

Hitzeschockprotein Hsp 60 als Katalysator für die Kettenfaltung mitochondrialer Proteine

Die gesamte Information für die dreidimensionale Faltung eines Proteins ist in der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette enthalten. Dieses Dogma der modernen Biochemie basiert auf der Beobachtung, daß vor allem kleine Proteine nach vollständiger Entfaltung (zum Beispiel durch Harnstoff oder Guanidiniumchlorid) spontan in den gefalteten Zustand zurückkehren (renaturieren) können [1]. Die Rückfaltung dieser Proteine *in vitro* verläuft im allgemeinen schneller als ihre Synthese in der Zelle. Dies führte zu der verbreiteten Ansicht, daß auch *in vivo* die Proteinkettenfaltung ein spontaner Prozeß sei, der ohne die Hilfe eines Biokatalysators ablaufe. Viele Proteine mit komplexer, aus mehreren Domänen oder Untereinheiten aufge-

bauter Struktur lassen sich jedoch *in vitro* nicht oder nur sehr ineffizient korrekt falten bzw. wieder zu oligomeren Komplexen vereinen [2]. Über die Mechanismen der Faltung neusynthetisierter Proteine *in vivo* war lange Zeit kaum etwas bekannt. Erst jetzt ergeben Befunde der molekularen Zellbiologie ein neues Bild. Untersuchungen der intrazellulären Sortierung und des Transports von Proteinen durch Membranen führten zur Identifizierung von Proteinkomponenten, die neusynthetisierte Polypeptidketten binden und deren Faltung beeinflussen. Der Begriff „Molecular Chaperones“ hat sich als Bezeichnung für diese Komponenten weitgehend durchgesetzt [3]. Zu ihnen gehören Proteine, die von der Zelle unter Stress verstärkt synthetisiert werden, sogenannte Hitzeschockproteine, wie das Protein Hsp60 aus Mitochondrien. Um seine Funktion als Katalysator für die Proteinfaltung geht es im folgenden Beitrag.

Bei der Untersuchung der Proteinfaltung unter physiologischen Bedingungen ist die Wahl des experimentellen Systems besonders problematisch. Wir nutzten die Tatsache, daß Proteine der Mitochondrien überwiegend von Genen im Zellkern codiert und als Vorstufenprotein an den Ribosomen im Cytosol synthetisiert werden. Danach müssen sie durch die beiden Mitochondrienmembranen in die Mitochondrien importiert werden [4]. Die Information dafür ist im allgemeinen in Aminosäuresequenzen am Aminoende der Proteine lokalisiert, die mit Rezeptorstrukturen an der Oberfläche der Mitochondrien in Wechselwirkung treten; nach dem Eintransport wird diese sogenannte Targeting-Information proteolytisch abgespalten. Der Transportprozeß findet an Translokations-Kontaktstellen statt. Das sind Regionen, an denen die Außen- und Innenmembran des Mitochondriums sehr nahe zusammenliegen. Dort befindet sich ein komplexer Translokationsapparat für Proteine. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist, daß die Vorstufenproteine die Membranen in einer entfalteten Konformation durchqueren. Komponenten im Cytosol, unter anderem die Hitzeschockproteine mit dem Molekulargewicht 70 000 (70kDa-Hitzeschockproteine), halten die neusynthetisierten Vorstufenproteine in dieser locker gefalteten Konformation [5].

Wir untersuchten zunächst eine Hefemutante, in der das Gen für Hsp60 defekt war [6]. Hsp60 ist als hochmolekularer Komplex aus 14 Untereinheiten (Molekulargewicht je 60 000) in der Matrix der Mitochondrien lo-

kalisiert; die Aminosäuresequenz dieses Proteins hat sich im Lauf der Evolution wenig verändert, sie ist zu etwa 60 Prozent mit der Sequenz des Hitzeschockproteins GroEL aus Bakterien identisch. Dies ist einmal mehr ein Hinweis auf die Entwicklung der Mitochondrien aus freilebenden Einzellern, die auf einer frühen Evolutionsstufe als Endosymbionten in Zellen aufgenommen wurden. Der Gendefekt der Hefemutante führt dazu, daß sich mitochondriale Proteine nicht mehr zu oligomeren Komplexen zusammenlagern. So können die Mitochondrien zum Beispiel das Vorstufenprotein der F_1 -ATPase oder der Ornithintranscarbamylase zwar noch aus dem Cytosol importieren und proteolytisch zu den reifen Proteinen verarbeiten; der aktive Enzymkomplex wird jedoch nicht mehr gebildet. Stattdessen entstehen aus den importierten Proteinen unlösliche Aggregate im Matrixraum. Dieser Effekt ist nur bei Wachstum der Zelle unter restriktiven Bedingungen (37 °C) ausgeprägt. Aufgrund einer Punktmutation ist das Hsp60-Molekül thermolabil und denaturiert bei 37 °C. Molekulare Einzelheiten der Wechselwirkung mitochondrialer Proteine mit Hsp60 analysierten wir mit Hilfe eines Modellproteins, dessen Faltungszustand über seine Resistenz gegen den Angriff durch Proteasen hinreichend bestimmt werden konnte [7]. Kompakt gefaltete Proteine sind häufig sehr widerstandsfähig gegen Spaltung durch Proteasen. Wir nutzten diese Eigenschaft des cytosolischen Proteins Dihydrofolatreduktase (DHFR), eines löslichen monomeren Enzyms, das normalerweise in Mitochondrien nicht vorkommt.

