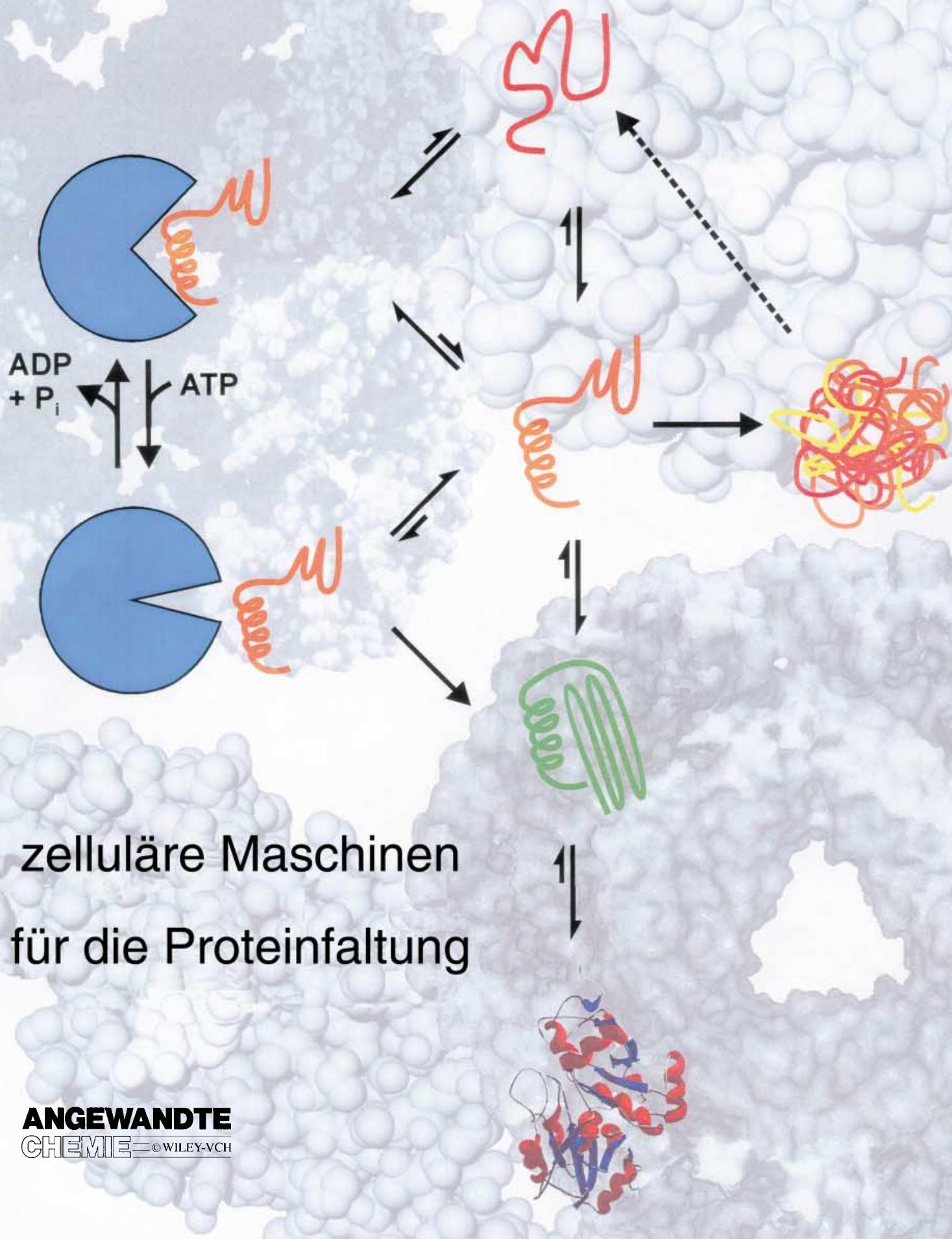


Molekulare Chaperone



Molekulare Chaperone: zelluläre Maschinen für die Proteinfaltung

Stefan Walter und Johannes Buchner*

Proteine sind lineare Polymere, die von den Ribosomen aus aktivierten Aminosäuren synthetisiert werden. Das Produkt dieses Biosyntheseprozesses ist eine Polypeptidkette, die anschließend in ihre individuelle dreidimensionale Struktur falten muss, die sie zur Ausübung ihrer zellulären Funktion befähigt. Christian Anfinsen konnte zeigen, dass dieser Faltungsprozess keine zusätzlichen Faktoren und keine Energiezufuhr benötigt und somit autonom ist. Im Jahre 1972 wurde ihm für diese Leistung der Nobelpreis für Chemie zuerkannt. Ausgehend von In-vitro-Experimenten mit gereinigten Proteinen glaubte man lange, dass sich auch in der lebenden

Zelle die richtige Raumstruktur spontan bildet, sobald die neu synthetisierte Proteinkette das Ribosom verlässt. Darüber hinaus dachte man, dass Proteine ihre gefaltete (native) Konformation beibehalten, bis sie schließlich von speziellen Enzymen abgebaut werden. In den letzten zehn Jahren hat sich diese Sichtweise der zellulären Proteinfaltung stark geändert. Heute weiß man, dass eine Zelle über komplexe und hoch entwickelte Proteinmaschinen verfügt, die die Proteinfaltung unterstützen und die strukturelle Integrität von Proteinen unter Bedingungen aufrechterhalten, unter denen diese zu entfalten und zu aggregieren drohen. Diese Proteinmaschinen be-

zeichnet man als molekulare Chaperone, da sie, wie ihre menschlichen Pendants, unerwünschte Kontakte zwischen ihren „Schützlingen“ verhindern. In diesem Aufsatz sollen die wichtigsten Eigenschaften dieser Klasse von Proteinen vorgestellt und an ausgewählten Beispielen die Struktur-Funktions-Beziehungen sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen erläutert werden.

Stichwörter: Chaperonproteine • Proteinaggregation • Proteinfaltung • Proteinstrukturen • Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

1. Proteinfaltung und molekulare Chaperone

In vitro können unter jeweils optimierten Bedingungen viele Proteine mit guten Ausbeuten in ihre native Struktur zurückgefaltet werden. In einer lebenden Zelle dagegen sind die Reaktionsbedingungen für alle Proteine gleich. Hohe Proteinkonzentrationen und Temperaturen fördern vor allem die Proteinaggregation, eine unerwünschte Nebenreaktion, die mit der produktiven Faltung konkurriert.^[1, 2]

Im Gegensatz zum „assembly“, bei dem mehrere Polypeptidketten einen definierten, funktionalen Komplex bilden, versteht man unter Aggregation die ungeordnete, unspezifische Assoziation von Polypeptiden, bei der heterogene Proteinpartikel ohne biologische Aktivität entstehen. Angesichts der Energiemenge, die eine Zelle in die Synthese eines neuen Proteins investieren muss, überrascht es nicht, dass sich Strategien herausgebildet haben, die die produktive Faltung

eines Proteins in seine aktive Konformation unterstützen. Während der molekularen Evolution wurden Polypeptidsequenzen vermutlich nicht nur aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften selektiert, sondern auch danach, ob sie produktiv falten können. Zur Vergrößerung des zugänglichen Konformationsraums entwickelten Zellen molekulare Chaperone, eine Gruppe von Proteinen, die an entfaltete Polypeptide binden, ihre Aggregation verhindern und – unter Energieverbrauch – die produktive Faltung unterstützen.^[3, 4]

1.1. In-vitro-Proteinfaltung

Die Übertragung der Erbinformation von der DNA zur mRNA und weiter von der mRNA zum Polypeptid erfolgt nach den Prinzipien der molekularen Komplementarität und des genetischen Codes. Dabei wird eine lineare Abfolge von Basentriplets in eine lineare Abfolge von Aminosäuren überführt. Im abschließenden Schritt des Prozesses vom Gen zum funktionalen Protein, der Proteinfaltung, wird diese lineare Information (Aminosäuresequenz) in eine räumliche Information (gefaltete Proteinstruktur) umgewandelt. Diese

[*] Prof. Dr. J. Buchner, Dr. S. Walter

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49)89-289-13345
E-mail: johannes.buchner@ch.tum.de

Faltungsreaktion ist ein äußerst komplexer Vorgang. Obwohl man in den vergangenen Jahrzehnten viel über die dem Faltungsprozess zugrunde liegenden physikalischen Prinzipien gelernt hat,^[5–8] sind wir noch immer nicht in der Lage präzise vorherzusagen, in welche Struktur ein gegebenes Polypeptid falten wird.

Die Untersuchung der Proteinfaltung begann in den 60er Jahren mit den bahnbrechenden Arbeiten von Anfinsen und Mitarbeitern, die die reversible Faltung der Ribonuclease A (RNase A) untersuchten, ein in großen Mengen verfügbares, RNA-spaltendes Enzym.^[9, 10] Inkubation des Enzyms mit 8 M Harnstoff in Gegenwart eines Reduktionsmittels führte zu einem entfalteten Protein ohne Disulfidbrücken, das keinerlei enzymatische Aktivität mehr aufwies. Man nimmt an, dass dieser denaturierte Zustand von RNase A der Konformation ähnelt, die das Protein unmittelbar nach seiner Synthese am Ribosom einnimmt. Nach dem Entfernen von Denaturierungs- und Reduktionsmitteln durch Dialyse wurde eine allmähliche Rückkehr der Enzymaktivität beobachtet. Offenbar konnte das Enzym *in vitro* wieder in seine native Struktur falten. Diese Beobachtungen zeigten, dass die räumliche Struktur dieses Proteins in seiner Aminosäuresequenz festgelegt war und keine zusätzlichen Faktoren für die Strukturbildung benötigt wurden. Die Proteinfaltung ist somit ein autonomer und – unter geeigneten Bedingungen – spontaner Prozess. In den folgenden Jahren untersuchten Biochemiker das Faltungsverhalten anderer kleiner, monomerer Proteine und konnten die Schlussfolgerungen von Anfinsen bestätigen.^[11, 12] Diese Ergebnisse führten letztlich zu der Vorstellung, dass sich im Prinzip jedes Protein *in vitro* falten lässt.^[13, 14]

Auf der Energiehyperfläche der Proteinkonformation bildet der native Zustand ein (relativ scharfes) Minimum.^[5, 15]

Der denaturierte Zustand hingegen besteht aus einer Vielzahl von Konformationen mit hoher innerer Energie und Flexibilität. Während der Faltung bilden sich zahlreiche nichtkovalente Wechselwirkungen aus, die eine genaue räumliche Positionierung der einzelnen Atome eines Proteins erfordern. Unter diesen Wechselwirkungen scheint der hydrophobe Effekt eine wichtige Rolle zu spielen.^[16] Hydrophobe Moleküle neigen in einem polaren Lösungsmittel dazu, sich aus enthalpischen und entropischen Gründen zusammenzulagern. Dementsprechend finden sich hydrophobe Aminosäuren bevorzugt im Innern eines gefalteten Proteins. Als man damit begann, die Faltung größerer Proteine zu untersuchen, die aus mehreren Untereinheiten oder Domänen bestehen, zeigte sich, dass der hydrophobe Effekt nicht nur wichtig für die Stabilität der gefalteten Struktur ist, sondern dass er auch unerwünschte Folgen haben kann.^[1] Zu Beginn der Faltungsreaktion bilden viele Proteine Intermediate, die hydrophobe Oberflächen aufweisen. Die teilgefalteten Proteine können über diese hydrophoben Bereiche unspezifisch assoziieren und schließlich aggregieren. Da die Aggregation eine Reaktion zweiter oder höherer Ordnung ist, hat die Proteinkonzentration einen großen Einfluss darauf, ob Faltung in den nativen Zustand oder Aggregation überwiegt.^[17] Für ein gegebenes Protein lassen sich die Faltungsausbeuten steigern, indem man Umgebungsparameter wie Proteinkonzentration, Temperatur, pH-Wert usw. optimiert.

1.2. In-vivo-Proteinfaltung

Im Unterschied zur In-vitro-Faltung müssen in einer lebenden Zelle alle Proteine unter gleichen Bedingungen falten. Die hohe Temperatur und die hohe Konzentration an

Stefan Walter, geboren 1967 in München, studierte Biochemie an der Universität Bayreuth, wo er 1996 bei Prof. Franz X. Schmid über das Thema Proteinfaltung und -stabilität promovierte. Anschließend ging er als Postdoc an die Yale University. Im Labor von Arthur Horwich untersuchte er strukturelle Aspekte der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung. 1999 ging er zurück nach Deutschland an die Technische Universität München, wo er zurzeit am Lehrstuhl für Biotechnologie auf den Gebieten molekulare Chaperone und Prionproteine arbeitet.



S. Walter



J. Buchner

Johannes Buchner wurde 1960 in Ihrlerstein geboren. Er studierte Biologie mit Schwerpunkt Biochemie an der Universität Regensburg. Seine Doktorarbeit fertigte er im Labor von Prof. Rainer Rudolph am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie an. Thema war die Faltung rekombinanter Proteine und die Funktion molekularer Chaperone. Nach der Promotion verbrachte er einen Postdoc-Aufenthalt an den National Institutes of Health in Bethesda im Labor von Dr. Ira Pastan. Schwerpunkt der dortigen Arbeiten war die Erzeugung von Immunitoxinen für die Krebstherapie. Im Jahre 1992 übernahm er am Lehrstuhl von Prof. Rainer Jaenicke, Universität Regensburg, eine Gruppenleiterstelle und habilitierte sich 1995 für das Fach Biochemie. 1995 wurde ihm auch ein Heisenbergstipendium der DFG verliehen. 1997 erhielt er einen Ruf auf eine C4-Professur für Biochemie an der Medizinischen Hochschule Hannover und 1998 auf eine C4-Professur für Biotechnologie an der Technischen Hochschule München. Dort führt er seit Ende 1998 die Forschung an molekularen Chaperonen und biotechnologischen sowie medizinischen Aspekten der Proteinfaltung fort.

nichtnativen Proteinen innerhalb der Zelle sind zudem ungünstig für eine effiziente Faltung. Daher erscheint es zunächst überraschend, dass Zellen unter physiologischen Bedingungen keine Proteinaggregate enthalten. Für diese Beobachtung gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1) Neu synthetisierte Proteine aggregieren zwar *in vivo*, aber die Aggregate werden rasch von zellulären Proteasen entfernt. Das würde bedeuten, dass Zellen große Mengen an Energie für die Produktion von Proteinen verschwenden, die niemals den nativen Zustand erreichen. 2) Zellen haben eine Methode entwickelt, um die Aggregation von neu synthetisierten Proteinen weitgehend zu vermeiden. Erreicht wurde das durch komplexe Proteinmaschinen, die Chaperone, die in den Prozess der Proteinfaltung eingreifen und Aggregationsreaktionen verhindern. Molekulare Chaperone liefern keine sterische Information für die Faltung des Zielproteins, sondern unterdrücken vielmehr unproduktive Wechselwirkungen und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein seine native Struktur ausbilden kann.

