

Supramolekulare Proteinkomplexe: Struktur, Assemblierung und Stabilität von Typ-1-Pili

Journal Article**Author(s):**

Giese, Christoph; Glockshuber, Rudi

Publication date:

2013-09-01

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000071241>

Rights / license:

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

Originally published in:

Biospektrum 19(5), <https://doi.org/10.1007/s12268-013-0343-8>

Supramolekulare Proteinkomplexe

Struktur, Assemblierung und Stabilität von Typ-1-Pili

CHRISTOPH GIESE, RUDI GLOCKSHUBER
INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND BIOPHYSIK, ETH ZÜRICH, SCHWEIZ

Type 1 pili are extracellular, supramolecular protein complexes required for the attachment of pathogenic *E. coli* strains to host cells. Hundreds to thousands of protein subunits are assembled within minutes *in vivo* and form filaments with unique kinetic stability against dissociation. Here, we review recent work on the structure, assembly mechanism and potential technical applications derived from this exciting biological system.

DOI: 10.1007/s12268-013-0343-8
© Springer-Verlag 2013

■ Mehr als 80 Prozent aller Harnwegsinfektionen des Menschen werden durch uropathogene *Escherichia coli*-Stämme hervorgerufen [1], die an ihrer Oberfläche adhäsive Pili tragen. Die Typ-1-Pili von *E. coli*-Stämmen, die die unteren Harnwege infizieren, sind filamentöse, ausschließlich aus Proteinuntereinheiten bestehende Komplexe (**Abb. 1A**), die an Mannose-Einheiten des Membran-Glykoproteins Uroplakin 1a von Harnwegsepithelzellen binden und die Anheftung der Bakterien als ersten Schritt bei der Etablierung einer Harnwegsinfektion vermitteln. Zudem ermöglichen Typ-1-Pili die Internalisierung und das Überleben der Bakterien in Wirtszellen. Typ-1-Pili sind somit Virulenzfaktoren und ein Target für die Entwicklung neuer antibakterieller Substanzen, die die bakterielle Anheftung an Wirtszellen inhibieren [2].

Allgemeiner Aufbau und Biogenese der Typ-1-Pili

Typ-1-Pili bestehen aus vier verschiedenen strukturellen Proteinuntereinheiten: FimH, FimG, FimF und FimA. FimA ist die Hauptstrukturuntereinheit. Bis zu 3.000 Kopien von FimA assemblieren zu einer starren, rechtsgängigen helikalen Quartärstruktur mit einem Durchmesser von sieben Nanometern und einer Länge von ein bis zwei Mikrometern und bilden den Pilusstamm. FimH, FimG und FimF assoziieren zu einem kurzen, flexiblen Filament, das als Tip-Fibrillum bezeichnet

wird und eine Kopie von FimH und eine oder mehrere Kopien von FimG und FimF enthält. FimH wird als erste Untereinheit in den Pilus eingebaut, sitzt an dessen Spitze und besitzt zwei Domänen. Die N-terminale Lektindomäne FimH_L ist für die Bindung an den Rezeptor Uroplakin 1a verantwortlich und bestimmt somit die Funktion des gesamten Pilus. Die C-terminale Domäne von FimH (FimH_C) und die Adapteruntereinheiten FimF und FimG verknüpfen FimH_L mit dem Pilusstamm (**Abb. 1B**).

Zwei weitere Proteine, das lösliche, periplasmatische Chaperon FimC und die Assemblierungsplattform FimD in der äußeren Bakterienmembran, sind für die Pilus-Assemblierung *in vivo* essenziell. FimC bindet alle neu ins bakterielle Periplasma sekretierten Pilusuntereinheiten, katalysiert deren Faltung und transportiert die gefalteten Untereinheiten zu FimD, wo die Untereinheiten an das wachsende Pilusende abgegeben werden [3, 4]. FimD ist ein Multidomänenprotein der äußeren Membran, bindet spezifisch die FimC-Untereinheitenkomplexe, katalysiert deren Assemblierung und vermittelt die Translokation der Untereinheiten über die äußere Membran (**Abb. 1B**, [3, 5]).