Durch rekombinante Gentechnik wurde ein Fusionsprotein zwischen DHFR und der Erkennungssequenz (Targeting-Sequenz) für den Transport durch die Mitochondrienmembran erzeugt. Isolierte Mitochondrien importieren dieses Protein sehr effizient, wenn es ihnen in einer entfalteten, gegen Proteasen sehr empfindlichen Konformation angeboten wird. Nach dem Transport durch die Mitochondrienmembran und Spaltung der Präsequenz faltet sich DHFR in die stabile Konformation des aktiven Enzyms; zur korrekten Faltung kommt es jedoch nur in Gegenwart von funktionsfähigem Hsp60. Unter diesen Bedingungen erreichen 50 Prozent des importierten Fusionsproteins innerhalb von drei bis fünf Minuten die gefaltete, proteaseresistente Konformation. Der Faltungsprozeß ist damit wesentlich langsamer als der Transport durch die Membran. Die Faltungsreaktion ist streng ATP-abhängig. Unter Bedin-

gungen, die zu einer Erniedrigung des ATP-Spiegels im Innern der Mitochondrien führen, bildet neuimportierte DHFR mit Hsp60 einen isolierbaren Komplex. In Abwesenheit von ATP ist die mit Hsp60 assoziierte DHFR ungefaltet. Wiederzugabe von ATP führt zur Faltung und zur Ablösung des Proteins von Hsp60. Dabei wurde gezeigt, daß sich die DHFR noch vor der Ablösung von Hsp60 ATP-abhängig und in enger Wechselwirkung mit Hsp60 partiell faltet. Dadurch ergab sich zum ersten Mal der Hinweis, daß die physiologische Proteinfaltung an der Oberfläche eines Faltungskatalysators stattfinden kann.

Der Wirkungsmechanismus des Hsp60 ist noch weitgehend unklar. Wir nehmen an, daß Hsp60 – und wahrscheinlich auch die verwandte bakterielle Komponente GroEL – allgemeine Strukturmerkmale entfalteter Proteine erkennen, die durch eine Membran transportiert werden oder als neusynthetisierte Ketten aus dem Ribosom hervortreten. Durch Wechselwirkung mit Hsp60 wird eine Aggregation der entfalteten Polypeptidkette verhindert. Die Faltung wird erst erlaubt, wenn die sich unabhängig voneinander faltenden Domänen durch Membranen transportiert bzw. synthetisiert sind. Hsp60 und GroEL sind selbst ATPasen, also Enzyme, die ATP spalten. Es ist denkbar, daß die ATP-Hydrolyse zu einer Konformationsänderung der Komponenten führt. Dadurch könnte sich die Wechselwirkung mit dem noch unvollständig gefalteten Protein lockern und die Faltung als kontrollierte Reaktion ablaufen. Je weiter der Faltungsprozeß fortgeschritten ist, desto schwächer wird die Bindung an Hsp60. Die Beteiligung weiterer Faktoren bei der endgültigen Ablösung des gefalteten Proteins ist möglich. Es muß aber betont werden, daß auch bei diesem Mechanismus der physiologischen Proteinfaltung die Information für die endgültige Konformation allein in der Aminosäuresequenz des Proteins enthalten ist. Die Rolle von Hsp60 dürfte es sein, unerwünschte intra- und intermolekulare Wechselwirkungen der sich faltenden Ketten, die zu Mißfaltung und Aggregation führen, zu verhindern. Da solche Phänomene verstärkt auch bei bereits gefalteten Proteinen unter Hitzestress auftreten, ist verständlich, daß unter diesen Bedingungen die Synthese von Hsp60 und GroEL verstärkt wird.

Es bleibt abzuwarten, ob die für mitochondriale Proteine nachgewiesenen Abläufe auch bei der de-novo-Faltung von Proteinen im eukaryotischen Cytosol eine Rolle spielen.

Mögliche Kandidaten für die Ausübung einer Hsp60-ähnlichen Funktion sind die Hitzeschockproteine der 70 kDa-Familie. Die Antwort auf die Frage, wie sich Proteine in der natürlichen Umgebung der Zelle falten, ist von grundlegender Bedeutung, nicht zuletzt auch für biotechnologische Prozesse.

F.-U. Hartl, J. Ostermann und W. Neupert, Universität München; A. L. Horwich, Yale University.

[1] C. B. Anfinsen: „Principles that govern the folding of protein chains“. *Science* 181, 223 (1973).

[2] G. Fischer und F. X. Schmidt: „The mechanism of protein folding. Implications of in vitro-refolding models for de novo protein folding in the cell“. *Perspect. Biochem.*, im Druck.

[3] S. M. Hemmingsen, C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix und J. R. Ellis: „Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly“. *Nature* 33, 330 (1988).

[4] F.-U. Hartl, N. Pfanner, D. W. Nicholson und W. Neupert: „Mitochondrial protein import“. *Biochim. Biophys. Acta* 998, 1 (1989).

[5] R. J. Deshaies, B. D. Koch, M. Werner-Washburne, E. A. Craig und R. Schekman: „A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides.“ *Nature* 332, 800 (1988).

[6] M. Y. Cheng, F.-U. Hartl, J. Martin, R. A. Pollock, F. Kalousek, W. Neupert, E. M. Hallberg, R. L. Hallberg und A. L. Horwich: „Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria“. *Nature* 337, 620 (1989).

[7] J. Ostermann, A. L. Horwich, W. Neupert und F.-U. Hartl: „Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis“. *Nature* 341, 125 (1989).