Molekulare Chaperone findet man in allen Kompartimenten einer Zelle, in denen Proteine falten oder – allgemeiner – ihren Konformationszustand ändern. Obwohl die Proteinbiosynthese die bedeutendste Quelle für entfaltete Polypeptidketten ist, entstehen diese auch durch andere Prozesse. Bei unphysiologisch hohen Temperaturen oder in Gegenwart bestimmter Reagentien können Proteine strukturell destabilisiert werden und entfalten. Die Konsequenz wäre letztlich ein Funktionsverlust der betroffenen Proteine und eine Anreicherung von Proteinaggregaten. Die Zelle reagiert auf diese Bedingungen, indem sie erhöhte Mengen an bestimmten Schutzproteinen produziert, ein Phänomen, das als Hitzeschock- oder Stressantwort bezeichnet wird.^[18] Bei vielen dieser Schutzproteine handelt es sich um molekulare Chaperone.

1.3. Funktionale Eigenschaften molekularer Chaperone

Molekulare Chaperone bilden eine Gruppe von Proteinen mit ähnlicher Funktion. Anhand ihres Molekulargewichts lassen sich molekulare Chaperone in mehrere Klassen oder Familien einteilen. Eine Zelle kann dabei mehrere Mitglieder der gleichen Chaperonfamilie exprimieren. So produziert z. B. die Hefe *S. cerevisiae* 14 verschiedene Formen des Chaperons Hsp70 (Hitzeschockprotein 70 kDa).^[19] Proteine aus der gleichen Chaperonklasse zeigen häufig ein hohes Maß an Sequenzhomologie und sind strukturell wie funktionell eng verwandt. Dagegen bestehen zwischen Chaperonen aus unterschiedlichen Familien kaum strukturelle Ähnlichkeiten. Gemeinsam ist jedoch den meisten molekularen Chaperonen eine Reihe von funktionalen Eigenschaften.

1.3.1. Bindung an Proteine mit hydrophoben Oberflächen

Die wichtigste Eigenschaft molekularer Chaperone ist sicherlich ihre Fähigkeit, an entfaltete oder teilgefaltete Proteine zu binden (Abbildung 1). Zu Beginn des Faltungsprozesses (Abbildung 1, I_{uc}) oder bei Missfaltung sind die hydrophoben Reste eines Proteins teilweise lösungsmittel-

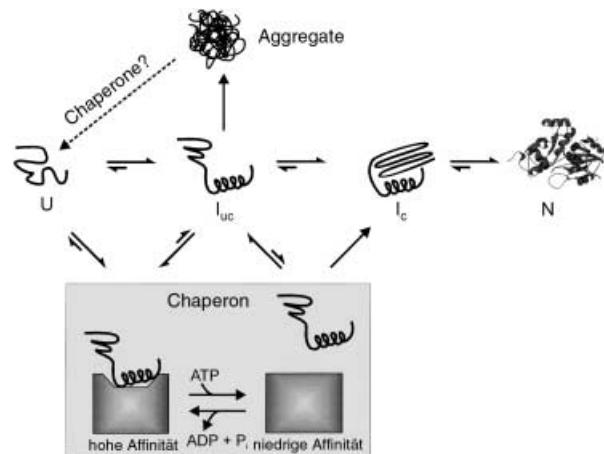


Abbildung 1. Allgemeines Modell der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung. Proteinbiosynthese und zellulärer Stress führen zur Entstehung von entfalteten Polypeptiden U. Diese Moleküle falten unter Bildung unterschiedlicher Intermediate (I_{uc} , I_c), die in zunehmendem Maße eine geordnete Struktur aufweisen, in den nativen, funktionellen Zustand N. Einige Intermediate (I_{uc}) exponieren hydrophobe Oberflächen und können daher aggregieren. Man nahm lange an, diese Reaktion sei irreversibel, aber neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass manche Chaperone die Fähigkeit haben, Aggregate zu resolubilisieren. Molekulare Chaperone unterbinden die unerwünschte Aggregation, indem sie an die Spezies I_{uc} und U binden. Diese Assoziation maskiert nicht nur die hydrophoben Bereiche auf dem gebundenen Polypeptid, sondern verringert zudem die Konzentration an aggregationsanfälligen Molekülen und verlangsamt somit die Aggregation. In vielen Fällen bewirkt eine ATP-induzierte Konformationsänderung im Chaperon die Dissoziation des gebundenen Polypeptids. Ein Teil der freigesetzten Moleküle wird einen „committed state“ I_c ausbilden, ein Zustand, in dem sie nicht länger die Unterstützung des Chaperons benötigen, während die restlichen Moleküle (I_{uc}) wieder an das Chaperon binden und an einem weiteren Zyklus teilnehmen. Je nach Art des Chaperons kann es bei der Bindung zu Konformationsänderungen im Polypeptidsubstrat kommen.

exponiert und machen es damit anfällig für Aggregation. Durch Assoziation dieser hydrophoben Proteinmoleküle mit molekularen Chaperonen wird die Aggregation inhibiert. Die geringe Spezifität der hydrophoben Wechselwirkung und die konformationelle Flexibilität der Faltungsintermediate führen dazu, dass sich Chaperone promiskuitiv verhalten. Sie können an eine Vielzahl von Polypeptiden binden, die sich in ihrer Aminosäuresequenz und Konformation stark unterscheiden. Native Proteine und auch viele späte Faltungsintermediate (Abbildung 1; N und I_c) exponieren hingegen meist keine hydrophoben Bereiche und stellen somit keine Substrate für molekulare Chaperone dar.

1.3.2. Konformationsänderungen in Zielproteinen

In der Regel induzieren molekulare Chaperone Konformationsänderungen in ihren Zielproteinen. Ein Beispiel hierfür ist die gezielte Entfaltung eines Proteinsubstrats. Diese Entfaltungsaktivität verknüpft die Chaperone mit dem zellulären Apparat, der für den Abbau von Proteinen zuständig ist. Entfaltungsreaktionen spielen wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei der Faltung eines Zielproteins (siehe Abschnitt 2.1.2). Man nimmt an, dass während der Faltung auch nichtnative Kontakte innerhalb einer Polypeptidkette entstehen. Diese können zur Bildung falsch gefalteter Spezies

führen, die in lokalen Energieminima gefangen sind.^[20] Die Chaperon-vermittelte Entfaltung kann diese nichtproduktiven Wechselwirkungen auflösen und liefert dem Proteinmolekül so eine neue Gelegenheit, die korrekte Struktur auszubilden.

1.3.3. Kontrollierte Freisetzung gebundener Polypeptide

Hydrophobe Wechselwirkungen sind nicht nur für die Stabilität der gefalteten Proteinstruktur von Bedeutung, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von oligomeren Proteinen und Proteinkomplexen. Die Assoziation der Untereinheiten erfolgt dabei über Kontaktflächen, die häufig von hydrophoben Aminosäuren gebildet werden. Daher gibt es eine Reihe von Proteinen, die an entfaltete Polypeptide binden und deren Aggregation unterdrücken, ohne damit gleich molekulare Chaperone zu sein. Was Chaperone von diesen hydrophoben Proteinen unterscheidet, ist ihre Fähigkeit, definierte Komplexe mit nichtnativen Proteinen einzugehen und – noch wichtiger – das gebundene Polypeptid kontrolliert wieder freizusetzen. Dies geschieht durch Umschalten in eine andere Konformation, die eine geringere Affinität für hydrophobe Polypeptide aufweist (Abbildung 1). Nach den Gesetzen der Thermodynamik stabilisiert die Bindung eines Proteinsubstrats die hochaffine Form des Chaperons. Daher erfordert der Übergang in den niederaffinen Zustand Energie. Diese stammt meist aus der Hydrolyse von ATP oder aus der Wechselwirkung mit anderen Proteinkomponenten der jeweiligen Chaperonmaschine.

2. Wirkmechanismen molekularer Chaperone

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die allgemeinen Prinzipien der Proteinfaltung erläutert wurden, sollen im Folgenden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften einiger ausgewählter Klassen von molekularen Chaperonen genauer vorstellt werden.

2.1. GroE

Das bislang am besten untersuchte molekulare Chaperon ist das GroE-System des Bakteriums *E. coli*.^[21–24] Die beiden Gene *groEL* und *groES* kodieren Proteine mit einer Größe von 57 kDa bzw. 10 kDa. Sie sind beide für das Überleben von *E. coli* erforderlich.^[25] Dies bedeutet, dass zumindest ein essentielles *E.-coli*-Protein bei seiner Faltung auf die Vermittlung durch GroE-Chaperone angewiesen ist.

2.1.1. Die Struktur der GroE-Chaperone

Bemerkenswert an GroEL ist seine Quartärstruktur, die einem Fass ähnelt.^[26, 27] 14 Untereinheiten sind in zwei Ringen aus je sieben Molekülen angeordnet und bilden dabei zwei getrennte Hohlräume mit einem Durchmesser von 45 Å (Abbildung 2A, B). Jede der 14 GroEL-Untereinheiten ist aus drei Domänen aufgebaut. Die äquatorialen Domänen

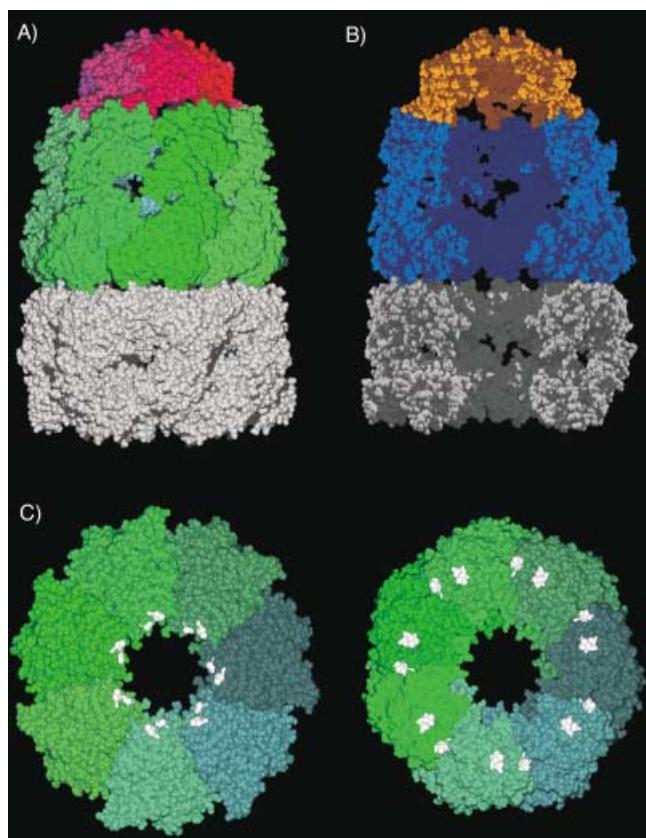


Abbildung 2. Röntgenkristallstruktur des GroE-Chaperons aus *E. coli*.^[26, 27] A) Seitenansicht eines asymmetrischen GroE-Komplexes mit Proktiliform („bullet“), bestehend aus einem GroEL-Doppelring und einer GroES-Kuppel. Der untere GroEL-Ring ist grau dargestellt, die sieben Untereinheiten des oberen Rings grün. GroES (rot) bindet an das Ende des oberen Rings. B) Längsschnitt des Bullet-Komplexes; jeder GroEL-Ring umschließt einen Hohlraum, der als Faltungskompartiment für ein Polypeptidsubstrat dient. Einige Bereiche der äquatorialen Domänen konnten in der Strukturbestimmung nicht aufgelöst werden, daher entsteht der irreführende Eindruck, dass die beiden Hohlräume miteinander verbunden sind. Die Bindung von GroES an den oberen GroEL-Ring blockiert den Zugang zum oberen Kompartiment und induziert zugleich eine Rotation der apikalen Domänen. Der Durchmesser des proximalen Hohlrums steigt von 45 Å auf 80 Å, seine Höhe von 73 Å auf 85 Å. C) Veränderungen in der GroEL-Struktur bei Bindung von GroES. In dieser Aufsicht sind die sieben Untereinheiten eines GroEL-Rings in grün und blau dargestellt. Die hydrophoben Aminosäuren in den apikalen Domänen, die an der Polypeptidbindung beteiligt sind,^[40] sind weiß dargestellt. In Abwesenheit von GroES (linke Abbildung) kleiden diese Reste die Innenseite des Hohlrums aus und sind so für die hohe Affinität dieses Zustandes gegenüber entfalteten Polypeptiden verantwortlich. Bei Bindung von GroES (rechte Abbildung) rotieren die apikalen Domänen um 90°, sodass die hydrophoben Bereiche in der Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten verschwinden. Die Innenseite des zentralen Hohlrums wird hydrophil, und es kommt zur Freisetzung des gebundenen Polypeptids.

bilden den zentralen Teil des Fasses. Sie sind zuständig für die Bindung und Hydrolyse von ATP und vermitteln alle Kontakte zwischen den beiden Ringen sowie die meisten Kontakte zwischen den Untereinheiten desselben Rings. Die apikalen Domänen befinden sich an den Enden des Fasses. Hier erfolgt die Bindung von Proteinsubstraten und des Cochaperons GroES. Äquatoriale und apikale Domänen sind durch eine intermediäre Domäne miteinander verbunden, die als molekulares Scharnier dient und Strukturänderungen während des Funktionszyklus von GroE ermöglicht.

Das Cochaperon GroES besteht aus sieben Untereinheiten und hat die Form einer Kuppel mit einem Durchmesser von 75 Å.^[28] Eine Besonderheit von GroES ist der „mobile loop“, ein Abschnitt aus 16 Aminosäuren, der für die Bindung an GroEL zuständig ist.^[29, 30] Die Bindung von GroES erfolgt an den Enden des GroEL-Doppelrings (Abbildung 2A) und findet nur in Gegenwart von Nucleotiden statt, d.h., ADP oder ATP muss an die äquatorialen Domänen des entsprechenden GroEL-Rings gebunden sein.^[31] In der Literatur wurden zwei Typen von GroES-GroEL-Komplexen beschrieben, die wegen ihrer Form „bullets“ und „footballs“ genannt werden und sich in ihrer Zusammensetzung (GroEL:GroES) unterscheiden.^[32–36] In der Bullet-Form ist nur an einem der GroEL-Ringe GroES gebunden (Abbildung 2A, B), in der Football-Form an beiden, wobei sich ein scheinbar symmetrischer Komplex bildet. In Gegenwart von ADP scheint sich nur die Bullet-Form zu bilden, während in Gegenwart von ATP die Bildung von Football- und Bullet-Form erfolgt.

