG, T., LI, B.Y., DANIELSON, P.D., SHAH, P.C., ROCKWELL, S., LECHLEIDER, R.J., MARTIN, J., MANGANARO, T., DONAHOE, P.K. (1996) The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell*, **86**, 435-444.
- 144 OKADOME, T., OEDA, E., SAITOH, M., ICHIJO, H., MOSES, H.L., MIYAZONO, K., KAWABATA, M. (1996) Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21687-21690.
- 145 CHEN, Y.G., LIU, F., MASSAGUE, J. (1997) Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.*, **16**, 3866-3876.
- 146 CAMERON, A.M., STEINER, J.P., SABATINI, D.M., KAPLIN, A.I., WALENSKY, L.D., SNYDER, S.H. (1995) Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 1784-1788.
- 147 JAYARAMAN, T., BRILLANTES, A.M., TIMERMAN, A.P., FLEISCHER, S., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., MARKS, A.R. (1992) FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.*, **267**, 9474-9477.
- 148 MARKS, A.R. (1996) Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.*, **76**, 631-649.
- 149 CAMERON, A.M., NUCIFORA, F.C., FUNG, E.T., LIVINGSTON, D.J., ALDAPE, R.A., ROSS, C.A., SNYDER, S.H. (1997) FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27582-27588.

- 150 XIAO, R.P., VALDIVIA, H.H., BOGDANOV, K., VALDIVIA, C., LAKATTA, E.G., CHENG, H. (1997) The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat heart. *J. Physiol.*, **500**, 343-354.
- 151 BRILLANTES, A.B., ONDRIAS, K., SCOTT, A., KOBRINSKY, E., ONDRIASOVA, E., MOSCHELLA, M.C., JAYARAMAN, T., LANDERS, M., EHRLICH, B.E., MARKS, A.R. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, **77**, 513-523.
- 152 AHERN, G.P., JUNANKAR, P., DULHUNTY, A.F. (1997) Ryanodine receptors from rabbit skeletal muscle are reversibly activated by rapamycin. *Neuroscience Lett.*, **225**, 81-84.
- 153 SHOU, W., AGHDASI, B., ARMSTRONG, D.L., GUO, Q., BAO, S., CHARNG, M.-J., MATHEWS, L.M., SCHNEIDER, M.D., HAMILTON, S.L., MATZUK, M.M. (1998) Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature*, **391**, 489-492.
- 154 YEM, A.W., TOMASSELLI, A.G., HEINRIKSON, R.L., ZURCHER-NEELY, H., RUFF, V.A., JOHNSON, R.A., DEIBEL JR., M.R. (1992) The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2868-2871.
- 155 LEBEAU, M.C., MASSOL, N., HERRICK, J., FABER, L.E., RENOIR, J.M., RADANYI, C., BAULIEU, E.E. (1992) P59, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4281-4284.
- 156 TAI, P.K., ALBERS, M.W., CHANG, H., FABER, L.E., SCHREIBER, S.L. (1992) Association of a 59-Kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science*, **256**, 1315-1318.
- 157 RATAJCZAK, T., CARRELLO, A., MARK, P.J., WARNER, B.J., SIMPSON, R.J., MORITZ, R.L., HOUSE, A.K. (1993) The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J. Biol. Chem.*, **268**, 13187-13192.
- 158 KIEFFER, L.J., SENG, T.W., LI, W., OSTERMAN, D.G., HANDSCHUMACHER, R.E., BAYNEY, R.M. (1993) Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA and further characterization. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12303-12310.
- 159 LEVERSON, J.D., NESS, S.A. (1998) Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism. *Mol. Cell*, **1**, 203-211.
- 160 FERREIRA, P.A., NAKAYAMA, T.A., PAK, W.L., TRAVIS, G.H. (1996) Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature*, **383**, 637-40.
- 161 HELEKAR, S.A., PATRICK, J. (1997) Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 5432-7.
- 162 LU, K.P., HANES, S.D., HUNTER, T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*, **380**, 544-547.
- 163 BRUNKE, M., DIERKS, T., SCHLOTTERHOSE, P., ESCHER, A., SCHMIDT, B., SZALAY, A.A., LECHTE, M., SANDHOLZER, U., ZIMMERMANN, R. (1996) Luciferase assembly after transport into mammalian microsomes involves molecular chaperones and peptidyl-prolyl cis/trans-isomerases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23487-23494.
- 164 BÄCHINGER, H.P. (1987) The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the *in vitro* folding of type III collagen. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17144-17148.
- 165 LILL, R., CROOKE, E., GUTHRIE, B., WICKNER, W. (1988) The "trigger factor cycle" includes ribosomes, presecretory proteins, and the plasma membrane. *Cell*, **54**, 1013-8.
- 166 STOLLER, G. (1994) Isolierung und Charakterisierung von Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerasen aus *Escherichia coli*. *Diplomarbeit*, MLU Halle.
- 167 CALLEBAUT, I., MORNON, J.P. (1995) Trigger factor, one of the *Escherichia coli* chaperone proteins, is an original member of the FKBP family. *FEBS Lett.*, **374**, 211-215.
- 168 RHEINBERGER, H.J., GEIGENMÜLLER, U., WEDDE, M., NIERHAUS, K. (1988) Parameters for the preparation of *Escherichia coli* ribosomes and ribosomal subunits active in tRNA binding. *Meth. Enzymol.*, **164**, 658-670.

