

Christian Münch: Dem Stress der Zelle auf der Spur

„Generell fragen wir uns, wie reagiert eine Zelle, wenn sie Stress erfährt?“

Wenn es im Leben so einfach zuginge wie in einem Reagenzglas, wäre Christian Münchs Karriere anders verlaufen. Denn *in vitro* hatte Christian Anfinsen schon Ende der 1950er Jahre nachgewiesen, dass sich die dreidimensionale Form, in die sich ein Protein falten muss, damit es seine Funktion erfüllen kann, eindeutig aus der Reihenfolge seiner Aminosäuren ergibt - eine Leistung, für die er 1972 mit einem Chemienobelpreis ausgezeichnet wurde. In einer lebendigen Zelle, in der sich Moleküle aller Art in äußerster Enge drängen, ist diese Eindeutigkeit aber nur unter dem Schutz molekularer Anstandsdamen zu verwirklichen. Diese Chaperone sind dafür da, Fehlfaltungen zu verhindern. Sie machen mehrere Prozent aller intrazellulären Proteine aus und sind so zahlreich, dass alle anderen Proteine in ihnen wie in einer dicken Suppe schwimmen.

Anstandsdamen für junge Proteine

Der massenhafte Einsatz von Chaperonen ist lebenswichtig, weil neugeborene Proteine ohne deren Hilfe schnell auf Irrwege geraten oder ungeschützten Attacken ausgesetzt sind. Ein Protein entsteht in minutenlanger Produktion in einem Ribosom. Taucht es als nur leicht vorgefaltete Aminosäurenkette aus dessen Ausgangstunnel in das wässrige Milieu des Zellplasmas ein, muss es blitzartig seine korrekte räumliche Gestalt finden, wenn es für den Einsatz im Zellplasma bestimmt ist. Wenn es für andere Einsatzorte vorgesehen ist, wird es weitgehend ungefaltete in das Tunnelsystem des Endoplasmatischen Reticulums (ER) importiert oder zu einem Mitochondrium eskortiert, um dort endgültig gefaltet zu werden. Das Milieu der Zelle ist einem ungefalteten Protein gefährlich, weil die Hälfte aller natürlichen Aminosäuren wasserabweisende Seitengruppen hat. Werden diese während des Faltungsprozesses nicht zügig im Inneren des Proteins verborgen, dann verklumpen sie wie Fetttropfen miteinander oder mit den hydrophoben Gruppen anderer entstehender Proteine. Viele Chaperone wachen deshalb schon direkt am Ribosom. Sie schirmen den hydrophoben Teil eines neuen Proteins so lange ab, bis er sich nach

innen falten kann. Das tun sie in einem wiederholten Zyklus des Anpackens und Loslassens, bis das ganze Protein korrekt gefaltet ist. Andere Chaperone haben die Form eines Fasses, in dessen Lumen ein Protein sich ungestört falten kann. Diese Faltung ist keine chemische Reaktion, sondern vollzieht sich durch die Ausbildung zahlreicher nichtkovalenter Bindungen wie zum Beispiel von Wasserstoffbrücken. Jedes Protein sollte auf dem Weg dieser Faltung einen Zustand möglichst geringer freier Energie erreichen. Auch dabei helfen die Chaperone. Denn in der thermodynamischen Landschaft, die ein junges Protein wie durch einen Trichter abnehmender Energie dorthin führt, gibt es Abgründe und Sackgassen, aus denen es allein nicht mehr herauskäme.

