

Abbildung 90: Ca^{2+} -Bindungsstellen in Maus-Furin (Than et al., 2005). Die anomale Differenzelektronendichte (Ca-1, Ca-2) resultierte aus Beugungsmessungen zu beiden Seiten der K-Absorptionskante von Calcium, die bei einer Röntgenwellenlänge von 3.07 \AA liegt.

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. Weitere Informationen unter www.mpasmb-hamburg.mpg.de

Proteindynamik

Die MPG-Arbeitsgruppe für Proteindynamik untersucht die Struktur und Dynamik von Proteinen in Beziehung zur biologischen Funktion. Einen aktuellen Schwerpunkt bilden dabei Anwendungen auf Proteine, die für eine mögliche Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Tuberkulose von potentieller Bedeutung sind. Darüber hinaus entwickelt die Gruppe Methoden der Proteinstrukturanalyse. Dazu gehören insbesondere Verfahren zur Nutzung anomaler Röntgenbeugung sowie zur Automatisierung von Beugungsmessungen und ihrer Auswertung.

Die Max-Planck-Beamline BW6 an DORIS, an der alle Röntgenbeugungsmessungen durchgeführt wurden, ist eine der wenigen weltweit verfügbaren Synchrotronmessstationen, die neben der Nutzung harter Röntgenstrahlung auch den Einsatz langwelliger Röntgenstrahlung in der Kristallstrukturanalyse biologischer Makromoleküle ermöglichen. Die Messung anomaler Röntgenbeugung zu beiden Seiten von Röntgenabsorptionskanten bei Wellenlängen bis zu 3.1 Å kann zur Identifikation relativ leichter Elemente wie Calcium, Kalium, Mangan u.a. angewandt werden. Ein Beispiel für eine derartige Anwendung stellt eine Untersuchung des Enzyms Furin der Maus dar. Furin gehört zur eukaryontischen Familie der Proprotein-Konvertasen, die viele Sekretproteine und Peptidhormone aus größeren Vorläufermolekülen ausschneiden und aktivieren. Furin ist an der Embryogenese, aber auch an einer Reihe pathologischer Prozesse, etwa bei Tumormetastasierung und Neurodegenerationen, beteiligt. Es ist u. a. ein Schlüsselenzym der Aktivierung von Glykoproteinen vieler lipidumhüllter pathogener Viren. Die Kristallstruktur von Furin wurde bereits zuvor auf der Grundlage von MAD-Messungen an BW6 gelöst (Henrich et al., *Nature Struct. Biol.* **10**, (2003) 520–526). In einem weiteren Experiment wurden vor kurzem die chemische Natur und die Lage der für die enzymatische Funktion wesentlichen Bindungsstellen aufgeklärt (Than et al., 2005). Mit Hilfe anomaler Beugung zu beiden Seiten der Calcium-K-Kante ($\lambda = 3.07 \text{ \AA}$) konnten Ca^{2+} -Ionen in zwei Bindungsstellen eindeutig identifiziert werden (Abb. 90).

In kollaborativen Projekten wurde eine Reihe neuer Proteinstrukturen gelöst, teilweise unter Anwendung anomaler Phasierungsverfahren. Ein erstes Beispiel stellt p14/MP1 dar, ein Signalkomplex (Kurzbauer et al., 2004). Der p14/MP1-Komplex ist innerhalb der Zelle an Endosomen lokalisiert. Die beiden Proteine bilden zusammen eine Gerüstplattform, an die Signale weiterleitende Enzymkomplexe (MAP-Kinasen) binden kön-