- 169 HOMANN, H.E., NIERHAUS, K.H. (1971) Ribosomal proteins. *Eur. J. Biochem.*, **20**, 249-257.
- 170 LAEMMLI, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 171 BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 172 GILL, S.C., VON HIPPEL, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- 173 STOLLER, G., RÜCKNAGEL, K.P., NIERHAUS, K.H., SCHMID, F.X., FISCHER, G., RAHFELD, J.U. (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.*, **14**, 4939-4948.
- 174 MORRISON, J.F. (1969) Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalyzed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta*, **185**, 269-286.
- 175 SCHUTKOWSKI, M., DREWELLO, M., WÖLLNER, S., JAKOB, M., REIMER, U., SCHERER, G., SCHIERHORN, A. & FISCHER, G. (1996). Extended binding sites of cyclophilin as revealed by the interaction with HIV-1 Gag polyprotein derived oligopeptides. *FEBS Lett.*, **394**, 289-294.
- 176 JANOWSKI, B., WÖLLNER, S., SCHUTKOWSKI, M., FISCHER, G. (1997) A protease-free assay for peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases using standard peptide substrates. *Anal. Biochem.*, **252**, 299-307.
- 177 MÜCKE, M., SCHMID, F.X. (1994) Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds. *Biochemistry*, **33**, 14608-14619.
- 178 RAHFELD, J.U., RÜCKNAGEL, K.P., STOLLER, G., HORNE, S.M., SCHIERHORN, A., YOUNG, K.D., FISCHER, G. (1996) Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase of *Escherichia coli* - similarity to mip-like proteins of pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22130-22138.
- 179 COMPTON, L.A., DAVIS, J.M., MACDONALD, J.R., BÄCHINGER, H.P. (1992) Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 927-934.
- 180 KIPPING, M. (1996) Identifizierung von Proteinen und Untersuchung von Proteinmodifikationen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. *Diplomarbeit*, MLU Halle
- 181 BLATTNER, F.R., PLUNKETT, G., BLOCH, C.A., PERNA, N.T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADOVIDES, J., GLASNER, J.D., RODE, C.K., MAYHEW, G.F., GREGOR, J., DAVIS, N.W., KIRKPATRICK, H.A., GOEDEN, M.A., ROSE, D.J., MAU, B., SHAO, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1432-1434.
- 182 HOTTENROTT, S., SCHUMANN, T., PLÜCKTHUN, A., FISCHER, G., RAHFELD, J.U. (1997) The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15697-15701.
- 183 SPEDDING, G. (1990) Isolation and analysis of ribosomes from prokaryotes, eukaryotes, and organelles. In: Spedding, G (ed) *Ribosomes and Protein Synthesis. A practical approach*. Oxford University Press., Oxford, pp.1-29.
- 184 SCHECHTER, I, BERGER, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. papain. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **27**, 157-162
- 185 HARRISON, R.K., STEIN, R.L. (1992) Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl *cis-trans* isomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3464-3471.
- 186 SCHOLZ, C., STOLLER, G., ZARNT, T., FISCHER, G., SCHMID, F.X. (1997) Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO J.*, **16**, 54-58.
- 187 ZARNT, T., TRADLER, T., STOLLER, G., SCHOLZ, C., SCHMID, F.X., FISCHER, G. (1997) Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding. *J. Mol. Biol.*, **271**, 827-837.