GroEL gehört zur Familie der Hsp60-Chaperone, die man auch als Chaperonine bezeichnet. Aufgrund ihrer Funktion und Verwandtschaft lassen sich die Mitglieder dieser Klasse in zwei Gruppen einteilen. Gruppe-I-Chaperonine wie GroEL bestehen aus sieben Untereinheiten je Ring und benötigen ein Cochaperon wie GroES. Man findet sie in Eubakterien sowie in den Mitochondrien und den Chloroplasten der eukaryotischen Zelle. Gruppe-II-Chaperonine bestehen aus acht oder neun Untereinheiten je Ring und benötigen kein Partnerchaperon. Man findet sie im Cytosol von Archaeabakterien und Eukaryoten. Der molekulare Wirkmechanismus der Gruppe-II-Chaperonine ist wesentlich weniger gut verstanden als der der Gruppe-I-Chaperonine. Ob sie eine ähnlich breite Substratspezifität aufweisen, ist einer der ungeklärten Aspekte.^[37, 38]

2.1.2. Die Bindung von Polypeptiden an GroEL

GroEL erkennt ein potentielles Polypeptidsubstrat vorwiegend anhand der exponierten hydrophoben Oberflächen, die charakteristisch für ungefaltete und missgefaltete Proteine sind. Die Dominanz von hydrophoben Wechselwirkungen bei der Substratbindung zeigt sich in den thermodynamischen Eigenschaften der Bindungsreaktion.^[39] Die Bindestelle für Proteine auf GroEL wurde zum einen durch Mutationsanalysen identifiziert,^[40] zum anderen anhand von Kristallstrukturen der isolierten apikalen Domäne^[41] sowie eines Komplexes zwischen GroEL und einem hydrophoben Peptid.^[42] Das Substrat bindet in einer hydrophoben Furche, die um die Öffnung des zentralen Hohlraums liegt (Abbildung 2C). Die hohe Plastizität der Bindestelle erlaubt kleinere Strukturänderungen, sodass für jedes Substrat eine optimierte Bindungsfläche bereitgestellt werden kann. Da das teilgefaltete Substrat ebenfalls flexibel ist, kommt es bei der Assoziation sehr wahrscheinlich sowohl im Substrat als auch in den apikalen Domänen zu strukturellen Änderungen.^[43] Das erklärt, warum GroEL eine Vielzahl teilgefalteter Proteine binden kann.

In den vergangenen Jahren wurden die Strukturen verschiedener Substratproteine im Komplex mit GroEL näher untersucht. Es scheint, dass GroEL mit verschiedenen Kon-

formationen wechselwirken kann, die von weitgehend ungefaltet bis zu nativ-ähnlich reichen.^[44–46] Wie lässt sich diese strukturelle Heterogenität erklären? Ein Proteinsubstrat kann entweder falten (d.h. eine Struktur ausbilden) oder an GroEL binden. Beide Prozesse konkurrieren miteinander, denn beide beruhen auf dem hydrophoben Effekt. Bei der Faltung werden die hydrophoben Aminosäuren vom Lösungsmittel abgeschirmt, indem sie einen hydrophoben Kern im Innern des Proteins bilden. Bei der Bindung andererseits erfolgt die Abschirmung durch Wechselwirkung mit der hydrophoben Bindetasche in den apikalen Domänen von GroEL. Für einen einzelnen Aminosäurerest in einem Polypeptid schließen sich die beiden Möglichkeiten aus, aber nicht notwendigerweise für das gesamte Protein. Die Struktur(en) des gebundenen Polypeptids entsprechen vermutlich einem energetischen Minimum, das durch die relative Größe zweier ΔG -Werte bestimmt wird: einem für die Faltung und einem für die Bindung. Letztlich stellt GroEL keine Anforderungen an die Struktur des gebundenen Proteins, solange dieses eine genügend große hydrophobe Oberfläche für die Wechselwirkung aufweist. Hier unterscheidet sich GroEL von Hsp70 (Abschnitt 2.2), bei dem der tunnelartige Aufbau der Bindungsstelle eine lokal gestreckte Konformation des Polypeptids erfordert.^[47]

2.1.3. Wechselwirkung zwischen GroEL und GroES

Die Wechselwirkung der beiden Partnerchaperone ist von zentraler Bedeutung für den Funktionszyklus von GroE, denn die Bindung von GroES führt zu großen strukturellen Änderungen im GroEL-Partikel.^[27, 48] Erstens fungiert GroES als molekularer Deckel: Es versperrt die Öffnung des GroEL-Rings, an den es bindet, und schließt damit ein gebundenes Polypeptid in den Hohlraum ein. Zweitens führt die Bindung von GroES zu einer Rotation der apikalen Domänen, in deren Verlauf sich die Eigenschaften des zentralen Hohlraums grundlegend ändern. Die hydrophoben Gruppen, die für die Polypeptidbindung verantwortlich sind, werden verschoben und so durch polarere Reste ersetzt (Abbildung 2C). Dies verringert die Affinität für hydrophobe Polypeptide und führt damit zur Freisetzung des gebundenen Proteins in den (verschlossenen) Hohlraum.^[49, 50] Drittens erhöht sich bei dieser Konformationsänderung das Volumen des Hohlraums von 85 000 Å³ auf ca. 175 000 Å³. Damit erhält das freigesetzte Polypeptid ausreichend Raum, um die Konformationsänderungen durchzuführen, die für die Bildung des nativen Zustands erforderlich sind. Die GroES-Bindung wirkt daher als molekularer Schalter, der das Chaperon vom Einfang- in den Faltungsmodus überführt. Sie induziert die Freisetzung des gebundenen Proteins in eine Umgebung, die seine produktive Faltung begünstigt.^[49, 50] Wegen des begrenzten Volumens des Hohlraums ist die GroE-vermittelte Proteinfaltung auf Polypeptide beschränkt, die kleiner als 60 kDa sind.^[51] Interessanterweise gibt es jedoch ein Protein, das nur in Gegenwart von GroEL und GroES falten kann, obgleich es mit 82 kDa zu groß ist, um in den Hohlraum zu passen.^[52] Die GroE-vermittelte Faltung scheint in diesem Sonderfall jedoch nach einem anderen Mechanismus zu verlaufen.^[53]

2.1.4. ATP-Hydrolyse durch GroEL und Substratfreisetzung

Nach der (partiellen) Faltung des Proteins im Innern von GroE muss das Substrat anschließend den Hohlraum wieder verlassen. Der GroEL-GroES-Komplex ist zwar sehr stabil ($K_d \approx 1 \text{ nm}$), hat aber mit der ATPase-Funktion einen eingebauten Timer, der die Dissoziation von GroES reguliert. Die sieben am *cis*-Ring (der Ring, der mit GroES und dem faltenden Polypeptid assoziiert ist; Abbildung 3) gebundenen

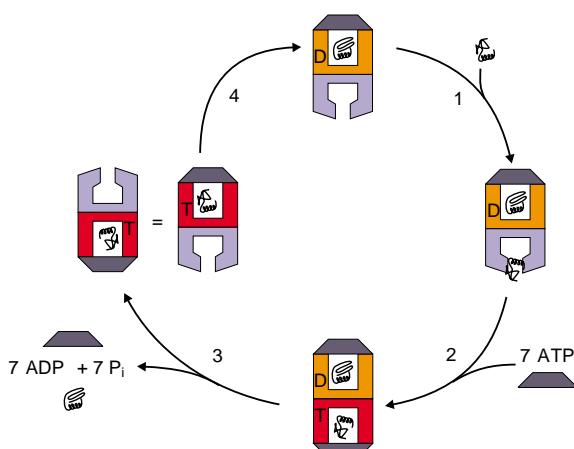


Abbildung 3. Funktionszyklus des GroE-Chaperons. Obwohl GroEL aus einem Doppelring besteht, ist es zweckmäßig, den Zyklus anhand seiner Funktionseinheiten, den Einzelringen, zu beschreiben. Beide Ringe sind gleichzeitig aktiv, befinden sich aber in unterschiedlichen Phasen des Zyklus. Die Prozessierung eines Proteinsubstrats erfordert zwei Umläufe des GroE-Zyklus. Während dieser Zeit bleibt das Polypeptid mit dem selben GroEL-Ring assoziiert. Aus grafischen Gründen wurde jedoch das GroEL-Molekül nach Schritt 3 um 180° gedreht, wobei das Polypeptid scheinbar in den oberen Ring wandert. Der Zyklus der GroE-vermittelten Faltung lässt sich in drei Schritte unterteilen: Einfangen, Faltung und Freisetzung. Während des Einfangens (Schritt 1; D = ADP) wird die Aggregation eines hydrophoben Polypeptids durch Bindung an GroEL unterdrückt. Der Acceptorring (unterer Ring, lila) ist nucleotidfrei und weist daher eine hohe Affinität für Polypeptide auf. Die Bindung von ATP (T) und GroES an diesen Ring (Schritt 2) induziert eine Reihe von Strukturänderungen in GroEL (roter Ring). Die Affinität zum gebundenen Polypeptid nimmt ab, und es wird in den verschlossenen Hohlraum entlassen, wo es mit der Faltung beginnen kann. Die anschließende Hydrolyse von ATP (Schritt 4) bewirkt eine zweite Konformationsänderung in GroEL (oberer Ring, orange), die es dem *trans*-Ring (unterer Ring, lila) ermöglicht, ein Polypeptid zu binden und damit einen neuen Zyklus zu beginnen. Nach Bindung von ATP und GroES an den *trans*-Ring dissoziert GroES vom *cis*-Ring, und das Polypeptidsubstrat wird aus dem Hohlraum entlassen (Schritt 3).

ATP-Moleküle werden mit einer Geschwindigkeit von $0.25 - 0.5 \text{ min}^{-1}$ hydrolysiert.^[54, 55] Dies induziert eine Konformationsänderung im *trans*-Ring von GroEL, durch die sich dessen Affinität für ATP erhöht.^[56] Die Bindung von ATP an den *trans*-Ring stimuliert dann die Dissoziation von GroES vom *cis*-Ring und ermöglicht es so dem eingeschlossenen Substrat, das Faltungskompartiment zu verlassen.^[57]

2.1.5. Der Funktionszyklus von GroE

Der Zyklus der GroE-vermittelten Proteinfaltung (Abbildung 3) lässt sich funktionell in drei Phasen gliedern: Einfangen, Falten und Freisetzen.^[23] Während der Einfangphase

bindet ein Polypeptidsubstrat an die apikalen Domänen eines GroEL-Rings. Die Bindung von Mg/ATP und GroES an denselben Ring im nächsten Schritt führt zu einer großen Konformationsänderung im GroEL-Tetradecamer, und es entsteht ein faltungsaktiver *cis*-Komplex. Das Polypeptid wird in die geschützte Umgebung des *cis*-Hohlraums entlassen und beginnt zu falten. Nach etwa $15 - 30 \text{ s}$ ist das am *cis*-Ring gebundene ATP hydrolysiert, und es erfolgt eine weitere Konformationsänderung, die die Freisetzung von gebundenem GroES durch ATP-Bindung an den *trans*-Ring ermöglicht. Das Polypeptid verlässt den Hohlraum, und zwar unabhängig davon, ob es seinen nativen Zustand erreicht hat oder nicht.

Die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie wird benötigt, um die Energiebilanz des Chaperonzyklus auszugleichen. Die jeweilige Bindung von Polypeptid, GroES und ATP an GroEL verläuft exergonisch und ist irreversibel; der Reaktionszyklus wird somit in eine Richtung getrieben. Weil in einem Zyklus Start- und Endpunkt identisch sind, muss dieser sequentielle Verlust an Energie kompensiert werden.

2.1.6. Entfaltung von Polypeptiden durch GroE

Eine wichtige Frage ist, wie GroEL die Faltung von Proteinen unterstützt, die in einem nichtnativen, missgefalteten Zustand vorliegen. Man vermutet, dass GroEL diese Proteine partiell entfalten kann und sie damit wieder auf den richtigen Weg in den nativen Zustand bringt.

Vermutlich gibt es mehrere Mechanismen, die GroEL zur Entfaltung eines Proteins nutzen kann. Das einfachste Modell, die thermodynamische Kopplung, basiert auf der bereits erwähnten Konkurrenz zwischen Bindung und Faltung.^[58] Da ein Protein zur Bindung an GroEL hydrophobe Oberflächen aufweisen muss und die Exposition hydrophober Oberflächen in der Regel mit dem Grad der Faltung abnimmt, wird GroEL bevorzugt an stärker entfaltete Konformationen eines Polypeptids binden. Falls die verschiedenen Konformationen des Proteins im schnellen Gleichgewicht miteinander stehen, wird das Protein durch GroEL entfaltet. Experimentell konnte diese Wirkung von GroEL für eine Reihe relativ kleiner Proteine gezeigt werden.^[59]

Der Kopplungsmechanismus hat aber einen bedeutenden Nachteil: Da nach diesem Modell alle Entfaltungsreaktionen in freier Lösung ablaufen, könnte GroEL keine Proteinmoleküle entfalten, bei denen dieser Prozess sehr langsam verläuft. Einen Ausweg bietet möglicherweise ein weiterer Entfaltungsmechanismus, der erstmalig für das Enzym Rubisco postuliert wurde. Bei der Faltung von Rubisco tritt ein stabiles, kompaktes Faltungsintermediat auf, das ohne nachweisbare Konformationsänderungen an GroEL bindet. Bei Bindung von ATP und GroES an den Rubisco-GroEL-Komplex wurde jedoch eine (temporäre) Entfaltung des Substrats beobachtet,^[60] deren Ursache vermutlich die bei der Bindung des Chaperons erfolgende Rotationsbewegung der apikalen Domänen ist (Abbildung 2C). Dies könnte einen mechanischen Stress auf das gebundene Protein ausüben und damit gleichsam dessen Struktur auseinander ziehen. Voraussetzung dafür ist, dass das Polypeptid an mehrere apikale Domänen gleichzeitig gebunden ist.^[61] Diese

Form der aktiven Entfaltung konnte allerdings bislang noch für kein anderes stringentes Substratprotein von GroEL gezeigt werden. So wurde bei der Malat-Dehydrogenase (MDH) keine nennenswerte Strukturänderung beobachtet, wenn diese bei Bindung von GroES an den MDH-GroEL-Komplex freigesetzt wird.^[45]

2.1.7. Faltung im Innern des Chaperons

Im Verlauf der GroES-Bindung wird das Substrat in die geschützte Umgebung des *cis*-Hohlraums entlassen. Darin kann das Protein falten, ohne dabei durch andere Polypeptide gestört zu werden, denn GroES versperrt den Zugang zum Innern des Chaperons, und unerwünschte Nebenreaktionen wie Aggregation können daher nicht auftreten. Diese Situation wird häufig als Faltung in „unendlicher Verdünnung“ oder als Faltung im „Anfinsen-Käfig“ bezeichnet. Monomere Proteine können in diesen 15–30 s ihren nativen Zustand erreichen, falls ihre Faltung hinreichend schnell verläuft, oder aber sie nehmen einen „committed state“ ein, einen nicht-nativen Zustand, in dem sie nicht länger auf die Unterstützung durch das GroE-Chaperon angewiesen sind (Abbildung 1). Für ein oligomeres Protein, dessen nativer Zustand die Assoziation mehrerer Polypeptidketten erfordert, ist dieser „committed state“ der obligatorische Austrittspunkt aus dem Chaperonyzyklus, denn jede weitere Wechselwirkung mit GroE würde den Weg zum nativen Protein blockieren.^[45, 62]

Was geschieht mit Proteinen, deren Faltung länger dauert als ein Chaperonyzyklus? Ihr weiteres Schicksal hängt vermutlich davon ab, in welcher Konformation sie GroE verlassen. Ein Teil der Moleküle wird entweder den nativen Zustand oder den „committed state“ erreicht haben und damit nicht länger ein Substrat für die Chaperon-vermittelte Faltung bilden.^[63] Die anderen Moleküle können erneut an GroEL binden und an einem weiteren Zyklus teilnehmen. Wie bereits erwähnt, ist es möglich, dass es dabei zu strukturellen Umlagerungen kommt, z.B. zur Entfaltung missgefalteter Moleküle, die sich gebildet haben könnten.