Strukturelle Grundlagen der Wechselwirkung zwischen Pilusuntereinheiten und ihrer Assemblierung

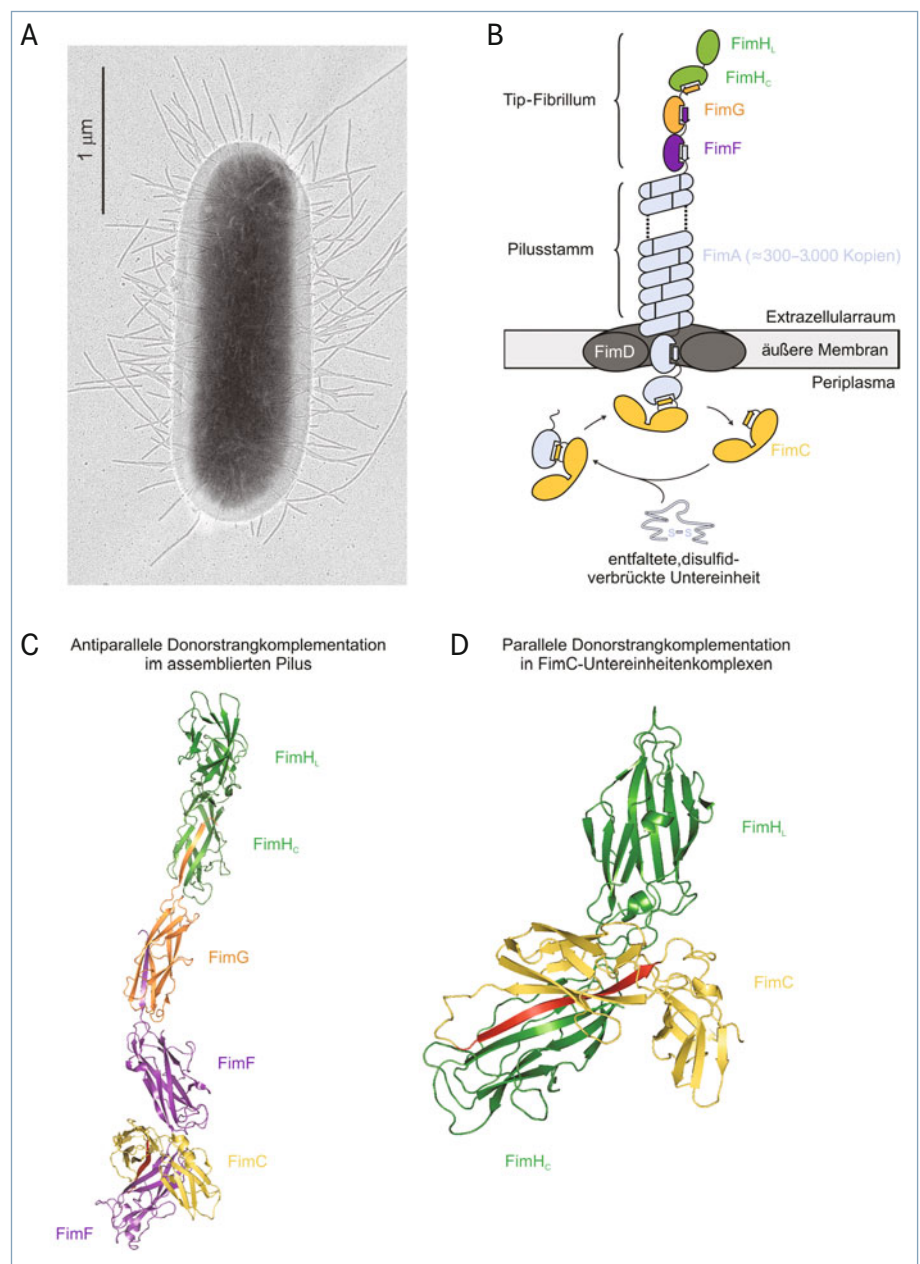
Die Strukturaufklärung von verschiedenen Piluskomponenten und Assemblierungs-

