

## Mechanismen der Proteinfaltung

# Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential

AXEL MOGK | MATTHIAS P. MAYER | ELKE DEUERLING

Proteine müssen bestimmte räumliche Strukturen einnehmen, das heißt sich falten, um ihre biologischen Funktionen erfüllen zu können. Die Proteinfaltung ist ein sehr stör-anfälliger Prozess und wird in lebenden Zellen von besonderen Proteinen, den molekularen Chaperonen, überwacht. Die Entdeckung dieser Moleküle und das Verständnis ihrer Funktionen und Mechanismen eröffnen neue Perspektiven für die biotechnologische Produktion von Proteinen, wie zum Beispiel medizinischen Wirkstoffen.

Die funktionelle Vielfalt der Proteine beruht auf der Verschiedenheit der räumlichen Anordnung ihrer Aminosäuren. Eine der Grundfragen der Molekularbiologie ist die nach dem Mechanismus der Proteinfaltung, einem Prozess, bei dem die lineare Aminosäuresequenz eines Proteins nach der Proteinbiosynthese in die spezifische dreidimensionale Struktur überführt wird. Traditionell wurde die Faltung von Proteinen im Reagenzglas (*in vitro*), ausge-

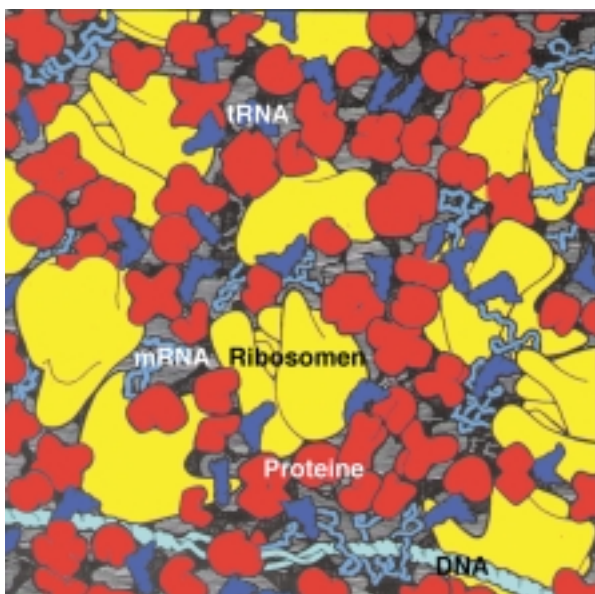
hend von aufgereinigten und chemisch denaturierten Modellproteinen, untersucht. Anfinsen konnte 1961 zeigen, dass die gesamte notwendige Information für die aktive 3D-Struktur eines Proteins bereits in seiner linearen Aminosäureabfolge (Primärsequenz) enthalten ist. Treibende Kraft der Proteinfaltung ist die Zusammenlagerung von hydrophoben Aminosäuren, die versuchen, dem polaren Lösungsmittel Wasser zu entkommen. Die Anzahl an theoretisch möglichen, jedoch falschen Konformationen eines Proteins ist astronomisch hoch: Selbst ein kleines Protein, bestehend aus 100 Aminosäuren, könnte  $10^{30}$  verschiedene mögliche dreidimensionale Strukturen einnehmen. Das zufällige Erreichen der richtigen Konformation beim Durchtesten der möglichen Konformationen würde  $10^{11}$  Jahre beanspruchen. Die Faltung von Proteinen ist jedoch meist ein schneller Prozess im Bereich von wenigen Sekunden oder gar Millisekunden. Wie also findet ein Protein die Nadel im Heuhaufen – die native Struktur aller theoretisch möglichen Konformationen?

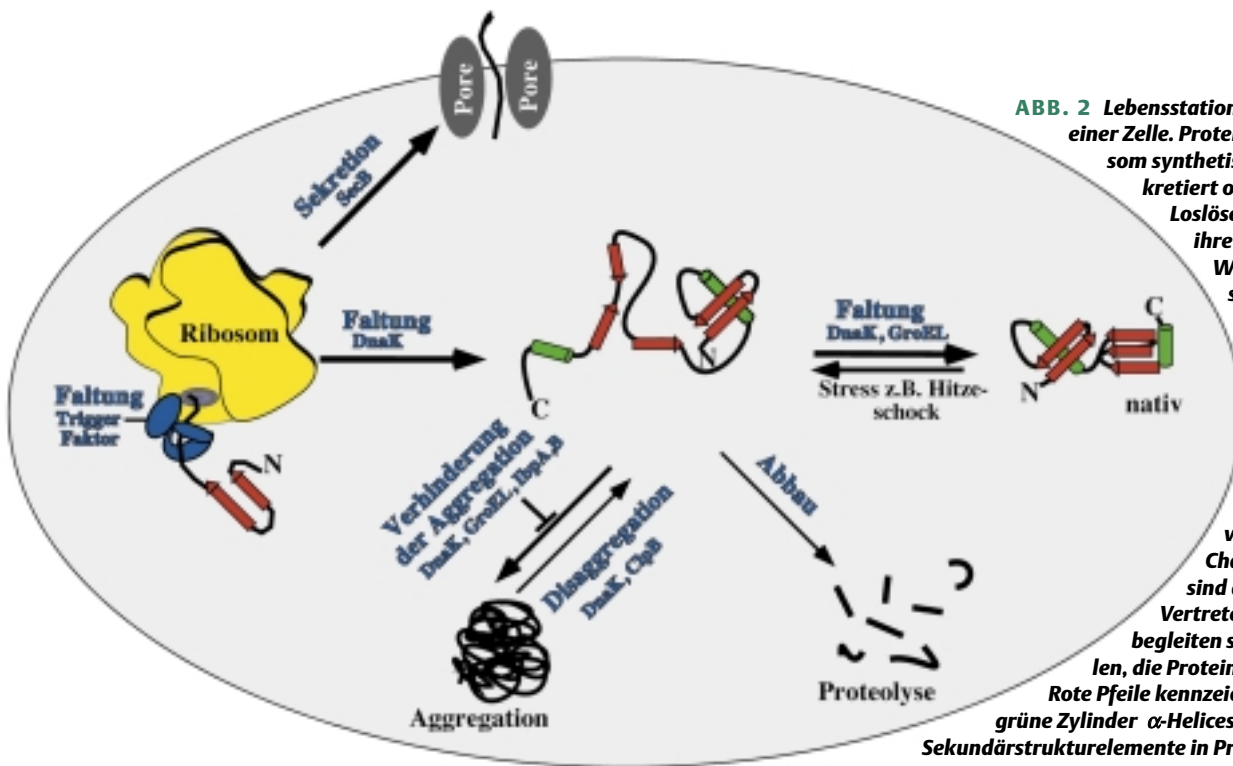
### Energielandschaften und Faltungstrichter

Zunächst nahm man an, es gäbe einen spezifischen Faltungsweg, den ein Protein durchlaufen muss, um in kürzester Zeit die native Struktur zu finden. Allerdings kann ein Protein von vielen verschiedenen entfalteten Zuständen aus die native Form erreichen. In den aktuellen Modellen wird deshalb der Mechanismus der Proteinfaltung mit „Faltungstrichtern“ und „Energielandschaften“ verglichen (siehe Kasten auf Seite 184). Sämtliche nicht native Konformationen besitzen eine höhere Energie als die native Struktur, die den thermodynamisch günstigsten Zustand darstellt, und falten sich daher den Energieberg herab. Ein Faltungstrichter repräsentiert also sehr viele unterschiedliche Faltungswege, die je nach Gestalt des Trichters schnell oder langsam den energieärmsten Punkt (native Struktur) erreichen.

Die Faltung von Proteinen ist stör-anfällig, vor allem bei größeren Proteinen, die aus mehreren Domänen (funktionelle Faltungseinheiten aus etwa 100 – 200 Aminosäuren) bestehen. Es kommt zum Beispiel zu inkorrekten Wechselwirkungen verschiedener Abschnitte der Proteinkette, die zur Ausbildung eines aggregationsgefährdeten Faltungsintermediates (Protein mit einer nativ-ähnlichen 3D-Struktur)

**ABB. 1** „Molecular Crowding“ in der Zelle. Schematische Darstellung, die zeigt, wie dichtgepackt Ribosomen, Proteine, RNA- und DNA-Moleküle im Cytosol von Zellen vorliegen. In diesem Milieu müssen Proteine falten und versuchen, ihre native Struktur beizubehalten. (Abbildung aus [6]).





