

Abbildung 80: *Transkriptionsfaktor NusA von Thermotoga maritima.*  
(Quelle: M. Worbs et al.: *Mol. Cell* 7 (2001) 1177)

# Max-Planck-Gesellschaft

## Arbeitsgruppen für Strukturelle Molekularbiologie

**Leiter:** H.-D. Bartunik, E. Mandelkow (Sprecher), A. Yonath

**Die Max-Planck-Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit den Beziehungen zwischen der Struktur und der Funktion von biologischen Makromolekülen. Thematische Schwerpunkte sind**

- die Enzyme und ihr katalytischer Mechanismus,
- das Zytoskelett und seine Rolle in Zellbewegung und Alzheimer-Krankheit,
- das Ribosom und seine Funktion in der Proteinbiosynthese.

**Die Proben werden mit biochemischen Methoden isoliert oder mit molekularbiologischen Methoden synthetisiert. Die wesentliche Methode der Strukturuntersuchung ist die Röntgenbeugung von Proteinkristallen, Fasern oder Lösungen; daneben werden weitere biophysikalische Analyseverfahren wie Spektroskopie, Elektronenmikroskopie, Bildverarbeitung und andere eingesetzt. Schwerpunkte methodischer und instrumenteller Entwicklungen sind neue Kristallisationsverfahren, Einsatz von elektronischen Detektoren, Laue-Methoden und eine Messstrecke für die Proteinkristallographie.**

### Forschungsschwerpunkte

#### Proteindynamik

Die MPG-Arbeitsgruppe für Proteindynamik untersucht Struktur-Funktionsbeziehungen von Proteinen. Sie setzt dabei Methoden der Proteinkristallographie bei ultra-hoher Auflösung, der Kryokristallographie sowie der Nanosekunden-zeitaufgelösten Röntgenbeugung ein. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Entwicklung von Methoden anomaler Phasenlösung und ihre Anwendung auf de-novo-Bestimmungen von Proteinstrukturen. Die Gruppe betreibt eine Messstation an der Wiggler-Beamline BW6 an DORIS.

Ein Schwerpunkt der wissenschaftlichen Arbeiten lag bei der weiteren Entwicklung von Verfahren experimenteller Phasierung. Mit Hilfe anomaler Streuung bei einer Röntgenwellenlänge (SAD-Methode) bzw. bei mehreren Wellenlängen (MAD) wurde eine Reihe neuer Proteinstrukturen aufgeklärt. Ein wichtiges Beispiel stellt die Struktur des Transkriptionsfaktors NusA von *Thermotoga maritima* dar (Abb. 80), die auf der Grundlage anomaler Streuung an der Se-K-Kante gelöst wurde. Durch die Anordnung multipler Domänen (S1, KH) entsteht eine ausgedehnte Oberfläche für die Bindung von RNA. Durch kooperative Effekte können die Stärke und Spezifität der RNA-Bindung moduliert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag bei der Entwicklung von Verfahren und Techniken zur Automatisierung der Beugungsmessungen und ihrer Auswertung. Damit wurden wesentliche Voraussetzungen für die Lösung von Proteinstrukturen in hohem Durchsatz und damit für Anwendungen in der Strukturgenomik an der Beamline BW6 geschaffen. In einem ersten Schritt sollen vorgefrorene Proteinkristalle automatisch auf ein Diffraktometer transferiert werden. Dazu wurde ein Robotersystem konzipiert, das in Kürze fertig gestellt und installiert werden soll. Ein zweiter Schritt, bei dem der montierte Kristall automatisch identifiziert und in den Röntgenstrahl positioniert wird, wurde bereits abgeschlossen; dieses System wurde schon in Routinemessungen eingesetzt. Ein dritter Schritt, der die Möglichkeit zu automatischer Beugungsdatensammlung sowie zur sofortigen Reduktion der Daten schafft, wurde ebenfalls bereits realisiert. Weitere Schritte, die sich in der Entwicklung befinden, zielen auf eine automatische Beurteilung der Kristallqualität, Wahl der Messstrategie sowie Lösung der Patterson als Basis für automatisierte SAD/MAD-Phasierung; diese Schritte bedürfen bisher der Expertise erfahrener Kristallographen. Es wird erwartet, dass sich die Auswahl geeigneter Kristalle (Screening) sowie die eigentliche Kristallstrukturan-

lyse für einen erheblichen Teil aller Proteine, die als Targets für Projekte der Strukturgenomik von Interesse sind, automatisieren lässt.

