

Abbildung 74: Struktur der NCI-Domäne von menschlichem Placenta-Collagen IV. Die Abbildung zeigt ein NCI-Hexamer. Die Struktur wurde auf der Grundlage einer adhoc-Präparation von Bromderivaten und MAD-Phasierung an der K-Kante von Brom gelöst. (Quelle: Than et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 6607)

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 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 der nichtkollagenen (NC1) Domäne von Kollagen IV aus menschlicher Plazenta dar. Adhoc-Derivatisierung mit Natriumbromid und der Einsatz anomaler Streuung an der Br-K-Kante löste das Problem der Nichtisomorphie von Kristallen, das eine Bestimmung der Struktur trotz langjähriger Bemühungen bisher verhindert hatte. Die Struktur (Abb. 74) ist insbesondere von Bedeutung für die Untersuchung bestimmter Krankheiten auf molekularer Ebene; dazu gehören die Goodpasture- und Alport-Syndrome.

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 HT („High Throughput“) Verfahren und damit für Anwendungen in der Strukturgenomik an der Beamline BW6 geschaffen. Weitere Schritte der Entwicklung zielen insbesondere auf eine Automatisierung der Beurteilung der Kristallqualität, der Bestimmung der Kristallklasse sowie der Wahl der Messstrategie für HT-Strukturlösung mit SAD/MAD-Phasierung; diese Schritte bedürfen bisher der Intervention durch erfahrene Proteinkristallographen.

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

Zytoskelett

Die MPG-Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ befasst sich mit der Strukturbestimmung von Proteinen des Zytoske-