**ABB. 2 Lebensstationen von Proteinen in einer Zelle.** Proteine werden am Ribosom synthetisiert und entweder sekretiert oder falten nach dem Löslösen vom Ribosom in ihre native Struktur. Während dieses Prozesses sind Proteine aggregationsanfällig oder können bei Missfaltung abgebaut werden. Auch bereits native Proteine können zum Beispiel nach Hitzestress ihre Struktur verlieren. Molekulare Chaperone (dargestellt sind die prokaryotischen Vertreter aus *Escherichia coli*) begleiten sämtliche Lebenszyklen, die Proteine durchschreiten. Rote Pfeile kennzeichnen  $\beta$ -Stränge und grüne Zylinder  $\alpha$ -Helices; beides mögliche Sekundärstrukturelemente in Proteinen.

führen. Solche Faltungsintermediate besitzen häufig exponierte hydrophobe Aminosäuren, die als „klebrige“ Stellen die Aggregation (Verklumpen) des Intermediates verursachen können. Je höher die Konzentration dieser anfälligen Intermediate ist, desto wahrscheinlicher ist auch deren Aggregation.

Einige Proteine benötigen während ihrer Faltung zusätzlich die korrekte Isomerisierung der Peptidbindung zwischen einer beliebigen Aminosäure und der Aminosäure Prolin. Wichtig ist zudem speziell für sekretierte cysteinhaltige Proteine die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinaminosäuren. Faltungsintermediate mit falscher Prolinisomerisierung oder falscher Disulfidverbrückung können ebenfalls aggregationsgefährdet sein. Beide Faltungsreaktionen werden von speziellen Enzymen, den PPIasen beziehungsweise den Proteindisulfidisomerasen, katalysiert. Genauere Informationen können einem Übersichtsartikel von Prof. Dr. G. Fischer entnommen werden [14].

### Faltung in der Zelle

Anfängliche Rückschlüsse, dass die gesamte Faltungsinformation in der Aminosäuresequenz eines Proteins enthalten ist, gelten auch heute noch, allerdings ist die Proteinfaltung in einer Zelle wesentlich komplexer als die Rückfaltung denaturierter Modellproteine im Reagenzglas. Proteine werden *in vivo* an den Ribosomen vektorial vom N- zum C-Terminus synthetisiert (Abbildung 2). Im Gegensatz zu *In-vitro*-Experimenten, die von vollständigen Polypeptidketten ausgehen und in stark verdünnten Lösungen erfolgen ( $\leq 1$  g/l Protein), steht Proteinen im Cytosol der Zelle somit

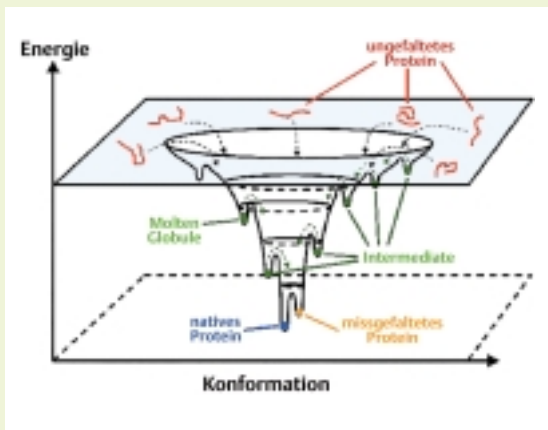
zunächst nicht die gesamte notwendige Faltungsinformation zur Verfügung. Zudem herrscht im Cytosol eine enorme Enge, da Ribosomen, Nukleinsäuren und Proteine dicht gedrängt sind (340 g/l; Abbildung 1). In diesem Milieu (*molecular crowding*) exponieren elongierende Polypeptidketten und Faltungsintermediate hydrophobe Aminosäuren, was zur Aggregation der Proteinketten führen kann (Abbildung 2). Ein besonderer Aspekt kommt bei zu sezernierenden Proteinen hinzu: Ihre Faltung muss im Cytosol verhindert werden, um ihren Export im entfalteten Zustand durch die Translokationskanäle der Cytoplasmamembran zu ermöglichen.

Aber auch nativ gefaltete Proteine sind ständig in Gefahr, ihre Struktur zu verlieren und sich zu entfalten. Diese Eigenschaft vieler Proteine war in der Evolution wahrscheinlich der Preis für Flexibilität in der Konformation, die für die Funktion der Proteine essentiell ist. Es müssen daher teilweise nur sehr kleine Energiebarrieren überschritten werden, um eine Strukturveränderung zu bewirken. Um so mehr können Änderungen in der zellulären Umgebung den Faltungszustand thermodynamisch instabiler Proteine beeinflussen: Stressbedingungen, wie ein rascher Temperaturanstieg, können beispielsweise zu Missfaltung und Aggregation beziehungsweise zum proteolytischen Abbau vieler Proteine führen (Abbildung 2).

### Molekulare Chaperone überwachen die Faltung

Die besonderen Bedingungen innerhalb einer Zelle (*molecular crowding* s.o.) sowie äußere Einflüsse von Stressfak-

## DER FALTUNGSTRICHTER



Der Faltungstrichter stellt die freie Energie (vertikale Achse) aller möglichen Proteinstrukturen als Funktion der konformationellen Freiheitsgrade dar (horizontale Achsen). Verschiedene ungefaltete Stadien eines Proteins auf der Oberseite fallen in den Faltungstunnel hinein. Er besitzt viele verschiedene lokale Minima, in die das Protein hineinfallen kann. Einige dieser lokalen Minima repräsentieren Zwischenstufen (Intermediate) auf dem Weg zum energieärmsten nativen Zustand des Proteins. Ein Teil dieser Intermediate repräsentiert bereits relative stabile kompakte Strukturen „Molten Globules“, während andere lokale Minima als Falle wirken und Proteine in einem missgefalteten Zustand halten. (Abbildung aus [15]).

toren führten daher in allen Zellen zur Entwicklung eines Schutzsystems. Dieses System besteht aus molekularen Chaperonen. Chaperone findet man in sehr hohen Konzentrationen in allen Zellen, vom Bakterium bis zum Mensch. Sie sind evolutionär hochkonserviert und können Faltungsprozesse zeitlich und räumlich kontrollieren sowie inkorrekte Faltung verhindern. Chaperone sind besonders wichtig für das Überleben von Zellen unter Stressbedingungen, denn sie bilden ein Reparatursystem für missgefaltete und sogar für aggregierte Proteine. Verschiedene Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitzeschock, induzieren die Synthese von Chaperonen, weshalb sie auch als „Hitzeschockproteine“ (Hsps) bezeichnet werden. Entsprechend der evolutionären Konservierung werden sie in Familien eingeteilt, deren Namen vom Molekulargewicht der jeweiligen Hauptvertreter abgeleitet wird (zum Beispiel Hsp70 – einem Protein von 70 Kilodalton (kDa)). Tabelle 1 stellt die Struktur und Funktion der wichtigsten Chaperonfamilien, mit einigen prokaryotischen (prok.) und eukaryotischen (euk.) Vertretern und deren Co-Chaperonen, regulatorischen Proteinen, dar.

Molekulare Chaperone begleiten Proteine auf ihrem gesamten Lebensweg von der Neusynthese bis zu ihrem Ab-

bau. Im Folgenden werden Funktionen von Chaperonen für den bislang am besten untersuchten Modellorganismus *Escherichia coli* dargestellt. Abbildung 1 zeigt exemplarisch die möglichen Stadien eines Proteins im Cytosol und die daran beteiligten molekularen Chaperone.

### De-novo-Faltung

Neu synthetisierte Proteine werden in Bakterien bereits am Ribosom durch das Chaperon Trigger-Faktor in Empfang genommen. Die Bedeutung dieser Interaktion wird dadurch unterstrichen, dass der Trigger-Faktor im Lauf der Evolution bei allen Eubakterien konserviert vorkommt. In Eukaryoten wurde der Trigger-Faktor bislang nicht gefunden, man nimmt allerdings an, dass hier andere Proteine, zum Beispiel der Ribosomen-assoziierte Proteinkomplex NAC, eine ähnliche Funktion ausüben. Exponierte hydrophobe Bereiche der neu synthetisierten Polypeptidkette werden vermutlich durch die Bindung von Trigger-Faktor vor falschen Interaktionen geschützt und Faltungsprozesse, die bei einigen Proteinen bereits am Ribosom starten, können unterstützt werden [1].