Alle Röntgenbeugungsmessungen wurden an der Beamline BW6 an DORIS durchgeführt, die von MPG und GBF gemeinsam betrieben wird.

## Zytoskelett

Die MPG-Gruppe „Zytoskelett“ befasst sich mit der Strukturbestimmung von Proteinen des Zytoskeletts mit Hilfe der Synchrotronstrahlung, insbesondere mit der Untersuchung des Struktur-Funktions-Zusammenhangs von Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Mikrotubuli sind hohlzylindrische Proteinfasern, die durch spontane Polymerisation von Tubulin entstehen. Sie spielen bei der Organisation zellulärer Strukturen eine wichtige Rolle und sind an vielen dynamischen Prozessen in der Zelle beteiligt.

Es gibt eine große Zahl von Proteinen und Protein-komplexen, die mit Mikrotubuli assoziiert sind. Von diesen stehen zwei Gruppen im Vordergrund des Interesses: Die erste ist die Gruppe der Motorproteine, die für den Transport zellulärer Bestandteile entlang der Mikrotubuli verantwortlich sind. Zu dieser Gruppe gehören Dynein und die Familie der Kinesine. Die zweite Gruppe sind die so genannten „MAPs“ (Mikrotubuli-assoziierte Proteine); sie haben hauptsächlich stabilisierende bzw. regulative Wirkung auf das Mikrotubuli-Gerüst der Zelle. Hierzu gehört das Tau-Protein, das eine besondere Rolle bei der Entstehung verschiedener Formen neuronaler Erkrankungen, wie FTDP-17 und Alzheimer-Krankheit, spielt. Neuere Untersuchungen belegen, dass es einen direkten, funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen, den Motorproteinen und den MAPs, gibt. Dies eröffnet neue Perspektiven für die Erforschung der molekularen Ursachen der genannten Krankheiten.

Konventionelles Kinesin, der Hauptvertreter der Kinesin-Familie, besteht in seiner nativen Form aus zwei schweren und zwei leichten Peptidketten. Jede der beiden schweren Ketten hat an ihrem N-Terminus eine etwa 350 Aminosäuren umfassende, globuläre „Motordomäne“. Diese Motordomänen sind für die Interaktion mit den Mikrotubuli und für die Umwandlung

chemischer Energie in gerichtete Bewegung (mechanische Arbeit) verantwortlich. Dabei wird die energiereiche Verbindung ATP (Adenosin-tri-phosphat) zu ADP (Adenosin-di-phosphat) und Phosphat hydrolysiert.

Mittlerweile sind Röntgenstrukturen von Motordomänen verschiedener Kinesine bekannt, unter anderem aus konventionellem Kinesin von Mensch und Ratte. Vor kurzem ist es gelungen, die Motordomäne des Pilzkinesins NcKin (*Neurospora crassa* Kinesin) zu kristallisieren und die Struktur mit Röntgendiffraktion zu bestimmen. NcKin weist gegenüber anderen Kinesinen einige Besonderheiten auf. NcKin hat keine leichten Ketten und bewegt sich drei- bis fünfmal schneller als das konventionelle Kinesin aus tierischen Zellen. Der Vergleich der Struktur des Pilzkinesins mit den bereits bekannten Kinesinstrukturen liefert Hinweise auf den Mechanismus der Motoraktivität von Kinesinen im allgemeinen und auf die Ursachen für die hohe Geschwindigkeit des Pilzkinesins im besonderen: Kleine strukturelle Änderungen in der ATP-Bindungstasche (hervorgerufen durch die Spaltung von ATP in ADP und Phosphat) werden durch ein dynamisches Netzwerk von Salzbrücken auf benachbarte Regionen in der Motordomäne übertragen und verstärkt. Diese Regionen sind einerseits für die Wechselwirkung mit Mikrotubuli und andererseits für die Kommunikation mit der zweiten Motordomäne verantwortlich. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist der Ersatz der Spaltprodukte ADP und Phosphat durch frisches ATP. Im Vergleich mit den anderen Kinesinen hat das schnelle Pilzkinesin eine viel weitere ATP-Bindungstasche. Dadurch kann der Austausch von ADP und ATP schneller erfolgen. Weiterhin trägt vermutlich auch die höhere Beweglichkeit der Region, über die die beiden Motordomänen miteinander kommunizieren, zur Geschwindigkeit des Pilzkinesins bei.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau hat in Lösung keine bestimmte Struktur, die Tau-Moleküle nehmen vielmehr weitgehend zufällige Konformationen an. Das Fehlen einer definierten globulären Struktur führt bei Proteinen häufig zu unerwünschter Aggregation und zur Bildung großer Polymerkomplexe (Fasern), die die Zelle schädigen. Dieser Prozess ist die Grundlage verschiedener Demenzen des Menschen (Beispiel: Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Creutzfeld-Jacob-Krankheit) und verwand-

