

## Proteinfaltung

# Regulation der Chaperonaktivität im endoplasmatischen Retikulum

STEFFEN PREISSLER

CAMBRIDGE INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, UK

**Maintenance of protein homeostasis depends on cellular stress response pathways that mediate adaptive changes in gene expression. In the endoplasmic reticulum additional mechanisms adjust the availability of the abundant Hsp70-type chaperone, BiP, during short-term fluctuations in the unfolded protein load. Here, recent insights into the regulation of BiP by incorporation into inactive oligomers and reversible AMPylation are discussed.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1455-6  
© Der Autor 2020

■ Etwa ein Drittel der im Genom eukaryotischer Zellen codierten Proteine wird sekretiert oder in Membranen eingebaut. Die meisten dieser Proteine werden bereits während ihrer Synthese zu einem spezialisierten Organell, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), transportiert. Dort falten sekretorische Proteine in ihre native Struktur und werden ggf. in größere Komplexe eingebaut bevor sie zu ihren Zielorten weitertransportiert werden. Zudem finden ER-spezifische Maturierungsprozesse, wie *N*-Glykosylierung und die Bildung von Disulfidbindungen, statt. Die Faltung neu-synthetisierter Proteine ist der stör anfälligste Schritt der Genexpression und eine große Herausforderung für Zellen. Daher ist das ER mit einem stringenten Qualitätskontrollsystem ausgestattet, das die korrekte Faltung von Proteinen begünstigt und den Abbau fehlgefalteter Proteine einleitet, bevor sie das ER verlassen. Störungen in diesen Prozessen können zelluläre Funktionen beeinträchtigen und stehen im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Krankheiten [1].

### Proteinhomöostase im ER

Molekulare Chaperone sind Proteine, die mit anderen entfalten oder fehlgefalteten Proteinen interagieren und somit deren Aggregation verhindern. Dadurch spielen Chaperone eine zentrale Rolle in der Proteinqualitätskontrolle (PQ) und tragen entscheidend zur zellulären Faltungskapazität bei. Um die

zelluläre Proteinhomöostase zu wahren, müssen sich Chaperone und ihre Substrate stets im Gleichgewicht zueinander befinden. Ein Überschuss an entfaltenen Proteinen führt zu zellschädigendem Faltungsstress. Wenn sich die Konzentration entfalteter Proteine ändert, muss daher die Faltungskapazität entsprechend angepasst werden.

Faltungsstress kann u. a. durch oxidative Veränderungen von Proteinen, Hitze oder Mutationen verursacht werden. Eine Änderung des Chaperonbedarfs tritt aber auch dann auf, wenn sich die Proteinsyntheserate ändert. Zelluläre Signalwege erhöhen daher bei Anhäufung entfalteter Proteine die Expression von Chaperonen, um die Balance zwischen Chaperonen und Substraten wiederherzustellen. Im Fall des ER übernimmt diese Aufgabe der *unfolded protein response* (UPR) [2]. Für sekretorische Zelltypen vielzelliger Organismen ist die dynamische Anpassung der Faltungskapazität im ER von besonderer Bedeutung, da diese großen physiologischen Schwankungen der Proteinsynthese unterliegen. Dies betrifft v. a. Zellen des Immun- und Nervensystems sowie der Drüsengewebe.

### Das ER-Chaperon BiP

BiP (*immunoglobulin heavy-chain binding protein*) ist eines der wichtigsten Chaperone im ER. Es liegt dort bereits unter normalen Bedingungen in hoher Konzentration vor, die bei anhaltendem Faltungsstress sogar weiter