Man vermutet, dass nach dem Ablösen des Trigger-Faktors die neu synthetisierte cytosolische Polypeptidkette ihre Faltung in die native Struktur startet beziehungsweise fortsetzt. Die Geschwindigkeit des Faltungsprozesses und die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein unterscheiden sich je nach Protein sehr stark. Proteine mit sehr kleinem Molekulargewicht falten in der Regel vermutlich eigenständig in ihre native Struktur. Größere Proteine, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind, haben dagegen häufig Faltungsprobleme und sind oft in nicht nativen, aggregationsgefährdeten Konformationen gefangen. Solche Proteine werden als Substrate von den Chaperonen der Hsp70 (DnaK)- oder Hsp60 (GroEL)-Proteinfamilie erkannt und durch Zyklen von Bindung und Loslösung von dem jeweiligen Chaperonsystem auf ihrem Weg zur nativen Struktur begleitet. GroEL kann erst nach dem Ablösen der Proteinkette vom Ribosom mit dem entfaltenen Protein assoziieren. DnaK hingegen kann vermutlich sowohl mit der wachsenden Proteinkette am Ribosom als auch mit dem freigesetzten Protein wechselwirken [1, 3, 8].

Zu sezernierende Proteine werden in *Escherichia coli* häufig durch das Chaperon SecB gebunden und zur Exportmaschinerie in der Cytoplasmamembran transportiert. Man nimmt an, dass das Proteinsubstrat durch Interaktion mit SecB in einer exportkompetenten – nur teilweise gefalteten Struktur gehalten wird – ein nativ gefaltetes Protein würde eine zu kompakte Struktur einnehmen und daher nicht durch den Exportkanal passen. Membranproteine werden während ihrer Synthese spezifisch an SRP (Signal Recognition Particle) gebunden und zur Membran gebracht [13].

### Chaperone helfen bei Proteinreparaturen

Stressbedingungen, wie zum Beispiel eine drastische Temperaturerhöhung, können zu einer dramatischen Protein-

TAB. 1 | CHAPERONFAMILIEN: STRUKTUR UND FUNKTION

| Chaperon-familie | Struktur  | ATP | Vertreter prok. euk.                | Co-Chaperon   | Funktion   |
|------------------|---|-----|-------------------------------------|---|--|
| Hsp100           | 6-7-mer<br>            | +   | ClpB<br>ClpA<br>Hsp104              |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disaggregation zusammen mit Hsp70</li> <li>- Proteolyse zusammen mit der Protease ClpP</li> <li>- Thermoresistenz</li> <li>- Disaggregation zusammen mit Hsp70</li> </ul>   |
| Hsp90            | Dimer<br>              | +   | HtpG<br>Hsp90                       | Hop, p23, CDC37   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Resistenz gegen extremen Hitzeschock</li> <li>- Stressresistenz, Kontrolle der Faltung und Aktivität von Steroidrezeptoren, Proteinkinasen u. a.</li> </ul>   |
| Hsp70            | Monomer<br>            | +   | DnaK<br>Hsp70<br>Hsc70              | DnaJ, GrpE<br>Hsp40<br>Bag1<br>Hip<br>Chip<br>Hop<br>HspBP1 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>De-novo</i>-Proteinfaltung</li> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen</li> <li>- Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit ClpB</li> <li>- Regulation der Hitzeschockantwort</li> <li>- <i>De-novo</i>-Proteinfaltung</li> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen</li> <li>- Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit Hsp104</li> <li>- Regulation der Hitzeschockantwort</li> <li>- Regulation der Aktivität gefalteter Regulatorproteine (z. B. Transkriptionsfaktoren und Kinasen)</li> </ul> |
| Hsp60            | 14-mer<br>16-mer<br> | +   | GroEL<br>CCT/TRiC                   | GroES<br>Prefoldin  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>De-novo</i>-Proteinfaltung</li> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen</li> <li>- <i>De-novo</i>-Faltung von Actin und Tubulin</li> </ul>  |
| sHsp             | 8-24-mer<br>         |     | IbpA<br>IbpB<br>Hsp25<br>Crystallin |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen</li> <li>- Bindung an Inclusion Bodies</li> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen</li> <li>- Bestandteil der Linse des Wirbeltierauges</li> </ul>   |
| Trigger-Faktor   | Monomer<br>          |     | Trigger-Faktor                      | -   | - Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit Funktion in der <i>De-novo</i> -Proteinfaltung   |
| NAC              | Heterodimer<br>      |     | NAC                                 |   | - Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit potentieller Funktion in der <i>De-novo</i> -Proteinfaltung  |
| SecB             | Tetramer<br>         |     | SecB                                |   | - Sekretion von Proteinen  |

entfaltung und damit zu einer Proteinaggregation in der Zelle führen. Verschiedene Chaperonsysteme, wie DnaK (Hsp70), GroEL (Hsp60) und kleine Hitzeschockproteine IbpAB (sHsps), dienen als Schutzpuffer und verhindern durch die Bindung entfalteter Proteine deren Aggregation. Kleine Hitzeschockproteine findet man interessanterweise auch in großen Proteinaggregaten, den Einschlusskörpern (Inclusion Bodies), die bei der Überproduktion heterologer Proteine in *E. coli* entstehen können (siehe später). Man nimmt an, dass kleine Hitzeschockproteine entfaltete Proteine unter Stressbedingungen binden und diese nach Rückkehr zu optimalen Wachstumsbedingungen an Hsp60- oder Hsp70-Chaperone zur Rückfaltung übergeben.

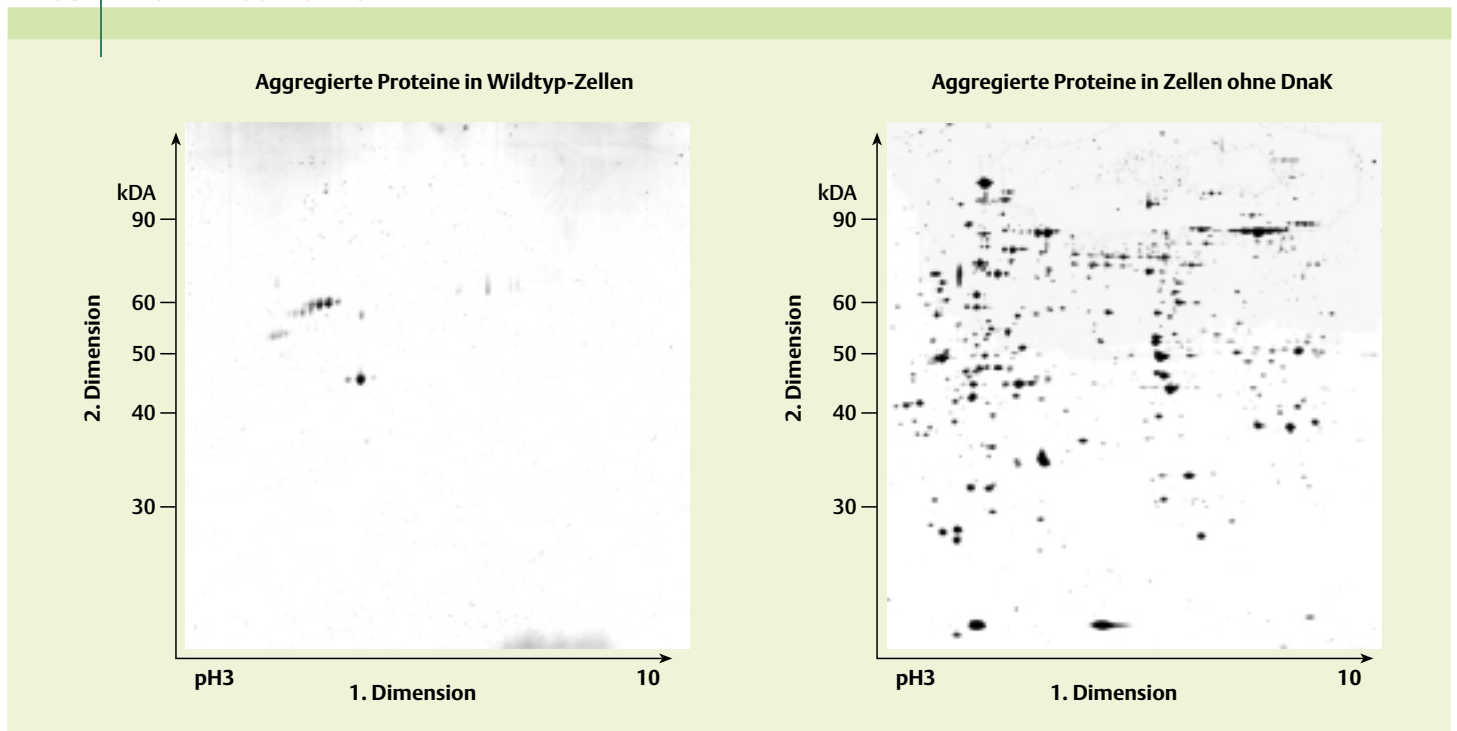
Zellen verfügen somit sowohl für die Faltung neu synthetisierter Proteine als auch für deren Aggregationsverhinderung unter Stressbedingungen über ein Arsenal an Chaperonen. Man nimmt an, dass die einzelnen Chaperonklassen ein funktionelles Netzwerk bilden und sowohl um die Bindung an entfaltete Proteine konkurrieren als auch bei deren Rückfaltung kooperieren können.