Unklar ist noch immer, ob die Wände des Hohlraums einen Einfluss auf das faltende Protein ausüben, d.h. ob der Platzmangel und die komplexe chemische Zusammensetzung der Wände des Hohlraums die Faltungsreaktion beeinflussen. Zur Beantwortung dieser Frage müsste man die Faltung im Innern von GroEL mit der in freier Lösung vergleichen, was nur für Proteine möglich ist, deren Faltung nicht von GroE abhängt.

Was ist die optimale Dauer eines GroE-Zyklus? Generell bedeuten längere Umlaufzeiten, dass GroEL pro Zeiteinheit weniger ATP hydrolysiert und damit weniger Energie verbraucht. Es würde darüber hinaus bedeuten, dass ein Polypeptid im Mittel mehr Zeit im Faltungskäfig verbringt. Dies hätte zwei Konsequenzen: Mehr GroEL-Moleküle pro Zelle würden benötigt, um die erforderliche Chaperonaktivität bereitzustellen, und die Faltung für schnelle Proteine würde verlangsamt. Oder, schlimmer noch, Untereinheiten von oligomeren Proteinen könnten bei zu langer Verweildauer im Anfinsen-Käfig eine Konformation einnehmen, in der sie nicht mehr mit ihren Partneruntereinheiten produktiv asso-

ziieren können.^[64] Wäre der Zyklus zu schnell, hätte dies eventuell Auswirkungen auf die Effizienz des Chaperon-systems, denn kürzere Umlaufzeiten bedeuten einen höheren Energieverbrauch, aber nicht unbedingt höhere Faltungsausbeute.

Um seine Rolle als molekulares Chaperon erfüllen zu können, muss GroEL eine Vielzahl von entfalteten, missgefalteten oder teilgefalteten Polypeptiden erkennen. Experimente mit denaturierten Zellextrakten haben gezeigt, dass etwas 40 % aller *E.-coli*-Proteine mit GroEL wechselwirken können.^[65] Es ist aber unwahrscheinlich, dass GroE an der Faltung all dieser Proteine beteiligt ist, da seine zelluläre Konzentration von ca. 1 μM dafür zu gering ist.^[66] Unlängst wurde eine Reihe von *E.-coli*-Proteinen identifiziert, die mit GroEL wechselwirken,^[67] aber es ist gegenwärtig noch unklar, wie viele von ihnen wirklich GroEL für ihre Faltung benötigen.

2.2. Das Hsp70-System

Die Hsp70-Proteine stehen im Mittelpunkt eines ubiquitären Chaperonsystems, das man in den meisten Kompartimenten der eukaryotischen Zelle ebenso findet wie in Eubakterien und in vielen Archaea. Wie im Falle der GroE-Proteine stammt der am besten untersuchte Vertreter dieser Chaperonfamilie, DnaK, aus *E. coli*. Hsp70-Proteine sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, z.B. an der Proteinfaltung und am Abbau instabiler Proteine.^[68] Die Funktion von Hsp70 scheint dabei in der Bindung kurzer hydrophober Abschnitte in teilgefalteten Polypeptiden zu bestehen, wodurch Aggregationsreaktionen unterdrückt und Faltungsprozesse gestoppt werden.^[19, 69]

In der Zelle wechselwirken DnaK und viele andere Hsp70-Chaperone mit zwei Typen von Partnerproteinen, die, ähnlich wie GroES im Falle von GroEL, wichtige Schritte in ihrem Funktionszyklus regulieren: den Hsp40- und den GrpE-Proteinen. Darüber hinaus wurden in den vergangenen Jahren vor allem in der eukaryotischen Zelle weitere Partnerproteine identifiziert, von denen einige Hsp70 mit anderen Chaperonsystemen verknüpfen (z.B. Hsp90, Abschnitt 2.3).

2.2.1. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Hsp70

Hsp70 besteht aus zwei funktionellen Einheiten: einer N-terminalen ATPase-Domäne und einer kleineren C-terminalen Peptidbindedomäne. Die Kristallstrukturen beider Domänen wurden getrennt gelöst.^[70–72] Die ATPase-Domäne von Hsp70 (Abbildung 4A) besteht aus zwei Teilen, die durch eine Spalte getrennt sind, in der sich die Bindestelle für das Nucleotid befindet.^[73] Die Art des gebundenen Nucleotids bestimmt die Peptidbinde-eigenschaften der C-terminalen Domäne. Im ATP-Zustand ist die Affinität zu Peptidsubstraten vergleichsweise schwach, und Assoziation und Dissoziation verlaufen schnell.^[74] Im ADP-Zustand oder in Abwesenheit von Nucleotid sinken die Geschwindigkeiten von Assoziation und Dissoziation um mehr als zwei Größenordnungen,

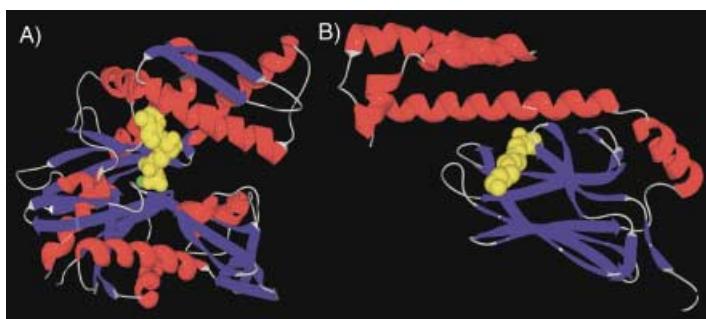


Abbildung 4. Struktur des DnaK-Chaperons aus *E. coli*. A) Röntgenkristallstruktur der Nucleotidbindedomäne von DnaK mit gebundenem ADP.^[71] Das Nucleotid (gelb) und ein Mg²⁺-Ion (grün) sind in einer tiefen, für das Lösungsmittel unzugänglichen Spalte gebunden, die von den beiden Subdomänen des Proteins gebildet wird. Die Struktur ähnelt stark den Strukturen von Hexokinase und Aktin, zwei anderen ATP-bindenden Proteinen. B) Röntgenkristallstruktur der Peptidbindedomäne von DnaK im Komplex mit einem heptameren Peptid.^[72] Die Peptidbindestelle weist eine hydrophobe Furche auf, die sich in einer Subdomäne befindet, die von acht antiparallelen β-Strängen gebildet wird (blau). Das Peptid NRLLL TG (gelb, gezeigt sind nur die Rückgratatome) bindet in diese Furche in einer gestreckten Konformation. Eine zweite, α-helicale Domäne (rot) fixiert das Peptid in der Bindestasche. Diese Konformation entspricht vermutlich dem hochaffinen Zustand von Hsp70.

und die Affinität für Peptide nimmt deutlich zu. Die ATP-Hydrolyse fungiert somit als molekularer Schalter zwischen zwei Zuständen von Hsp70, die sich durch hohe Dynamik/geringe Affinität und geringe Dynamik/hohe Affinität bei der Bindung von Peptiden und Proteinen auszeichnen. Da die Struktur des vollständigen Chaperons bislang noch nicht bestimmt werden konnte, liegt keine direkte Information vor, wie die Kommunikation zwischen Nucleotid- und Peptidbindung auf molekularer Ebene erfolgt. Aus der Röntgenkristallstruktur der Peptidbindedomäne mit einem gebundenen Heptapeptid lassen sich allerdings Modelle entwickeln, die einen Einblick in dieses Zusammenspiel liefern könnten.^[72]

2.2.2. Bindung von Peptiden durch Hsp70

Die Peptidbindedomäne besteht aus zwei Struktureinheiten: einem β-Sandwich mit einer hydrophoben Furche auf seiner Oberseite und einer darüberliegenden α-helicalen Domäne. Das Peptidsubstrat wird in der Furche gebunden und nimmt dabei eine gestreckte Rückgratkonformation ein (Abbildung 4B). Stabilisiert wird der Komplex durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Peptid und β-Sandwich und über Wasserstoffbrücken. Die α-helicale Subdomäne liegt auf der Oberseite der Furche und fixiert so das Peptid in der Bindestelle. Diese „geschlossene“ Konformation erklärt die für den ADP-Zustand von Hsp70 beobachtete hohe Affinität und die langsame Austauschgeschwindigkeit von Peptiden. Wie kann die Bindung von ATP an die N-terminale Domäne die Dynamik der Peptidbindung erhöhen? Man vermutet, dass ATP eine Konformationsänderung im Chaperon induziert, bei der sich die helicale Subdomäne von der Peptidbindestelle entfernt und so deren Zugänglichkeit erhöht.^[47]

Experimente mit Peptidbibliotheken haben gezeigt, dass Hsp70 bevorzugt an Peptide mit hydrophoben Seitenketten

bindet.^[75–77] Bei Proteinen finden sich diese Bereiche meist im Innern der gefalteten Struktur und an den Kontaktflächen zwischen Untereinheiten.^[78] Die Topologie der Peptidbindestelle von Hsp70 erfordert außerdem, dass der Abstand zwischen dem gebundenen Segment und dem Rest des Proteinsubstrats etwa 10 Å beträgt. Dies bedeutet, dass der Teil des Proteins, der an Hsp70 gebunden ist, weitgehend entfaltet und sehr flexibel sein muss.

Neben der Spezifität der Polypeptidbindung sind auch kinetische Aspekte von Bedeutung. Die Proteinaggregation ist ein vergleichsweise schneller Prozess, der innerhalb von Sekunden abläuft. Um mit ihr konkurrieren zu können, muss die Komplexbildung zwischen einem entfalteten Polypeptid und Hsp70 ähnlich schnell verlaufen. Im nucleotidfreien Zustand wurden für Peptidsubstrate Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation von $10\text{--}100\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gemessen.^[79] Unter der Annahme, dass die zelluläre Konzentration entfalteter Polypeptide in der Größenordnung von 10 μM liegt, würde die Komplexbildung zumindest mehrere Minuten dauern. Sie wäre damit zu langsam, um die Aggregation effizient zu unterdrücken. Im offenen, ATP-gebundenen Zustand von Hsp70 liegen die Bindungsgeschwindigkeiten für Peptide um mindestens Faktor 10 höher. Allerdings erfordert das Einfangen eines Polypeptids die Umwandlung dieses labilen Hsp70-ATP-Polypeptid-Komplexes in die stabilere Hsp70-ADP-Polypeptid-Form durch Hydrolyse von gebundenem ATP. Diese Reaktion läuft jedoch nur mit einer Geschwindigkeit von ca. 0.1 min⁻¹ ab und ist damit ebenfalls zu langsam, um mit der Aggregation zu konkurrieren. Paradoxe Weise folgt daraus, dass Hsp70-Proteine aus kinetischen Gründen keine sehr potenzen Inhibitoren der Proteinaggregation sein sollten. Tatsächlich beobachtete man experimentell, dass DnaK alleine die Aggregation nicht-nativer Proteine nur schlecht unterdrückt.^[80, 81] Dieses Problem unterstreicht die Bedeutung der beiden Helferproteine Hsp40 und GrpE für die Funktion der Hsp70-Chaperone.

2.2.3. Partnerproteine von Hsp70: Modulation des funktionellen Zyklus

Bei Hsp40 handelt es sich um eine heterogene Klasse von Proteinen, die aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut sind, darunter die bei allen Hsp40-Chaperonen konservierte, ca. 75 Aminosäuren große J-Domäne. Mutationsstudien haben gezeigt, dass diese Domäne essentiell für die Wechselwirkung zwischen Hsp40 und Hsp70 ist.^[82] Ihr Name leitet sich von DnaJ ab, dem Hsp40-Protein aus *E. coli*, das mit DnaK zusammenwirkt. Die wichtigsten Eigenschaften von Hsp40 sind seine Fähigkeit zur Bindung von Peptiden und zur Stimulation der ATPase von Hsp70.^[83] Der Funktionszyklus der Hsp70-Maschine beginnt vermutlich damit, dass ein Polypeptidsubstrat an Hsp40 bindet (Abbildung 5).^[81] Der Hsp40-Protein-Komplex assoziiert dann mit Hsp70 (DnaK), das Proteinsubstrat wird auf die geöffnete Peptidbindestelle von Hsp70 übertragen und der Komplex durch die anschließende, Hsp40-stimulierte Hydrolyse des ATP stabilisiert. Im letzten Schritt erfolgt der Austausch von ADP gegen ATP, wodurch Hsp70 wieder in den dynamischen Zustand zurückkehrt und das gebundene Polypeptid freigesetzt wird.