- 188 VAN DUYN, G.D., STANDAERT, R.F., KARPLUS, P.A., SCHREIBER, S.L., CLARDY, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.*, **229**, 105-124.
- 189 BOSSARD, M.J., BERGSMAN, D.J., BRANDT, M., LIVI, G.P., ENG, W.K., JOHNSON, R.K., LEVY, M.A. (1994) Catalytic and ligand binding properties of the FK506 binding protein FKBP12: effects of the single amino acid substitution of Tyr82 to Leu. *Biochem. J.*, **297**, 365-372.
- 190 DECENZO, M.T., PARK, S.T., JARRETT, B.P., ALDAPE, R.A., FUTER, O., MURCKO, M.A., LIVINGSTON, D.J. (1996) FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes. *Protein Eng.*, **9**, 173-180.
- 191 ALDAPE, R.A., FUTER, O., DECENZO, M.T., JARRETT, B.P., MURCKO, M.A., LIVINGSTON, D.J. (1992) Charged surface residues of FKBP12 participate in formation of the FKBP12-FK506-calcineurin complex. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16029-16032.
- 192 TIMERMAN, A.P., WIEDERRECHT, G., MARCY, A., FLEISCHER, S. (1995) Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2451-2459.
- 193 FUTER, O., DECENZO, M.T., ALDAPE, R.A., LIVINGSTON, D.J. (1995) FK506 binding protein mutational analysis. Defining the surface residue contributions to stability of the calcineurin co-complex. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18935-18940.
- 194 ZARNT, T. (1993) Identifizierung und Charakterisierung neuer Inhibitoren von Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen. *Diplomarbeit*, MLU Halle
- 195 BERNABEU, C., TOBIN, E.M., FOWLER, A., ZABIN, I., LAKE, J.A. (1983) Nascent polypeptide chains exit the ribosome in the same relative position in both eucaryotes and procaryotes. *J. Cell Biol.*, **96**, 1471-1474.
- 196 HAYANO, T., TAKAHASHI, N., KATO, S., MAKI, N., SUZUKI, M. (1991) Two distinct forms of peptidylprolyl-*cis-trans*-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*, **30**, 3041-3048.
- 197 LIU, J., CHEN, C.M., WALSH, C.T. (1991) Human and *Escherichia coli* cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry*, **30**, 2306-2310.
- 198 SCHIENE, C. (1995) Isolierung und Charakterisierung von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aus *Escherichia coli* und *Photobacterium phosphoreum*. *Diplomarbeit*, MLU Halle
- 199 RINAS, U. (1996) Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.*, **12**, 196-200.
- 200 HESTERKAMP, T., BUKAU, B. (1996) The *Escherichia coli* trigger factor. *FEBS Lett.*, **389**, 32-34.
- 201 HESTERKAMP, T., DEUERLING, E., BUKAU, B. (1997) The amino-terminal 118 amino acids of *Escherichia coli* trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21865-21871.
- 202 VERSCHOOR, A., SRIVASTAVA, S., GRASSUCCI, R., FRANK, J. (1996) Native 3D structure of eukaryotic 80S ribosome - morphological homology with the *E-coli* 70S ribosome. *J. Cell Biol.*, **133**, 495-505.
- 203 OGG, S.C., WALTER, P. (1995) SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell*, **81**, 1075-1084.
- 204 BECKMANN, R., BUBECK, D., GRASSUCCI, R., PENCZEK, P., VERSCHOOR, A., BLOBEL, G., FRANK, J. (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, **278**, 2123-2126.
- 205 MOTHES, W., PREHN, S., RAPOPORT, T.A. (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.*, **13**, 3973-3982.