Die Bedeutung molekularer Chaperone als Schutzsystem wird anhand von Zellen deutlich, denen aufgrund einer Mutation ein molekulares Chaperon (zum Beispiel das Hsp70) fehlt. Solche Zellen zeigen häufig ein temperatursensitives Wachstum und akkumulieren bei erhöhter Temperatur große Mengen an aggregierten Proteinen. Abbildung 3 zeigt, dass in DnaK-Mutanten von *Escherichia coli* etwa 200 Proteine bei erhöhter Temperatur (42 °C) aggregieren und diese Zellen daher nicht mehr lebensfähig sind [9].

### Rückfaltung aggregierter Proteine

Extreme Stresssituationen können die Pufferkapazität der Chaperonsysteme überlasten und zur Aggregation von stresssensitiven Proteinen führen. Aggregation wurde lange Zeit als totes Gleis im Lebenszyklus von Proteinen angesehen vergleichbar mit einem hartgekochten Ei, das nicht mehr weich zu machen ist. Neuere Untersuchungen an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, dem Bakterium *Escherichia coli* und der Pflanze *Arabidopsis thaliana* de-

ABB. 3 | PROTEINAGGREGATION IN ZELLEN



Gezeigt sind zweidimensionale Gelelektrophoresen von aggregierten Proteinen, die aus hitzegeschockten (42 °C) *Escherichia coli*-Zellen isoliert wurden, denen DnaK (Hsp70) fehlt (rechts). Als Vergleich ist die gleiche Präparation aus Zellen mit normalem Chaperongehalt gezeigt (links), wo man praktisch keine verklumpten Proteine findet. Jeder sichtbare runde Fleck (insgesamt circa 200) entspricht einem cytosolischen Protein. Die Proteine wurden in der ersten Dimension entsprechend ihres isoelektrischen Punkts und in der zweiten Dimension entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt.

monstrierten jedoch, dass bereits aggregierte Proteine erfolgreich disaggregiert und sogar zur aktiven Struktur zurückgefaltet werden können [5, 10]. Dies funktioniert sowohl in lebenden Zellen als auch im Reagenzglas zum Beispiel bei durch Hitze denaturierter Malatdehydrogenase (MDH). Große Aggregate von MDH wurden *in vitro* wieder aufgelöst und die MDH in ihre aktive Form zurückgeführt [7]. Rein theoretisch könnte damit auch ein hartgekochtes Ei, bei dem ebenfalls Proteine denaturiert wurden, wieder verflüssigt werden. Diese Funktion wird von einem Bi-Chaperonsystem bestehend aus ClpB (Hsp104) und DnaK (Hsp70) erfüllt. Nur die Kombination beider Chaperone führt zur Aggregatauflösung und Proteinrückfaltung. Die Aktivität des Bi-Chaperonsystems ist für das Überleben der oben genannten Organismen bei sehr hoher Umgebungstemperatur essentiell (Entwicklung von Thermotoleranz).

### Molekulare Mechanismen der Chaperone

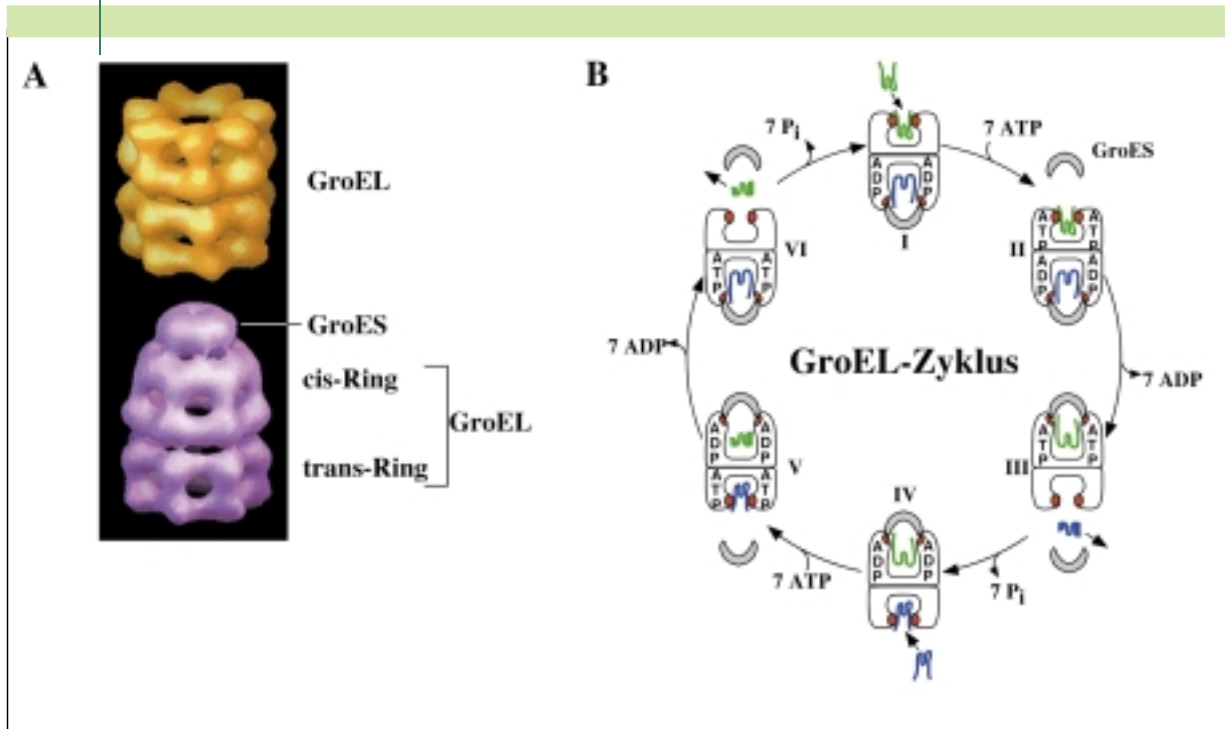
Nach heutiger Erkenntnis ist den meisten Chaperonen die Bindung an ein oder mehrere kurze Peptidsegmente, die reich an hydrophoben Aminosäuren sind, gemein. Solche Peptidsegmente kommen in nativ gefalteten Proteinen meist im Innern, dem hydrophoben Kern, vor. Bei noch

nicht gefalteten oder missgefalteten Proteinen werden diese Segmente exponiert und können von Chaperonen gebunden werden. Dadurch wird verhindert, dass sich mehrere solcher Segmente von verschiedenen Polypeptidketten aneinanderlagern und zur Aggregation führen. Diese Aktivität der Chaperone wird als „Halter“-Funktion bezeichnet und kann ATP-unabhängig erfolgen (zum Beispiel sHsp). Die Rückfaltung in die aktive 3D-Struktur erfordert die „Falter“-Funktion, welche ATP-abhängig ist. Zwei Chaperonmaschinen, die als „Falter“ agieren, sind schon recht gut untersucht: Hsp60 und Hsp70. Über Struktur und Funktionsweise der anderen in der Tabelle genannten Chaperonfamilien ist noch relativ wenig bekannt. Im Folgenden soll der molekulare Mechanismus für je einen Hauptvertreter der Hsp60- und Hsp70-Chaperone, GroEL und DnaK von *Escherichia coli*, beschrieben werden.

### Das Hsp60-Chaperon

Das tonnenförmige GroEL-Chaperon, welches in allen Prokaryoten, Mitochondrien und Chloroplasten vorkommt, besteht aus zwei übereinander liegenden Ringen aus je sieben identischen Untereinheiten [2, 8]. Abbildung 4A zeigt Rekonstruktionen der GroEL-Struktur aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen [11] und Abbildung 4B den aus biochemischen und strukturellen Untersuchungen abgeleiteten Chaperonzyklus von GroEL [12]. Jeder der beiden GroEL-Ringe bildet einen Hohlraum, in dem missgefaltete Polypeptide an den Innenseiten gebunden werden. Beide Ringe können Substrate phasenverschoben falten (Abbildung 4B, grünes Substrat, I-VI; blaues Substrat, IV-III),

ABB. 4 GroEL-STRUKTUR UND CHAPERONZYKLUS



Die Abbildungen stammen von Dr. H. Saibil [11], die uns freundlicherweise die Erlaubnis der Reproduktion erteilt hat. Auf Dr. Saibils Internetseite kann GroEL-GroES als kurzer Videofilm angesehen werden (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg16z/chaperone.html>).

wobei der Faltungszyklus eines Rings etwa 15 Sekunden dauert. Dieser Mechanismus wird daher auch mit der Arbeitsweise eines Zweitaktmotors verglichen.