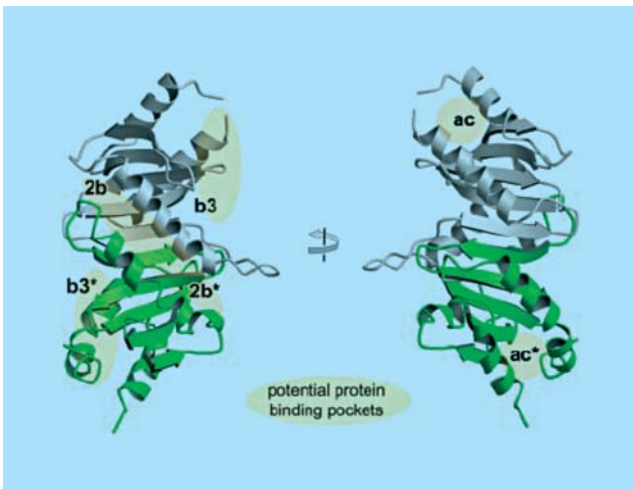


Abbildung 91: Kristallstruktur des p14/MP1-Heterodimers der Maus mit Bindungsstellen für Protein-Protein-Wechselwirkungen (Kurzbaier et al., 2004).

nen. Die Struktur (Abb. 91) zeigt insbesondere auch die möglichen Bindungsstellen für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dieses Kenntnis schafft eine Basis für potentielle therapeutische Nutzung.

Weitere Kristallstrukturanalysen wurden insbesondere an Proteinen von *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) im Rahmen des vom BMBF geförderten XMTB-Strukturgenomik-Konsortiums durchgeführt. Bei diesem Projekt gilt das Interesse bestimmten Proteinen, die für die Entwicklung neuartiger Therapien gegen Tuberkulose (TB) von potentieller Bedeutung sind. Die Gefährdung durch TB-Erkrankungen hat sich durch die pandemische Ausbreitung von HIV/AIDS und das zunehmende Auftreten von Resistenzen gegen bereits bekannte Antibiotika weiter erhöht. Das XMTB-Konsortium klärt die dreidimensionale Struktur der Zielproteine auf, untersucht Wechselwirkungen mit niedrigmolekularen Liganden und schafft damit einen wichtigen Ausgangspunkt für eine gezielte Entwicklung neuer Wirkstoffe. Die MTB-Proteine wurden in *E. coli* exprimiert, mit Verfahren der Affinitätschromatographie aufgereinigt und schließlich kristallisiert. Ein Beispiel stellt die Struktur der Shikimatkinase von *M. tuberculosis* dar (Abb. 92), die als Komplex mit Liganden bei 1.8 Å Auflösung aufgeklärt wurde. Das Enzym katalysiert einen Schritt der Biosynthese aro-

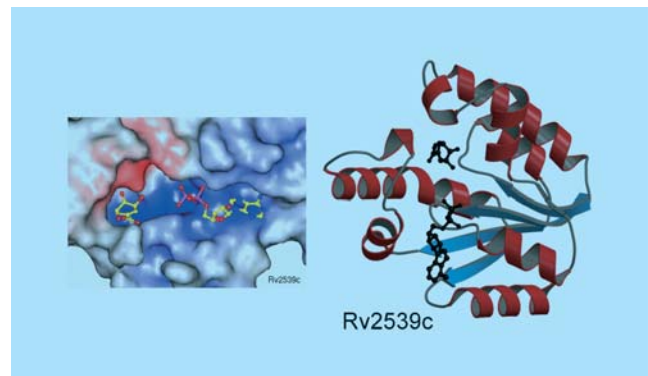


Abbildung 92: Protein-Ligand-Komplex der Shikimatkinase von *M. tuberculosis* bei 1.8 Å Auflösung (Bourenkov, Hartmann, Oberschall, Strizhov, Bartunik, 2005).

matischer Aminosäuren und anderer essentieller aromatischer Verbindungen in Mykobakterien. Dieser (Shikimat-) Reaktionsweg ist in Säugern nicht vorhanden. Die beteiligten Enzyme stellen somit potentiell interessante Ziele der Wirkstoffentwicklung dar.