intermediaten hat zusammen mit einer Vielzahl biochemischer Experimente im Laufe der letzten Jahre maßgeblich zum Verständnis des Assemblierungsmechanismus adhäsiver Pili beigetragen. FimA, FimF, FimG und FimH_C sind homologe β -Faltblattproteine mit einer Immunglobulin-ähnlichen dreidimensionalen Struktur, denen jedoch der C-terminale β -Faltblattstrang regulärer Immunglobulin-domänen fehlt. Gleichzeitig besitzen die Untereinheiten FimA, FimF und FimG jedoch am Aminoterminus eine Extension aus ca. 15 bis 20 Aminosäuren, die im Kontext der assemblierten Quartärstruktur des Pilus als β -Faltblattstrang die unvollständige Tertiärstruktur der jeweils vorausgehenden Untereinheit vervollständigt. Die N-terminalen Extensionen von FimA, FimF und FimG, die auch als „Donorstrang“ bezeichnet werden, sind antiparallel zum C-terminalen β -Strang der vorausgehenden Untereinheit angeordnet (**Abb. 1C**). Im Adhäsion FimH ist am N-Terminus der C-terminalen Domäne FimH_C statt eines Donorstrangs die N-terminale Lektindomäne FimH_L fusioniert. Dies stellt einerseits sicher, dass FimH ausschließlich als endständige Untereinheit des Tip-Fibrillums in den Pilus eingebaut wird, und ist andererseits die Grundlage dafür, dass die Pilus-Assemblierung stets mit FimH als erster Untereinheit beginnt.

Der in der Quartärstruktur adhäsiver Pili beobachtete Mechanismus der Donorstrang-Komplementation ist auch in den periplasmatischen Komplexen zwischen dem Chaperon FimC und den einzelnen Untereinheiten realisiert. Dabei wird die unvollständige Struktur der Untereinheit jeweils durch Insertion eines ausgestreckten Polypeptid-segments von FimC vervollständigt, wobei sich jedoch die Orientierung des FimC-Donorstrangsegments gegenüber der Donorstranginsertion zwischen benachbarten Untereinheiten umkehrt. Somit wird FimC transient Teil der Tertiärstruktur der gebundenen Pilusuntereinheiten, bevor es diese wieder an den wachsenden Pilus abgibt (**Abb. 1D**).

Neben dem Transport von Pilusuntereinheiten zur Assemblierungsplattform FimD hat FimC zwei weitere, einzigartige Funktionen: So beschleunigt FimC spezifisch die Faltung aller Pilusuntereinheiten. Im Fall der Hauptstrukturuntereinheit FimA, die sich in Abwesenheit von FimC überraschenderweise nur extrem langsam faltet (ca. 1,6 Stunden Halbwertszeit), ist der Beschleunigungsfaktor mindestens 10.000-fach. Dieser hocheffizienten Katalyse durch FimC liegt wahrscheinlich eine Verringerung der topologischen Komplexität der Faltung von Pilusuntereinheiten nach Bindung an das Chaperon zugrunde. Darüber hinaus ist FimC für die Qualitätskontrolle der Ausbildung der Disulfidbrücken in den Pilusuntereinheiten zuständig, die alle eine invariante, strukturelle Disulfidbrücke zwischen den ersten beiden β -Faltblattstängen ihrer Pilindomänen besitzen. Es zeigte sich, dass FimC entfaltete Untereinheiten nur dann erkennt, wenn in der ungefalteten Untereinheit die Disulfidbrücke bereits ausgebildet ist. Die Bildung der Disulfidbrücke erfolgt im bakteriellen Periplasma durch Disulfidaustausch mit der Dithioloxidase DsbA, die ihre eigene, katalytische Disulfidbrücke auf Cysteinpaare sekretorischer Proteine überträgt. Da nur FimC-gebundene Pilusuntereinheiten assemblierungskompetent sind, stellt FimC auf diese Weise sicher, dass der assemblierte Pilus ausschließlich aus stabilen Untereinheiten mit intakten Disulfidbrücken besteht [4, 6].