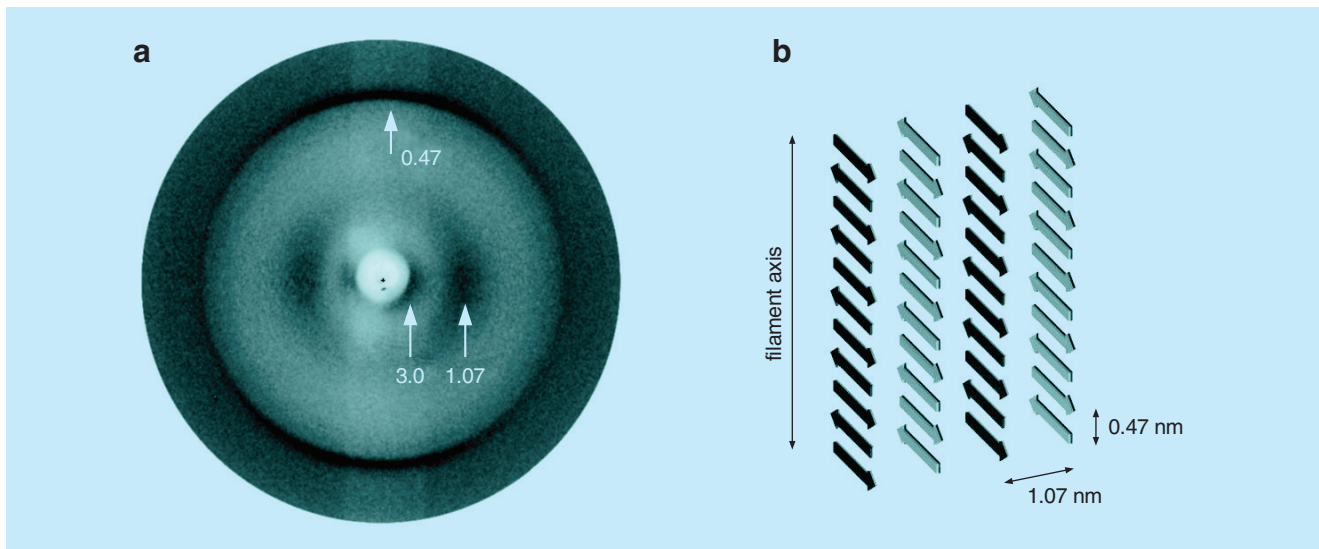


Abbildung 81: Röntgendiffraktion von teilweise orientierten Fasern der Mikrotubuli-Bindungsdomäne des Tau-Proteins (a) und daraus abgeleitete Organisation der für die Aggregation der Tau-Moleküle wesentlichen  $\beta$ -Stränge im Kernbereich der Filamente (b).

