

Abbildung 78: Collage von J.M. Harms „Die 30S ribosomale Untereinheit von *Thermus thermophilus*: Von den Kristallen zur Struktur.“ Die 2-dimensionale Struktur der 16S RNA wurde aus Gutell et al. 2000 entnommen.

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 ultrahoher Auflösung, der Kryokristallographie sowie der Nanosekunden-zeit aufgelösten 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 zur Lösung neuer Proteinstrukturen. Die Nutzung der anomalen Streuung in Verbindung mit Kryotechniken ermöglicht es in der Regel, eine Proteinstruktur mit unbekannter Faltung innerhalb von ein oder zwei Tagen so weit aufzuklären, dass die Elektronendichteverteilung modelliert und verfeinert werden kann – oft auf der Grundlage von Beugungsmessungen an einem einzigen Kristall. Wenn Beugungsdaten bis zu hoher Auflösung verfügbar sind, sind anomale Phasen von so hoher Genauigkeit, dass die experimentelle Elektronendichteverteilung in vielen Fällen weitgehend automatisch interpretiert werden kann.

Ein Beispiel dafür ist die Aufklärung der Kristallstruktur der 6-Hydroxy-L-Nikotin-Oxidase (Abb. 79) in Zusammenarbeit mit der Universität Freiburg. Dieses stereospezifische Enzym, ein dimeres Flavoprotein mit einem Molekulargewicht von 93 000, ermöglicht es dem Bakterium *Arthrobacter nicotinovorans*, seinen gesamten Bedarf an Kohlenstoff und Stickstoff aus der Umwandlung von Nikotin zu erzeugen. Die Homologie zu wesentlichen Teilen der menschlichen Monoaminoxidase (MAO), deren Hemmung ein Bestandteil der medikamentösen Behandlung von Parkinsonpatienten darstellt, erhöht das Interesse an dieser Struktur zusätzlich.

Techniken rascher Derivatisierung beeinflussen den Zeitaufwand für Proteinstrukturaufklärung erheblich. Die Strukturanalyse der 6HLNO veranschaulicht die Möglichkeit, unmittelbar vor Beginn der Röntgenmessungen geeignete Derivate herzustellen, in diesem Fall durch Eindiffusion von Xenon unter hohem Druck von etwa 20 bar bzw. von Halogeniden. Generell ist der Zugang zu geeigneten Röntgenabsorptionskanten einer möglichst großen Zahl von Elementen von erheblicher praktischer Bedeutung für eine schnelle Lösung von Proteinstrukturen mit anomalen Verfahren. Wir er-