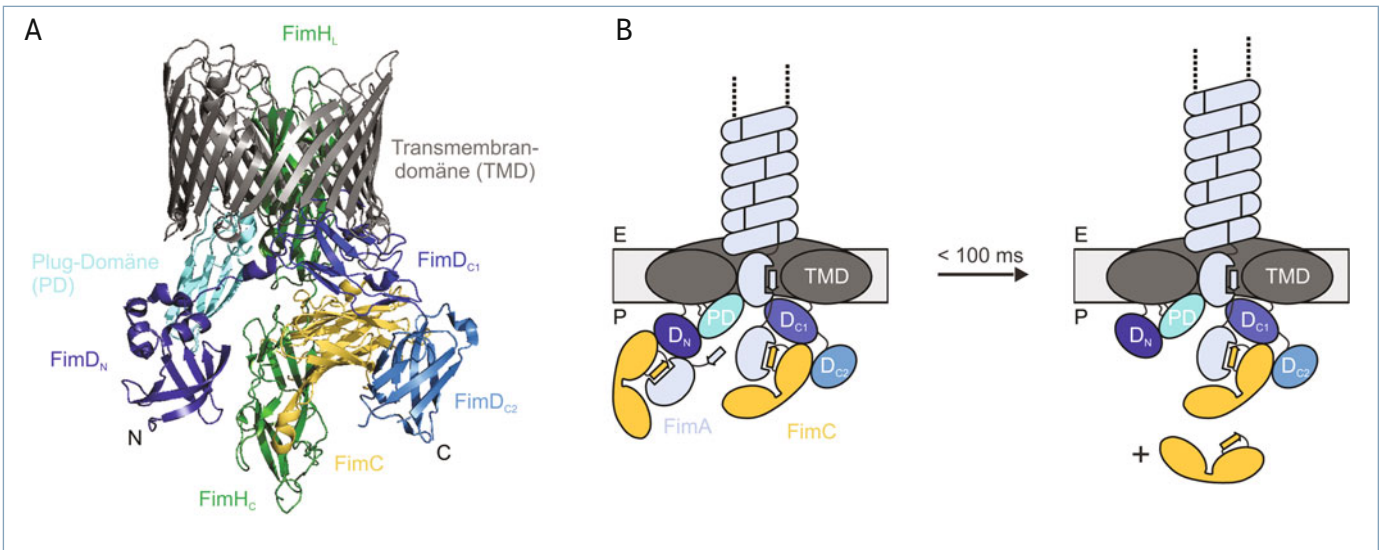
Die interessanteste Komponente bei der Assemblierung von Typ-1-Pili ist ohne Zweifel die Assemblierungsplattform FimD in der äußeren *E. coli*-Membran. FimD besteht aus einer N-terminalen, periplasmatischen Domäne (FimD_N), die spezifisch die FimC-Untereinheitenkomplexe erkennt, einer Transmembrandomäne aus einem 24-strängigen β -Faltblatt-Fass, die gleichzeitig die Translokationspore für die Pilusuntereinheiten bildet, einer *Plug*-Domäne, die im inaktiven Zustand von FimD die Translokationspore verschließt, und zwei C-terminalen, periplasmatischen Domänen (FimD_{C1} und FimD_{C2}) [7]. In Abwesenheit FimC-gebundener Untereinheiten liegt FimD in einem inaktiven Konformationszustand vor, in dem die *Plug*-Domäne die Translokationspore verschließt. Die Überführung von FimD in den aktiven Zustand erfolgt nach Bindung des FimC-FimH-Komplexes an FimD_N. Daraufhin klappt die *Plug*-Domäne aus der Translokationspore ins Periplasma heraus, und die Pore wird neu durch die FimH-Lektindomäne FimH_L besetzt.