Geprägt vom Münchner Dreigestirn

Münchs Begeisterung für die Proteinfaltung im Allgemeinen und für die Vorgänge im Mitochondrium im Besonderen wurde in München geweckt. Er studierte das Fach Biochemie zwar in Tübingen, aber sein Curriculum gab ihm die Chance zu einem einjährigen Forschungsaufenthalt in München, wo er im Rotationsverfahren sechs verschiedene Labore kennenlernte - darunter die von Walter Neupert, Franz-Ulrich Hartl und Stefan Jentsch. Die Begegnung mit diesem Dreigestirn wurde prägend für seinen wissenschaftlichen Werdegang. Neupert war ein weltweit herausragender Spezialist für Mitochondrien, deren Bedeutung als metabolische Zentren man kaum gerecht wird, wenn man sie nur als Kraftwerke der Zelle bezeichnet. Zu seinen großen Entdeckungen gehörte, dass Mitochondrien Proteine nach deren Herstellung ungefaltet importieren. Ende der 1980er Jahre brachte er in seinem Labor Arthur Horwich, den er auf einer Konferenz kennengelernt hatte, und seinen Post-Doc Franz-Ulrich Hartl zusammen - und beide erbrachten dem Anfinsen-Dogma zum Trotz den Beweis, dass das Enzym Ornithin-Trancarbamylase sich im Mitochondrium nur in Gegenwart eines molekularen Helfers falten kann. Damit hatten sie das erste Chaperon entdeckt und das neue Forschungsgebiet der Proteostase begründet, das sich mit der Dynamik des Proteingleichgewichtes und dessen Auswirkungen auf Gesundheit und Krankheit beschäftigt. Welcher Mechanismen der Qualitätskontrolle sich Zellen dabei bedienen, erforschte Stefan Jentsch. Er fand beispielsweise heraus, dass und wie ungefaltete Proteine aus dem ER exportiert und im Zytoplasma der Entsorgung zugeführt werden.

Fast wie ein Prion

„Neurodegenerative Krankheiten werden hauptsächlich durch Proteinmissfaltung verursacht“, sagt Christian Münch. „Auch deshalb wählte ich nach dem Diplom in

Tübingen ein Thema aus diesem Bereich für meine Doktorarbeit.“ Er wechselte ans berühmte MRC Laboratory of Molecular Biology im englischen Cambridge, um bei Anne Bartolotti über einen besonderen Aspekt der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) zu promovieren. Er erforschte das Verhalten des Enzyms SOD1, von dem bekannt war, dass seine Missfaltung ein zentraler Auslöser der pathogenen Kaskade ist, die zum Ausbruch familiärer ALS-Formen führt. Münch konnte nachweisen, dass das missgefaltete SOD1 seine mutierte Form lawinenartig schnell verbreitet, sich also wie ein Prion verhält, ein infektiöses Protein, das Veränderungen anderer Proteine induziert. Das sei damals „eine revolutionäre Zeit“ gewesen, erinnert sich Münch, weil in kurzem Abstand ähnliche Befunde zu verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen publiziert worden seien. „Mein Paper ist viele hundert Mal zitiert worden.“¹ 2011 wurde Münch dafür mit dem Postgraduate Prize der British Neuroscience Association ausgezeichnet.

Eine doppelte Antwort

Ausgestattet mit einem Stipendium der European Molecular Biology Organization schloss sich Münch im Mai 2012 der Gruppe von Wade Harper an der Harvard Medical School an. Den Schwerpunkt seiner Forschung legte er dort auf die spezielle mitochondriale Antwort auf missgefaltete Proteine, den *mitochondrial unfolded protein response* (UPR^{mt}). Dass lebende Zellen auf den Stress einer gefährlich hohen Menge un- oder missgefalteter Proteine überhaupt mit einer Antwort reagieren, um die Proteostase wieder herzustellen, war in den 1990er Jahren entdeckt worden, zuerst in Bezug auf das ER, in dem alle für den Export und für die Verankerung in der Zellmembran bestimmten Proteine gefaltet werden, dann für das Cytoplasma und für die Mitochondrien, die in ihrem Inneren wie das ER über eigene Chaperone verfügen. Prinzipiell soll diese Antwort stets zweierlei bewirken, nämlich die Produktion von Chaperonen erhöhen und die Produktion anderer Proteine vorübergehend drosseln. Schlagartig kann so das Angebot an Faltungshelfern steigen und die Nachfrage nach Faltung sinken. Aus dem ER und aus dem Cytoplasma wird diese doppelte Antwort nach einer Reaktion spezieller Signalmoleküle mit entsprechenden Transkriptionsfaktoren der DNA im Zellkern übermittelt. Das konnte bis Anfang der 2010er Jahre auch deshalb im Detail ausgearbeitet werden, weil es für Säugetierzellkulturen gute Reagenzien gab, mit denen ER-Stress im Labor ausgelöst werden konnte. Für Mitochondrien gab es solche hochspezifischen Reagenzien bis dahin nicht. Weil es von einer Doppelmembran umgeben ist, kann das Mitochondrium seinen UPR auch nicht so einfach mit Hilfe von Signalproteinen in den Zellkern schicken wie das ER. Dessen UPR zu erforschen, war für die Wissenschaft zudem