Zytoskelett

Mikrotubuli sind hohlzylindrische Proteinfasern, die einen wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts ausmachen. Sie bestimmen die äußere Form und die innere Organisation der Zellen. Es handelt sich dabei um dynamische Strukturen, die sich den wechselnden Erfordernissen der Zellen anpassen können. Die Max-Planck-Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ untersucht Mikrotubuli und Proteine, die mit Mikrotubuli assoziiert sind. Dazu gehören unter anderem die so genannten MAPs („Mikrotubuli-Assoziierte Proteine“), die auf der Oberfläche der Mikrotubuli binden und eine regulierende Wirkung haben, sowie Motorproteine, die sich unter Verbrauch von ATP als Energielieferant an den Mikrotubuli entlang fortbewegen und dabei Proteinkomplexe oder Zellorganelle über makroskopische Distanzen transportieren.

Unter den MAPs befindet sich das Tau-Protein, das bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, den

Tauopathien, eine Rolle spielt. Die bekannteste Erkrankung dieser Art ist die Alzheimer-Krankheit, bei der es im Gehirn zu Ablagerungen von Proteinfasern in Form von Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln kommt, was im Endstadium zu einem massiven Verlust von Nervenzellen führt. Die neurofibrillären Bündel bestehen zum überwiegenden Teil aus Fasern des Tau-Proteins. Ziel der Max-Planck-Arbeitsgruppe ist es, herauszufinden, welche Mechanismen dazu führen, dass sich Tau von den Mikrotubuli ablöst und schwer auflösbare, faserförmige Aggregate bildet.

Unter normalen Bedingungen ist Tau ein gut lösliches Protein. Im Zytosol gelöstes Tau steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit Tau, das an Mikrotubuli gebunden ist. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Bindung von Tau an Mikrotubuli durch eine spezifische Phosphorylierung im Bereich der Bindungsregion reguliert wird. Das dafür verantwortliche phosphorylierende Enzym, die Protein-Kinase MARK, wurde bereits vor einigen Jahren in unserem Labor identifiziert (Drewes et al., *Cell* **89** (1997) 297–308). Damit stellt MARK einen potentiellen Ansatzpunkt für gezielte Eingriffe in die Regulierung von Tau dar. Möglicherweise lässt sich die Aktivität von MARK so steuern, dass die pathologische Aggregation von Tau verhindert oder hinausgezögert wird. Mit der erfolgreichen Kristallisation von MARK und der Aufklärung ihrer Struktur durch Röntgenkristallographie mit Synchrotronstrahlung ist dieses Ziel etwas näher gerückt.

Mit Hilfe von Röntgenkleinwinkelstreuung an Tau-Lösungen und mit spektroskopischen Methoden konnte gezeigt werden, dass natives Tau ein weitgehend ungefaltetes Protein ist, das in Lösung keine oder nur sehr wenig Struktur besitzt. Bei der Aggregation zu den für die Alzheimer-Krankheit typischen Fasern, den paarigen helikalen Filamenten (PHF), bilden bestimmte Sequenzmotive aus dem Bereich der Mikrotubuli-Bindungsdomäne kurze beta-Stränge (Barghorn et al., *J. Biol. Chem.* 2004). Durch Röntgen-Faserdiffraktion an künstlich hergestellten PHFs mit Hilfe der Synchrotronstrahlung von DORIS konnte gezeigt werden (Abb. 93), dass die Fasern eine „cross-beta“-Struktur haben, wobei sich die beta-Stränge der einzelnen Moleküle senkrecht zur Faserachse ausrichten und zusammen ein in Faserrichtung ausgedehntes, quasi unbeschränktes beta-Faltblatt bilden.