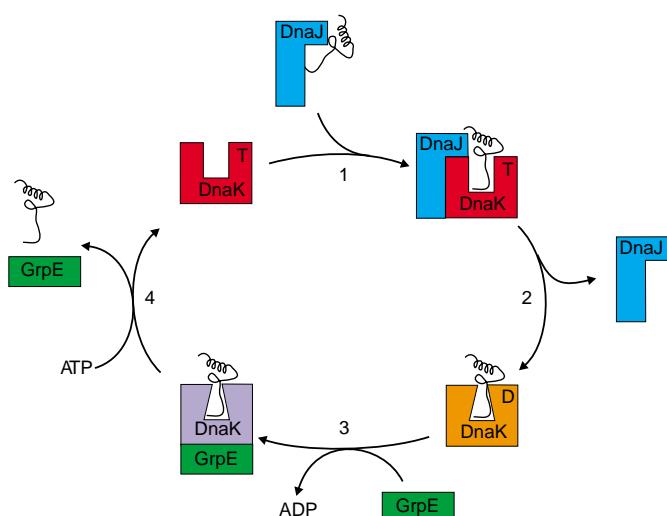


Abbildung 5. Funktionszyklus des DnaK-Chaperonsystems aus *E. coli*. Ein weitgehend entfaltetes Polypeptidsubstrat (schwarzes Band) wird von dem Cochaperon DnaJ (blau) eingefangen. Im Verlauf der Komplexbildung mit DnaK (rot) wird das Substrat von DnaJ auf die Peptidbindestelle von DnaK übertragen (Schritt 1). Die DnaJ-stimulierte Hydrolyse von ATP ändert die Konformation der Bindestelle (orange) und fixiert das Substrat unter Bildung eines stabilen Protein-DnaK-Komplexes (Schritt 2). Nach der Dissoziation von DnaJ wird das gebundene ADP durch den Nucleotidaustauschfaktor GrpE (grün) freigesetzt (Schritt 3). Die anschließende Bindung von ATP an DnaK setzt GrpE wieder frei und induziert eine Konformationsänderung, bei der sich die Peptidbindestelle öffnet (Schritt 4). Das Polypeptid kann nun abdissoziieren.

In Gegenwart von Hsp40 verläuft die ATP-Hydrolyse schneller und ist damit vermutlich nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Zyklus. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch der zweite potentiell langsame Schritt, der Nucleotidaustausch, stimuliert werden kann. Diese Aufgabe erfüllt das Cochaperon GrpE,^[84] das fest an nucleotidfreies, nicht aber an nucleotidegebundenes Hsp70 bindet. Dementsprechend verringert GrpE die Affinität von Hsp70 für Nucleotide. Der katalysierte Nucleotidaustausch ist vermutlich ein zweistufiger Prozess (Abbildung 5). Im ersten Schritt bindet GrpE an Hsp70 und verdrängt so das gebundene ADP. Die anschließende Bindung von ATP wiederum führt zur Dissoziation von GrpE.^[85, 86] Die Röntgenkristallstruktur eines Komplexes zwischen GrpE und der Nucleotidbindedomäne von DnaK liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum GrpE die Affinität von DnaK für Nucleotide verringert.^[71] Die Nucleotidbindetasche im Komplex ist weiter geöffnet als in freiem DnaK; dadurch sind weniger Wechselwirkungen zwischen Nucleotid und Protein möglich.

Bisher gibt es keine experimentellen Beweise, dass Hsp70-Chaperone aktiv Konformationsänderungen in ihren Zielproteinen induzieren können, wie dies für andere molekulare Chaperone gezeigt wurde. Darüber hinaus stellt Hsp70, im Unterschied zu GroE, keine spezielle Mikroumgebung für die Proteinfaltung zur Verfügung. Hsp70 scheint vielmehr als allgemeiner Acceptor für entfaltete Polypeptide zu dienen, die im Zuge der Proteinbiosynthese oder bei anderen zellulären Prozessen entstehen. Die Bindung dieser Zielproteine an Hsp70 unterdrückt ihre Aggregation und verhindert

ihre weitere Faltung. Was mit dem Polypeptid nach der Freisetzung von Hsp70 weiter geschieht, hängt vermutlich von der Natur des Polypeptids und vom zellulären Kontext ab. Einige Proteine könnten spontan in ihre native Struktur falten, während andere auf starker spezialisierte Chaperonsysteme wie GroE und Hsp90 übertragen werden oder auf Systeme, die am Proteintransport oder -abbau beteiligt sind.

2.3. Das Hsp90-Chaperonsystem

Eukaryoten haben mit Hsp90 eine spezielle Chaperon-Maschinerie entwickelt, die weit komplexer aufgebaut ist als die GroE- und Hsp70-Systeme. Diese Maschinerie schließt zum einen das Hsp70-System mit ein (zumindest während eines Teils des Zyklus), zum anderen umfasst es eine große Zahl von Cofaktoren. Mehr als ein Dutzend wurden bisher identifiziert.

Das einzigartige an diesem System ist die Tatsache, dass im Unterschied zu anderen Chaperonen bereits eine große Zahl von Substratproteinen bekannt ist, deren Strukturbildung unter physiologischen Bedingungen von Hsp90 abhängt. Dies lässt vermuten, dass stabile Komplexe aus Hsp90 und seinen Substratproteinen gebildet werden, die deren Isolierung ermöglichen. Ein Beispiel, das den Einfluss von Hsp90 auf die Faltung anderer Proteine verdeutlicht, ist die Src-Kinase. Dieses Protein ist ein wichtiges Element bei der Regulation des Zellzyklus und deshalb ein interessantes Ziel für therapeutische Intervention. Die Suche nach natürlichen Substanzen, die die Funktion der Src-Kinase in vivo inhibieren, führte zur Entdeckung des Ansamycins Geldanamycin.^[87] Die nachfolgende Analyse zeigte jedoch, dass dieser potentielle Src-Kinase-Inhibitor mit hoher Affinität und Spezifität an Hsp90 bindet.^[88] Diese Wechselwirkung inaktiviert Hsp90, was schließlich zur Erniedrigung der Konzentration an aktiver Src-Kinase führt.

Die Zahl der entdeckten Proteine, die zum Erreichen ihrer funktionellen Konformation das Hsp90-System benötigen, wächst ständig.^[89] Es ist aber zurzeit noch nicht bekannt, welche gemeinsame Eigenschaft – ein Sequenzmotiv oder ein spezielles Strukturelement etwa – die Basis für die Wechselwirkung mit Hsp90 bildet. Viele der Substratproteine von Hsp90 sind regulatorische Proteine oder führen Schlüsselfunktionen in der Proliferation aus. Die Hsp90-Abhängigkeit ihrer Aktivität könnte eine zusätzliche Ebene der Regulation ermöglichen.^[90]

Wie erfüllt Hsp90 seine Aufgabe? In-vivo-Experimente lassen vermuten, dass das Zielprotein mehrere Hsp90-Komplexe durchläuft, die sich in der Zusammensetzung der Partnerproteine unterscheiden.^[91] Welche konformationellen Änderungen des Zielproteins dabei auftreten, ist vollkommen unbekannt. In einem noch rätselhaften Prozess wird die Ausbildung der funktionellen Konformation des Zielproteins durch die Wechselwirkung mit den verschiedenen Hsp90-Komplexen ermöglicht.

2.3.1. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Hsp90

Hsp90 ist ein elongiertes Dimer mit einer Dissoziationskonstanten von ca. 60 nm.^[92, 93] Die Dimerisierungsstelle ist im C-terminalen Teil des Proteins lokalisiert.^[92, 94] Die dreidimensionale Struktur der N-terminalen Domäne von Hsp90 (Aminosäuren 1–215) wurde röntgenkristallographisch gelöst (Abbildung 6).^[95, 96] Diese Domäne weist ein neuartiges



Abbildung 6. Struktur der N-terminalen, ATP-bindenden Domäne von Hsp90 aus Hefe im Komplex mit ADP.^[97] Die Domäne besteht aus einem verdrehten achtsträngigen β -Faltblatt mit einem darüberliegenden Cluster aus α -Helices. Das Nucleotid (gelb) befindet sich in einer ungewöhnlichen geknickten Konformation und ist in einer tiefen Tasche gebunden, die von den umgebenden Helices und Schleifen gebildet wird. Diese Tasche ist auch der Bindungsort des Antitumor-Agents Geldanamycin.^[95]

Faltungsmuster auf, das aus einem β -Faltblatt und Helices besteht, die auf dem Faltblatt liegen. Es stellte sich heraus, dass diese Domäne die ATP-Bindestelle enthält.^[97] ATP wird in einer ungewöhnlichen geknickten Konformation gebunden, wobei der Adenosinring und die Riboseeinheit im Innern der Bindetasche verborgen sind und die Phosphatgruppen zur Oberfläche zeigen. Wie die Chaperone GroE und Hsp70 ist auch Hsp90 eine schwache ATPase.^[98, 99] Hsp90 aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* hydrolysiert bei der physiologischen Temperatur 0.3 ATP min⁻¹. Die ATP-Hydrolyse scheint von entscheidender Bedeutung für die Funktion von Hsp90 in vivo zu sein, weil Hsp90-Mutanten, die Defekte in der ATP-Hydrolyse aufweisen, nicht die Funktionen erfüllen können, die für die Erhaltung der Lebensfähigkeit essentiell sind.^[99, 100] Neuere Befunde lassen vermuten, dass der ATPase-Zyklus mit großen konformationellen Änderungen im Hsp90-Dimer verbunden ist.^[101, 102] Die kinetische Analyse der ATPase-Reaktion zeigte, dass Regionen außerhalb der ATP-Bindedomäne für die effiziente Hydrolyse von Bedeutung sind. Es scheint, dass die N-terminalen Domänen bei Bindung von ATP mit anderen Teilen des Hsp90-Moleküls wechselwirken, die den Acceptor für die γ -Phosphatgruppe von ATP enthalten.^[102] Dazu kommt, dass die beiden N-terminalen Domänen des Hsp90-Dimers in Gegenwart von ATP mitei-

nander wechselwirken.^[101] Diese Wechselwirkung ist für die koordinierte und effiziente ATP-Hydrolyse notwendig.^[93] Wie diese ATP-induzierten Wechselwirkungen die Konformation der Zielproteine beeinflussen, muss noch gezeigt werden.

Aus dem ATPase-Zyklus lassen sich zwei mögliche Konsequenzen ableiten, die das Konzept von Chaperonen als molekulare Maschinen verdeutlichen: 1) Die blockweise Bewegung von Domänen kann, ähnlich wie bei GroE beobachtet, die Zugänglichkeit von Bindestellen für nichtnative Proteine beeinflussen. Fragmentierungsstudien lassen vermuten, dass Hsp90 zwei Bindestellen für nichtnative Proteine enthält, die sich in ihrer Spezifität unterscheiden.^[98, 103] Es könnte sein, dass diese Bindestellen, die sich in verschiedenen Abschnitten des Proteins befinden, ATP-reguliert miteinander kooperieren. 2) ATP-abhängige Konformationsänderungen können die Wechselwirkungen mit spezifischen Cofaktoren oder Partnerproteinen beeinflussen. Dies impliziert, dass der Hsp90-Zyklus durch die Hydrolyse des ATP getrieben und reguliert wird. Da die Hydrolysereaktion und die Bildung der verschiedenen Hsp90-Komplexe, die für die Aktivierung von Zielproteinen notwendig sind, ähnlich schnell ablaufen,^[104] scheint diese Möglichkeit durchaus realistisch zu sein.

2.3.2. Partnerproteine von Hsp90

Gegenwärtig weiß man nur wenig darüber, welche Faktoren die Assoziation von Hsp90 mit seinen zahlreichen Partnerproteinen regulieren. Auch die Funktion dieser Cofaktoren ist weitgehend unbekannt. Einige der Partnerproteine enthalten aus mehreren Helices bestehende „Dockingmodule“, die „tetratricopeptide repeat“(TPR)-Motive, die eine Furche bilden, in der eine gestreckte Peptidsequenz binden kann.^[105] Die wechselwirkenden Peptidsequenzen wurden an den C-terminalen Enden von Hsp90 und Hsp70 gefunden.^[106] Hop/St1, eines der Partnerproteine von Hsp90, das von zentraler Bedeutung für den Hsp90-Zyklus ist, besteht weitgehend aus TPR-Motiven. Seine Funktion scheint es entsprechend zu sein, die Chaperone Hsp90 und Hsp70 direkt miteinander zu verbinden (Abbildung 7).^[107] Zusätzlich inhibiert die Bindung von St1 die ATPase von Hsp90.^[108]

Andere Hsp90-Cofaktoren gehören zur Klasse der Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen). PPIasen sind Enzyme, die die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Peptid-Bindungen in Proteinen katalysieren.^[109, 110] PPIasen, die aus einer Domäne bestehen, sind an der Signaltransduktion und Proteinfaltung in vivo beteiligt. In Hefe gibt es zwei Hsp90-assoziierte PPIasen, in höheren Eukaryoten wurden bisher drei Isoformen entdeckt. Allen ist gemeinsam, dass sie außer der PPIase-Domäne zusätzliche Domänen aufweisen. Interessanterweise enthalten die Hsp90-assoziierten Prolylisomerasen auch Domänen mit TPR-Motiven. Es ist zurzeit noch unklar, was die Funktion dieser Enzyme im Hsp90-Komplex ist und nach welchen Kriterien sie in den Komplex eingebaut werden; es gibt Hinweise darauf, dass das gebundene Zielprotein dabei eine Rolle spielt.^[111] Ihre enzymatische Aktivität lässt vermuten, dass die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung auch im Zusammenhang mit Hsp90-Komplexen von Bedeutung ist. Gezeigt wurde bereits, dass alle

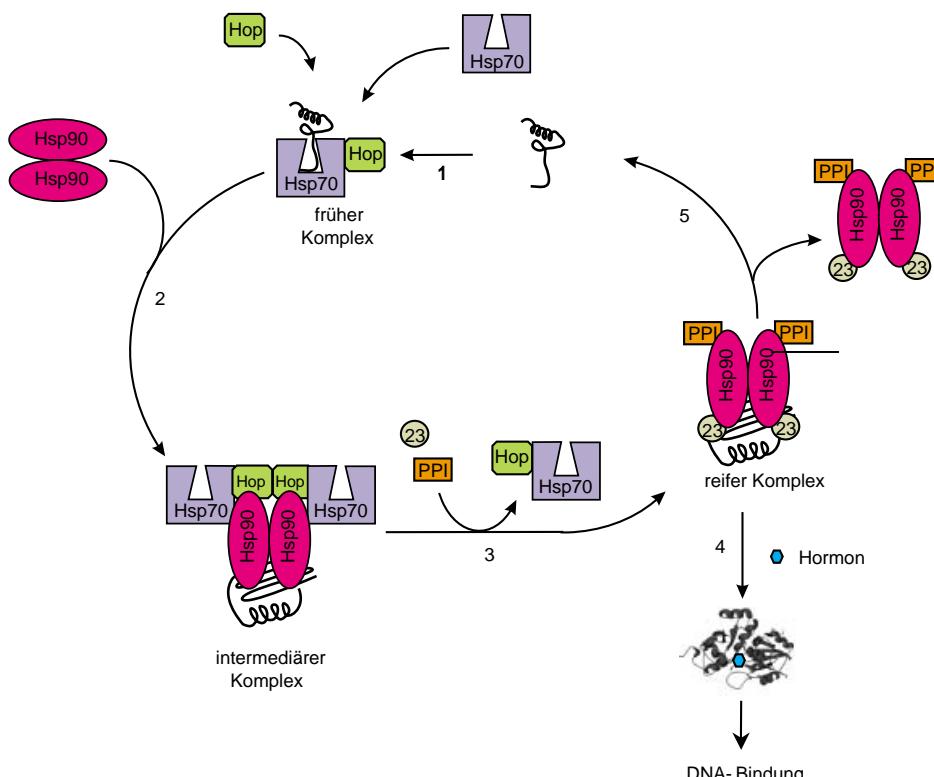


Abbildung 7. Funktionszyklus des Hsp90-Chaperonsystems am Beispiel eines Steroidhormon-Rezeptors (SHR); die Beteiligung von Cofaktoren könnte je nach Zielprotein variieren. Eine inaktive Konformation von SHR wird zunächst von Hsp70 eingefangen (Schritt 1). Das Cochaperon Hop hilft dabei, einen physikalischen Kontakt zwischen Hsp70 und Hsp90 herzustellen. Vermutlich schließt sich daran die Hydrolyse von ATP durch Hsp70 an, was zur Folge hat, dass SHR unter Bildung des intermediären Komplexes auf das Hsp90-Dimer übertragen wird (Schritt 2). Der Übergang zum reifen Komplex wird eingeleitet durch den Austausch von Hsp70 und Hop gegen große Prolylisomerasen (PPIs) und ein weiteres Helferprotein, p23 (Schritt 3). Die Bindung des Hormons an den Rezeptor führt zur Freisetzung von SHR aus dem reifen Komplex. Der Rezeptor nimmt seine aktive Konformation ein und wandert in den Zellkern (Schritt 4). In Abwesenheit eines Hormonliganden könnte SHR einen weiteren Zyklus durchlaufen (Schritt 5).