ter Erkrankungen bei Tieren (Beispiel: BSE = Rinderwahn). Das hier untersuchte Tau-Protein aggregiert zu paarigen helikalen Filamenten (PHFs) in der Alzheimer-Krankheit, und Mutationen des Tau-Proteins lösen so genannte „frontotemporale“ Demenzen aus (FTDP-17). Der Aggregationsprozess konnte *in vitro* nachvollzogen werden. Dadurch war es möglich, die Struktur der Filamente mit Hilfe der Röntgenfaserdiffraktion zu untersuchen (Abb. 81). Bestimmte Tau-Mutanten der frontotemporalen Demenz neigen besonders stark zur Fibrillenbildung, verglichen mit der langsameren Aggregation des Tau-Proteins bei der Alzheimer-Krankheit. In beiden Fällen liegt aber ein ähnliches Strukturprinzip zugrunde: Das Tau-Protein enthält ein Hexapeptid-Motiv, welches von einer ungeordneten Struktur in die Konformation eines  $\beta$ -Stranges übergehen kann. Die Umwandlung geschieht zunächst spontan in einem ersten, langsamen Prozess (Nukleation), später wird sie beschleunigt durch den Kontakt mit bereits umgewandelten Tau-Molekülen (Polymerisationsphase). Dabei kommt es zur Ausbildung einer  $\beta$ -Faltblatt-ähnlichen, filamentösen Struktur. Eine systematische Untersuchung der Faktoren, die die Aggregation zu Tau-Filamenten begünstigen, könnte dazu beitragen, die Entstehungsursachen der Alzheimer-Krankheit besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

## Struktur der Ribosomen

Der genetische Code ist eine Bibliothek von Bauplänen, die die Sequenz von Proteinen beschreibt. Die Übersetzung des genetischen Codes und die Produktion der Proteine wird durch ein universelles Zellorganell, das Ribosom, geleistet.

Das Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, die verschiedene Funktionen im Rahmen der Proteinbiosynthese erfüllen. Die kleine Untereinheit (30S in Prokaryonten, bestehend aus der 16S rRNA und 20 ribosomalen Proteinen) ist für die Übersetzung des genetischen Codes, dessen Blaupause auf der mRNA abgelegt ist, verantwortlich. Die große Untereinheit (50S in Prokaryonten, bestehend aus 5S rRNA, 23S rRNA und 33 ribosomalen Proteinen) fügt die einzelnen Aminosäuren zu einer langen Peptid-Kette entsprechend dem Bauplan zusammen. Aufgrund der zentralen Rolle des Ribosoms in der Protein-Biosynthese ist das Ribosom zugleich das primäre Target der meisten Antibiotika.

Im Jahr 2000 konnte die Struktur der 30S ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* bei einer Auflösung von 3,3 Å röntgen-kristallographisch aufgeklärt werden und im Folgenden bis zu einer Auflösung von 3,1 Å verfeinert werden. Darauf basierend konnte

die Arbeitsgruppe Komplexe der 30S Untereinheit mit dem Initiationsfaktor IF3 sowie zwei Antibiotika, Tetracyclin und Edeine, aufklären.

Der Initiationsfaktor IF3 erfüllt wesentliche Funktionen in der Initiationsphase der Protein-Biosynthese. Zu diesem Zeitpunkt sind die 30S und 50S Untereinheiten getrennt, die mRNA wird in die 30S Untereinheit eingefädelt und die Initiationsfaktoren IF1-3 sowie die Initiator-tRNA werden angelagert. IF3 stellt sicher, dass keine vorzeitige Bindung der ribosomalen Untereinheiten stattfindet und die mRNA mit dem korrekten Start-Codon eingebaut wird. Die Kristallstruktur des Komplexes der 30S Untereinheit mit IF3 konnte einige der Funktionen von IF3 auf struktureller Ebene verständlich machen.

Tetracyclin war das erste Breitband-Antibiotikum, das entdeckt wurde, und ist noch immer eines der am weitesten verbreiteten Antibiotika, obwohl Resistenzen gegen Tetracyclin den Anwendungsbereich in den vergangenen Jahren dramatisch eingeschränkt haben. Tetracyclin war bekannt dafür, ein so genannter „A-site-inhibitor“ zu sein, also die Bindung von tRNA an der „A-site“ zu unterbinden und dadurch die Protein-Biosynthese zum Erliegen zu bringen. Die Struktur des 30S-Tetracyclin Komplexes zeigt, dass für die Wirkung von Tetracyclin eine Bindungsstelle verantwortlich ist, die mit der Bindungsstelle der tRNA übereinstimmt und so die Blockade des Ribosoms verursacht. Daneben wurden sechs weitere Bindungsstellen von Tetracyclin gefunden, die aber in erster Linie die Konstituierung des Ribosoms beeinflussen und keine direkte bakterizide Wirkung entfalten.