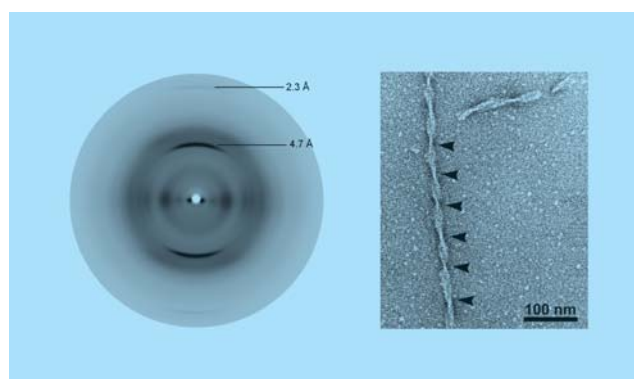


Abbildung 93: Faserdiffraktion von künstlichen Tau-Aggregaten. Das Diffraktionsmuster (links) lässt eine „cross-beta“ Struktur erkennen, bei der die beta-Stränge senkrecht zur Faserachse ausgerichtet sind. Das Bild rechts zeigt künstliche PHF-Fasern in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme.

Mikrotubuli-assoziierte Proteine, insbesondere das Tau-Protein, spielen auch bei der Steuerung und Regulierung des intrazellulären Transports durch Motorproteine der Kinesinfamilie eine wichtige Rolle (Mandelkow et al., 2004). Das typische Kinesin („konventionelles Kinesin“) besteht aus zwei schweren und zwei leichten Peptidketten. Die beiden schweren Ketten besitzen jeweils eine aktive Domäne („Kopf“ oder „Motordomäne“), welche in der Lage ist, an Mikrotubuli zu binden, ATP zu hydrolysieren und die dabei auftretende Konformationsänderung in gerichtete Bewegung entlang des Mikrotubulus umzusetzen. Die Aktivität der Kinesinmotoren wird dabei durch MAPs auf der Oberfläche der Mikrotubuli eingeschränkt. Überexpression von Tau-Protein in retinalen Ganglionzellen behindert den Transport von Mitochondrien und anderen Zellkomponenten im Axon, was die Zellen anfällig für krankhafte Veränderungen macht. Dieser Effekt lässt sich durch Phosphorylierung mit MARK und Ablösung des Tau-Proteins von der Oberfläche der Mikrotubuli wieder rückgängig machen. Der Mechanismus der Kinesin-Bewegung wurde in den vergangenen Jahren durch Röntgenstrukturanalyse von Motordomänen verschiedener konventioneller Kinesine untersucht. Die Untersuchungen wurden nun ausgeweitet auf nichtkonventionelles Kinesin, sowie auf Kinesin-Mutanten, die Veränderungen in der ATP Hydrolyse aufweisen.

Struktur der Ribosomen

Der genetische Code ist auf den ersten Blick nur eine Abfolge von vier unterschiedlichen Nukleinsäuren. Jeweils drei Nukleinsäuren (ein Codon) kodieren eine Aminosäure. Die Übersetzung des genetischen Codes und die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren zu einer Proteinkette wird durch eine universelle Zellorganelle, das Ribosom, geleistet – und zwar in atemberaubender Geschwindigkeit und mit einer sehr geringen Fehlerrate. Dieser Prozess der Proteinbiosynthese ist außerordentlich komplex und erfordert eine Vielzahl verschiedener Co-Faktoren, die einzelne Schritte der Proteinsynthese regulieren.

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

Basierend auf den strukturellen Untersuchungen der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* konnten in den vergangenen Jahren einige wichtige Mechanismen der ribosomalen Protein-Biosynthese sowie die Wirkungsweise verschiedener ribosomaler Antibiotika erfolgreich charakterisiert werden. Ein ganz wesentlicher Schritt der Protein-Biosynthese, die Terminierung, hatte sich bis dato einer strukturellen Charakterisierung entzogen.

Ribosome Recycling – der letzte Schritt im Protein-Biosynthese Zyklus

Ribosome Recycling ist der letzte Schritt der ribosomalen Protein-Biosynthese und erfordert die Beteiligung zweier essentieller Ko-Faktoren, namentlich des *ribosome recycling factors* (RRF) und des *elongation factors G* (EF-G). Die beiden Faktoren entfernen die

letzte verbliebene tRNA aus dem Ribosom und sorgen für die Zerlegung des Ribosoms in seine beiden Untereinheiten. Obgleich RRF schon Anfang der 70er Jahre entdeckt und charakterisiert wurde, blieb der Mechanismus, mit dem RRF die Termination der Protein Synthese stimuliert, weitgehend unklar.