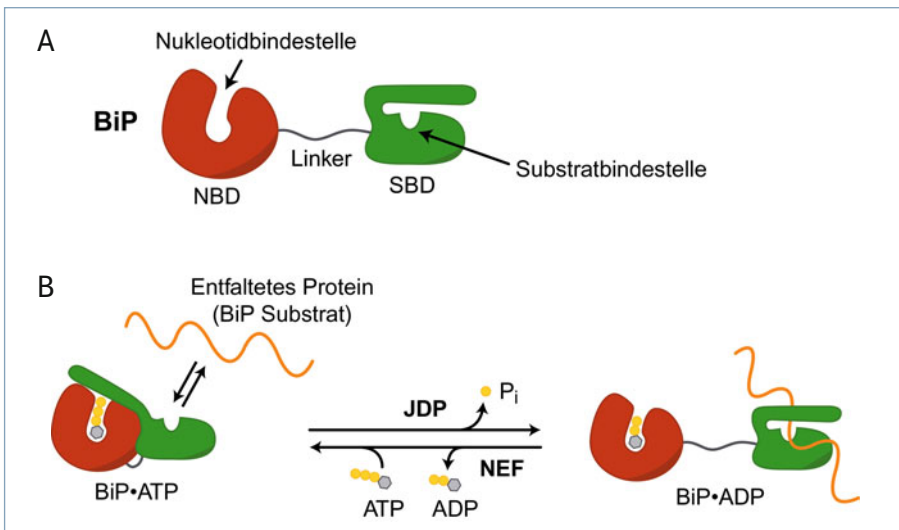
ansteigt. Neben der klassischen Chaperonfunktion hat BiP eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des UPR und ist somit essenziell für die Proteinhomöostase im ER.

BiP gehört zur Familie der Hsp70-Chaperone und besteht aus einer Nukleotidbindedomäne (NBD) sowie einer Substratbindedomäne (SBD). Beide sind über ein Linkerpeptid miteinander verbunden (**Abb. 1A**). Die Interaktion zwischen BiP und seinen Substraten ist hoch dynamisch und wird allosterisch reguliert. Dabei gehen aufeinander folgende Zyklen von Adenosintriphosphat(ATP)-Bindung und -Hydrolyse mit großen Konformationsänderungen in BiP einher. Im ATP-gebundenen Zustand hat BiP eine geringe Affinität für Substrate, wohingegen die ATP-Hydrolyse zu starker Substratbindung führt. Des Weiteren beeinflussen Kofaktoren einzelne Schritte des Zyklus: J-Domänenproteine rekrutieren Substrate und stimulieren die ATP-Hydrolyserate von BiP, während Nukleotidaustauschfaktoren die Dissoziation von Adenosindiphosphat (ADP) beschleunigen (**Abb. 1B**).

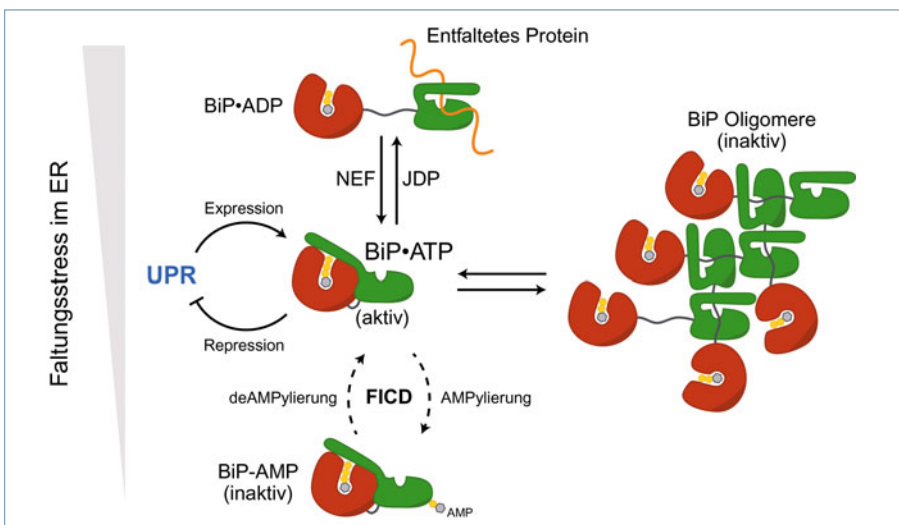
Zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase muss BiP im richtigen stöchiometrischen Verhältnis zu seinen Substraten vorliegen. Eine Überproduktion von BiP beeinträchtigt beispielsweise die Sekretion einiger Proteine sowie die Aktivierung des UPR. Eine grundlegende Frage ist deshalb, wie die Verfügbarkeit von aktivem BiP effizient an sich rasch ändernde Proteinsyntheseraten und Substratkonzentrationen angepasst werden kann. Eine Regulation ausschließlich durch Produktion und Abbau von BiP scheint zu langsam, um eine effektive Anpassung an kurzzeitige Veränderungen zu gewährleisten. Interessanterweise wurden kürzlich Mechanismen beschrieben, welche die Aktivität von vorhandenem BiP regulieren: Oligomerisierung und AMPylierung.