Edeine ist ein universelles Antibiotikum. Es unterbindet also im Gegensatz zu Tetracyclin, das nur an bakteriellen Ribosomen seine Wirkung entfaltet, die Protein-Biosynthese in jeder Zelle unabhängig von ihrem phylogenetischen Ursprung. Aus diesem Grunde ist Edeine kein Antibiotikum pharmazeutischer Relevanz, aber wegen seiner Universalität ein ausgezeichnetes Modell, um allgemeine Aspekte der Protein-Biosynthese zu untersuchen. Die Untersuchung des 30S-Edeine Komplexes hat gezeigt, dass Edeine – wenig überraschend – in einer universell konservierten Region des Ribosoms bindet, die durch dynamische Konformations-Änderungen direkt an der Initiation beteiligt ist. Edeine unterbindet diese Konformations-Änderungen und bewirkt damit einen Stillstand des Prozesses. Darüber

hinaus blockiert Edeine den Pfad der mRNA und verhindert die korrekte Positionierung der Initiator-tRNA auf der kleinen ribosomalen Untereinheit.

Ebenfalls im Jahr 2000 wurde die Struktur der 50S ribosomalen Untereinheit von *Haloarcula marismortui* publiziert. Dieser Organismus ist zum einen wenig geeignet, um die Wechselwirkung des Ribosoms mit Antibiotika zu untersuchen, zum anderen führen die Kristallisationsbedingungen zu einem inaktiven Ribosom. Das hat unter anderem zu einem inkorrekten Modell für die katalytische Aktivität der 50S Untereinheit geführt. In 2001 konnte die Arbeitsgruppe aber die Struktur der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* (Abb. 82 links) aufklären. Dieses Bakterium, das seinen Namen einer extremen Stabilität gegenüber radioaktiver Strahlung verdankt, bietet ein nahezu perfektes Modell-System, um die Ribosomen-Antibiotika-Wechselwirkungen zu untersuchen. Als Folge konnten die Strukturen von therapeutisch wichtigen Antibiotika wie Clindamycin, Chloramphenicol und Erythromycin im Komplex mit der 50S ribosomalen Untereinheit ermittelt werden.

Chloramphenicol ist sehr wirkungsvoll in der Behandlung eines breiten Spektrums bakterieller Infektionen, einschließlich schwerer anaerober Infektionen. Clindamycin wird unter anderem zur Bekämpfung anaerober Infektionen und Cocci-Bakterien sowie zur Behandlung von *Pneumocystis* induzierter Lungenentzündung von AIDS-Patienten verwendet. Beide Antibiotika binden direkt im Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms. Die Strukturen der ribosomalen Untereinheit mit Clindamycin und Chloramphenicol bestätigen die Vermutung, dass diese Antibiotika die Protein-Biosynthese durch „molekulare Mimikry“ unterbrechen: Sie besetzen nämlich Bereiche, die denen von zelleigenen Aminosäuren ähnlich sind, und werden deshalb durch das Ribosom gebunden. Da sie aber naturgemäß keine Peptidbindung eingehen können, bringen sie die Peptidyltransferase-Reaktion zum Stillstand.

Die so genannten Makrolide-Antibiotika, deren bekanntester Vertreter Erythromycin ist, werden zur Bekämpfung einer Vielzahl bakterieller Infektionen verwendet. Anhand biochemischer Daten war bereits bekannt, dass Erythromycin die Peptidyltransferase-Reaktion erst nach der Bildung einer kurzen Aminosäurekette unterbindet. Die Struktur der 50S Untereinheit im Komplex mit Erythromycin sowie mit den