RRF ist in Bakterien universell erhalten, fehlt aber vollständig in Archaea oder Eukaryonten (mit Ausnahme von Chloroplasten und Mitochondrien). Die Entfernung des RRF Gens (*ffr*) ist in jedem Falle tödlich für den bakteriellen Organismus. Die Universalität von RRF und die Beschränkung auf bakterielle Organismen machen aus RRF einen sehr interessanten Angriffspunkt für Antibiotika. Dies erfordert allerdings ein atomares Abbild der Wirkungsweise dieses ribosomalen Faktors.

Wir konnten kürzlich die Kristallstruktur der 50S Untereinheit von *D. radiodurans* in Verbindung mit der katalytischen Domäne des RRF (RRF-D1) zu einer Auflösung von 3.3 Å ermitteln. RRF-D1 bindet auf der Seite des 50S Moleküls, die der 30S Untereinheit im Ribosom zugewandt ist (Abb. 94). Die Position ist ähnlich der, die aus biochemischen und elektronen-mikroskopischen Aufnahmen vorhergesagt wurde. Dies bestätigt die Annahme, das RRF – obwohl es strukturell einer tRNA sehr ähnlich sieht – gänzlich anders als eine tRNA an das Ribosom bindet. Die Kristallstruktur bietet aber im Gegensatz zu den biochemischen Daten einen sehr viel präziseren Einblick, da auch kleine Änderungen in der lokalen Struktur des Ribosoms beobachtet werden können.

Die detaillierte Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen RRF und dem Ribosom zeigt, dass ausschließlich Elemente involviert sind, die auch essentiell für den Transport von tRNA Molekülen durch das Ribosom sind. Dies zeigt, dass RRF zwar kein strukturelles Mimikry, sehr wohl aber ein funktionelles Analog einer tRNA darstellt. Die wichtigsten Kontakte zwischen RRF und dem Ribosom erfolgen mit den 23S rRNA Helizes H69 und H71. Diese beiden Helizes binden im 70S Ribosom die 30S Untereinheit und sind daher besonders wichtig für die Stabilität des Ribosoms.

Interessanterweise induziert RRF eine starke Konformationsänderung von Helix 69, die zu einer Destabilisierung des 70S Ribosoms führen muss und daher einen wesentlichen Beitrag zum Ribosome Re-