Der Faltungszyklus für das grüne Substrat beginnt mit der Anlagerung an den offenen Ring (cis-Ring, I). Nach der Bindung von ATP (II) wird das Substrat durch Anlagerung des GroES-Co-Chaperons, welches ebenfalls aus sieben Untereinheiten besteht und als Deckel agiert, in der Faltungskammer eingeschlossen (III). Analog einer unendlichen Verdünnung wird das Substrat dadurch an der Interaktion mit anderen Proteinen gehindert. Durch die ATP- und GroES-Bindung und die kooperative ATP-Hydrolyse in allen Untereinheiten des cis-Rings finden Konformationsänderungen in GroEL statt, wodurch sich das Volumen der Faltungskammer vergrößert und die Substratbindestellen von GroEL (rote Stellen in Abbildung 4B) vom Substrat wegdrücken (II-III-IV). Es konnte gezeigt werden, dass es durch diese Bewegungen zu einer globalen, also auf die gesamte Polypeptidkette wirkenden, Entfaltung des gebundenen Polypeptids kommt [16]. Man nimmt an, dass dadurch ungünstige hydrophobe Interaktionen gelöst werden und das Protein eine neue Gelegenheit bekommt, sich richtig zu falten. Es wird also aus einem lokalen Minimum des Faltungstrichters herausgehoben (siehe Kasten auf Seite 184). ATP-, GroES- und Substratbindung an die Untereinheiten des unbeteiligten Rings (trans-Ring) führt zur Dissoziation des GroES-Co-Chaperons des cis-Rings und zur Freisetzung des Substrats (IV-V-VI). Manche Proteine falten noch während sie von GroEL eingeschlossen sind (Abbildung 4A, grünes Substrat), andere Proteine falten erst, nachdem sie

**(A) Rekonstruktion der GroEL-Struktur mit und ohne GroES-„Deckel“ aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen. (B) Modell des GroEL-Chaperonzyklus. Zwei missgefaltete Proteine (grün und blau) können gleichzeitig im Gegenteil gefaltet werden. Die roten Flächen symbolisieren die hydrophoben Substratbindungsstellen von GroEL.**

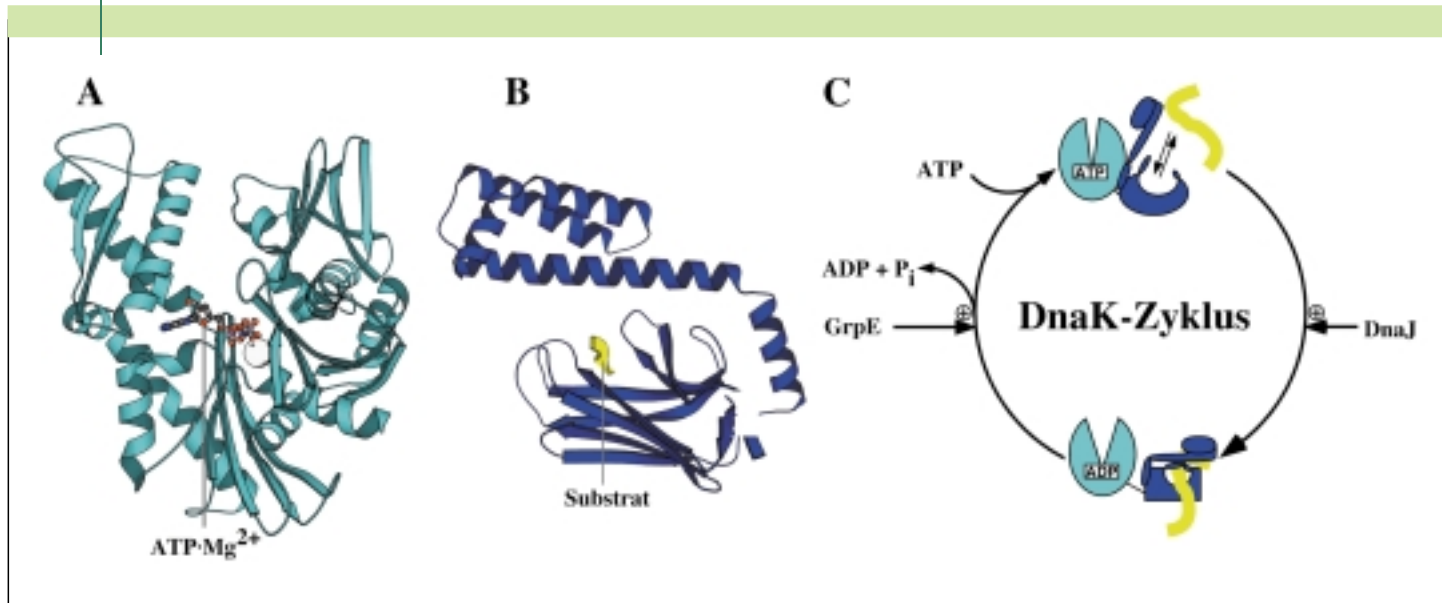
von GroEL freigesetzt wurden (Abbildung 4A, blaues Substrat). Manche Proteine benötigen mehrere Zyklen von Binden und Freisetzen, ehe sie die native Struktur erreichen.

Ein offensichtliches Problem ist die Größe der Faltungskammer der Hsp60-Chaperone, die nur für Polypeptide kleiner als 60 kDa Platz bietet. Es ist schwer vorstellbar, dass größere Polypeptide, die immer aus mehreren Domänen bestehen, durch Hsp60 in der Faltung unterstützt werden können.

### Das Hsp70-Chaperon

Im Gegensatz zu GroEL schließt DnaK sein Substrat nicht vollständig ein, sondern bindet nur ein einziges, kurzes Peptidsegment von ungefähr fünf Aminosäuren. DnaK besteht aus einer ATPase-Domäne und einer Substratbindungsdomäne (Abbildung 5A, B). Das Binden und Loslassen des Substrats wird durch ATP-Hydrolyse und ADP/ATP-Austausch kontrolliert und durch die zwei Co-Chaperone DnaJ und GrpE reguliert. Der Chaperonzyklus von DnaK ist in Abbildung 5C dargestellt. Im ATP-Zustand werden Substrate von DnaK sehr schnell gebunden und wieder losgelassen. Insgesamt bindet DnaK in diesem Zustand Substrate nur mit geringer Affinität. Im ADP-Zustand hat DnaK eine hohe Affinität für Substrate. Substratbindung und Substrat-

ABB. 5 DnaK-STRUKTUR UND CHAPERONZYKLUS



(A) Räumliche Struktur der ATPase-Domäne von DnaK im Komplex mit ATP und  $Mg^{2+}$  in Sekundärstrukturdarstellung (Homologiemodell von DnaK nach [4]). (B) Räumliche Struktur der Substratbindedomäne von DnaK im Komplex mit einem Peptidsubstrat in Sekundärstrukturdarstellung [17]. (C) Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von DnaK. Im ATP-Zustand erfolgt die Bindung und Dissoziation des Substrats (hellgrün) mit hoher Geschwindigkeit. Im ADP-Zustand ist das Substrat in der Substratbindedomäne eingeschlossen und fest an DnaK gebunden. Der Übergang von der niedrigaffinen zur hochaffinen Konformation erfolgt durch ATP-Hydrolyse, die durch die Interaktion mit Substrat und dem DnaJ-Co-Chaperon ausgelöst wird. Der ADP-ATP-Austausch, der über die Dauer der Substratbindung entscheidet, wird durch das GrpE-Co-Chaperon reguliert.

dissoziation sind jedoch sehr langsam. Die ATP-Hydrolyse wird durch DnaJ, welches ebenfalls das Substrat durch hydrophobe Wechselwirkungen binden kann, stimuliert. Man nimmt an, dass DnaJ das Substrat erkennt und an DnaK übergibt, wobei ATP hydrolysiert und ein Segment des Substrats fest eingeschlossen wird [2].