Hsp90-assoziierten Prolylisomerasen und p23, ein kleines Hsp90-bindendes Protein, in vitro selektiv nichtnative Proteine binden.^[112–115] Dies lässt darauf schließen, dass diese Proteine auch im Hsp90-Komplex in Kontakt mit dem Zielprotein sind. Das Hsp90-System ist also eine hoch dynamische, sich reversibel anordnende molekulare Maschine mit beweglichen Teilen.

2.3.3. Regulation von Proteinkonformationen durch Hsp90

Wie beeinflusst Hsp90 die Faltung anderer Proteine? Gegenwärtig scheint es so, dass Hsp90 unter physiologischen Bedingungen keine große allgemeine Bedeutung bei der De-novo-Faltung von Proteinen hat.^[116] Von ganz entscheidender Bedeutung ist Hsp90 jedoch für die Faltung einer Reihe von Proteinen, die an wichtigen regulatorischen Prozessen beteiligt sind. Es gibt indirekte Hinweise, dass diese Zielproteine in metastabilen Konformationen vorliegen. Im Falle der Steroidhormon-Rezeptoren bilden die Liganden einen Teil des hydrophoben Kerns des Proteins und tragen deshalb signifikant zur Stabilität der gefalteten Struktur bei. Hsp90 wird vermutlich benötigt, um die Steroidhormon-Rezeptoren in einem offenen konformationellen Zustand zu halten, der in der Lage ist, den Liganden zu binden (Abbildung 7). In

Abwesenheit des Chaperons könnte der Rezeptor einen energetisch günstigeren kollabierten Zustand einnehmen. In einigen Fällen ermöglicht die Chaperon-Abhängigkeit die Einführung einer zusätzlichen Regulationsebene für das Zielprotein, unabhängig von der Anwesenheit eines spezifischen Signals für das Zielprotein. Darüber hinaus kann die Assoziation mit Hsp90 generell instabile intermediäre Konformationen stabilisieren und so den für Proteine zugänglichen Konformationsraum vergrößern. Regulation der Konformation könnte der gemeinsame Nenner für ein strukturell und funktionell diverses Set an Hsp90-Zielproteinen sein. Darüber hinaus erscheint die Vermutung plausibel, dass Hsp90 unter Stressbedingungen mit einer größeren Zahl von entfalteten Proteinen wechselwirkt.

2.3.4. Der Hsp90-Chaperonzyklus

Um das Ziel der konformativen Regulation zu erreichen, muss ein Zielprotein drei Hsp90-Komplexe durchlaufen, die sich in der Zusammensetzung der Cofaktoren unterscheiden.^[91, 104] Zu-

nächst wird das Zielprotein von Hsp70 und seinen Cofaktoren gebunden (Abbildung 7, Schritt 1), die dann einen Komplex mit Hop/St1 und Hsp90 bilden (Abbildung 7, Schritt 2). Man nimmt an, dass in diesem Schritt das nichtnative Protein von einem Chaperon zum anderen weitergereicht wird, analog dem Substrattransfer von Hsp40 auf Hsp70 (Abbildung 5).^[117] Wie in allen Prozessen, an denen Hsp70 beteiligt ist, ist nicht sicher, ob Bindung und Freisetzung eine Konformationsänderung im Zielprotein zur Folge haben. Weiterhin ist unklar, ob Hsp90-Zielproteine erst an Hsp70 und dann an Hsp90 binden müssen. Dies hängt vermutlich vom jeweiligen Zielprotein ab. In vitro ist Hsp90 in der Lage, direkt an nichtnative Proteine zu binden.^[90, 118] In einem gut untersuchten Beispiel wurde gezeigt, dass das gebundene Protein weitgehend gefaltet ist. Auf dem Faltungsweg scheint diese Konformation nahe dem nativen Zustand zu liegen, denn sie weist eine charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur auf, aber keine enzymatische Aktivität.^[119] Dies ist in guter Übereinstimmung mit der in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Konformation ligandenfreier Steroidhormon-Rezeptoren.

Anders als bei den übrigen Chaperonen ist die Bildung und Dissoziation des Komplexes aus Hsp90-Hsp70-St1/Hop und dem nichtnative Protein nur Teil des Gesamtzyklus. Der Assoziation dieser Chaperonkomponenten mit dem nicht-

nativen Protein schließt sich die Freisetzung von Hsp70 und St1/Hop und die Assoziation des Cofaktors p23 sowie einer der großen PPIasen an (Abbildung 7, Schritt 3).^[120] p23 bindet an Hsp90 nur in Gegenwart von ATP.^[121] Allerdings sind zurzeit keine weiteren Faktoren bekannt, die die Dissoziation des Hsp70-Hsp90-Komplexes und die Bildung des Hsp90-p23-PPIase-Komplexes bewirken. Aus dem Hsp90-p23-PPIase-Komplex wird das nichtnative Protein (zumindest bei den Steroidhormon-Rezeptoren) in seiner aktiven, Liganden-bindenden Konformation freigesetzt (Abbildung 7, Schritt 4 oder 5).^[122] Es ist anzunehmen, dass Konformationsänderungen in Hsp90 die Wechselwirkung mit den verschiedenen Komponenten der Chaperon-Maschine steuern. Diese Partnerproteine könnten entweder überprüfen, ob Hsp90 mit Zielprotein beladen ist und entsprechend die Progression des Zyklus steuern, und/oder sie könnten direkt an den Konformationsänderungen des an Hsp90 gebundenen Zielproteins beteiligt sein.

2.4. Kleine Hitzeschockproteine (sHsps)

An einem weiteren Prozess, bei dem Proteine durch reversible Wechselwirkung mit spezialisierten Faltungsfaktoren vor Aggregation geschützt werden können, sind die kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) beteiligt. Diese Proteine wurden in fast allen bisher untersuchten Organismen gefunden. In vielen Organismen gibt es mehrere Mitglieder dieser Proteinfamilie, was auf funktionelle Diversität hindeutet. Im Unterschied zu anderen Klassen von Chaperonen sind sie auf charakteristische Weise heterogen bezüglich Sequenz und Größe. Ihr gemeinsames Merkmal ist eine konservierte C-terminale Domäne, die α -Crystallindomäne.^[123] Der Begriff leitet sich vom prominentesten Mitglied dieser Proteinfamilie, dem Augenlinsenprotein α -Crystallin, ab.

2.4.1. Struktur der sHsps

Alle bisher untersuchten sHsps bilden oligomere Komplexe aus meist 12 bis 42 Untereinheiten. Die röntgenstrukturanalytisch bestimmte dreidimensionale Struktur eines archaealen sHsps zeigt eine Hohlkugel mit Öffnungen, die ins Innere führen (Abbildung 8).^[124] Die Grundeinheit dieser oligomeren Struktur ist ein Dimer, das zur Bildung der Kugelstruktur weiter assoziiert. Die C-terminale Domäne des Monomers weist überwiegend Faltblattstruktur auf, die Struktur der N-terminalen Domäne konnte nur zum Teil bestimmt werden. Die elektronenmikroskopische Rekonstruktion der Struktur von α -Crystallin bestätigte den kugelförmigen Aufbau.^[125] Jedoch wurde für α -Crystallin, anders als für archaeales sHsp, eine Reihe unterschiedlicher oligomerer Strukturen beobachtet.

2.4.2. Komplexbildung mit entfalteten Proteinen

sHsps wurden in die Familie der molekularen Chaperone aufgenommen, weil sie spezifisch mit entfalteten Proteinen wechselwirken und deren Aggregation verhindern.^[126, 127] Verglichen mit den oben diskutierten Chaperonen haben

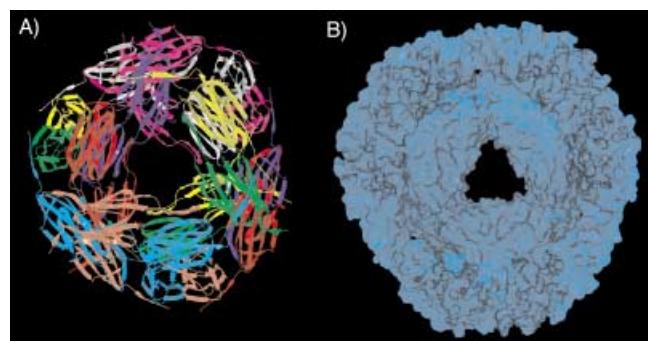


Abbildung 8. Struktur des kleinen Hitzeschockproteins aus dem Archaeabakterium *Methanococcus jannaschii*.^[124] A) Das Hitzeschockprotein bildet große poröse Hohlkugeln, die aus 24 identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Die Untereinheiten weisen hauptsächlich β -Faltblattstruktur auf. B) Querschnitt durch das sHsp aus *M. jannaschii*. Der Außen-durchmesser des Partikels beträgt ca. 120 Å, der Innendurchmesser ca. 65 Å und das Volumen ca. 140000 Å³. Bedingt durch die Aminosäurezusammensetzung ist die innere Oberfläche wesentlich hydrophober als die äußere.

die sHsps eine erstaunliche Bindekapazität. Sie sind in der Lage, eine große Zahl von nichtnative Proteinen zu binden, vermutlich bis zu einem nichtnative Protein je Untereinheit des oligomeren sHsp-Komplexes.^[128] Darüber hinaus scheint es keine Obergrenze für die Größe des gebundenen Proteins zu geben.^[129]

Eine erstaunliche Eigenschaft der sHsps ist die Bildung großer, regulärer Komplexe mit ihren Substratproteinen. Da bislang keine Assemblierungs-Intermediate entdeckt wurden, scheint die Substratbindung hoch kooperativ zu verlaufen.^[130] Die parallel ablaufende Bindung einer definierten Zahl von nichtnative Proteinen scheint eine Voraussetzung für die stabile Komplexbildung mit Substratproteinen zu sein. Die Spezifität dieser Reaktion wird dadurch unterstrichen, dass die Bindung von Substratproteinen bei einem definierten Verhältnis von nichtnative Protein zu sHsp gesättigt werden kann. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch unbekannt. Für Hsp26, einem sHsp aus Hefe, gaben In-vitro-Experimente Einblick in die Regulation der Bindekaktivität dieses Chaperons.^[130] Bei Temperaturen über 40 °C dissoziert der definierte oligomere Komplex in einer reversiblen Reaktion in stabile Dimere. Diese Dissoziation scheint Bindestellen für nichtnative Proteine freizulegen. Bemerkenswerterweise führt die Bindung von nichtnative Proteinen an das Hsp26-Dimer zur Bildung großer, definierter Komplexe. Diese Hsp26-Substrat-Komplexe haben einen Aufbau, der sich grundlegend vom Hsp26-Komplex unterscheidet.

2.4.3. sHsps als Teil der Chaperon-Maschinerie

Die Komplexe, die sHsps mit nichtnative Proteinen in vitro bilden, sind erstaunlich stabil.^[128–131] Obwohl das gebundene Protein nicht spontan freigesetzt wird, wirken diese Komplexe nicht als irreversible Fallen für das entfaltete Protein. Als Beweis wurde gezeigt, dass ein gebundenes Enzym zum nativen Zustand gefaltet werden kann, wenn man einen spezifischen Liganden zugibt, der die funktionelle Konformation des Enzyms stabilisiert.^[131] Anders als bei anderen Chaperonen wurde bislang jedoch noch kein aktiver

Freisetzungsmechanismus entdeckt. Interessanterweise ist in einigen Organismen die Expression von sHsps und Hsp70 genetisch gekoppelt.^[132] Dies und der Befund, dass die Überexpression von Hsp70 einen positiven Effekt auf die Auflösung von Aggregaten in vivo hat,^[133] lässt vermuten, dass sHsps ihre Funktion zusammen mit anderen, ATP-abhängigen Mitgliedern der Chaperonfamilie ausüben. Der biochemische Beweis für dieses kooperative Verhalten wurde mit In-vitro-Experimenten geführt, in denen Hsp70 zu vorgeformten sHsp-Substrat-Komplexen gegeben wurde. In Gegenwart von ATP war Hsp70 in der Lage, die Faltung des Substratproteins zum nativen Zustand zu ermöglichen (Abbildung 9).^[131] In unabhängigen Experimenten wurden Zelllysate auf Faktoren untersucht, die die Freisetzung von sHsp-gebundenen Proteinen unterstützen.^[128, 134] Auch diese Experimente haben Hsp70 als Schlüsselkomponente in der Reaktivierung von Proteinen identifiziert, die durch sHsps vor Aggregation geschützt wurden.