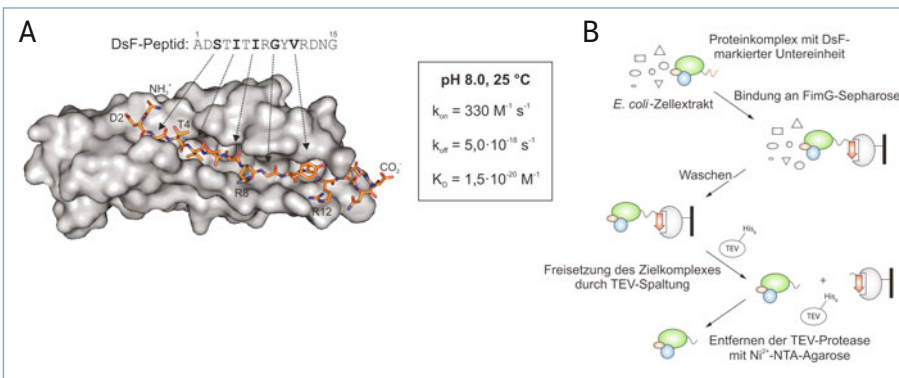
▲ **Abb. 1:** Typ-1-Pili von *Escherichia coli*. **A**, elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle des *E. coli*-Stamms W3110 mit zahlreichen Typ-1-Pili auf der Zelloberfläche. **B**, allgemeiner Aufbau und Biogenese von Typ-1-Pili. **C**, Bänderdarstellung der dreidimensionalen Struktur des Tip-Fibrillums [11]. Im assemblierten Pilus wechselwirken die Untereinheiten nicht-kovalent über antiparallele Donorstrangkplementation. Die letzte FimF-Untereinheit ist an das Chaperon FimC gebunden. **D**, Bänderdarstellung der dreidimensionalen Struktur des FimC-FimH-Komplexes [12]. Das Chaperon FimC wechselwirkt mit Pilusuntereinheiten über parallele Donorstrangkplementation, wie hier am Beispiel des FimC-FimH-Komplexes gezeigt. Der Donorstrang von FimC ist in C und D rot markiert.

Das Vorhandensein von FimH_L ist *in vitro* für diesen Aktivierungsschritt essenziell, was zusätzlich erklärt, warum FimH stets als erste Untereinheit in den Pilus eingebaut wird [5]. Im aktivierten, ternären FimD-FimH-FimC-Komplex bleibt das Chaperon FimC, stabilisiert durch Wechselwirkungen mit den C-terminalen FimD-Domänen, an FimH gebunden,

bis der nächste FimC-Untereinheitenkomplex an die nun frei gewordene FimD_N-Domäne bindet (**Abb. 2A**). Da FimC mit einer Molekülmasse von 23 Kilodalton zu groß ist, um in die Translokationspore einzutreten, wird verhindert, dass FimH vorzeitig in den extrazellulären Raum diffundiert. Die weiteren Schritte der Pilusassemblierung sind durch einen



▲ **Abb. 2:** Struktur und katalytische Funktion der Assemblierungsplattform FimD. **A,** Bänderdarstellung der 2,8-Ångström-Kristallstruktur des FimD-FimC-FimH-Komplexes mit der Assemblierungsplattform FimD in ihrer aktivierten Konformation [7]. **B,** schematische Darstellung der von FimD katalysierten Donorstrangaustauschreaktion am Beispiel des Einbaus einer FimA-Untereinheit in den Pilusstamm. FimA: grau-blau, FimC: gelb, Farbgebung der FimD-Domänen wie in A; E: Extrazellularraum, P: Periplasma.



▲ **Abb. 3:** Struktur und praktische Anwendung des FimG-DsF-Komplexes. **A,** Kristallstruktur und kinetische und thermodynamische Parameter des FimG-DsF-Komplexes [8, 10]. Die FimG-Domäne ist in grauer Oberflächendarstellung, das DsF-Peptid in Stabdarstellung gezeigt. **B,** Arbeitsschritte bei der Anwendung des FimG-DsF-Systems in der Affinitätschromatografie.

