

# „Korrekt gefaltete“ Proteine – ein metastabiler Zustand?

Ehud Gazit\*

## Einleitung

In den letzten Jahren hat das Interesse an der Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen stetig zugenommen.<sup>[1]</sup> Dafür gibt es zwei Hauptgründe: 1) die starke Zunahme genetisch bedingter oder sporadischer Amyloidosen und anderer Krankheiten, die mit der Fehlfaltung von Proteinen zusammenhängen, von denen viele mit der verlängerten Lebenserwartung der Bevölkerung westlicher Länder korrelieren; 2) der Ausbruch einer der bedeutendsten infektiösen Proteinfehlfaltungs-Erkrankungen, der bovinen spongiformen Encephalopathie (BSE), auch Rinderwahnsinn genannt.

Gegenwärtig sind mehr als zwanzig untereinander nicht verwandte Proteinfehlfaltungs-Erkrankungen bekannt.<sup>[1]</sup> Dazu gehören Morbus Alzheimer, Diabetes vom Typ II, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) und verschiedene unabhängige Amyloidoseformen. Diese Krankheiten haben verschiedene Ursachen, weisen aber einige biochemische und biophysikalische Gemeinsamkeiten auf. In allen Fällen wandeln sich normale, korrekt gefaltete zelluläre Proteine zunehmend in einen aggregierten Zustand um. Dies geht einher mit größeren Umwandlungen der normalen Sekundärstruktur in eine  $\beta$ -Faltblatt-reiche Konformation.

Normalerweise brechen Proteinfehlfaltungs-Krankheiten spontan aus. Aus unbekannten Gründen werden zu einem gewissen Zeitpunkt, meist im Alter, normale Proteine in den pathologischen aggregierten Zustand transformiert. In wenigen Fällen können auch genetische Gründe gefunden werden: Hier haben die Proteine, die zur Aggregation neigen, eine andere Aminosäuresequenz als die entsprechenden normalen Proteine der übrigen Population. Solche Mutationen führen zu einem frühen Ausbruch der Fehlfaltungs-Erkrankungen. Beispiele für genetische Faktoren sind die Flemish-Mutation im  $\beta$ -Amyloid( $\beta$ A)-Peptid, die zu einer frühen Manifestierung von Morbus Alzheimer führt,<sup>[2]</sup> die Japanische Mutation im Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP), die einen frühen Ausbruch von Diabetes Typ II verursacht,<sup>[3]</sup> und die Mutationen im PrP-Protein, durch die die erblichen Formen der spongiformen Encephalopathien CJD, Gerstmann-Straussler-Scheinker-Krankheit oder atypische Demenz verursacht werden.<sup>[4]</sup>

[\*] Dr. E. Gazit

Department of Molecular Microbiology and Biotechnology  
Tel Aviv University, Tel Aviv, 69978 (Israel)  
Fax: (+972)3-640-9407  
E-mail: ehudg@post.tau.ac.il

Infektiöse Proteinfehlfaltungen (Prionen-Krankheiten) sind direkt mit den spontanen und genetisch bedingten Proteinfehlfaltungs-Erkrankungen verknüpft.<sup>[4]</sup> So ist BSE die infektiöse Form der spontanen oder vererbten CJD. Bei BSE ist das infektiöse Agens ein Aggregat zellulärer PrP-Proteine, die die Strukturumwandlung in die infektiöse Pr(Sc)-Form durchgemacht haben. Dieses Pr(Sc)-Aggregat geht mit normalem, korrekt gefaltetem zellulärem PrP-Protein eine Wechselwirkung ein, die dessen irreversiblen Übergang von der nativen in die aggregierte und falsch gefaltete Form nach sich zieht.