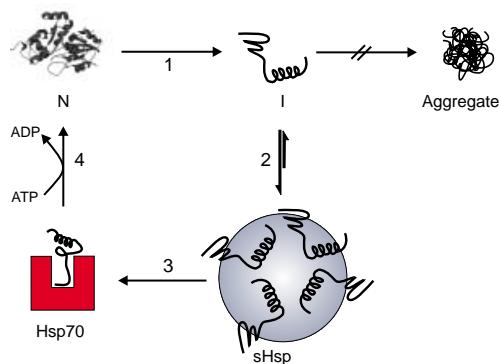


Abbildung 9. Aggregationsschutz von Polypeptiden durch kleine Hitzechockproteine. Unter Hitzechock-Bedingungen oder chemischem Stress können native Polypeptide N partiell entfalten, was zur Akkumulation von Faltungsintermediaten I führt (Schritt 1). Diese Moleküle werden durch Bindung an kleine Hitzechockproteine vor Aggregation geschützt (Schritt 2). Die gebildeten, großen Polypeptid-sHsp-Komplexe können in Gegenwart von Hsp70 wieder zerfallen (Schritt 3); der molekulare Mechanismus dieser stimulierten Freisetzung ist jedoch noch unbekannt. Nach dem Transfer des Proteinsubstrats auf das Hsp70-System falten die Polypeptide in einem ATP-abhängigen Prozess wie in Abbildung 5 beschrieben (Schritt 4).

sHsps scheinen die Funktion zu haben, nichtnative Proteine zu binden, wenn große Mengen entfalteter Proteine anfallen, z.B. als Folge von Stressbedingungen oder der Überexpression von Proteinen. Die Bindung verhindert die Bildung großer Aggregate und ermöglicht die nachfolgende Rückfaltung durch Hsp70 und möglicherweise andere ATP-abhängige Chaperonsysteme (Abbildung 9). Diese Kooperation verschiedener Komponenten der zellulären Chaperon-Maschinerie ermöglicht es so, zwei Schlüsseleigenschaften molekularer Chaperone, Bindung und Faltung, räumlich und zeitlich zu trennen.

2.5. Weitere Chaperone

Die in den Abschnitten 2.1–2.4 vorgestellten molekularen Chaperone sind die wichtigsten bekannten Systeme für die

Proteinfaltung. Wie bereits erwähnt, spielen molekulare Chaperone aber auch bei anderen Prozessen, in denen Proteinkonformationen verändert werden, eine wichtige Rolle. Ein Beispiel hierfür ist die Resolubilisierung von Proteinaggregaten. Neuere Ergebnisse zeigen, dass zwei Chaperone aus der Hsp100/Clp-Familie – ClpB aus *E. coli* sowie Hsp104 aus Hefe – Proteinaggregate auflösen können. Beide Chaperone scheinen dazu aber die Unterstützung des Hsp70-Systems zu benötigen.^[135, 136] Hsp100/Clp-Chaperone sind auch am Abbau von Proteinen beteiligt. Als „Unfoldasen“ nutzen sie hier die aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie zur aktiven Entfaltung eines Zielproteins.^[137] Interessanterweise bilden alle Hsp100/Clp-Chaperone Ringe aus sechs oder sieben Untereinheiten.

In *E. coli* assoziieren viele Proteine, die für den Export bestimmt sind, nach ihrer Synthese am Ribosom mit dem Chaperon SecB.^[138–140] Es wurde gezeigt, dass SecB zunächst die Faltung eines Zielproteins unterbricht und es dann zu der membranlokalisierten Transportmaschinerie geleitet, wo es nach außen geschleust wird. Transportsysteme für entfaltete Proteine wurden auch in manchen Organellen der eukaryotischen Zelle gefunden, z.B. in den Mitochondrien oder im endoplasmatischen Retikulum.

3. Perspektiven

Der Lebenszyklus eines Proteins ist geprägt von den konformationellen Veränderungen, denen es unterliegt. Faltung, Transport, Funktionserhaltung und Abbau von Proteinen sind Prozesse, die das Mitwirken von molekularen Chaperonen erfordern. Im vergangenen Jahrzehnt hat sich das Wissen über diese Vorgänge enorm erweitert, und wir verfügen heute über eine große Menge an Informationen über Struktur und Funktion von Chaperonen. Trotz dieser Fortschritte weist das entstandene Bild allerdings noch deutliche Lücken auf. Es existiert eine erstaunliche Vielzahl an Chaperonsystemen, und zum gegenwärtigen Zeitpunkt wissen wir nur wenig über ihre genaue Funktion in der Zelle und darüber, wie sie ihre Aufgaben auf molekularer Ebene bewältigen. Im Folgenden wollen wir einige interessante Tendenzen aufzeigen, die sich für die Zukunft abzeichnen.

3.1. Chaperon-Netzwerke

Eine wichtige, aber im Augenblick noch unbeantwortete Frage ist, inwieweit die verschiedenen Klassen von Chaperonen in der Zelle zusammenarbeiten. Beispiele für derartige Netzwerke sind die Kooperation zwischen Hsp90 und Hsp70 bei der Aktivierung von Steroidhormon-Rezeptoren (Abbildung 7) oder die Kooperation von Hsp70 mit GroE (Abschnitt 2.2.3). Es ist nicht bekannt, ob die Prozessierung eines Polypeptidsubstrats in derartigen Netzwerken gerichtet oder zufällig erfolgt.^[80, 141, 142] Unklar ist auch, warum sich die Funktionen der unterschiedlichen Chaperone so stark überlappen. Sie alle können die Proteinaggregation unterdrücken, und viele von ihnen werden gleichzeitig unter Stressbedingungen überproduziert. Einerseits benötigen Zellen vermut-

lich ein gewisses Maß an Funktionsredundanz als Absicherung, andererseits darf vermutet werden, dass eine genauere Analyse der Proteinfaltung in der Zelle neue Erkenntnisse über die spezifische Rolle einzelner Chaperone hervorbringen wird.

3.2. Konformationsänderungen von Proteinen während der Assoziation mit Chaperonen

Chaperone können in Polypeptiden Strukturänderungen wie Faltung, Entfaltung oder Dissoziation induzieren. Die Entfaltung von Proteinen ist ein relativ unspezifischer Prozess, denn alle bekannten Proteine lassen sich durch eine einzige chemische Verbindung, Guanidinhydrochlorid, entfalten. Unter zellulären Bedingungen ist die Entfaltung von Proteinen endergonisch und benötigt daher die Zufuhr von Energie. Die Funktion eines Chaperons bestünde somit u.a. darin, die Proteinentfaltung mit der aus der ATP-Spaltung gewonnenen chemischen Energie zu koppeln, sodass der Gesamtprozess exergonisch verläuft. Eine derartige Entfaltungsaktivität scheint sowohl für den Abbau von Proteinen als auch für das Recycling von missgefalteten Proteinmolekülen wichtig zu sein. Auf einem ähnlichen Prinzip beruht vermutlich auch die Chaperon-vermittelte Dissoziation von definierten Proteinkomplexen oder unspezifischen Aggregaten. In beiden Fällen muss eine Vielzahl von Wechselwirkungen, die die Assoziation der Bestandteile stabilisieren, aufgebrochen werden, was Energie erfordert.

3.3 Chaperone und Krankheiten

Die Bedeutung molekularer Chaperone für die Lebensfähigkeit einer Zelle ersieht man daraus, dass die Deletion dieser Gene häufig letal ist oder schwerwiegende zelluläre Defekte nach sich zieht, z.B. eine verringerte Stressresistenz. Wenn eine bestimmte Chaperonfunktion nicht oder nur in eingeschränktem Maße vorhanden ist, kann eine Erkrankung die Folge sein. Andererseits könnte die Aktivität eines Chaperons aber auch das Auftreten einer Krankheit begünstigen, etwa im Fall der bovinen spongiformen Encephalopathie (BSE) oder beim Creutzfeld-Jakob-Syndrom. Bei beiden Krankheiten treten im Gehirn faserige Ablagerungen von Aggregaten des Prionproteins PrP auf.^[143] Bei Säugern ist die Beteiligung molekularer Chaperone an der Entstehung von Prionenerkrankungen noch spekulativ. Bei der Hefe *S. cerevisiae* hingegen gilt als gesichert, dass die Prionenbildung die Gegenwart des molekularen Chaperons Hsp104 erfordert.^[144] Hsp104 scheint Größe und Zahl der Keime zu kontrollieren, die für die Polymerisation der Prionenfibrillen und ihre Weitervererbung wichtig sind. Hefezellen mit Prionen können durch die Inaktivierung von Hsp104 „geheilt“ werden.^[144, 145] Chaperone kommen auch als Zielmoleküle bei der Behandlung von Krebs und dem septischen Schocksyndrom sowie bei Gewebetransplantationen etc. in Betracht. Abhängig vom jeweiligen Beitrag könnte entweder ihre Inhibierung oder ihre Stimulation für eine erfolgreiche Therapie erforderlich sein.

3.4. Molekulare Chaperone in der Biotechnologie

Die Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien wird häufig durch die Bildung von „inclusion bodies“ erschwert, großer Aggregate, die hauptsächlich aus inaktiven Formen des überproduzierten Proteins bestehen.^[146] In einigen Fällen konnte dieses Problem durch die parallel ablaufende Expression molekularer Chaperone verringert werden.^[147–149] Molekulare Chaperone könnten deshalb als nützliche Werkzeuge zur Optimierung biotechnischer Prozesse dienen und den Einsatz von Zellfabriken ermöglichen, die auf die Produktion rekombinanter Proteine spezialisiert sind.

3.5. Chaperone und Evolution

Wie bereits erwähnt, sind kleine Proteine bei ihrer Faltung *in vitro* in der Regel nicht auf molekulare Chaperone angewiesen, größere Proteine hingegen schon. Offensichtlich müssen große Proteine evolutionäre Vorteile haben, die den notwendigen Mehraufwand für ihre Herstellung aufwiegen. Zwei Überlegungen könnten hier eine Rolle spielen: 1) Der für kleine Proteine zugängliche Konformationsraum ist möglicherweise begrenzt, d.h., einige Raumstrukturen können nur von längeren Polypeptidketten ausgebildet werden. Da Struktur und Funktion eines Proteins eng korrelieren, könnten sich einige biologische Funktionen nur mit großen Proteinen realisieren lassen. 2) Große Proteine sind häufig aus mehreren Domänen aufgebaut, die spezifische Funktionen wie Oligomerisierung oder Substratbindung ausführen. Dieses Bauprinzip ermöglicht die Entwicklung von Proteinen mit neuen Eigenschaften durch einfache Neukombination bereits existierender Bausteine.

Ein anderer Aspekt, der die Bedeutung molekularer Chaperone in der Evolution zeigt, betrifft die konformativelle Stabilität von Proteinen. Enzyme benötigen zur Ausübung ihrer biologischen Funktion eine gewisse Flexibilität, z.B. um Substrate zu binden oder auf Regulationssignale zu reagieren. Die molekulare Evolution führte daher zur Selektion von Proteinen mit *optimaler*, und nicht *maximaler* Stabilität der nativen Struktur. Typischerweise liegt die Freie Enthalpie der Faltung im Bereich von 20 bis 80 kJ mol⁻¹,^[150] ein Wert, der einer kleinen Zahl an molekularen Wechselwirkungen (z.B. Ionenpaarbildung oder Wasserstoffbrücken) entspricht. Ein Nachteil dieser geringen Stabilität ist, dass einige Proteine bereits bei leicht erhöhter Temperatur entfalten. Daher wurde ein Mechanismus benötigt, der unter diesen Bedingungen die irreversible Aggregation von Proteinen unterdrückt. Deutlich wird die enge Beziehung zwischen Chaperonen und Evolution am Beispiel der Funktion von Hsp90 während der Individualentwicklung.^[151] Danach wird dieses Chaperon konstitutiv benötigt, um die Funktion mutierter Proteine zu gewährleisten. Unter Stressbedingungen können Chaperone diese Aufgabe nicht länger erfüllen: Die Mutationen treten zutage und haben neue Eigenschaften und Phänotypen zur Folge.

Die Erforschung der Funktion molekularer Chaperone hat eine Reihe unverhoffter Wendungen genommen. Dies gilt sowohl in Hinblick auf die Mechanismen dieser ATP-betrie-

benen Maschinen als auch für ihre Beteiligung an grundlegenden zellulären Prozessen. Im Unterschied zu ihren vom Aussterben bedrohten menschlichen Pendants treten die molekularen Chaperone gerade erst ins Rampenlicht. Die Entschlüsselung ihrer Bedeutung für die Mechanismen, die das Leben auf molekularer Ebene bestimmen, steht erst am Anfang.

Wir bedanken uns bei Harald Wegele und Holger Grallert für das Durchlesen des Manuskripts sowie bei Rob Montfort für seine Hilfe bei der Erstellung von Abbildung 8. Die Arbeit der Autoren wurde unterstützt durch die DFG, das BMBF, die EU und den FCI.

Eingegangen am 1. August 2001 [A 487]