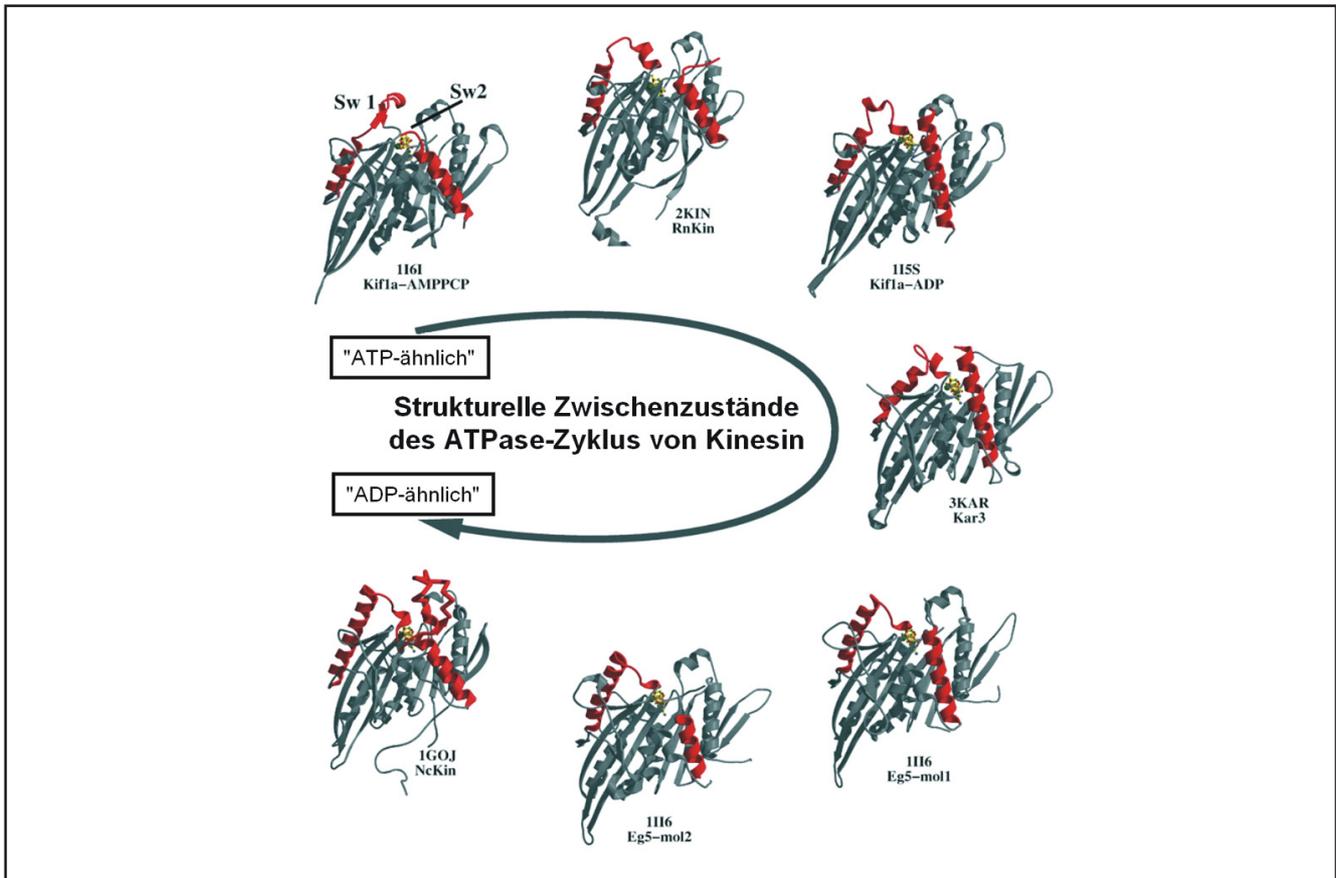


Abbildung 75: Die Zusammenstellung verschiedener Strukturen von Kinesin und verwandten Motorproteinen in einheitlicher Orientierung verdeutlicht die Unterschiede in den variablen Bereichen an der Oberfläche der Motordomäne. Besonders hervorgehoben sind die Schalter-Regionen („Switch-Regionen“, Sw1 und Sw2) mit den sich anschließenden Helizes, die in Länge und Ausrichtung relativ zum Kern der Motordomäne variieren.

letts mit Hilfe der Synchrotronstrahlung, insbesondere mit der Untersuchung des Struktur-Funktions-Zusammenhangs von Mikrotubuli und den damit assoziierten Proteinen. Mikrotubuli sind Proteinfasern, die zusammen mit anderen Komponenten des Zytoskeletts für die äußere Gestalt der Zellen und für die innere räumliche Organisation der subzellulären Bestandteile verantwortlich sind. Mikrotubuli sind dabei keineswegs statisch und unveränderlich, wie der Ausdruck „Zytoskelett“ vermuten lässt, sie besitzen vielmehr eine hohe Dynamik und können sich daher rasch an die sich ändernden Erfordernisse anpassen. Die Steuerung der Mikrotubuli-Dynamik geschieht durch den Einfluss anderer Proteine, die mit den Mikrotubuli direkt (MAPs – Mikrotubuli-Assoziierte Proteine) oder indirekt inter-

agieren. Andererseits dienen Mikrotubuli als Schienen für intrazelluläre Transportvorgänge und nehmen dadurch selbst Einfluss auf die innere Dynamik der Zellen. Prominente Beispiele für solche Prozesse, bei denen Mikrotubuli eine wichtige Rolle spielen, sind die Trennung der Tochterchromatiden bei der Zellteilung und die Bildung von Zellfortsätzen (Axone, Dendriten) bei der Differenzierung von Nervenzellen.

Aktive Elemente beim Mikrotubuli-basierten Transport sind die Motorproteine aus der Familie der Kinesine. Das so genannte „konventionelle Kinesin“, der Hauptvertreter der Kinesine, besteht aus zwei schweren und zwei leichten Peptidketten. Jede der beiden schweren Ketten hat eine etwa 350 Aminosäuren umfassende

globuläre „Motordomäne“. Diese Motordomänen binden an die Oberfläche der Mikrotubuli und wandeln chemische Energie in Form energiereicher Moleküle (ATP – Adenosintriphosphat) in gerichtete Bewegung um. In der MPG-Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ wurde vor einiger Zeit die Struktur der Motordomäne aus Rattenkinesin in monomerer und dimerer Form bestimmt. Mittlerweile sind etwa 15 Röntgenstrukturen von Motordomänen verschiedener Kinesine bekannt, unter anderem von menschlichem Kinesin sowie von nicht-konventionellen Kinesinen aus verschiedenen Organismen. Durch den Vergleich dieser Strukturen konnten Einblicke in die Funktionsweise der molekularen Motoren gewonnen werden.