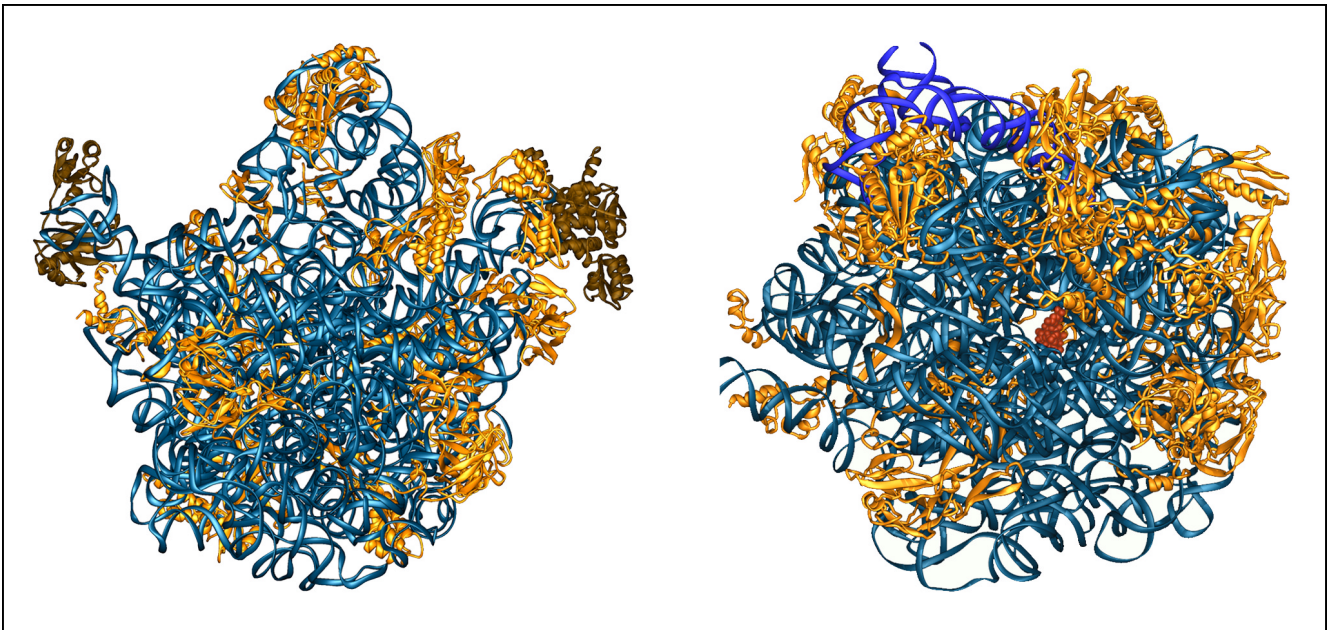


Abbildung 82: Links: Die 50S ribosomale Untereinheit von *Deinococcus radiodurans*. Rechts: Der Blick durch den Tunnel der 50S ribosomalen Untereinheit, blockiert durch Erythromycin (als oranges Kugelmodell). Die ribosomale RNA ist in blau dargestellt, die ribosomalen Proteine in gelb.

zwei anderen Makroliden (Roxithromycin und Clarithromycin) zeigt, dass diese Klasse der Antibiotika den Tunnel der 50S Untereinheit blockiert, durch den alle Proteine hindurchgefädelt werden (Abb. 82 rechts). Dies führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Protein-Biosynthese.

Der größte Teil der Antibiotika wird heute nicht zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt, sondern in der Tiermast (bis zu 80% der weltweit produzierten Antibiotika), zur Produktion und Konservierung von Nahrungsmitteln und vielen anderen mehr oder minder sinnvollen Anwendungen.

Als unmittelbare Folge sind viele bakterielle Erreger in zunehmendem Maße multi-resistent gegen eine

große Zahl verschiedener Antibiotika. Üblicherweise vergehen nicht mehr als ein bis zwei Jahre nach der Einführung eines neuen Antibiotikums, bis die ersten resistenten Erreger auftreten. Die Entwicklung neuer Antibiotika kann daher mit der zunehmenden Verbreitung resistenter Bakterienstämme kaum Schritt halten: In den letzten 30 Jahren ist nur eine neue Wirkstoffklasse auf den Markt gekommen.

Die Aufklärung der Struktur der großen ribosomalen Untereinheit in Verbindung mit verschiedenen Antibiotika, und damit die Kenntnis der Wechselwirkung zwischen Antibiotika und Ribosomen, erlaubt es nunmehr, die langwierige und kostenintensive Entwicklung neuer Medikamente deutlich zu beschleunigen bzw. zu vereinfachen.