- [1] R. Jaenicke, R. Seckler, *Adv. Protein Chem.* **1997**, *50*, 1–59.
- [2] A. L. Fink, *Folding Des.* **1998**, *3*, R9–R23.
- [3] M. J. Gething, J. F. Sambrook, *Nature* **1992**, *355*, 33–45.
- [4] J. Buchner, *FASEB J.* **1996**, *10*, 10–19.
- [5] T. E. Creighton, *Biochem. J.* **1990**, *270*, 1–16.
- [6] P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *51*, 459–489.
- [7] C. M. Dobson, A. Šali, M. Karplus, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 908–935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 868–893.
- [8] W. F. van Gunsteren, R. Bürgi, C. Peter, X. Daura, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 363–367; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 351–355.
- [9] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F. H. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *58*, 1309–1314.
- [10] C. B. Anfinsen, *Science* **1973**, *181*, 223–230.
- [11] D. B. Wetlauffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 697–701.
- [12] T. E. Creighton, *J. Mol. Biol.* **1975**, *25*, 167–199.
- [13] R. Jaenicke, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 385–402; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 395–413.
- [14] R. Jaenicke, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1987**, *49*, 117–237.
- [15] K. A. Dill, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133–7155.
- [16] W. Kauzman, *Adv. Protein Chem.* **1959**, *14*, 1–63.
- [17] T. Kiefhaber, R. Rudolph, H. H. Kohler, J. Buchner, *Biotechnology* **1991**, *9*, 825–829.
- [18] R. J. Ellis, *Nature* **1987**, *328*, 378–379.
- [19] E. Craig, W. Yan, P. James in *Molecular Chaperones and Folding Catalysts* (Hrsg.: B. Bukau), Harwood, Amsterdam, **1999**, S. 139–162.
- [20] W. Colon, L. P. Wakem, F. Sherman, H. Roder, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12535–12541.
- [21] W. A. Fenton, A. L. Horwich, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 743–760.
- [22] P. B. Sigler, Z. Xu, H. S. Rye, S. G. Burston, W. A. Fenton, A. L. Horwich, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 581–608.
- [23] D. Thirumalai, G. H. Lorimer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 245–269.
- [24] H. Grallert, J. Buchner, *J. Struct. Biol.* **2001**, *135*, 95–103.
- [25] O. Fayet, T. Ziegelhoffer, C. Georgopoulos, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1379–1385.
- [26] K. Braig, Z. Otwinowski, R. Hedge, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich, P. B. Sigler, *Nature* **1994**, *371*, 578–586.
- [27] Z. Xu, A. L. Horwich, P. B. Sigler, *Nature* **1997**, *388*, 741–750.
- [28] J. F. Hunt, A. J. Weaver, S. J. Landry, L. Giersch, J. Deisenhofer, *Nature* **1996**, *379*, 37–45.
- [29] S. J. Landry, O. Zeilstra-Ryalls, O. Fayet, C. Georgopoulos, L. Giersch, *Nature* **1993**, *364*, 255–258.
- [30] A. Richardson, F. Schwager, S. J. Landry, C. Georgopoulos, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4981–4987.
- [31] H. R. Saibil, Z. Dong, S. Wood, A. auf der Mauer, *Nature* **1991**, *353*, 25–26.
- [32] T. Langer, G. Pfeifer, J. Martin, W. Baumeister, F. U. Hartl, *EMBO J.* **1992**, *11*, 4757–4765.
- [33] S. Chen, A. M. Roseman, A. S. Hunter, S. Wood, S. G. Burston, N. A. Ranson, A. R. Clarke, H. R. Saibil, *Nature* **1994**, *371*, 261–264.
- [34] M. Schmidt, K. Rutkat, R. Rachel, G. Pfeifer, R. Jaenicke, P. V. Viitanen, G. H. Lorimer, J. Buchner, *Science* **1994**, *265*, 656–659.
- [35] A. Azem, M. Kessel, P. Goloubinoff, *Science* **1994**, *265*, 653–656.
- [36] O. Llorca, S. Marco, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta, *FEBS Lett.* **1994**, *345*, 181–186.
- [37] K. Willison, A. L. Horwich, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **1993**, *339*, 313–325.
- [38] I. Gutsche, L. O. Essen, W. Baumeister, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 295–312.
- [39] Z. Lin, F. P. Schwarz, E. Eisenstein, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1011–1014.
- [40] W. A. Fenton, Y. Kashi, K. Furtak, A. L. Horwich, *Nature* **1994**, *371*, 614–619.
- [41] A. M. Buckle, R. Zahn, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3571–3575.
- [42] L. Chen, P. B. Sigler, *Cell* **1999**, *99*, 757–768.
- [43] S. Falke, M. T. Fisher, E. P. Gogol, *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 569–577.
- [44] C. V. Robinson, N. Gross, S. J. Eyles, J. J. Ewbank, M. Mayhew, F. U. Hartl, C. M. Dobson, S. E. Radford, *Nature* **1994**, *372*, 646–651.
- [45] J. Chen, S. Walter, A. L. Horwich, D. L. Smith, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 721–728.
- [46] H. Lilie, J. Buchner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8100–8104.
- [47] B. Bukau, A. L. Horwich, *Cell* **1998**, *92*, 351–366.
- [48] A. M. Roseman, S. Chen, H. White, K. Braig, H. R. Saibil, *Cell* **1996**, *87*, 241–251.
- [49] J. S. Weissman, C. M. Hohl, O. Kovalenko, Y. Kashi, S. Chen, K. Braig, H. R. Saibil, W. A. Fenton, A. L. Horwich, *Cell* **1995**, *83*, 577–587.
- [50] M. Mayhew, A. C. R. da Silva, J. Martin, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, F. U. Hartl, *Nature* **1996**, *379*, 420–426.
- [51] C. Sakihawa, H. Taguchi, Y. Makino, M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21251–21256.
- [52] Y. Dubaque, R. Looser, U. Fünfschilling, P. Jeno, S. Rospert, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5868–5876.
- [53] T. K. Chaudhuri, G. W. Farr, W. A. Fenton, S. Rospert, A. L. Horwich, *Cell* **2001**, *107*, 235–246.
- [54] G. S. Jackson, R. A. Staniforth, D. J. Halsall, T. Atkinson, J. J. Holbrook, A. R. Clarke, S. G. Burston, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2554–2563.
- [55] M. J. Todd, P. V. Viitanen, G. H. Lorimer, *Science* **1994**, *265*, 659–666.
- [56] S. G. Burston, N. A. Ranson, A. R. Clarke, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 138–152.
- [57] H. S. Rye, S. G. Burston, W. A. Fenton, J. M. Beechem, Z. Xu, P. B. Sigler, A. L. Horwich, *Nature* **1997**, *388*, 792–798.
- [58] S. Walter, G. H. Lorimer, F. X. Schmid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9425–9430.
- [59] R. Zahn, C. Spitzfaden, M. Ottiger, K. Wüthrich, A. Plückthun, *Nature* **1994**, *368*, 261–265.
- [60] M. Shitlerman, G. H. Lorimer, S. W. Englander, *Science* **1999**, *284*, 822–825.
- [61] G. W. Farr, K. Furtak, M. B. Rowland, N. A. Ranson, H. R. Saibil, A. L. Horwich, *Cell* **2000**, *100*, 561–573.
- [62] H. Grallert, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20171–20177.
- [63] M. J. Todd, G. H. Lorimer, D. Thirumalai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4030–4035.
- [64] H. Grallert, K. Rutkat, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20424–20430.
- [65] P. V. Viitanen, A. A. Gatenby, G. H. Lorimer, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 363–369.
- [66] G. H. Lorimer, *FASEB J.* **1996**, *10*, 5–9.
- [67] W. A. Houry, D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, F. U. Hartl, *Nature* **1999**, *402*, 147–154.
- [68] F. U. Hartl, *Nature* **1996**, *381*, 571–580.
- [69] G. C. Flynn, J. Pohl, M. T. Flocco, J. E. Rothman, *Nature* **1991**, *353*, 726–730.
- [70] K. M. Flaherty, C. Deluca-Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1990**, *346*, 623–628.
- [71] C. J. Harrison, M. Hayer-Hartl, M. Di Liberto, F. U. Hartl, J. Kuriyan, *Science* **1997**, *276*, 431–435.
- [72] X. Zhu, X. Zhao, W. F. Burkholder, A. Gragerov, C. M. Ogata, M. E. Gottesman, W. A. Hendrickson, *Science* **1996**, *272*, 1606–1614.

- [73] K. M. Flaherty, D. B. McKay, W. Kabsch, K. C. Holmes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5041–5045.
- [74] D. Schmid, A. Baici, H. Gehring, P. Christen, *Science* **1994**, *263*, 971–973.
- [75] S. Blond-Elguindi, S. E. Cwirla, W. J. Dower, R. J. Lipshutz, S. R. Sprang, J. F. Sambrook, M. J. Gething, *Cell* **1993**, *75*, 717–728.
- [76] A. Gragerov, L. Zeng, X. Zhao, W. F. Burkholder, M. E. Gottesman, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 848–854.
- [77] S. Rüdiger, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, *EMBO J.* **1997**, *16*, 1501–1507.
- [78] G. Knarr, M. J. Gething, S. Modrow, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27589–27594.
- [79] J. Gamer, G. Multhaup, T. Tomoyasu, J. S. McCarty, S. Rüdiger, H.-J. Schönfeld, C. Schirra, H. Bujard, B. Bukau, *EMBO J.* **1996**, *15*, 607–617.
- [80] T. Langer, C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M. K. Hayer, F. U. Hartl, *Nature* **1992**, *356*, 683–689.
- [81] H. Schröder, T. Langer, F. U. Hartl, B. Bukau, *EMBO J.* **1993**, *12*, 4137–4144.
- [82] D. M. Cyr, T. Langer, M. G. Douglas, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 176–181.
- [83] D. Wall, M. Zylicz, C. Georgopoulos, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5446–5451.
- [84] K. Liberek, J. Marszałek, D. Ang, C. Georgopoulos, M. Zylicz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2874–2878.
- [85] M. Zylicz, D. Ang, C. Georgopoulos, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17437–17442.
- [86] H.-J. Schönfeld, D. Schmidt, H. Schröder, B. Bukau, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2183–2189.
- [87] Y. Uehara, Y. Myrakawi, S. Mizuno, S. Kawai, *Virology* **1988**, *164*, 294–298.
- [88] L. Whitesell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8324–8328.
- [89] K. Richter, J. Buchner, *J. Cell. Physiol.* **2001**, *188*, 281–290.
- [90] J. Buchner, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 136–141.
- [91] D. F. Smith, *Sci. Med.* **1995**, *2*, 38–47.
- [92] M. Maruya, M. Sameshima, T. Nemoto, I. Yahara, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 903–907.
- [93] K. Richter, P. Muschler, O. Hainzel, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33689–33696.
- [94] A. Chadli, I. Bouhouche, W. P. Sullivan, B. Stensgard, N. McMahon, M. G. Catelli, D. O. Toft, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12524–12529.
- [95] C. E. Stebbins, A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl, N. P. Pavletich, *Cell* **1997**, *89*, 239–250.
- [96] C. Prodromou, S. M. Roe, P. W. Piper, L. H. Pearl, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 430–434.
- [97] C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *Cell* **1997**, *90*, 65–75.
- [98] T. Scheibel, T. Weikl, J. Buchner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1495–1499.
- [99] B. Panaretou, C. Prodromou, L. H. Pearl, P. W. Piper, *EMBO J.* **1998**, *17*, 4829–4836.
- [100] W. M. Oberman, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 901–910.
- [101] C. Prodromou, B. Panaretou, S. Chohan, G. Siligardi, R. O'Brien, J. E. Ladbury, S. M. Roe, P. W. Piper, L. H. Pearl, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4383–4392.
- [102] T. Weikl, P. Muschler, K. Richter, T. Veit, J. Reinstein, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 583–592.
- [103] J. C. Young, C. Schneider, F. U. Hartl, *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 139–143.
- [104] D. F. Smith, *Mol. Endocrinol.* **1993**, *7*, 1418–1429.
- [105] A. K. Das, P. W. Cohen, D. Barford, *EMBO J.* **1998**, *17*, 1192–1199.
- [106] C. Scheufler, A. B. G. Brinker, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl, I. Moarefi, *Cell* **2000**, *101*, 199–210.
- [107] S. Chen, D. F. Smith, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 35194–35200.
- [108] C. Prodromou, G. Siligardi, R. O'Brien, D. N. Woolfson, L. Regan, B. Panaretou, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *EMBO J.* **1999**, *18*, 754–762.
- [109] G. Fischer, F. X. Schmid, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2205–2212.
- [110] G. Fischer, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1479–1501; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1415–1436.
- [111] S. C. Nair, R. A. Rimerman, E. J. Toran, S. Chen, V. Prapanianich, R. Butts, *Mol. Cell Biol.* **1997**, *17*, 594–603.
- [112] S. Bose, T. Weikl, H. Bügl, J. Buchner, *Science* **1996**, *274*, 1715–1717.
- [113] C. Mayr, K. Richter, H. Lilie, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34140–34146.
- [114] F. Pirkl, E. Fischer, S. Modrow, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37034–37041.
- [115] B. C. Freeman, D. O. Toft, R. Morimoto, *Science* **1996**, *274*, 1718–1720.
- [116] D. F. Nathan, M. H. Vos, S. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12949–12956.
- [117] Y. Morishima, P. J. M. Murphy, D. P. Li, E. R. Sanchez, W. B. Pratt, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18054–18060.
- [118] H. Wiech, J. Buchner, R. Zimmermann, U. Jakob, *Nature* **1992**, *358*, 169–170.
- [119] U. Jakob, H. Lilie, I. Meyer, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7288–7294.
- [120] J. L. Johnson, D. O. Toft, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24989–24993.
- [121] J. L. Johnson, D. O. Toft, *Mol. Endocrinol.* **1995**, *9*, 670–678.
- [122] W. B. Pratt, D. O. Toft, *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 1–55.
- [123] W. W. deJong, J. A. Leunissen, C. E. Voorter, *Mol. Biol. Evol.* **1993**, *10*, 103–126.
- [124] K. K. Kim, R. Kim, S. H. Kim, *Nature* **1998**, *394*, 595–599.
- [125] D. A. Haley, J. Horwitz, P. L. Stewart, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 27–35.
- [126] J. Horwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10449–10453.
- [127] U. Jakob, J. Buchner, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 205–211.
- [128] G. J. Lee, A. M. Roseman, H. R. Saibil, E. Vierling, *EMBO J.* **1997**, *16*, 659–671.
- [129] M. Ehrnsperger, C. Hergersberg, U. Wienhues, A. Nichtl, J. Buchner, *Anal. Biochem.* **1998**, *259*, 218–225.
- [130] M. Haslbeck, S. Walke, T. Stromer, M. Ehrnsperger, H. E. White, S. Chen, H. R. Saibil, J. Buchner, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6744–6751.
- [131] M. Ehrnsperger, S. Gräber, M. Gaestel, J. Buchner, *EMBO J.* **1997**, *16*, 221–229.
- [132] E. T. Michelini, G. C. Flynn, *J. Bacteriol.* **1999**, *112*, 4237–4244.
- [133] H. H. Kampinga, G. F. Brunsting, G. J. J. Stege, A. W. T. Konings, J. Landry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 1170–1177.
- [134] G. J. Lee, E. Vierling, *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 189–198.
- [135] J. R. Glover, S. Lindquist, *Cell* **1998**, *94*, 73–82.
- [136] P. Goloubinoff, A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu, B. Bukau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13732–13737.
- [137] E. U. Weber-Ban, B. G. Reid, A. D. Miranker, A. L. Horwich, *Nature* **1999**, *401*, 90–93.
- [138] P. Bassford, J. Beckwith, K. Ito, C. Kumamoto, S. Mizushima, D. Oliver, L. L. Randall, T. Silhavy, P. C. Tai, B. Wickner, *Cell* **1991**, *65*, 367–368.
- [139] L. L. Randall, T. B. Topping, S. J. Hardy, M. Y. Pavlov, D. V. Freistroffer, M. Ehrenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 802–807.
- [140] A. J. Driessens, *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 193–196.
- [141] A. Buchberger, H. Schröder, T. Hesterkamp, H.-J. Schönfeld, B. Bukau, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 328–333.
- [142] L. Veinger, S. Diamant, J. Buchner, P. Goloubinoff, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11032–11037.
- [143] S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13363–13383.
- [144] Y. O. Chernoff, S. L. Lindquist, B. Ono, S. G. Inge-Vechtomov, S. W. Lieberman, *Science* **1995**, *268*, 880–884.
- [145] S. S. Eaglestone, L. W. Ruddock, B. S. Cox, M. F. Tuite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 240–244.
- [146] A. Mitraki, J. King, *Biotechnology* **1989**, *7*, 690–697.
- [147] P. Goloubinoff, A. A. Gatenby, G. H. Lorimer, *Nature* **1989**, *337*, 44–47.
- [148] P. Blum, M. Velligan, N. Lin, A. Matin, *Biotechnology* **1992**, *10*, 301–304.
- [149] E. Schwarz, H. Lilie, R. Rudolph, *Biol. Chem.* **1996**, *377*, 411–416.
- [150] C. N. Pace, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 14–17.
- [151] S. L. Rutherford, S. L. Lindquist, *Nature* **1998**, *396*, 336–342.