

Abbildung 62: *Plastocyanin von Populus nigra* (Dimitrov et al., 1999): Ausschnitt aus der Elektronendichteverteilung, die unmittelbar aus experimentellen Strukturfaktoren mit MAD-Phasen bei 1.3 Å Auflösung berechnet wurde. Zum Vergleich wurde ein Modell überlagert, das einer konventionellen Verfeinerung nicht-resonanter Daten bei extrem hoher Auflösung (0.85 Å) entstammt.

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 in Bakterien 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-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-Strahlführung BW6 an DORIS.

Ein Schwerpunkt der wissenschaftlichen Arbeiten lag bei der Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen von Haemproteinen, insbesondere der Bindung von Kohlenmonoxid an Myoglobin. Die Affinität für die Bindung dieses Liganden ist beim Myoglobin um mehrere Größenordnungen geringer als bei freien Porphyrinverbindungen; dies ist von erheblicher physiologischer Bedeutung. In Lehrbüchern wurde die geringere Bindungsaffinität durch eine gewinkelte Geometrie der Bindung des CO an das Eisenatom der Haemgruppe erklärt; die Verzerrung im Vergleich zur Linearität dieser Bindung in Porphyrinverbindungen wurde dem Einfluss der Proteinumgebung zugeschrieben. Diese Interpretation gründete sich auf frühere Kristallstrukturanalysen.

Der Arbeitsgruppe gelang es erstmals, diese und eine Reihe anderer Strukturen des Myoglobin bei ultrahoher Auflösung (1.15 Å) zu bestimmen; von besonderer Bedeutung war dabei, dass dies bei Zimmertemperatur möglich war. Wie sich zeigte, ist die Fe-CO-Bindung nahezu linear und der in Porphyrinverbindungen sehr ähnlich. Der sterische Mechanismus der Hemmung der CO-Bindung an das Protein konnte aufgeklärt und damit eine der ältesten Problemstellungen in der Biophysik gelöst werden. Darüber hinaus zeigte es sich, dass dynamische Aspekte eine zentrale Rolle spielen. Konzentrierte Bewegungen ausgedehnter Teile des Proteins sowie der Haemgruppe sind erforderlich, um dem CO-Liganden den Zugang zur aktiven Bindungsstelle zu ermöglichen.

In einer Reihe weiterer Experimente, bei denen Schockgefrieretechniken eingesetzt wurden, wurden diese Bewegungen in der Proteinmatrix und die Wechselwirkung mit dem Liganden in intermediären Zuständen

untersucht. Zur Aufklärung der Zeitfolge, in der die Zwischenzustände bevölkert werden, wurden Verfahren zeitaufgelöster Beugung in Verbindung mit Laseranregung auf einer Zeitskala von Nanosekunden genutzt; diese Arbeiten sind noch nicht abgeschlossen.

Ein anderer Schwerpunkt lag bei der weiteren Entwicklung theoretischer und experimenteller Methoden der Phasenbestimmung mit Hilfe multipler anomaler Dispersion (MAD). In Verbindung mit Kryotechniken ist es in der Regel möglich, eine neue Proteinstruktur auf der Grundlage von resonanten Beugungsmessungen an einem einzigen Kristall zu lösen, und dies oft innerhalb weniger Tage. Bei hinreichend hoher Auflösung können anomale Phasen sehr präzise bestimmt werden. Abbildung 62 zeigt als Beispiel das Ergebnis einer Anwendung auf Plastocyanin, einem Protein, das an Pho-

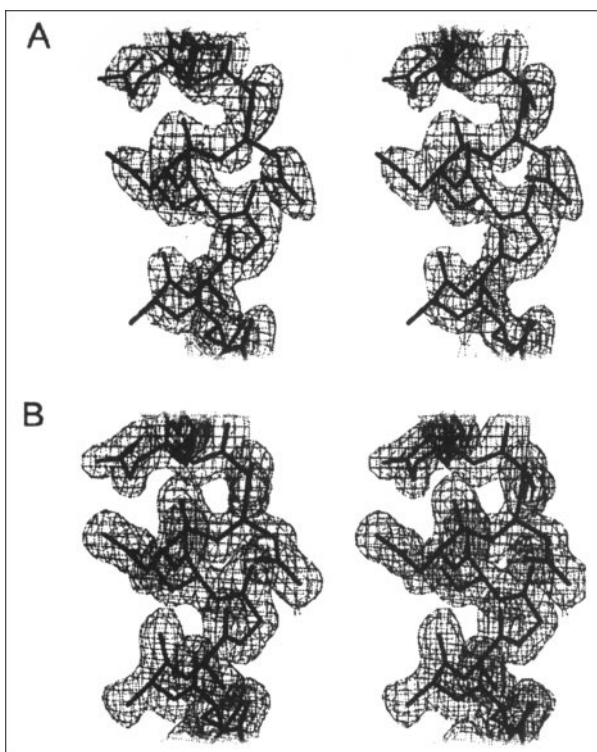


Abbildung 63: *Cytochrom-c-Nitritreduktase* von *S. deleyianum* (Einsle et al., 1999): (A) zeigt einen Ausschnitt aus der Dichteverteilung unmittelbar nach MAD-Phasierung, (B) nach der anschließenden Verfeinerung bei 1.9 Å Auflösung. Das Modell zeigt die homodimere Struktur, die insgesamt 15 Haemgruppen enthält.