Mechanismus charakterisiert, der als Donorstrang-Austauschreaktion bezeichnet wird. Dabei wird das am wachsenden Pilusende gebundene FimC durch den freien Donorstrang der nächsten Pilusuntereinheit verdrängt, nachdem diese als FimC-Komplex an FimD_N gebunden hat. Nach Ablösung der neu eingebauten Untereinheit von FimD_N rutscht dann der wachsende Pilus um die Länge einer Untereinheit (ca. 50 Ångström) nach außen, und das an der neuen Untereinheit gebundene FimC bildet nun das Ende des wachsenden Pilus. Dieser Reaktionszyklus wiederholt sich nun bis zu mehrere Tausend Mal und läuft in Gegenwart von FimD extrem schnell ab. Während sich z. B. aus FimC-FimA-Komplexen FimA-Polymere spontan nur extrem langsam bilden (ca. zehn Stunden Halb-

wertszeit), erfolgt die Verknüpfung zweier FimA-Untereinheiten in Gegenwart von FimD innerhalb von weniger als 100 Millisekunden (**Abb. 2B**). In der Tat wurde durch die *in vitro*-Rekonstitution der Pilusbiogenese FimD als erster Katalysator der Assemblierung von supramolekularen Proteinkomplexen identifiziert [5]. Die von FimD katalysierte Polymerisation von Typ-1-Pilusuntereinheiten erfolgt unabhängig von extern zugeführter Energie und bezieht ihre Triebkraft ausschließlich aus der Energie, die bei der Bildung von Komplexen zwischen Pilusuntereinheiten frei wird.

Stabilität von Typ-1-Pili und technische Anwendungen

Eine bemerkenswerte Eigenschaft von Typ-1-Pili ist ihre extreme Resistenz gegenüber

Dissoziation und Denaturierung durch hohe Konzentrationen von Denaturierungsmitteln, extreme pH-Werte oder hohe Temperaturen. Dagegen zeigen monomere Pilusuntereinheiten mit unvollständiger Immunglobulinfaltung nur eine sehr geringe Faltungsstabilität von typischerweise -10 kJ/mol [4, 8, 9]. Entscheidende Hinweise auf die Ursachen der enormen Stabilität von Pili lieferten Untereinheitenkonstrukte, bei denen durch künstliche Fusion von Donorstrangsegmenten an den C-Terminus eine intramolekulare Selbstkomplementation erzwungen wurde. Auf diese Weise wurden monomere, Donorstranggesättigte Untereinheiten erhalten, die dieselbe Konformation und antiparallele Donorstrangorientierung haben wie im intakten Pilus. Ihre kinetische und thermodynamische Charakterisierung zeigte, dass die Stabilität der Pili auf einer extrem hohen Aktivierungsenergiebarriere der Entfaltungsreaktion beruht, wodurch die Assoziation benachbarter Untereinheiten praktisch irreversibel wird [8]. In der Tat erwiesen sich bimolekulare Komplexe zwischen Pilusuntereinheiten und synthetischen Donorstrangpeptiden als so stabil, dass sie niemals dissoziieren. So ist der Komplex zwischen der Untereinheit FimG und dem Donorstrangpeptid der benachbarten Untereinheit FimF (DsF) der thermodynamisch und kinetisch stabilste nicht-kovalente Proteinligandenkomplex, der bisher bekannt ist: Seine Dissoziationskonstante beträgt $1,5 \times 10^{-20}$ mol/l (das entspricht einer Bindungsenergie von -113 kJ/mol), und seine