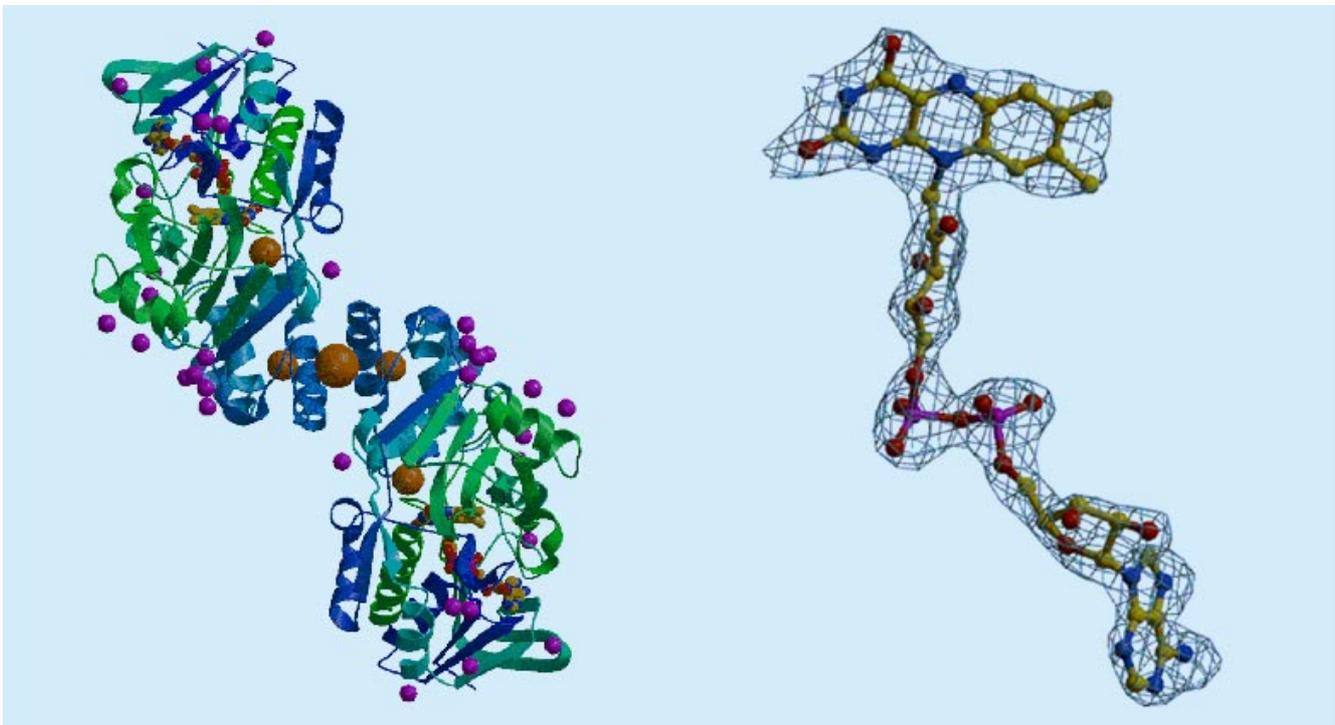


Abbildung 79: Kristallstruktur der 6-Hydroxy-L-Nikotin-Oxidase von *A. nicotinovorans* bei 1.95 Å Auflösung (Kachalova et al., 2000). Die Elektronendichteverteilung im Bereich des FAD (links) zeigt die hohe Qualität der experimentellen Phasen. Das verfeinerte Strukturmodell (rechts) zeigt das dimere Enzym mit den Lagen der Xenon-Atome und Bromid-Ionen. Diese Derivate wurden unmittelbar vor den Röntgenmessungen am BW6 hergestellt.

weiterten den Anwendungsbereich bis in den Bereich weicher Röntgenstrahlung und lösten die mit der zunehmenden Absorption verbundenen Skalierungsprobleme.

Es gelang erstmals, anomale Phasen sogar bei Röntgenwellenlängen bis zu etwa 3.1 Å zu bestimmen (Abb. 80). Damit können eine Reihe von Absorptionskanten wie Xe-L3, I-L3 und Ca-K genutzt werden. Darüber hinaus sind bei den langen Wellenlängen die anomalen Streubeiträge von Schwefelatomen im Proteinmolekül so stark, dass sie zur Phasenlösung genutzt werden können. Diese Entwicklungen machen die Suche nach Derivaten, die früher oft den langwierigsten Teil der Kristallstrukturanalyse von Proteinen ausmachte, in der Regel unnötig. Die vergleichsweise geringen systematischen Fehler bei der Phasierung mit anomalen Verfahren machen es darüber hinaus oft möglich, auf Messungen bei multiplen Wellenlängen (MAD-Methoden) zu verzichten, und stattdessen anomale Messungen bei einer

einzigsten Wellenlänge (SAD) in Verbindung mit Verfahren der Dichtemodifikation zur Strukturlösung einzusetzen. Dies führt zu einer weiteren Beschleunigung. Die neuen Techniken werden in Zukunft insbesondere auch für Anwendungen in der Strukturgenomik von Bedeutung sein.

Mit SAD- und MAD-Verfahren konnte im vergangenen Jahr eine Reihe wichtiger Strukturen gelöst werden. Ein Beispiel dafür ist die Struktur von Komplexen, die wesentliche Bestandteile bei der Bildung eines Multichaperons darstellen. Ein weiteres Beispiel ist eine bakterielle Cytochrome-c-Oxidase. Diese Arbeit stellt gleichzeitig die erste erfolgreiche Anwendung von MAD-Verfahren auf die Lösung der Kristallstruktur eines integralen Membranproteins dar.