- 206 JANIN, J., WODAK, S.J. (1983) Structural domains in proteins and their role in the dynamics of protein function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **42**, 21-78.
- 207 STOLLER, G., TRADLER, T., RÜCKNAGEL, K.P., RAHFELD, J.U., FISCHER, G. (1996) An 11.8 kDa proteolytic fragment of the *E.coli* trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity. *FEBS Lett.*, **384**, 117-122.
- 208 PORTER, R.R. (1973) Structural studies of immunoglobulins. *Science*, **180**, 713-716.
- 209 HESTERKAMP, T., BUKAU, B. (1996) Identification of the prolyl isomerase domain of *Escherichia coli* trigger factor. *FEBS Lett.*, **385**, 67-71.
- 210 GÖTHEL, S.F., SCHMID, R., WIPAT, A., CARTER, N.M., EMMERSON, P.T., HARWOOD, C.R., MARAHIEL, M.A. (1997) An internal FK506-binding domain is the catalytic core of the prolyl isomerase activity associated with the *Bacillus subtilis* trigger factor. *Eur. J. Biochem.*, **244**, 59-65.
- 211 SCHMIDT, B., KÖNIG, S., SVERGUN, D., VOLKOV, V., FISCHER, G., KOCH, M.H. (1995) Small-angle X-ray solution scattering study on the dimerization of the FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.*, **372**, 169-172.
- 212 PRATT, W.B., CZAR, M.J., STANCATO, L.F., OWENS, J.K. (1993) The hsp56 immunophilin component of steroid receptor heterocomplexes: could this be the elusive nuclear localization signal-binding protein? *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **46**, 269-279.
- 213 YEM, A.W., REARDON, I.M., LEONE, J.W., HEINRIKSON, R.L., DEIBEL JR., M.R. (1993) An active FK506-binding domain of 17,000 daltons is isolated following limited proteolysis of chicken thymus hsp56. *Biochemistry*, **32**, 12571-12576.
- 214 CALLEBAUT, I., RENOIR, J.M., LEBEAU, M.C., MASSOL, N., BURNY, A., BAULIEU, E.E., MORNON, J.P. (1992) An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 6270-6274.
- 215 HUNTER, T (1998) Prolyl isomerases and nuclear function. *Cell*, **92**, 141-143.
- 216 TZAMARIAS, D., STRUHL, K. (1995) Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.*, **9**, 821-831.
- 217 MALESZKA, R., HANES, S.D., HACKETT, R.L., DE COUET, H.G., MIKLOS, G.L. (1996) The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 447-451.
- 218 SUDOL, M., CHEN, H.I., BOUGERET, C., EINBOND, A., BORK, P. (1995) Characterization of a novel protein-binding module—the WW domain. *FEBS Lett.*, **369**, 67-71.
- 219 ROOF, W.D., HORNE, S.M., YOUNG, K.D., YOUNG, R. (1994) SlyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerases. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2902-2910.
- 220 WÜLFING, C., LOMBARDEO, J., PLÜCKTHUN, A. (1994) An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2895-2901.
- 221 MEWES, H.W., ALBERMANN, K., BAHR, M., FRISHMAN, D., GLEISSNER, A., HANI, J., HEUMANN, K., KLEINE, K., MAIERL, A., OLIVER, S.G., PFEIFFER, F., ZOLLNER, A. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature*, **387**, 737.
- 222 FRASER, C.M., CASJENS, S., HUANG, W.M., SUTTON, G.G., CLAYTON, R., LATHIGRA, R., WHITE, O., KETCHUM, K.A., DODSON, R., HICKEY, E.K., GWINN, M., DOUGHERTY, B., TOMB, J.F., FLEISCHMANN, R.D., RICHARDSON, D., PETERSON, J., KERLAVAGE, A.R., QUACKENBUSH, J., SALZBERG, S., HANSON, M., VANVUGT, R., PALMER, N., ADAMS, M.D., GOCAYNE, J., WEIDMAN, J., *et al.* (1997) Genomic sequence of a lyme-disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580-586.

