



Doctoral Thesis

Protein folding during cotranslational translocation

Author(s):

Kowarik, Michael Thomas

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004503015> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 14933

Protein Folding During Cotranslational Translocation

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

presented by

Michael Thomas Kowarik

Dipl. Natw. ETH, Swiss Federal Institute of Technology

born on December 10, 1973
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, examiner
Prof. Dr. Felix Kessler, co-examiner
Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

2003

Summary

All proteins in the cell are synthesized as linear polymers of amino acids. To acquire a biological active conformation, newly synthesized proteins have to assemble from the linear into the native, three-dimensional structure. In most if not all organisms, structure acquisition probably starts cotranslationally, i.e. during the biosynthesis of the polypeptide by the ribosome. The continuous elongation of the polypeptide leads to a directed, vectorial folding from the N to the C terminus, which is influenced by the close proximity to the ribosome and associated chaperones. Translation and translocation of secretory and membrane proteins occur at ribosomes bound to translocon channels in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. The process of protein transport across the ER membrane during translation is termed cotranslational translocation. Folding of proteins translocated into the ER also begins while the nascent polypeptide chain is entering the ER-lumen through the protein conducting channel of the translocon.

To test whether folding of a small protein domain can occur already within the translocon pore, we translocated Semliki Forest Virus Capsidprotease (Cp) into rough microsomes *in vitro*. The Cp protein, an autocatalytic protease of 38 x 34 x 20 Å in size, was synthesized with a cleavable (ss) as well as with a non-cleavable (sa) N terminal signal sequence for targeting and C terminal extensions from 32 to 84 amino acids. Using truncated mRNAs, we generated translocation intermediates of different lengths. Our results showed that Cp folded and cleaved itself off the nascent chain when the C terminal extension was longer than 67 residues (= Mean Folding Distance, MFD). This corresponds to the number of amino acids needed to bridge the distance from the ribosomal P-site to the ER-lumen. In contrast, 30% of signal anchored Cp cleaved inside the translocon. The early cleavage was probably caused by processes involved in membrane integration. We also checked smaller domains (from 30 to 35 Å in diameter) for their folding inside the translocon pore by placing their sequences into the C terminal extensions of ssCp, and assaying the MFD. We found that none of the three domains screened could increase the MFD of Cp, but a sequence generating an α helix did.

The results indicated that Cp and small protein domains in general have to emerge fully from the translocon to acquire their native conformation. An exception may be the cotranslational folding of the ectodomain of membrane proteins. We suggest that the translocon is structurally dynamic, and that it can adapt its shape and composition according to the needs of a translocated polypeptide.

Zusammenfassung

Proteine werden als lineare Polymere aus Aminosäuren hergestellt. Um biologische Funktionen ausführen zu können, müssen neu synthetisierte Proteine von der linearen in die ihre native, räumliche Struktur falten. Wahrscheinlich beginnt die Faltung in fast allen Organismen kotranslational, d.h. schon während der Synthese des Proteins durch das Ribosom. Die kontinuierliche Verlängerung des Polypeptids führt zu einem vektoriellen Faltungsweg, der von N zum C Terminus fortschreitet und durch die unmittelbare Nachbarschaft vom Ribosom und assoziierten Chaperonen beeinflusst wird. Translation und Translokation von sekretorischen und Membranproteinen ins Endoplasmatischen Reticulum (ER) findet an Ribosomen statt, die direkt an das Translokon in der ER-Membran gebunden sind. Der Prozess des Membrantransports, der während der Translation stattfindet, wird kotranslationelle Translokation genannt. Auch die Faltung von solchen translozierten Proteinen beginnt, wenn die wachsenden Aminosäurenkette durch die Pore des Translokons ins ER eintritt.

In dieser Arbeit haben wir untersucht, ob ein kleines Protein schon in der Pore des Translocons falten kann. Dazu wurde die Semliki Forest Virus Capsid Protease (Cp) in Mikrosomen transloziert. Cp, eine autokatalytische Protease mit einer Grösse von 38 x 34 x 20 Å, wurde mit einer spaltbaren (ss) und einer nicht spaltbaren (sa) Signalsequenz am N Terminus und Verlängerungen von 32 bis 84 Aminosäurenresten am C Terminus *in vitro* synthetisiert. Wir benutzten trunkierte mRNA Moleküle um Translokationsintermediate von unterschiedlicher Länge herzustellen. Unsere Resultate zeigen, dass die Faltung und autokatalytische Proteolyse von Cp bei einer C terminalen Verlängerung von 67 Aminosäuren (Mittlere Faltungsdistanz = MFD) stattfindet. Das entspricht auch der Anzahl Aminosäuren in einer Peptidkette, die benötigt wird, um die Strecke zwischen dem Ort der ribosomalen Peptidyltransferaseaktivität und dem ER-Lumen zu überbrücken. Hingegen konnten 30 % von Cp mit der nicht spaltbaren Signalankersequenz schon im Translocon falten, in einem Prozess der wahrscheinlich mit der Integrierung der Transmembransequenz in die Lipiddoppelschicht zusammenhängt. Des Weiteren haben wir überprüft, ob kleinere Proteindomänen (mit maximalen Durchmessern von 30–35 Å) als Cp im Translokon falten können. Dazu wurden vier verschiedene Proteindomänensequenzen hinter die ssCp Sequenz kloniert und die MFD in den entsprechenden Intermediaten analysiert. Keine der überprüften Domänen konnte die MFD von ssCp vergrössern, ganz im Gegensatz zu einer Sequenz, die eine α helikale Konformation annehmen kann.

Aus diesen Resultaten schliessen wir, dass Cp und auch kleinste Proteindomänen aus der Pore des Translocons austreten müssen um ihre native Konformation annehmen zu können. Membranproteine hingegen scheinen eine Ausnahme dazustellen. Sie können teilweise kotranslational im Proteinkanal des Translokons falten. Deswegen ist es wahrscheinlich, dass das Translokon dynamisch ist und seine Zusammensetzung ganz den Bedürfnissen des wachsenden Proteins angepasst wird.