extrapolierte Halbwertszeit der spontanen Dissoziation/Entfaltung beträgt ca. vier Milliarden Jahre (**Abb. 3A**, [8, 10]). Die enorme Stabilität des FimG-DsF-Komplexes führte bereits zu ersten technischen Anwendungen in der Affinitätschromatografie von Proteinkomplexen [10]. So wurde der 15 Aminosäuren lange FimF-Donorstrang gezielt an einzelne Untereinheiten von heterooligomeren Proteinkomplexen fusioniert, und die intakten Proteinkomplexe (darunter sogar intakte Ribosomen) konnten mit auf Sepharose kovalent immobilisiertem FimG in sehr hoher Reinheit direkt aus unbehandelten Zellextrakten isoliert werden. Zum Ablösen der gebundenen Komplexe von FimG unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde an der Fusionsstelle zur DsF-Sequenz eine spezifische Protease-Schnittstelle verwendet (**Abb. 3B**). Diese ersten Beispiele zeigten, dass das FimG-DsF-System gegenüber etablierten Affinitätspeptiden deutlich effizienter ist [10]. Neben der Verwendung des FimG-DsF-Systems zur Identifizierung der Komponenten von heterooligomeren Proteinkomplexen unbekannter Zusammensetzung bietet sich vor allem auch sein Einsatz für die funktionelle Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen in definierter Orientierung an.

Danksagung

Die in diesem Artikel erwähnten Beiträge der Autoren wurden von der ETH Zürich und dem Schweizerischen Nationalfonds im Rahmen des NCCR-Strukturbiologieprogramms und der Projekte 138677 und 31003A-122095 unterstützt. ■

Literatur

- [1] Stamm W, Stapleton A (2004) Approach to the Patient with Urinary Tract Infection. In: Gorbach S, Bartlett J, Blacklow N (Hrsg) Infectious diseases. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S 861–872
- [2] Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ (2012) Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 36:1046–1082
- [3] Nishiyama M, Vetsch M, Puorger C et al. (2003) Identification and characterization of the chaperone-subunit complex-binding domain from the type 1 pilus assembly platform FimD. *J Mol Biol* 330:513–525
- [4] Vetsch M, Puorger C, Spirig T et al. (2004) Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* 431:329–333
- [5] Nishiyama M, Ishikawa T, Rechsteiner H et al. (2008) Reconstitution of pilus assembly reveals a bacterial outer membrane catalyst. *Science* 320:376–379
- [6] Crespo MD, Puorger C, Scharer MA et al. (2012) Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC. *Nat Chem Biol* 8:707–713
- [7] Phan G, Remaut H, Wang T et al. (2011) Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate. *Nature* 474:49–53
- [8] Puorger C, Eidam O, Capitani G et al. (2008) Infinite kinetic stability against dissociation of supramolecular protein complexes through donor strand complementation. *Structure* 16:631–642
- [9] Vetsch M, Sebbel P, Glockshuber R (2002) Chaperone-independent folding of type 1 pilus domains. *J Mol Biol* 322:827–840
- [10] Giese C, Zosel F, Puorger C et al. (2012) The most stable protein-ligand complex: applications for one-step affinity purification and identification of protein assemblies. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:4474–4478
- [11] Le Trong I, Aprikian P, Kidd BA et al. (2010) Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like beta sheet twisting. *Cell* 141:645–655
- [12] Choudhury D, Thompson A, Stojanoff V et al. (1999) X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 285:1061–1066

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Rudi Glockshuber
 Institut für Molekularbiologie und Biophysik
 ETH Zürich
 Schafmattstraße 20
 CH-8093 Zürich
 Tel.: 0041-(0)44-633-6819
 Fax: 0041-(0)44-633-1036
 rudolf.glockshuber@mol.biol.ethz.ch

AUTOREN



Christoph Giese

2000–2005 Biochemiestudium an der Universität Halle-Wittenberg. 2006–2011 Promotion an der ETH Zürich, Schweiz, dort seit 2011 Postdoktorand.



Rudi Glockshuber

1979–1985 Chemiestudium an der LMU München und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1985–1989 Promotion am Genzentrum der LMU München. 1989–1994 Postdoktorand an der Universität Regensburg. 1994–1997 Tenure-Track-Assistenzprofessor an der ETH Zürich, Schweiz. 1997–2000 Außerordentlicher Professor an der ETH Zürich. Seit 2000 Ordentlicher Professor für Molekularbiologie an der ETH Zürich.