Unter physiologischen Bedingungen wird die Substratdissoziation durch den ADP/ATP-Austausch kontrolliert, der durch GrpE stimuliert wird. Die Zyklen des Bindens und Loslassens des Substrats sind nach neueren Berechnungen sehr kurz (etwa eine Sekunde pro Zyklus) und müssen wahrscheinlich oft wiederholt werden, bis ein Protein zurückgefaltet ist und nicht mehr als Substrat erkannt wird. Wie aber diese Bindungszyklen die Rückfaltung des missgefalteten Proteins fördern, ist noch nicht geklärt. Eine der möglichen Hypothesen ist, dass DnaK im Gegensatz zu GroEL eine lokal begrenzte Entfaltung des Substratproteins bewirkt [10]. Dieser Mechanismus hat natürlich den großen Vorteil, dass er unabhängig von der Größe des missgefalteten Proteinsubstrats ist. Es konnte gezeigt werden, dass unter den Hsp70-Substraten Proteine jeder Größe vorkommen und dass Proteine größer als 60 kDa während ihrer Faltung in besonderem Maße die Assistenz von Hsp70 benötigen [3, 9].

### Neue Perspektiven in der Biotechnologie

Der Zelle steht ein definiertes und reguliertes Arsenal von Chaperonen zur Verfügung, um möglichst jederzeit unproduktive Faltungsreaktionen neu synthetisierter Proteine zu unterdrücken und somit die Ausbeute an nativ gefalteten Proteinen zu erhöhen. In bestimmten Fällen (beispielsweise Hitzeschock) kann es zur Überlastung des zellulären Schutzsystems kommen. Verstärkte Missfaltung und nachfolgende Aggregation von Proteinen ist die Folge. Dies passiert auch häufig in biotechnologischen Prozessen, wenn man gentechnologisch Fremdproteine in Zellen überproduziert, um diese im großen Maßstab herzustellen und zu reinigen. Das Chaperonarsenal der Zelle ist überlastet und kann Proteine nicht mehr effizient in ihre biologisch aktive Struktur falten. Die Folgen sind unterschiedlich: Zum Beispiel werden Fremdproteine, wenn sie ungefaltet sind, sehr schnell von Proteasen abgebaut. Die missgefalteten Proteine können auch verklumpen und sehr große Aggregate bilden. Diese werden dann in Einschlusskörpern, den „Inclusion Bodies“ abgelagert (Abbildungen 6 und 7A). Ein Ausweg aus diesem Dilemma könnte der verstärkte Einsatz von Chaperonen in der Biotechnologie sein.

### Biotechnologische Proteinproduktion

Die biotechnologische Produktion von Proteinen erfährt weltweit einen rasanten Aufschwung. Von besonderer Bedeutung sind vor allem biotechnologisch hergestellte medizinische Wirkstoffe (wie zum Beispiel Impfstoffe, Wachstumsfaktoren und Hormone) sowie Proteine, die zur Diagnostik und in der Forschung eingesetzt werden (zum Beispiel Antikörper, DNA- und RNA-modifizierende Enzyme). Ziel ist es, diese Proteine in möglichst großen Mengen und in ihrer aktiven Form herzustellen.

Warum synthetisiert man Proteine in fremden Zellen? Viele Proteine können nicht aus ihren ursprünglichen Organismen in ausreichender Menge isoliert werden, zum Beispiel das humane Insulin. Oftmals ist die gentechnologische Produktion eines Proteins daher die einzige Möglichkeit, ausreichende Mengen herzustellen. Hierbei wird die genetische Information für das Protein in einen anderen Organismus eingebracht und dieser Wirtsorganismus so manipuliert, dass er große Mengen an Fremdprotein (rekombinantes Protein) synthetisiert. Zur Synthese von Proteinen gibt es verschiedene Wirtssysteme: Pflanzen- oder Säugerzelllinien, Hefezellen, Insektenzellen oder Bakterienzellen. Entscheidend für die Wahl des Systems ist immer die Ausbeute an rekombinantem Protein und seine biologische Aktivität. Eukaryotische Systeme kommen immer dann zum Einsatz, wenn Proteine nach ihrer Synthese modifiziert (zum Beispiel glykosyliert) werden müssen. Bakterielle Systeme, beispielsweise das Bakterium *Escherichia coli*, sind sehr einfach handhabbar, leicht zu fermentieren, genetisch sehr gut zugänglich, kostengünstig und bieten sehr hohe Ausbeuten an rekombinanten Proteinen. Bakterien stellen in der Biotechnologie immer noch das Hauptsystem zur heterologen Proteinsynthese dar.

### Optimierungsmöglichkeiten der Proteinfaltung

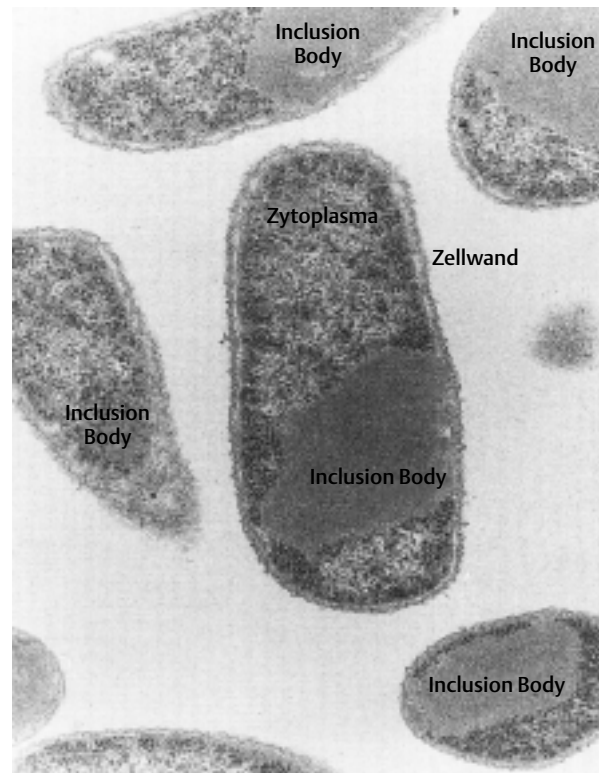
Durch unser gegenwärtiges Wissen über Chaperone können diese nun gezielt eingesetzt werden, um die Proteinfaltung zu optimieren und somit die Ausbeute an biologisch funktionellen rekombinanten Proteinen zu erhöhen. Hierbei gibt es prinzipiell zwei Strategien:

- Die gleichzeitige Überproduktion von Chaperonen und dem gewünschten Protein im zellulären Wirtssystem. Damit könnte man bereits in den produzierenden Zellen genügend Chaperone zur Verfügung stellen, um sowohl die initiale Neufaltung zu kontrollieren, als auch missgefaltete und eventuell aggregierte Proteine wieder zurückzufalten.
- Chaperone können auch während oder nach der Reinigung von missgefalteten Proteinen zum Einsatz kommen, zum Beispiel im Reagenzglas bei der Rückfaltung von aggregierten Proteinen aus Inclusion Bodies.

Beide Strategien sollen im Anschluss näher erläutert werden. Zwar ist der Nutzen der Chaperone in der Biotechnologie erst für einige wenige Beispiele belegt und der Nachweis einer allgemeinen Anwendung steht noch aus, dennoch zeigen diese Beispiele aussichtsreiche Perspektiven auf.

### Überproduktion molekularer Chaperone in Wirtszellen

Die Menge an Chaperonen kann in Wirtszellen erhöht werden, indem die Gene, die für Chaperone kodieren, zusätzlich zum Gen für das rekombinante Protein in die Wirtszelle eingeführt und exprimiert (in Protein umgesetzt) werden. Prinzipiell ist das bei allen Wirtssystemen möglich, am einfachsten jedoch bei Bakterien durch das Einbringen von