Diese beiden Formen von Proteinfehlfaltungs-Erkrankungen, die spontanen und die infektiösen, haben nicht nur tief greifende medizinische und soziale Auswirkungen, sie wecken auch erhebliche Zweifel am zentralen Dogma der Proteinfaltung, wie weiter unten diskutiert werden wird. Die BSE-Epidemie in Europa machte sehr deutlich, dass infektiöse Proteinfehlfaltungs-Erkrankungen sich auch massiv auf Wirtschaft und Politik auswirken. Ein besseres Verständnis des Mechanismus der Proteinaggregation ist erforderlich, da anders als bei anderen wichtigen Erkrankungen die Gentherapie kein sehr erfolgversprechender Weg ist, diesen Krankheiten zu begegnen. Aus thermodynamischer Sicht interessant ist bei allen durch falsch gefaltete Proteine ausgelösten Krankheiten, dass der Aggregationsprozess irreversibel verläuft und die Aggregate außergewöhnlich stabil sind. Genau dies ist auch der Grund für ein wichtiges medizinisches Problem: Die Proteinaggregate sind resistent gegen die Zerstörung durch Desinfektionsmittel. Dies verursacht erhebliche Sorgen, dass es durch kontaminiertes ärztliches oder zahnärztliches Gerät zu einer Infektion kommen kann.<sup>[5]</sup>

## Die „thermodynamische Theorie“ der Proteinfaltung

Das zentrale Dogma der Proteinfaltung wurde vor mehr als vierzig Jahren von Chris B. Anfinsen aufgestellt.<sup>[6]</sup> Die Grundaussage dieser Theorie, thermodynamische Theorie genannt, ist, dass der energetisch günstigste Faltungszustand von Proteinen der „korrekt gefaltete“ ist. In einer sehr eleganten Versuchsreihe bewiesen Anfinsen und seine Kollegen, dass die gesamte für die korrekte Proteinfaltung notwendige Information in der Primärsequenz enthalten ist. Außerdem wird ein entfaltetes Protein spontan in den korrekten Faltungszustand übergehen, der der Zustand mit der niedrigsten Gibbs-Energie (für dieses konkrete Protein) ist. Für diese Theorie erhielt Anfinsen 1972 den Chemie-

Nobelpreis. Während bei einem isolierten Proteinmolekül – in unendlich verdünnter Lösung, wie dies ausdrücklich in Anfinsens Modell (siehe unten) angenommen wird – wahrscheinlich wirklich der korrekte Faltungszustand der energieärmste Zustand ist, gibt es aufgrund experimenteller Ergebnisse Zweifel, ob dies auch für konzentrierte Proteingemische in wässriger Lösung gilt.

## Experimentelle Untersuchungen zur Proteinaggregation

Es ist bekannt, dass in konzentrierten wässrigen Lösungen zahlreiche, nicht verwandte Proteine aggregieren, ein Prozess, der intensiv untersucht wurde.<sup>[1]</sup> Die Aggregation läuft normalerweise in zwei Phasen ab (Abbildung 1). In der ersten Phase bilden sich reversibel Aggregationskeime. Dabei lagern

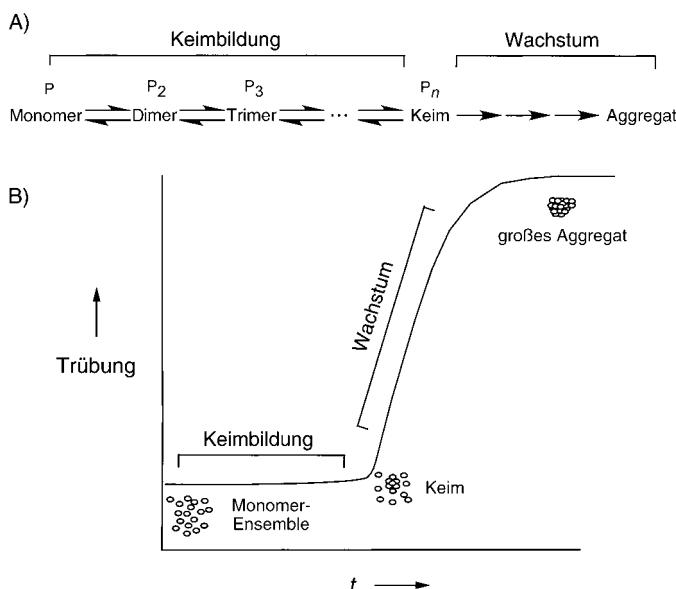


Abbildung 1. A) Die Proteinaggregation läuft in zwei Phasen ab: Keimbildung und Wachstum der Keime bis zu einer kritischen Masse. B) Typische Aggregationskurve. Die Aggregation wird im Allgemeinen anhand der Trübung der Lösung als Funktion der Zeit gemessen. Die vorgeschaltete Keimbildung verursacht das verzögerte Auftreten der Trübung.

sich Proteine sequenziell und thermodynamisch reversibel an einen wachsenden Keim an. Die zweite Phase des Prozesses beginnt, wenn der Aggregationskeim eine kritische Masse erreicht hat. Dann wird die Anlagerung weiterer Proteinmoleküle irreversibel, und es kann zur Bildung großer Aggregate kommen. Diese sind sehr stabil, und es gibt keine Hinweise auf ein Gleichgewicht zwischen dem aggregierten und dem korrekt gefalteten Zustand.