- 223 FRASER, C.M., GOCAYNE, J.D., WHITE, O., ADAMS, M.D., CLAYTON, R.A., FLEISCHMANN, R.D., BULT, C.J., KERLAVAGE, A.R., SUTTON, G., KELLEY, J.M., FRITCHMAN, J.L., WEIDMAN, J.F., SMALL, K.V., SANDUSKY, M., FUHRMANN, J., NGUYEN, D., UTTERBACK, T.R., SAUDEK, D.M., PHILLIPS, C.A., MERRICK, J.M., TOMB, J.F., DOUGHERTY, B.A., BOTT, K.F., HU, P.C., LUCIER, T.S., *et al.* (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **270**, 397-403.
- 224 MAYR, L.M., ODEFEY, C., SCHUTKOWSKI, M., SCHMID, F.X. (1996) Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique. *Biochemistry*, **35**, 5550-5561.
- 225 SCHÖNBRUNNER, E.R., MAYER, S., TROPSCHUG, M., FISCHER, G., TAKAHASHI, N., SCHMID, F.X. (1991) Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3630-3635.
- 226 KERN, D., KERN, G., SCHERER, G., FISCHER, G., DRAKENBERG, T. (1995) Kinetic analysis of cyclophilin-catalyzed prolyl *cis/trans* isomerization by dynamic NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, 13594-135602.
- 227 SCHOLZ, C., SCHINDLER, T., DOLINSKI, K., HEITMAN, J., SCHMID, F.X. (1997) Cyclophilin active site mutants have native prolyl isomerase activity with a protein substrate. *FEBS Lett.*, **414**, 69-73.
- 228 DOLINSKI, K., SCHOLZ, C., MUIR, R.S., ROSPERT, S., SCHMID, F.X., CARDENAS, M.E., HEITMAN, J. (1997) Functions of FKBP12 and mitochondrial cyclophilin active site residues *in vitro* and *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2267-2280.
- 229 ROUVIERE, P.E., GROSS, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.*, **10**, 3170-3182.
- 230 KLEEREBEZEM, M., HEUTINK, M., TOMMASSEN, J. (1995) Characterization of an *Escherichia coli* rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase. *Mol. Microbiol.*, **18**, 313-320.
- 231 HORNE, S.M., YOUNG, K.D. (1995) *Escherichia coli* and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch. Microbiol.*, **163**, 357-365.
- 232 KAY, J.E. (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases. *Biochem. J.*, **314**, 361-385.
- 233 TRADLER, T., STOLLER, G., RÜCKNAGEL, K.P., SCHIERHORN, A., RAHFELD, J.U., FISCHER, G. (1997) Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12. *FEBS Lett.*, **407**, 184-190.
- 234 FISCHER, S., MICHNICK, S., KARPLUS, M. (1993) A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP). *Biochemistry*, **32**, 13830-13837.
- 235 WIEDERRECHT, G., HUNG, S., CHAN, H.K., MARCY, A., MARTIN, M., CALAYCAY, J., BOULTON, D., SIGAL, N., KINCAID, R.L., SIEKIERKA, J.J. (1992) Characterization of high molecular weight FK-506 binding activities reveals a novel FK-506-binding protein as well as a protein complex. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21753-21760.
- 236 SEWELL, T.J., LAM, E., MARTIN, M.M., LESZYK, J., WEIDNER, J., CALAYCAY, J., GRIFFIN, P., WILLIAMS, H., HUNG, S., CRYAN, J., *et al.* (1994) Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21094-21102.