### Die Oligomerisierung von BiP

Seit langem wird bereits beobachtet, dass gereinigtes BiP homotypische Komplexe, also Oligomere, bildet, deren molekulare Architektur und physiologische Relevanz jedoch lange



▲ **Abb. 1:** Aufbau und nukleotidabhängige Konformationen von BiP. **A**, BiP besteht aus einer Nukleotidbindedomäne (NBD) und einer Substratbindedomäne (SBD), welche über ein Linkerpeptid miteinander verbunden sind. **B**, Im ATP-gebundenen Zustand besitzt BiP geringe Substratbindungaffinität. ATP-Hydrolyse zu ADP und Orthophosphat ( $P_i$ ), welche durch J-Domänenproteine (JDP) stimuliert werden kann, verursacht eine Konformationsänderung und führt zu verstärkter Substratbindung. Der Austausch von ADP zu ATP hat den entgegengesetzten Effekt und wird durch Nukleotidaustauschfaktoren (NEF) beschleunigt.



▲ **Abb. 2:** Posttranslationale Regulation von BiP. Bei Faltungstress im ER häufen sich entfaltete Substratproteine an, welche direkt mit Oligomerisierung um freies, ATP-gebundenes BiP konkurrieren. Ebenso konkurrieren entfaltete Proteine mit der Bindung von BiP an UPR-Signalmoleküle, was zu deren Aktivierung bei Faltungstress beiträgt. Bei sinkendem Stressniveau wird überschüssiges BiP durch FICD-abhängige, reversible AMPylierung (BiP-AMP) inaktiviert. J-Domänenproteine (JDP) und Nukleotidaustauschfaktoren (NEF) tragen zur dynamischen Interaktion von BiP mit seinen Substraten bei.

unklar blieb. Neue biochemische Analysen zeigten nun, dass diese Oligomere auf Substratinteraktionen zwischen einzelnen BiP-Proteinen beruhen, wobei die SBD eines BiP-Moleküls die Linkerregion eines benachbarten Moleküls bindet (**Abb. 2**, [3]). Dadurch sind die meisten Substratbindestellen innerhalb der Oligomere belegt. Aufgrund dieser

Eigenschaft steht Oligomerisierung von BiP in direkter Konkurrenz mit Substratbindung. Diese Art der Speicherung von überschüssigem BiP kann somit hinderliche Interaktionen mit neu synthetisierten und korrekt gefalteten Proteinen verhindern. Erhöht sich hingegen der Chaperonbedarf, steht BiP umgehend für die Interaktion mit konkurrierenden Substra-

ten zur Verfügung. Entsprechend konnten BiP-Oligomere in Lysaten von Säugerzellen nachgewiesen werden, welche jedoch verschwanden, wenn kurz vor der Lyse Faltungstress im ER induziert wurde [3].