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

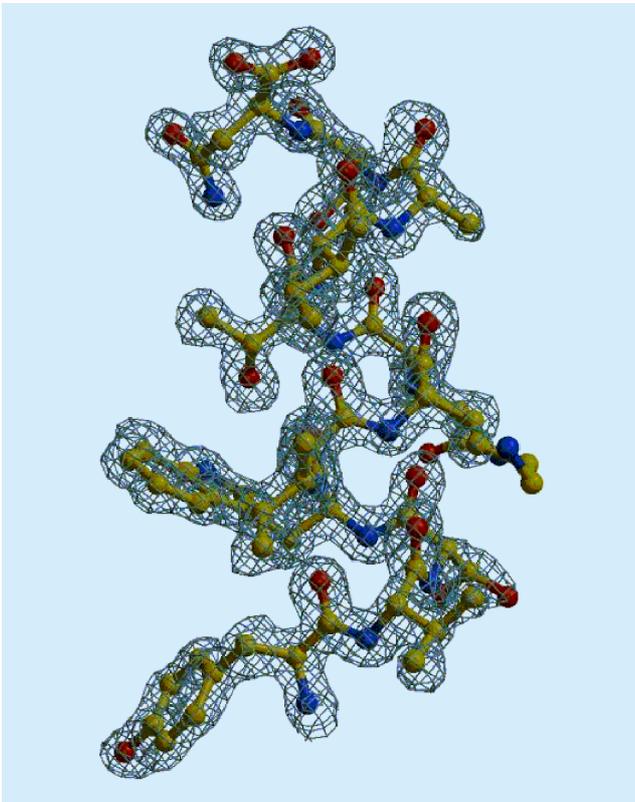


Abbildung 80: Erste Anwendung anomaler Phasierung im Bereich weicher Röntgenstrahlung auf orthorhombisches β -Trypsin von Rinderpankreas. MAD-Daten wurden an der K-Absorptionskante von Calcium (3.07 \AA) gemessen. Die anomalen Beiträge von Schwefelatomen im Proteinmolekül wurden mit einbezogen. Die Elektronendichtekarte zeigt die hohe Qualität der experimentellen Phasen vor Beginn der Verfeinerung.

Zytoskelett

Die MPG-Gruppe „Zytoskelett“ befasst sich mit der Strukturbestimmung von Proteinen des Zytoskeletts mit Hilfe der Synchrotronstrahlung sowie der Untersuchung des Struktur-Funktions-Zusammenhangs von Tubulin, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und Motorproteinen aus Nervenzellen. 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.

Kinesin und andere Proteine aus der Familie der Kinesine sind molekulare Motoren, die Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP gewinnen und diese für die gerichtete Bewegung entlang der Mikrotubuli verwenden. Das „konventionelle“ Kinesin 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 ATP-Hydrolyse und die Interaktion mit den Mikrotubuli verantwortlich. Kinesine sind hauptsächlich für den Transport vom Minus- zum Plus-Ende der Mikrotubuli zuständig („Plus-Motoren“). Dies gilt auch für das konventionelle Kinesin.

Mittlerweile sind Röntgenstrukturen von Motordomänen verschiedener Kinesine bekannt, unter anderem aus konventionellem Kinesin von Mensch und Ratte, aber auch von verwandten Motorproteinen mit umgekehrter Bewegungsrichtung (Ncd, Kar3; „Minus-Motoren“). Trotzdem ist der vollständige Mechanismus der ATP-Hydrolyse noch nicht geklärt, denn alle zur Zeit in der Proteindatenbank gesammelten Kinesin-Strukturen zeigen die Motordomäne im selben Zustand, nämlich als Komplex mit ADP. Vor kurzem ist es gelungen, die Motordomäne des Pilzkinesins NcKin (*Neurospora crassa* kinesin) – ebenfalls im Komplex mit ADP – zu kristallisieren und die Struktur mit Röntgendiffraktion zu bestimmen. NcKin hat keine leichten Ketten und bewegt sich drei- bis fünfmal schneller als das konventionelle Kinesin aus tierischen Zellen. Durch den Vergleich der Struktur des Pilzkinesins mit den bereits bekannten Kinesinstrukturen ergeben sich Hinweise auf den Mechanismus der Motoraktivität. In einem komplementären Ansatz wurde die Struktur einer „Schalterdomäne“ des Kinesins, die die Verbindung zwischen der katalytischen Kopfdomäne und der Schwanzdomäne darstellt, mit NMR-Methoden gelöst, da in diesem Fall eine flexible Struktur vorliegt, die sich nicht zur Kristallisation eignet. Die Ergebnisse zeigen, dass Röntgen- und NMR-Methoden gleichwertige Strukturen liefern für den überlappenden Teil der beiden Proteine, dass aber die NMR-Methode imstande ist, Röntgenergebnisse in den ungeordneten Teil eines Proteins auszuweiten.