Prof. Dr. Gunter Fischer danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und der Möglichkeit zur praktischen Bearbeitung in seiner Arbeitsgruppe. Seine stets offene Bereitschaft zur Diskussion und die zahlreichen wertvollen Ratschläge trugen wesentlich zum Fortschritt der Arbeit bei. Viel Erfahrung habe ich gewonnen durch seine Anleitung in Bezug auf das Herangehen an wissenschaftliche Fragestellungen, die Planung und Umsetzung effektiver experimenteller Ansätze sowie die Dokumentation von Ergebnissen im Rahmen von Veröffentlichungen. Darüber hinaus förderte er die wissenschaftliche Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen, speziell ermöglichte er mir einen Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hardesty (University of Texas at Austin, USA), wodurch ich mein Methodenspektrum um die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation erweitern konnte.

An dieser Stelle möchte ich allen Kooperationspartnern danken, die maßgeblich durch verständnisvolle und vorbehaltlose Zusammenarbeit die Voraussetzung zur Erweiterung der thematischen Fragestellungen der Arbeit schufen:

Prof. Dr. Knud H. Nierhaus (Arbeitsgruppe "Ribosomen", MPI für Molekulare Genetik, Berlin) danke ich für die Ermöglichung mehrerer erfolgreicher Arbeitsphasen in seinem Labor sowie der stets gewährten Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten und in Fragen rund ums Ribosom. Darüber hinaus möchte ich ihm und seinen Mitarbeitern für die freundliche Betreuung und die Bereitstellung von benötigten Materialien danken,

Prof. Dr. Franz X. Schmid (Biochemisches Laboratorium, Universität Bayreuth) danke ich für die Bereitschaft zur Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe, auf deren Grundlage die Faltungseigenschaften des Triggerfaktors erforscht werden konnten. Ebenso möchte ich mich bei seinen Mitarbeitern, insbesondere bei Christian Scholz, für die einwandfreie Zusammenarbeit und die Überlassung von Daten zur Faltungskatalyse bedanken.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Institutes für Biochemie für die vielseitige Unterstützung in wissenschaftlicher, organisatorischer und persönlicher Hinsicht im Verlauf der Arbeit danken, insbesondere

Dr. Mike Schutkowski für die vielen anregenden Diskussionen, seiner konstruktiven Kritik und seines schier unerschöpflichen Ideenreichtums bei experimentellen Fragestellungen sowie der gründlichen Überarbeitung des Manuskripts der Arbeit,

Dr. Jens Rahfeld für viele wertvolle Tips und Ratschläge bei der experimentellen Arbeit,

Dr. Peter Rücknagel für die Durchführung der Proteinsequenzierung und die Unterstützung in Fragen von Sequenzvergleichen und Datenbankanalysen,

Dr. Angelika Schierhorn für die Aufnahme der Massenspektren,

Thomas Tradler, der durch die Bereitstellung aller Expressionsstämme der verwendeten Triggerfaktor-derivate die wesentliche Voraussetzung für viele Untersuchungen lieferte,

Dr. Bettina Schmidt für die sorgfältige Überarbeitung des Manuskripts der Arbeit sowie

Susanne Füssel und Cordelia Schiene für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor 503.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich während der vergangenen Jahre liebevoll und geduldig unterstützten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß diese Arbeit selbständig und nur unter der Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, daß alle anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Gerlind Stoller, Halle, 25.03.1998