besonders attraktiv, weil sich früh zeigte, dass Krankheiten wie Diabetes eindeutig mit ER-Stress zusammenhängen. Mitochondrien seien dagegen eher stiefmütterlich behandelt worden, meint Münch. „Nur bestimmte Teile von ihnen, wie die Atmungskette, wurden stark untersucht, andere Teile fast gar nicht.“ Dabei seien Mitochondrien doch bei den allermeisten Erkrankungen dysfunktional und letzten Endes auch diejenigen Organellen, die den programmierten Zelltod auslösten.

Extreme Zustände im Mitochondrium

Als Christian Münch seine Arbeit in Wade Harpers Labor aufnahm, war der UPR^{mt} im Gegensatz zu seinen Pendanten aus dem ER und dem Cytoplasma jedenfalls erst im Fadenwurm *C. elegans*, nicht aber in Säugetierzellen vollständig beschrieben worden, wo die Situation deutlich komplexer ist. Mitochondrien haben ein eigenes Genom, das aus 16.600 Basenbuchstaben besteht, und vor allem für die 13 Proteine codiert, die für den Elektronentransport in der Atmungskette essentiell sind. Insgesamt sind aber rund 1500 Proteine im Mitochondrium aktiv, gut 99 Prozent davon müssen also importiert werden. „Diese Proteine sind in der mitochondrialen Matrix von extremst vielen hochreaktiven Molekülen umgeben, die sie permanent schädigen“, sagt Münch. Mitochondrien könnten Proteine deshalb wohl tatsächlich robuster falten und erhalten als andere Zellkompartimente. Dennoch kommt es in ihnen häufig zu jenem Ungleichgewicht zwischen richtig und falsch oder gar nicht gefalteten Proteinen, das den UPR^{mt} auslöst. Wenn man diesen speziellen UPR in Zellkulturen untersuchen will, dann braucht man eine Substanz, die ihn ausschließlich in Mitochondrien auslöst, und nicht gleichzeitig die sehr ähnlichen Chaperone im ER und anderswo hemmt. Und man muss seine anschließenden Messungen sehr schnell ausführen, weil die direkten Effekte eines UPR schon bald von kompensatorischen Effekten überlagert werden.

Exzellenter Alleingang in Harvard

Beide Herausforderungen bewältigte Münch in Boston. „Er hat im Alleingang neue Werkzeuge entwickelt, um den mitoUPR zu erforschen, und dabei mehrere Entdeckungen gemacht“, lobte Harper seinen Post-Doc, nachdem dieser 2016 als Gruppenleiter ans Institut für Biochemie II des Fachbereichs Medizin der Frankfurter Goethe-Universität gewechselt war. Im selben Jahr erschien in *Nature* ein Paper, das nur Münch und Harper gezeichnet hatten. Solche Zwei-Autoren-Artikel sind sehr selten: Denn sie zeigen, dass alle darin beschriebenen Experimente vom Erstautor allein unternommen wurden. In ein mitochondrienspezifisches Werkzeug hatte Münch einen aus der Krebsforschung stammenden Inhibitor des Chaperons HSP90 verwandelt. „Mitochondrien importieren Proteine über einen Protonengradienten in

der Membran“, sagt er. „Also habe ich den Inhibitor mit einem stark positiv geladenen Molekül gekoppelt, so dass es sich in Mitochondrien tausendmal mehr anreichert als im Rest der Zelle.“ Dank dieses Tricks konnte er in ausgefeilten Analysen des Transkriptoms und Proteoms nicht nur molekulare Botschaften abfangen, die das Mitochondrium im Notfall an den Zellkern schickt, sondern auch einen bisher unbekanntem Signalweg des UPR^{mt} entdecken, über den die Translation eigener Gene des Mitochondriums rapide und reversibel inhibiert wird, um „Faltungslast“ von ihm zu nehmen. ²