In einem weiteren Projekt geht es um die Frage, wie „ungeordnete“ Proteine miteinander und mit anderen Komponenten der lebenden Zelle strukturell wechselwirken. Die Abwesenheit von einer definier-

ten globulären Struktur führt häufig dazu, dass die Proteine miteinander „falsch“ reagieren, zu großen Polymerkomplexen (Fasern) aggregieren und damit die Zelle schädigen. Dieser Prozess ist die Grundlage verschiedener Demenzen des Menschen (Beispiel: Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Creutzfeld-Jacob-Krankheit) und von Tieren (Beispiel: BSE = Rinderwahn). Das hier untersuchte Tau-Protein aggregiert zu Neurofibrillenbündeln in der Alzheimer-Krankheit, und Mutationen des Tau-Proteins lösen sogenannte „frontotemporale“ Demenzen aus (FTDP-17). Der Aggregationsprozess wurde *in vitro* nachvollzogen, so dass es möglich wurde, die Natur der pathologischen Fibrillenbildung zu untersuchen. Es zeigte sich, dass bestimmte Tau-Mutanten der frontotemporalen Demenz besonders stark zur Fibrillenbildung neigen, verglichen mit der langsameren Aggregation des Tau-Proteins, die der Alzheimer-Krankheit zugrunde liegt. In beiden Fällen liegt aber ein ähnliches Strukturprinzip zugrunde: Eine kurze Sequenz des Proteins (ein Hexapeptid-Motiv) induziert beta-Strang-ähnliche Wechselwirkungen, die sich autonom amplifizieren und somit Fasern bilden. Diese Erkenntnisse können im Prinzip dazu benutzt werden, Hemmstoffe für die Aggregation zu suchen, mit denen der Krankheitsprozess aufgehalten werden könnte.

Struktur der Ribosomen

Bei der Proteinbiosynthese wird genetische Information (mRNA) gelesen und in Anweisungen für den schrittweisen Aufbau von Eiweißmolekülen übersetzt. Der gesamte Prozess wird durch das Ribosom, einen Molekülkomplex aus verschiedenen Proteinen und drei RNA-Ketten, ausgeführt. Die Proteinbiosynthese beginnt, wenn sich die beiden aktiven, verschieden großen Untereinheiten (30S und 50S in Prokaryonten) an der mRNA zu dem gesamten Ribosom zusammenschließen. Die Prinzipien der Proteinbiosynthese sind bereits auf biochemischem Wege erklärbar. Die Synthese beginnt damit, dass sich die kleine 30S-Untereinheit zusammen mit Initiationsfaktoren an die mRNA heftet.

Die 30S-Untereinheit stellt die Andockstellen für verschiedene tRNAs bereit; sie ist im Vergleich zur eher stabilen 50S-Untereinheit dynamisch und flexibel, was sie wissenschaftlich besonders interessant erscheinen lässt.

Das Verständnis des detaillierten Prozesses auf molekularer Basis erfordert jedoch die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur. Diese konnte für die 30S-Untereinheit von *Thermus thermophilus* bei 3.3 Å im vergangenen Jahr erstmals von der Arbeitsgruppe vorgestellt werden. Die kleine ribosomale Untereinheit besteht aus 20 Proteinen und einer 16S RNA-Kette bzw. mehr als 50 000 Nichtwasserstoff-Atomen mit einem Molekulargewicht von 0.85 Millionen Dalton. 98% der aus 1518 Nukleotiden bestehenden RNA-Kette und alle 20 Proteine konnten identifiziert oder modelliert werden.

Die Struktur der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Thermus thermophilus* weist bekannte wie auch neu entdeckte Falt- und Packungsmotive auf. Es gelang außerdem die funktionale Zuordnung für den Weg der mRNA und die Bindestellen der tRNA. Schließlich konnte aufgrund des erstellten Modells ein Konzept für die Dynamik der Translokation vorgeschlagen werden.

Die ribosomalen Kristalle enthalten einen Lösungsanteil von 65% und sind von einem Netzwerk von Kanälen durchsetzt, was das Eindringen und die spezifische Bindung an bestimmte Molekülstellen erheblich vereinfacht. So gelang es bereits, den Initiationsfaktor IF3 mit der 30S-Untereinheit zu co-kristallisieren, um weitere Einblicke in den Beginn der Proteinbiosynthese zu erhalten. Viele Antibiotika hemmen die Eiweiß-Synthese, indem sie zum Beispiel Andockstellen für tRNA an der ribosomalen Untereinheit blockieren. Durch Co-Kristallisation oder Diffusion entstandene 30S-Antibiotika-Komplexe werden kristallographisch untersucht, wobei zunächst die Bindungsstellen an der Untereinheit lokalisiert werden. Aus den induzierten Konformationsänderungen der dreidimensionalen Struktur kann, im Vergleich mit biochemischen Daten, die molekulare Wirkungsweise der Antibiotika erklärt werden (Abb. 78).