Es ist sehr interessant, dass nicht nur mit Krankheiten in Verbindung stehende Proteine in Lösung aggregieren. Auch andere Proteine – wie die SH3-Domäne, Myoglobin und ein bakterielles Kälteschockprotein – bilden in Lösung aggregierte Strukturen.<sup>[7]</sup> Einer der Grundtypen solcher Aggregate, die von nicht verwandten Proteinen gebildet werden, ist die Amyloidfibrille. Solche Fibrillen entstehen vermutlich durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Proteinketten.<sup>[7]</sup> Daraus wurde gefolgert, dass die aggregierte Form, und dabei vor allem die

amyloide Form, möglicherweise eine grundlegende Proteinkonformation ist.<sup>[1]</sup> Daneben sind auch nichtamyloidale Aggregate außergewöhnlich interessant, weil sie möglicherweise ein direkter Auslöser des Zelltodes sind.<sup>[8]</sup> Jedem Proteinchemiker ist das Phänomen geläufig, dass konzentrierte Proteinpräparationen nach langer Lagerung aggregieren und ausfallen können.

## Der Einfluss chemischer Chaperone

Chemische Chaperone sind kleine Moleküle, die einen sehr nachdrücklichen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität verschiedener nicht verwandter Proteine haben.<sup>[9]</sup> Zu den chemischen Chaperonen gehören natürlich vorkommende organische Osmolyte ebenso wie Lösungsmittel. Man vermutet, dass chemische Chaperone die thermodynamische Landschaft der Proteine verändern, indem sie die Proteinfaltung durch eine bevorzugte Hydratisierung des exponierten Polypeptid-Rückgrats und der Seitenketten von partiell entfalteten Strukturen beeinflussen.

Ein chemisches Chaperon, das die Proteinfaltung besonders wirksam beeinflusst, ist Trimethylamin-N-oxid (TMAO). Die These ist, dass Reagenzien wie TMAO „thermodynamisch entfaltete Proteine zur Faltung zwingen können“.<sup>[9]</sup> Im Gegensatz zu Lösungsmitteln wie Trifluorethanol, die die Helixbildung begünstigen, scheint TMAO keine besondere Sekundärstruktur zu fördern. 1999 wurde nachgewiesen, dass TMAO *in vitro* den Aggregationszustand des  $\beta$ -Amyloidpeptids beeinflussen kann, das am Morbus Alzheimer beteiligt ist: Bei Zugabe von TMAO kam es zu einer dosisabhängigen Peptidaggregation.<sup>[10]</sup> Wir beobachteten die gleiche Wirkung von TMAO bei einer Anzahl nicht verwandter Proteine (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Substanz, die Proteine in den korrekt gefalteten Zustand zwingt, verursacht also auch die Proteinaggregation. Wir erklären uns den molekularen Mechanismus dieses Phänomens so, dass TMAO Proteine auf die gleiche Weise, wie es sie in den gefalteten Zustand zwingt, auch in den aggregierten Zustand überführt, und zwar indem es für die Überwindung von Energiebarrieren sorgt.

## Die „Metastabilitätstheorie“ der Proteinfaltung

Die zusammenfassende Betrachtung der geschilderten Befunde veranlasste uns, die Thermodynamik der Proteinfaltung aus einem neuen Blickwinkel zu betrachten. Unser Ansatz unterscheidet sich von der traditionellen Sichtweise, die jedes einzelne Proteinmolekül als unabhängiges thermodynamisches System ansieht, dadurch, dass wir ein Protein-Ensemble in wässriger Lösung als ein einziges großes thermodynamisches System auffassen (Abbildung 2). Bei dieser Betrachtungsweise entspricht eine Lösung von Proteinen, die zur Aggregation neigen, aber (noch) korrekt gefaltet sind, einem System in einem Übergangszustand, das irgendwann das globale Minimum der Gibbs-Energie – den aggregierten Zustand – erreichen wird. Da viele unterschiedliche Proteine ähnliche Aggregationsprozesse durchlaufen, scheint eine Erweiterung des Modells angebracht. Offenbar gehen viele Proteine früher oder später in den aggregierten Zustand über. Bei einigen kann dies Minuten oder Stunden dauern, bei anderen Tage oder Monate. Wir vermuten, dass