Aufschlussreich ist dabei die Struktur des schnellen Pilzkinesins NcKin (*Neurospora crassa* Kinesin), die zuletzt in der Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ gelöst wurde. Kleine strukturelle Änderungen in der ATP-Bindungstasche, hervorgerufen durch die Hydrolyse von ATP, werden durch ein Netzwerk von Salzbrücken verstärkt und auf eine Region übertragen, die für die Bindung an die Mikrotubuli-Oberfläche wichtig ist („Switch2-Region“, Abb. 75). Dadurch wird die Festigkeit der Bindung zwischen Motordomäne und Mikrotubuli-Oberfläche im Takt der ATP-Hydrolyse moduliert. Gleichzeitig führt die Verschiebung der „Switch2-Region“ zu einer Konformationsänderung in einer benachbarten Region, die mit der zweiten Motordomäne in Kontakt steht und damit für die Kommunikation zwischen den beiden Motordomänen verantwortlich ist. Dies erklärt die Koordinierung der Aktivitäten beider Motordomänen, was für eine „reibungsfreie“ Bewegung des zusammengesetzten Kinesin-Motors unerlässlich ist. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist der Ersatz der Spaltprodukte des ATP durch frisches ATP. Im Vergleich mit den anderen Kinesinen hat das schnelle Pilzkinesin eine ATP-Bindungstasche, die weiter geöffnet ist, so dass der Austausch von ADP und ATP schneller erfolgen kann.

Die Funktion der MAPs besteht nach üblichem Verständnis hauptsächlich in einer stabilisierenden bzw. regulativen Wirkung auf das Mikrotubuli-Gerüst der Zelle. In der Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ konnte nachgewiesen werden, dass das Tau-Protein, das zur Gruppe der MAPs zählt, nicht nur die Mikrotubuli stabilisiert, sondern auch direkt Einfluss auf den Mikrotubuli-basierten Transport von Vesikeln und anderen Zellorga-

nellen nimmt, indem es die Wechselwirkung zwischen Kinesinen und Mikrotubuli reguliert. Dies wurde durch die Beobachtung der Bewegung einzelner Kinesin-Moleküle mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie („Total Internal Reflection Fluorescence“) bestätigt. Dabei stellte sich heraus, dass Tau hauptsächlich die Annäherung des Motorproteins an die Mikrotubuli behindert, während der eigentliche Bewegungsablauf nach erfolgtem Kontakt durch die Anwesenheit von Tau-Molekülen auf der Oberfläche der Mikrotubuli kaum beeinträchtigt wird.

Eine Fehlfunktion des Tau-Proteins kann weitreichende Folgen für die strukturelle Integrität und den Metabolismus der Zelle haben. Bei einigen neuronalen Erkrankungen (FTDP-17, Alzheimer-Krankheit) kommt es aus bisher ungeklärten Gründen zur Aggregation von Tau-Protein zu unlöslichen Fasern und letztlich zum Absterben von Nervenzellen. Um die Ursachen dieser pathologischen Aggregation von Tau-Protein zu klären, wurden in der Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ strukturelle Untersuchungen an Tau-Protein in Lösung und an künstlichen Tau-Fasern durchgeführt. Verglichen mit der langsamen Aggregation des Tau-Proteins bei der Alzheimerkrankheit neigen bestimmte Tau-Mutanten der frontotemporalen Demenz besonders stark zur Fibrillenbildung. Unter verschiedenen, teilweise einander ausschließenden Bedingungen (Zugabe von Polyanionen oder Fettsäuren, oxidierende oder reduzierende Bedingungen) erfolgt die Aggregation so schnell, dass sie sich *in vitro* verfolgen lässt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die Aggregation von Tau unabhängig von den experimentellen Bedingungen nach einem einheitlichen Strukturprinzip erfolgt. Die beobachteten Unterschiede lassen sich auf die unterschiedliche Kinetik der Teilreaktionen (Aktivierung, Nukleation, Polymerisation) zurückführen. Das Tau-Protein enthält ein Hexapeptid-Motiv, welches von einer ungeordneten Struktur in eine β -Faltblatt-Struktur übergehen kann. Die Umwandlung geschieht zunächst spontan in einem langsamen Prozess. Durch den Kontakt mit bereits umgewandelten Tau-Molekülen wird die Umwandlung beschleunigt. Dabei bilden sich lange Fasern mit einer β -Faltblatt-ähnlichen Struktur.

Für die Suche nach aggregationshemmenden Substanzen für den therapeutischen Einsatz ist es wichtig, ein adäquates *in vitro*-Modell der Tau-Aggregation zur Ver-

fügung zu stellen und ein schnelles, effektives Verfahren zu entwickeln, das es erlaubt, den Einfluss chemischer Verbindungen und anderer Faktoren auf die Faserbildung zu bestimmen. Dazu wurde eine systematische Untersuchung von Tryptophan-Mutanten des Tau-Proteins durchgeführt, in der gezeigt wurde, dass sich die Packung der Tau-Moleküle bei der Faserbildung mit Hilfe der Tryptophan-Fluoreszenz charakterisieren lässt, ohne die Aggregation selbst zu behindern. Damit erscheint die Fluoreszenzanalyse von Tryptophan-Mutanten des Tau-Proteins geeignet für die Suche nach potentiellen Wirkstoffen in groß angelegten Testreihen.