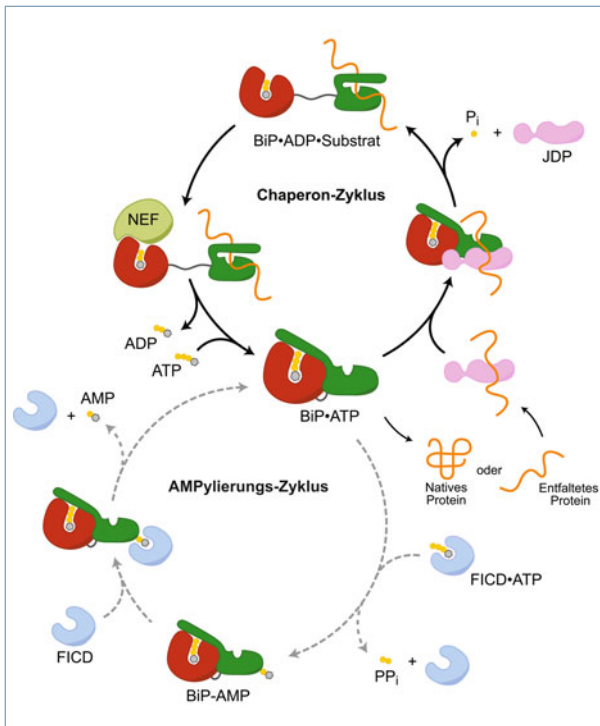
### Die AMPylierung von BiP

BiP wird unter bestimmten Bedingungen kovalent modifiziert. Frühe Zellkulturstudien legten den Schluss nahe, dass es sich dabei um ADP-Ribosylierung handelt. Dies konnte jedoch über Jahrzehnte hinweg nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Einiges deutete aber darauf hin, dass BiP durch die Modifikation inaktiviert wird: Die Modifikation tritt verstärkt auf, wenn die Proteinsynthese abnimmt und die Konzentration der BiP-Substrate sinkt. Umgekehrt verschwindet sie rasch bei Faltungstress.

Jüngste Studien fanden nun heraus, dass FICD, ein im ER lokalisiertes Enzym, Adenosinmonophosphat (AMP) auf BiP übertragen kann (**Abb. 2** und **3**, [4, 5]). Dies geschieht unter Verwendung von ATP. Die daraus entstehende Modifikation wird AMPylierung genannt und ähnelt chemisch der ADP-Ribosylierung.

Fic-Adenylyltransferasen gehören zu einer Familie von AMPylierenden Enzymen, die bislang hauptsächlich in pathogenen Bakterien untersucht wurden. FICD ist der einzige eukaryotische Vertreter aus dieser Familie und kommt nur in höher entwickelten Metazoen vor. Deletion des *FICD*-Gens in Säugerzellen führt zum vollständigen Verlust nachweisbarer BiP-Modifikation, was nahelegt, dass AMPylierung die quantitativ wichtigste Modifikation von BiP ist [6]. Weitere biochemische und strukturelle Analysen zeigten, dass BiP an einer einzigen Aminosäure in der SBD (Threonin 518) AMPyliert wird. Dadurch wird BiP allosterisch in einer Konformation festgehalten, die dem ATP-gebundenen Zustand ähnelt, was die Anregung der ATP-Hydrolyse durch J-Domänenproteine verhindert und den Chaperonzyklus blockiert [7, 8]. Diese Eigenschaften erklären, warum modifiziertes BiP nur eine geringe Affinität für Substrate besitzt.

Erstaunlicherweise kann FICD die AMPylierung von BiP auch rückgängig machen, wobei AMP hydrolytisch abgespalten wird (deAMPylierung) und BiP seine vollständige Funktionsfähigkeit wiedererlangt (**Abb. 3**, [9]). Damit ist FICD ein seltenes Beispiel für ein Enzym, welches mittels eines einzigen aktiven Zentrums eine chemische Gruppe an ein Zielprotein sowohl kovalent anbringen



◀ **Abb. 3:** Der Chaperon- und AMPylierungs-Zyklus von BiP. Die Interaktion von BiP mit entfaltenen Substraten wird von einem ATP-bindungs- und -hydrolyseabhängigen Zyklus bestimmt, der durch Nucleotid austauschfaktoren (NEF) und J-Domänenproteine (JDP), welche selbst auch Substrate binden und BiP zuführen können, beeinflusst wird. Bei niedriger Substratkonzentration akkumuliert ATP-gebundenes BiP, das durch FICD unter Verwendung von ATP und Bildung von Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) AMPyliert und inaktiviert wird (BiP-AMP). Bei steigendem Chaperonbedarf wird BiP-AMP von FICD durch hydrolytischer Abspaltung von AMP reaktiviert und wieder für den Chaperonzyklus bereitgestellt.