Meister der Massenspektroskopie

Methodisch avancierte Münch dabei zum Experten für quantitative Proteomik mit Massenspektrometern. In Frankfurt baute er diese Kompetenz mehr und mehr aus. „Wir können acht- bis zehntausend verschiedene Proteine gleichzeitig anschauen, im Grunde alle Proteinarten einer Zelle.“ Dafür müssen die Proteine der abgetöteten Zelle entnommen, zu Peptidbruchstücken verdaut und aufgereinigt werden, bevor sie in einen Elektrospray gehüllt in das Spektrometer hineingeschossen und basierend auf physikalischen Parametern differenziert ausgelesen werden. „Mit den neuesten Geräten können wir sogar 18 verschiedene Proben gleichzeitig einschließen und messen.“ So entsteht aus der Analyse einer Zellkultur eine Abfolge von Momentaufnahmen, aus denen sich der Zeitverlauf der Proteinproduktion während eines UPR^{mt} nachvollziehen lässt. So können auch „Lauschangriffe“ auf Signalkaskaden gelingen, werden Signale doch vorwiegend über Phosphorylierungen weitergegeben, die massenspektroskopisch detektierbar sind. Das gilt auch für Ubiquitinierungen, die Proteine für den Abbau markieren.

Ein solcher Abbau ist das Mittel letzter Wahl, wenn sich ein Protein durch einen UPR nicht mehr retten lässt. „Dann ist die Sache erledigt, so ist der Lebenszyklus“, sagt Münch und weist darauf hin, dass sich in jeder gesunden Zelle ein beständiges Wechselspiel zwischen Missfaltungstress und UPR vollzieht. Jeder UPR ist primär protektiv. Erst wenn der Proteinmüll überhandnimmt, wendet er sich ins Destruktive. Dann sorgt er nicht nur für die Entsorgung von Proteinen, sondern im Falle des UPR^{mt} für die Vernichtung des betroffenen Mitochondriums oder gar für den programmierten Zelltod. Die „Kippunkte“ zwischen diesen Stadien zu verstehen, ist eines der Hauptanliegen von Christian Münch. „Das ist hochrelevant für neurodegenerative Erkrankungen wie auch für Alterungsprozesse.“

Der mitoUPR bleibt Mittelpunkt

Weil sein Labor im Universitätsklinikum liegt, ist Münchs Grundlagenforschung eng mit der medizinischen Praxis verbunden und kann auch auf Zellproben von Patienten zurückgreifen. „Wir wollen wissen, bei welchen Krankheiten der mitoUPR vorkommt und durch welche Biomarker man ihn eventuell erkennen kann“, sagt Münch. „Generell fragen wir uns, wie reagiert eine Zelle, wenn sie Stress erfährt?“ Dazu können auch Stress durch Sauerstoffmangel oder aggressive Sauerstoffradikale zählen. „Der mitoUPR ist aber immer unser Fokus.“ Wie wichtig dessen Verständnis ist, belegt neben dem Life Sciences Bridge Award der Aventis Foundation vor allem Münchs millionenschwere Förderung durch das European Research Council, deren Fortsetzung er gerade beantragt hat. Die Vorzeichen für eine Bewilligung stehen gut. Denn jüngst haben Münch und seine Gruppe das Fragezeichen aufgelöst, das bislang in ihrer Darstellung des UPR^{mt} stand. „Wir haben den unbekanntesten Faktor in der Signalkette vom Mitochondrium zum Zellkern entdeckt.“

Author: Joachim Pietzsch, Wissenswort

¹ Münch C, O'Brien J, & Bertolotti A. 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *PNAS*, 108(9):3548-53.

² Münch C & Harper J W. 2016. Mitochondrial unfolded protein response controls matrix pre-RNA processing and translation. *Nature*, 534, 710-3.