Struktur der Ribosomen

Ribosomen decodieren die Baupläne der Erbsubstanz in jeder Zelle und setzen diese in die Synthese von Proteinen um. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, die jeweils verschiedene Funktionen im Rahmen der Protein-Biosynthese erfüllen. Die kleine Untereinheit (30S in Prokaryonten) ist für die Übersetzung des genetischen Codes verantwortlich. Die große Untereinheit (50S) fügt die einzelnen Aminosäuren zu einer Peptidkette, dem neu zu bildenden Protein, zusammen.

Aufgrund der zentralen Rolle des Ribosoms in der Protein-Biosynthese ist es zugleich das primäre Target der meisten Antibiotika. Da aber der Großteil der Antibiotika heutzutage in der Nahrungsmittelindustrie und nicht zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt wird, kommt es in immer größerem und schnellerem Rahmen zu Antibiotika-Resistenzen, während die Neuentwicklung von Medikamenten damit kaum Schritt halten kann. Mit der Strukturaufklärung bakterieller Ribosomen bzw. deren Untereinheiten und Komplexen mit Antibiotika ist den Forschern nun ein Mittel in die Hand gegeben, die vielfältigen Wechselwirkungen detailliert zu verstehen und somit ein gezieltes, kostengünstiges, deutlich beschleunigtes und vereinfachtes Medikamentendesign voranzutreiben.

Im Jahr 2002 wurden weitere Ribosomen-Antibiotika-Komplexe auf kristallographischem Wege analysiert. Azalide und Ketolide sind Antibiotika der neuesten Generation, die durch chemische Modifikation der

Makrolide gewonnen wurden. Makrolide wie Erythromycin, Roxithromycin und Clarythromycin blockieren den Tunneleingang der ribosomalen 50S Untereinheit, durch den die naszierende Proteinkette geführt wird. Der Durchlass wird auf ein Drittel geschmälert, die Protein-Biosynthese stoppt nach wenigen Zyklen, sobald die Proteinkette das Antibiotikum erreicht hat.

Das Ketolid ABT-773 und das Azalid Azithromycin wurden im Micromolarbereich mit der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* co-kristallisiert, die gezüchteten Kristalle wurden schockgefroren und Synchrotronstrahlung ausgesetzt. Die gewonnenen kristallographischen Daten erlaubten Rückschlüsse auf die spezifische Wirkungsweise.

Die Bindestelle des ABT-773 ist im Vergleich zu den Makroliden innerhalb des Tunneleingangs der 50S ribosomalen Untereinheit leicht verschoben, obwohl sich reaktive Molekülanteile perfekt mit denen von Roxithromycin überlagern lassen. Die Verschiebung führt zu vermehrten Kontakten mit verschiedenen Domänen der ribosomalen RNA, die zum Teil mutationsunabhängig sind, was die Aktivität gegen bestimmte Makrolid-resistente Phänotypen erklärt.

Azithromycin ist eines der wenigen Antibiotika, die im Spätstadium von Aids eingesetzt werden können. Aus der Elektronendichte des Azithromycin-Ribosom-Komplexes gingen überraschenderweise zwei Bindestellen innerhalb des ribosomalen Tunnels hervor (Abb. 76). Das zweite Azithromycin-Molekül bindet nicht nur an die ribosomale RNA, sondern auch an zwei ribosomale Proteine, die die Makrolid-Resistenz zur Folge haben.

Des Weiteren wurden kristallographische Untersuchungen zur Dynamik der Protein-Biosynthese, speziell der Peptid-Bindung und der Translokation, durchgeführt. Im Laufe des Elongationszyklus passiert jede Transfer-RNA (tRNA), die die einzelnen Aminosäuren an das Ribosom liefert, drei (A→P→E) ribosomale Bindestellen, abhängig von der Konformation des Ribosoms. Im prätranslokalen Zustand befinden sich je eine tRNA in A- und P-Bindestelle, während im posttranslokalen Stadium die P- und E-Stelle besetzt ist. Die korrekte Lagerung der Aminosäure-beladenen tRNA in der A-Stelle stimuliert den Flip des CCA-Endes der