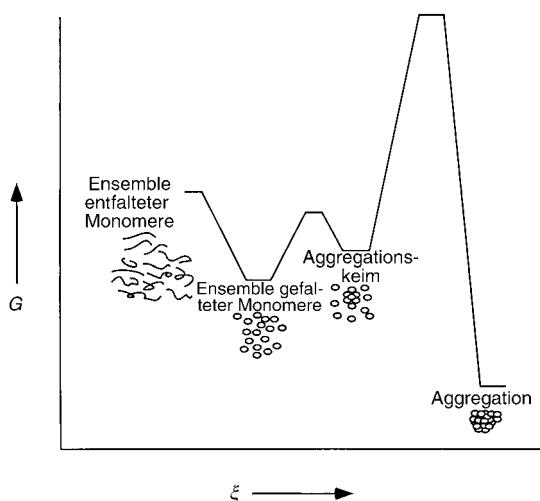


Abbildung 2. Modell für die Aggregation von Proteinen, in dem alle Proteine in einer wässrigen Lösung als ein einziges thermodynamisches System angesehen werden. Gezeigt ist die relative Gibbs-Energie für den ungefalteten, den gefalteten, den Keimbildungs- und den aggregierten Zustand der Proteine. Der aggregierte Zustand nimmt das globale Minimum der Gibbs-Energie ein. Die hohe Aktivierungsenergie führt jedoch dazu, dass die Proteine in ihrer korrekten Faltung kinetisch blockiert sind.  $G$  = Gibbs-Energie,  $\xi$  = Reaktionskoordinate.

bei unbegrenzter Zeit in jeder Proteinlösung oberhalb einer kritischen Konzentration  $C_{\text{ag}}$  irgendwann die Konformationsänderung zum aggregierten Zustand durchlaufen wird. Der genaue Wert von  $C_{\text{ag}}$  variiert je nach Proteintyp und hängt auch von Parametern wie Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert ab. Um dieses Modell zu überprüfen und um die Proteinaggregation als generellen Prozess zu verstehen, sollten künftige Versuche nicht nur über Stunden und Tage durchgeführt werden (wie dies z. B. mit dem  $\beta$ A-Peptid geschieht), sondern auch über Wochen oder Monate.

Der wesentlichste Aspekt ist, dass der thermodynamisch bevorzugte Zustand eines Protein-Ensembles wahrscheinlich der aggregierte oder fehlgefaltete ist. Nach diesem Modell entspricht eine konzentrierte Lösung korrekt gefalteter Proteine einem metastabilen Zustand. Als metastabil wird allgemein ein Zustand bezeichnet, der einem lokalen Energiedeminimum entspricht, das vom globalen Minimum durch eine Energiebarriere getrennt ist; daher kann der Zustand kinetisch blockiert sein. Obwohl der metastabile Zustand also nur einem lokalen und nicht dem globalen Minimum des Systems entspricht, ist er aus praktischen Gründen in einigen Fällen der Zustand, der für eine beachtliche Zeitspanne beobachtet werden kann.

In der Tat deuten einige experimentelle Daten darauf hin, dass der Übergang vom korrekt gefalteten Zustand in das globale Minimum des aggregierten Zustandes die Überwindung einer Energiebarriere erfordert. So führt oft das Erhitzen einer Proteinlösung zu schneller Aggregation. Meist wird dies damit erklärt, dass das Erhitzen eine partielle Entfaltung der Proteine bewirkt und dass diese Entfaltung die Aggregation beschleunigt. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, dass chemische Chaperone, die die partielle Entfaltung von Proteinen hemmen, dennoch die Aggregation

beschleunigen. Wir spekulieren daher, dass das Erhitzen in Wirklichkeit die Proteinlösung beim Überwinden der hohen Energiebarriere unterstützt, die den aggregierten Zustand vom kinetisch blockierten korrekt gefalteten Zustand trennt. Analog zwingen chemische Chaperone, die Proteine in den gefalteten Zustand drängen, diese weiter in die Aggregation, indem sie solch hohe Energiebarrieren überwinden helfen.