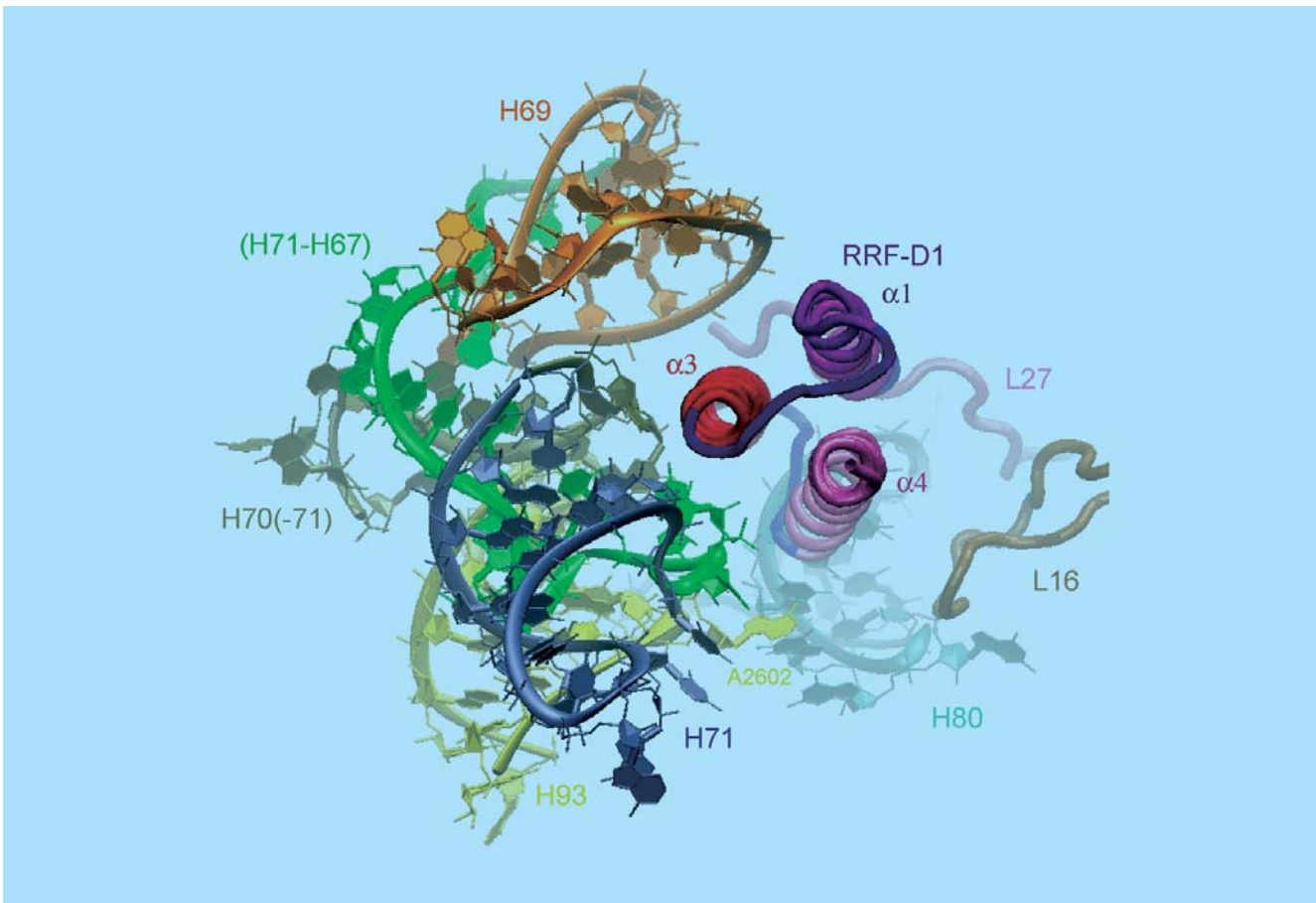


Abbildung 94: RRF bindet im Translokations-Zentrum der 50S Untereinheit. Alle strukturellen Elemente, die in Kontakt mit RRF sind – wie RNA Helizes 69–71 und 80 sowie die beiden Protein L16 und L27 – sind ebenfalls essentiell für die Translokation der tRNA Moleküle.

cycling darstellt. Dieser Effekt wird durch die Wirkung von EF-G noch verstärkt, da EF-G nach der GTP-Hydrolyse eine Konformation einnimmt, die RRF gegen Helix 69 schiebt und somit die Wechselwirkung mit der 30S Untereinheit unterbrechen kann. Dadurch würde die gemeinsame Wirkung von EF-G und RRF nicht nur die letzte verbleibende tRNA aus dem Ribosom heraus katapultieren, sondern ebenfalls die beiden ribosomalen Untereinheiten separieren und für die weitere Protein-Biosynthese wieder verfügbar machen.

Die strukturellen Untersuchungen an der 50S Untereinheit in Verbindung mit RRF wurden in Kollaboration

mit der Gruppe von Y. Kobayashi, Osaka University durchgeführt. Die Messungen wurden sowohl an der BW6/HASYLAB/DESY als auch am SLS/PSI durchgeführt. Aufgrund der pharmazeutischen Bedeutung von RRF wurde ein Patent angemeldet.

Weiterführende Links

Weitere Informationen und Links finden sich auf den Internet-Seiten der MPG (www.mpg.de – Presstexte; www.molgen.mpg.de), den Research Highlights des HASYLAB (www-hasylab.desy.de) sowie unter www.riboworld.com.