als auch entfernen kann. Tatsächlich besitzt FICD im Grundzustand fast ausschließlich deAMPylierungsaktivität. Das heißt, wenn der Chaperonbedarf im ER sinkt, muss FICD in den AMPylierungsmodus umschalten, um überschüssiges BiP zu inaktivieren. Wenn der Chaperonbedarf hingegen wieder ansteigt, scheint die Grundaktivität von FICD zu dominieren, was die Konzentration von aktivem BiP durch deAMPylierung erhöht. Wie die entgegengesetzten Aktivitäten von FICD an das Stressniveau im ER gekoppelt sind, ist bislang unbekannt.

### Perspektiven

Die neuen Befunde haben unser Verständnis von der Regulation der Faltungskapazität im ER maßgeblich erweitert. Demnach spielt die UPR-abhängige Anpassung der Chaperonexpression eine zentrale Rolle bei langfristiger Änderung des Chaperonbedarfs, z. B. während der Zelldifferenzierung oder bei anhaltendem Faltungsstress. Posttranslationale

Mechanismen hingegen erlauben eine schnellere Anpassung an kurzzeitige Schwankungen in der Konzentration entfalteter Proteine. Möglicherweise ist dies im ER vielzelliger Organismen besonders wichtig, um bei periodisch wiederkehrenden Änderungen der Proteinsyntheserate eine effiziente Sekretion zu gewährleisten. Es bleiben jedoch viele Fragen offen. Beispielsweise ist unklar, ob BiP noch auf anderer Ebene reguliert wird und wie die einzelnen Steuermechanismen in verschiedenen Zelltypen zusammenspielen. Zudem ist FICD aufgrund seiner besonderen enzymatischen Eigenschaften und Spezifität für BiP ein interessantes Zielprotein, um die Proteinhomeostase im ER pharmakologisch zu beeinflussen. Grundsätzlich könnte die gezielte Manipulation der Chaperonaktivität helfen, der altersbedingten Beeinträchtigung der Proteinfaltung und den damit verbundenen Erkrankungen entgegenzuwirken. ■

### Literatur

- [1] Wang M, Kaufman RJ (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529:326–335
- [2] Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334:1081–1086
- [3] Preissler S, Chambers JE, Crespillo-Casado A et al. (2015) Physiological modulation of BiP activity by trans-protonomer engagement of the interdomain linker. *Elife* 4:e08961
- [4] Ham H, Woolery AR, Tracy C et al. (2014) Unfolded protein response-regulated Drosophila Fic (dFic) protein reversibly AMPylates BiP chaperone during endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem* 289:36059–36069
- [5] Sanyal A, Chen AJ, Nakayasu ES et al. (2015) A novel link between Fic (filamentation induced by cAMP)-mediated adenylation/AMPylation and the unfolded protein response. *J Biol Chem* 290:8482–8499
- [6] Preissler S, Rato C, Chen R et al. (2015) AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *Elife* 4:e12621
- [7] Preissler S, Rohland L, Yan Y et al. (2017) AMPylation targets the rate-limiting step of BiP's ATPase cycle for its functional inactivation. *Elife* 6: e29428
- [8] Wieteska L, Shahidi S, Zhuravleva A (2017) Allosteric fine-tuning of the conformational equilibrium poises the chaperone BiP for post-translational regulation. *Elife* 6:e29430
- [9] Preissler S, Rato C, Perera LA et al. (2017) FICD acts bifunctionally to AMPylate and de-AMPylation the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nat Struct Mol Biol* 24:23–29

**Open Access** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse

Dr. Steffen Preissler  
Cambridge Institute for Medical Research  
University of Cambridge  
The Keith Peters Building  
Cambridge CB2 0XY, UK  
sp693@cam.ac.uk

### AUTOR



#### Steffen Preissler

2001–2006 Biologiestudium an der Universität Heidelberg. 2007–2012 Promotion an der Universität Konstanz. Seit 2013 Research Associate im Labor von Prof. Dr. D. Ron in Cambridge, UK.