### Zusammenfassung

Die Fehlfaltung von Proteinen ist ein Thema mit großen medizinischen, ökonomischen und sogar politischen Auswirkungen. Daher ist ein neuer Blick auf die Proteinfaltung notwendig, bei dem der fehlgefaltete Zustand im Mittelpunkt steht. Während es stimmt, dass bei isolierten Proteinmolekülen der korrekt gefaltete Zustand der Zustand mit der niedrigsten Gibbs-Energie ist, gilt dies offensichtlich nicht für Protein-Ensembles in Lösung. Alle experimentellen Daten führen zu dem Schluss, dass bei vielen Proteinen der günstigste Zustand oder der Zustand niedrigster Gibbs-Energie der aggregierte Zustand ist. Wir vermuten sogar, dass dies für alle Proteine gilt. Dann würde der korrekt gefaltete Zustand eines jeden Protein-Ensembles, gleich welcher Art, nur einem lokalen Minimum der Gibbs-Energie entsprechen. Stimmt dies, werden in unendlicher Zeit alle Proteine in einen aggregierten Zustand übergehen.

- [1] Übersichten: a) G. Taubes, *Science* **1996**, *271*, 1493–1495; b) J. D. Harper, P. T. Lansbury, Jr., *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 385–407; c) C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 329–332; d) C. M. Dobson, R. J. Ellis, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5251–5254; e) J. D. Sipe, A. S. Cohen, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 88–98; f) J. W. M. Höppener, B. Ahrén, C. J. M. Lips, *New Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 411–419.
- [2] L. Hendriks, C. De Jonghe, P. Cras, J.-J. Martin, C. Van Broeckhoven, *Ciba Found. Symp.* **1996**, *199*, 170–180.
- [3] a) S. Sakagashira, T. Sanke, T. Hanabusa, H. Shimomura, S. Ohagi, K. Y. Kumagaye, K. Nakajima, K. Nanjo, *Diabetes* **1996**, *45*, 1279–1281; b) S. Sakagashira, H. J. Hiddinga, K. Tateishi, T. Sanke, T. Hanabusa, K. Nanjo, N. L. Eberhardt, *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 2101–2109.
- [4] a) S. B. Prusiner, M. R. Scott, S. J. DeArmond, F. E. Cohen, *Cell* **1998**, *93*, 337–348; b) S. A. Priola, B. Chesebro, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11980–11985.
- [5] a) L. Manuelidis, *J. Neurovirol.* **1997**, *3*, 62–65; b) E. Zobeley, E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari, C. Weissmann, *Mol. Med.* **1999**, *5*, 240–243.
- [6] Übersichten: a) C. B. Anfinsen, *Science* **1973**, *181*, 223–230; b) C. B. Anfinsen, H. A. Scheraga, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 205–300.
- [7] a) J. T. Jarrett, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **1992**, *31*, 12345–12352; b) J. I. Guijarro, M. Sunde, J. A. Jones, I. D. Campbell, C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4224–4228; c) M. Gross, D. K. Wilkins, M. C. Pitkeathly, E. W. Chung, C. Higham, A. Clark, C. M. Dobson, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1350–1357; d) T. Konno, K. Murata, K. Nagayama, *FEBS Lett.* **1999**, *454*, 122–126; e) M. Fandrich, M. A. Fletcher, C. M. Dobson, *Nature* **2001**, *410*, 165–166.
- [8] M. S. Goldberg, P. T. Lansbury, Jr., *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, E115–E119.
- [9] A. Wang, D. W. Bolen, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9101–9108; I. Baskakov, D. W. Bolen, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4831–4834; P. H. Yancey, J. F. Siebenaller, *J. Exp. Biol.* **1999**, *24*, 3597–2603; E. Gazit, R. T. Sauer, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2652–2657; J. A. Burrows, L. K. Willis, D. H. Perlmuter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1796–1801.
- [10] D. S. Yang, C. M. Yip, T. H. Huang, A. Chakrabartty, P. E. Fraser, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32970–32974.