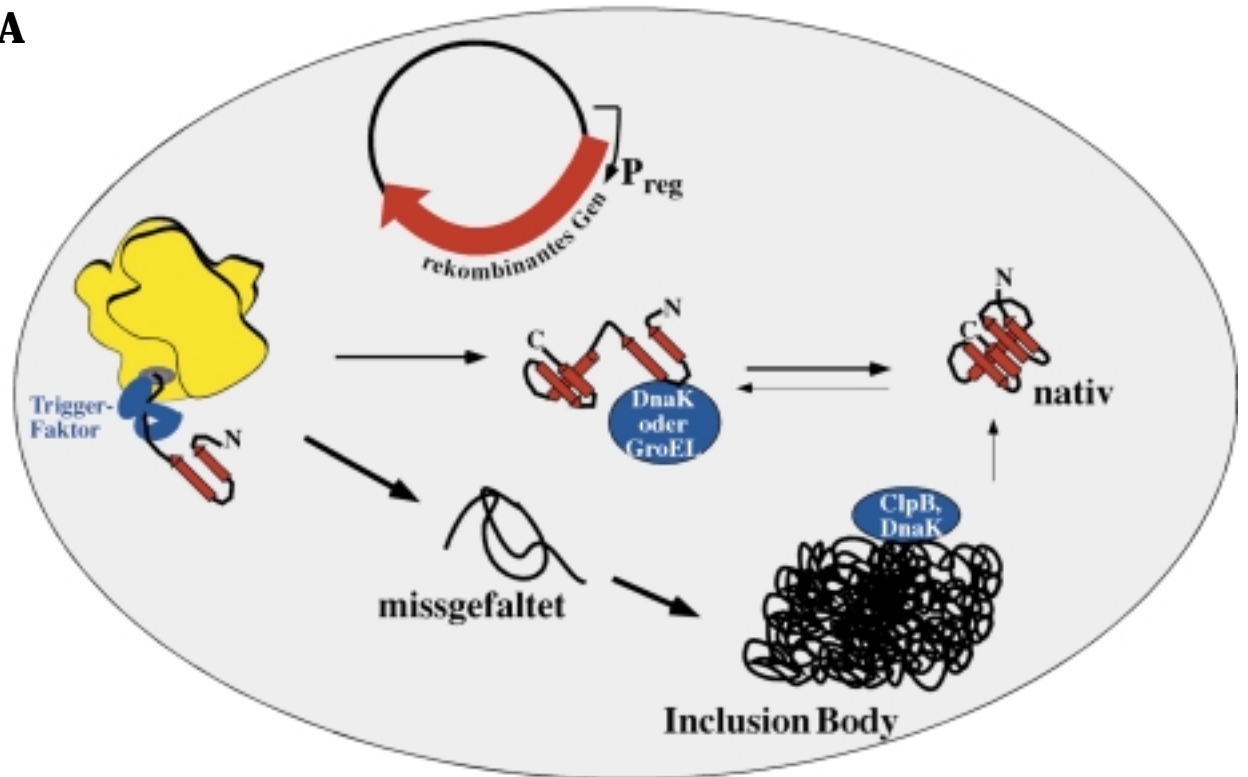
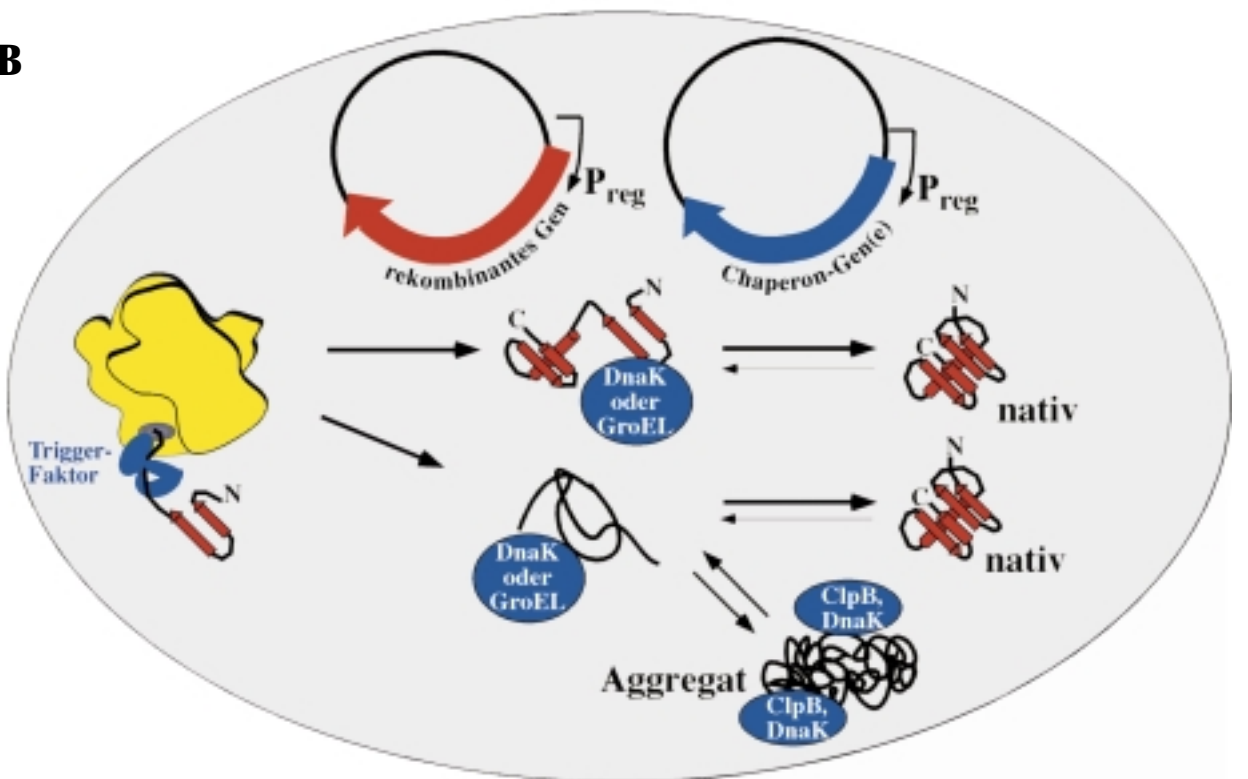
**ABB. 6** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bakterienzellen mit Inclusion Bodies. Das in Bakterienzellen überproduzierte Fremdprotein kann sich nicht korrekt falten und verklumpt zu riesigen unlöslichen Aggregaten (Inclusion Bodies).

Plasmiden (ringförmige DNA-Moleküle; Abbildung 7B). Durch eine gezielte Steuerung der Genexpression können Chaperone und das rekombinante Protein zeitgleich hergestellt werden.

Die erfolgversprechendsten Kandidaten für eine biotechnologische Anwendung stellen die prokaryotischen ATP-abhängigen Chaperonsysteme GroEL, DnaK und ClpB dar. Diese Systeme sind am besten untersucht und können nicht nur die Aggregation von Proteinen verhindern, sondern auch deren Rückfaltung in die native Konformation fördern. Um bereits Faltungsvorgänge am Ribosom während der Proteinsynthese zu unterstützen, könnte eine Überproduktion des Trigger-Faktors die Menge an nativem Protein erhöhen. Durch erhöhte Mengen an DnaK- und GroEL-System werden rekombinante Proteine löslich gehalten. Zusätzlich könnten sich bildende Aggregate von rekombinanten Proteinen durch die Überproduktion des Bi-Chaperonsystems (DnaK-System und ClpB) wieder in eine lösliche Form gebracht werden.

Einige Beispiele sind in der Literatur bereits beschrieben; sie zeigen, dass zusätzliche Chaperone die Löslichkeit von Proteinen in der Zelle erhöhen und deren Aggregation vermindern. Eine Überproduktion des Trigger-Faktors führt zum Beispiel zur besseren Löslichkeit von humanem Lysozym. Die Löslichkeit und Ausbeute der rekombinanten Enzyme Dihydrofolatreduktase aus Staphylokokken und einer humanen Protein-Tyrosin-Kinase (p50<sup>csk</sup>) ist in *Escherichia coli* bei gleichzeitiger Expression des GroEL-Systems verbessert im Vergleich zur Produktion in *Escherichia coli*-Zel-



**A****B**

**ABB. 7** Biotechnologische Proteinproduktion ohne (A) und mit (B) optimierten Mengen an Chaperonen in einer Bakterienzelle. (A) Es kommt verstärkt zu Missfaltung und Aggregation, da nicht genügend Chaperone vorhanden sind. (B) Einsatz von molekularen Chaperonen: Plasmide erlauben die kontrollierte Co-Expression von Chaperongen und dem Gen für das rekombinante Protein, wo-

durch mehr Chaperone für die Proteinfaltung zur Verfügung stehen und deshalb mehr lösliches rekombinantes Protein hergestellt werden kann.  $P_{reg}$ : regulierter Promotor für eine kontrollierte Genexpression; rote Pfeile kennzeichnen  $\beta$ -Stränge und rote Zylinder  $\alpha$ -Helices, beides sind mögliche Sekundärstrukturelemente in Proteinen.

len ohne Überproduktion. Eine Überproduktion des DnaK-Systems verbessert die Menge an löslicher aktiver rekombinanter Transglutaminase um das Vierfache. Die Zitate der entsprechenden Originalarbeiten können bei den Autoren angefordert werden.