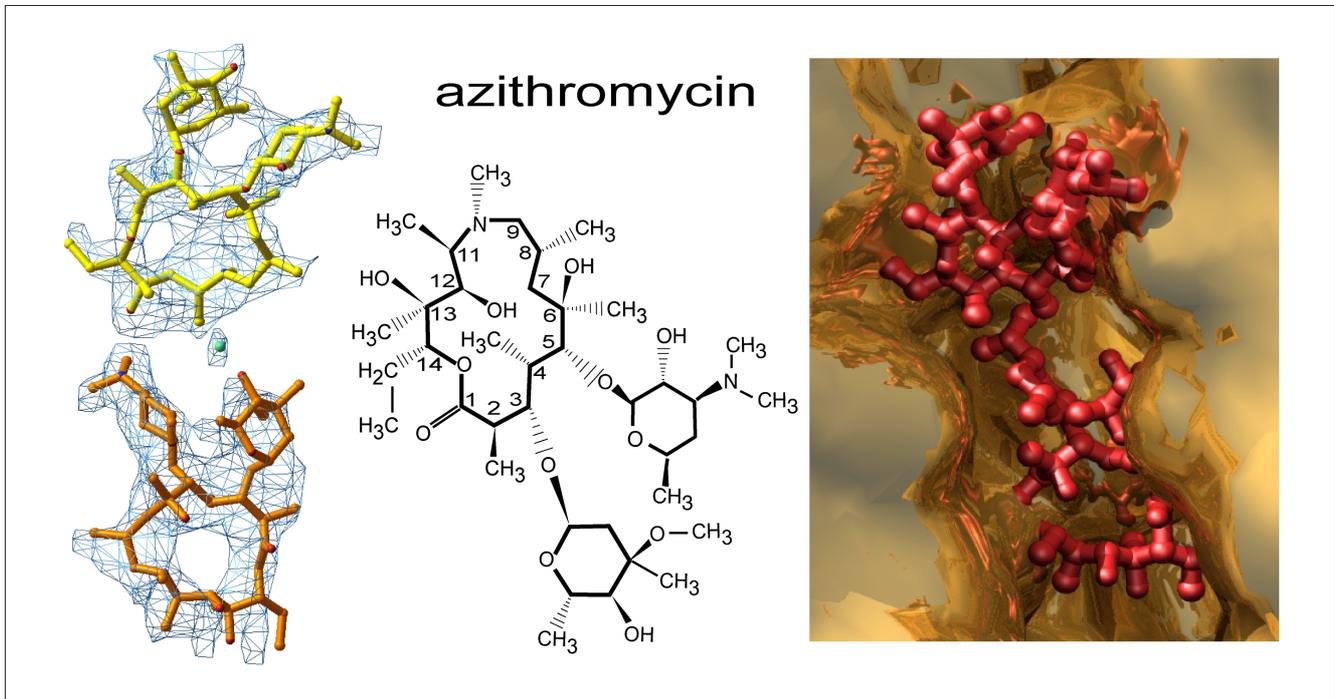


Abbildung 76: Der erste strukturelle Nachweis für eine zweite Bindestelle eines Makrolid Antibiotikums am Ribosom. Links: Elektronendichte für zwei an die ribosomale 50S Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* gebundene Azithromycin Moleküle. Mitte: Chemische Darstellung von Azithromycin. Rechts: Die zwei Moleküle blockieren den – in dieser Darstellung aufgeschnittenen – Tunnel.

A-Stellen-tRNA in die Position des 3'-Endes der P-Stellen-tRNA bei nahezu gleichzeitiger Peptidbindung. Diese Bewegung resultiert in einem naszierenden Peptid, das in den Eingang des Tunnels zeigt und der Translokation der entladenen P-Stellen-tRNA in die E-Stelle.

Kristallstrukturen ribosomaler Komplexe, bestehend aus der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* mit verschiedenen Substratanalogen, die den tRNA-Akzeptorstamm und das CCA-3'-Ende

der A-Stellen-tRNA imitieren, und dem Antibiotikum Sparsomycin wurden in molekularer Auflösung analysiert. Es gelang nicht nur, den Bindungsmodus der Substratanalogen und des Inhibitors aufzuklären, sondern auch dynamische Elemente innerhalb des Peptidyltransferasezentrums zu definieren. Innerhalb dieses Zentrums konnte eine 180 Grad Rotationsachse gefunden werden, woraus sich der Vorschlag einer allgemeinen Ribosomenmaschinerie für die Peptidbindung, die Translokation und das Anwachsen der naszierenden Peptidkette ergab.