Wichtig ist, dass nicht jedes Chaperonsystem für jedes Protein geeignet ist, zum Beispiel können rekombinante Proteine, die größer als 60 kDa sind, wahrscheinlich nicht von GroEL produktiv gefaltet werden. Chaperonsysteme müssen daher entweder auf das jeweilige Protein abgestimmt werden oder man setzt Zellen ein, die ein ganzes Arsenal von verschiedenen Chaperonen überproduzieren. Hinzu kommt, dass es auch sehr spezialisierte Chaperone gibt, die nur bei ganz bestimmten Proteinen die Faltung unterstützen zum Beispiel das HscA-System, ein Hsp70-Chaperon aus Bakterien, das spezifisch für den korrekten Aufbau von Eisen-Schwefel-Proteinen verantwortlich zu sein scheint.

### Rückfaltung aus Inclusion Bodies

Eine Alternative zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen ist die Reinigung des Proteins aus Inclusion Bodies. Diese Methode wird bislang häufig angewandt, da viele rekombinante Proteine unlöslich sind. Vorteil ist, dass das rekombinante Protein in nahezu beliebiger Menge in Zellen synthetisiert werden kann und sich in großen Aggregaten ablagert. Die Aggregate können sehr einfach nach dem Öffnen der Zelle durch Sedimentation gewonnen werden. Der Nachteil ist, dass das Protein zuerst wieder aus dem Aggregat herausgelöst und dann in die native Struktur zurückgefaltet werden muss; ein Prozess, der häufig schwierig und ineffizient ist. Im ersten Schritt werden die riesigen Aggregate zunächst solubilisiert. Dies geschieht bislang noch mittels aggressiver Lösungsmittel wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid. Diese Behandlung bewirkt zwar das Lösen der Proteine, aber die Lösungsmittel verhindern gleichzeitig eine Faltung des Proteins in die native Struktur. Deshalb müssen diese Bestandteile im zweiten Schritt entfernt werden und gleichzeitig muss das Protein in seine Struktur falten können. Dazu wird die Proteinlösung entweder schnell stark verdünnt oder gegen eine Pufferlösung ohne Lösungsmittel dialysiert. Beide Schritte dieser schwierigen Prozedur könnten durch den Einsatz von molekularen Chaperonen erleichtert und optimiert werden. Experimente mit dem Bi-Chaperon-System aus *E. coli* haben gezeigt, dass dieses System Aggregate der Malatdehydrogenase auflösen kann und das Enzym wieder in seinen aktiven Zustand überführt [7]. Bedeutend war auch der Befund, dass dieses Bi-Chaperonsystem unspezifisch arbeitet, das heißt verschiedene aggregierte Proteine wieder in Lösung bringen kann [9]. Eine Verwendung dieses Systems würde eine rigide Behandlung mit aggressiven Reagenzien komplett ersetzen. Darüber hinaus kann auch die Rückfaltung des rekombinanten Proteins in Anwesenheit des DnaK- oder des GroEL-Systems zusätzlich erleichtert und verbessert werden.

Trotz dieser aussichtsreichen Perspektiven ist natürlich auch der Kostenfaktor von Bedeutung. Die chaperonvermittelte Proteinfaltung *in vitro* setzt den Einsatz großer Mengen an aufgereinigten Chaperonen voraus. Proteinaufreinigungen sind jedoch aufwendig und kostspielig, sodass der Kostenfaktor solcher Rückfaltungsexperimente nicht unterschätzt werden sollte. Deshalb muss in jedem Einzelfall eine Kosten-Nutzen-Abschätzung vorgenommen werden.

### Zusammenfassung

*Molekulare Chaperone kommen ubiquitär in allen Zellen vom Bakterium bis hin zum Menschen vor und sind in verschiedene, evolutionär hochkonservierte Familien, beispielsweise in die Hsp70- und Hsp60-Familie, einteilbar. Chaperone können Faltungsvorgänge zeitlich und räumlich kontrollieren sowie eine inkorrekte Faltung verhindern. Darüber hinaus bilden Chaperone, vor allem unter Stressbedingungen, ein Reparatursystem für missgefaltete und verklumpte Proteine. Angesichts dieser besonderen Funktionen eröffnen Chaperone neue Perspektiven in der Biotechnologie. Bei der biotechnologischen Produktion von Proteinen, zum Beispiel von medizinisch wichtigen Wirkstoffen, kommt es häufig zur Missfaltung der Proteine, da das Chaperonarsenal der Zelle überlastet ist und die Proteine nicht mehr effizient falten können. Um dennoch biologisch aktive Proteine in großem Maßstab herzustellen, könnten molekulare Chaperone bereits in Zellen, die das gewünschte Protein synthetisieren, verstärkt zur Verfügung gestellt werden. Alternativ könnten Chaperone auch nach der Reinigung von missgefaltetem Protein eingesetzt werden, um das Protein zu renaturieren.*

### Summary

*Molecular chaperones are highly versatile molecules assisting a large variety of folding events during the entire life span of proteins. Chaperones control the folding of proteins into their native structure, repair misfolded proteins and are able to solubilize aggregated proteins. The current knowledge about the functions and molecular mechanisms of chaperones offer new prospects for the biotechnological production of heterologous proteins. Production of high amounts of recombinant proteins results very often in insoluble and inactive proteins. Using molecular chaperones may help to produce high amounts of native and functional protein both in vivo and in vitro.*

### Literatur

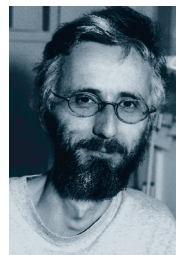
- [1] B. Bukau et al., Getting newly synthesized proteins into shape, *Cell* **2000**, *101*, 119-122.
- [2] B. Bukau und A. L. Horwich, The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines, *Cell* **1998**, *92*, 351-366.
- [3] E. Deuerling et al., Trigger-factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins, *Nature* **1999**, *400*, 693-696.
- [4] K. M. Flaherty, C. Deluca-Flaherty und D. B. McKay, Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein, *Nature* **1990**, *346*, 623-628.

- [5] J. R. Glover und S. Lindquist, Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins, *Cell* **1998**, *94*, 73-82.
- [6] D. S. Goodsell, Inside a living cell, *TiBS* **1998**, *16*, 203-206.
- [7] P. Goloubinoff et al., Sequential mechanism of solubilization and re-folding of stable protein aggregates by a bichaperone network, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13732-13737.
- [8] F. U. Hartl, Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature* **1996**, *381*, 571-580.
- [9] A. Mogk et al., Identification of thermolabile *E. coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6934-6949.
- [10] M. P. Mayer, S. Rüdiger und B. Bukau, Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 877-885.
- [11] A. M. Roseman et al., The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL, *Cell* **1996**, *87*, 241-251.
- [12] H. S. Rye et al., GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings, *Cell* **1999**, *97*, 325-338.
- [13] G. Schatz und B. Dobberstein, Common principles of protein translocation across membranes, *Science* **1996**, *271*, 1519-1526.
- [14] C. Schiene, Enzymes that catalyse the restructuring of proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 40-45
- [15] C. P. Schultz, Illuminating folding intermediates, *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 7-10.
- [16] M. Shtilerman, G.H. Lorimer und S.W. Englander, Chaperonin function: folding by forced unfolding, *Science* **1999**, *284*, 822-825.
- [17] X. Zhu et al., Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK, *Science* **1996**, *272*, 1606-1614.

## Autoren



Elke Deuerling, geb. 1967 in Lichtenfels. Studium der Biologie an der Universität Erlangen/Nürnberg und der Universität Bayreuth, Diplom 1992. Promotion 1995 am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth bei Prof. Wolfgang Schumann. 1996 Postdoc am ZMBH in Heidelberg bei PD Dr. Bernd Bukau in der Gruppe von Prof. Hermann Bujard. Seit 1997 wissenschaftliche Assistentin bei Prof. Bernd Bukau am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Freiburg.



Matthias P. Mayer, geb. 1960 in Zweibrücken. Studium der Biologie an der Universität Freiburg, Diplom 1987. Promotion 1990 am Lehrstuhl für Zellbiologie bei Prof. Hans Kleinig. 1990 – 1992 Postdoc im Labor von Prof. C. Dale Poulter, Department of Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah, U.S.A. 1992 – 1997 Maître-Assistant in der Arbeitsgruppe von Prof. Costa Georgopoulos, Département de Biochimie Médicale, Centre Médical Universitaire, Genf, Schweiz. Seit 1997 wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Bukau am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg.



Axel Mogk, geb. 1968 in Frankfurt am Main. Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth, Diplom 1995. Promotion 1997 am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth bei Prof. Wolfgang Schumann. Seit 1998 wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Bukau am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg.

**Anschriften:** Dr. Elke Deuerling, Dr. Matthias P. Mayer, Dr. Axel Mogk, Arbeitsgruppe Prof. Bernd Bukau, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Hermann-Herder-Str.7, D-79104 Freiburg.  
E-mail: deuerli@uni-freiburg.de