tosyntheseprozessen beteiligt ist, bei 1.3 Å Auflösung. Die Elektronendichteverteilung, die in diesem Fall unmittelbar aus den experimentell bestimmten Beträgen und Phasen der Strukturfaktoren berechnet wurde, weist bereits ohne Verfeinerung einen sehr hohen Kontrast und hohe Qualität auf. Auf diese Weise ist es im Prinzip möglich, Proteinstrukturen gänzlich ohne einschränkende Annahmen („Restrains“) bezüglich der geometrischen und energetischen Parameter aufzuklären.

MAD-Verfahren haben bereits jetzt enorme Bedeutung sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die industrielle Forschung und Entwicklung. Diese Bedeutung wird weiter zunehmen, insbesondere auch in der (strukturellen) Genomik. Am BW6 konnte im vergangenen Jahr eine Reihe von Strukturen hoher und überaus aktueller biologischer Relevanz gelöst werden. Abbildung 63 zeigt ein Beispiel, die *Cytochrom-c-Nitritreduktase* (Einsle et al., 1999); dieses bakterielle Enzym wandelt Nitrit in Ammoniak um. Ein weiteres Beispiel stellt die Struktur der membranbindenden Domäne des menschlichen Koagulationsfaktors V dar (Macedo-Ribeiro et al., 1999).

Alle Röntgenbeugungsmessungen wurden an der Strahlführung 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 sowie der Untersuchung des Struktur-Funktions-Zusammenhangs von Tubulin, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und Motorproteinen aus Nervenzellen. Weitere Untersuchungen betreffen die Dynamik zellulärer Bewegungs-, Polymerisations- und Transportprozesse sowie die Rolle des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau in der Alzheimer-Krankheit.

Mikrotubuli sind hohlzylindrische Proteinfasern, die in vielen eukaryontischen Zellen nachgewiesen wurden. Sie sind Teil des sogenannten Zytoskeletts, das die Zellform und die räumliche Organisation subzellulärer Strukturen bestimmt. Mikrotubuli wirken aber auch an

vielen Transportprozessen mit, teils direkt aufgrund ihrer eigenen Dynamik, teils indirekt als Transportschienen für Motorproteine wie Kinesin und Dynein. Mikrotubuli bestehen aus einem globulären Protein, dem Tubulin, das unter physiologischen Bedingungen spontan zu Mikrotubuli polymerisiert. Ihre Eigenschaften werden durch eine Reihe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) beeinflusst, die an der Oberfläche der Mikrotubuli binden.

Die genaue Funktion der MAPs ist noch nicht bekannt. MAP2 und Tau, zwei Proteine, die den größten Teil der MAPs im Gehirn darstellen, sind an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt und regeln deren mechanische Eigenschaften, die Organisation der Mikrotubuli in größere Verbände und die Wechselwirkung der Mikrotubuli mit Motorproteinen und anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen.

Eine anomale Aggregation des Tau-Proteins in der Alzheimer-Krankheit führt unter anderem auch zum Zusammenbruch der Mikrotubuli und zum Absterben der Neuronen. Um den Einfluss von MAPs auf die Bündelung der Mikrotubuli zu untersuchen, wurden

Mikrotubuli in Lösung durch Zentrifugation verdichtet und die dadurch erzielte Packung der Mikrotubuli mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung von Synchrotronstrahlung analysiert. In Abwesenheit von MAPs können Mikrotubuli bereits durch moderate Zentrifugation zu dichten Bündeln gepackt werden. MAP2 beeinflusst die Bündelung der Mikrotubuli empfindlich. Mit zunehmender Konzentration von MAP2 muss eine immer längere und intensivere Zentrifugation aufgebracht werden, um den Widerstand der MAPs gegen eine dichte Packung zu überwinden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die MAP-Proteine unter anderem die Rolle von „Raumfüllern“ haben, die dafür sorgen, dass in den Nervenzellen der Platz um die Mikrotubuli herum offen bleibt, um Transportvorgänge zu ermöglichen.

Das Motorprotein Kinesin gewinnt Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und setzt diese in gerichtete Bewegung entlang der Mikrotubuli um. Die Kopf- oder Motordomäne der schweren Kette des Kinesin ist sowohl für die Wechselwirkung mit Mikrotubuli als auch für die ATPase-Aktivität verantwortlich. In der Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ wurden Kinesine aus verschiedenen Organismen und insbesondere Konstrukte mit der

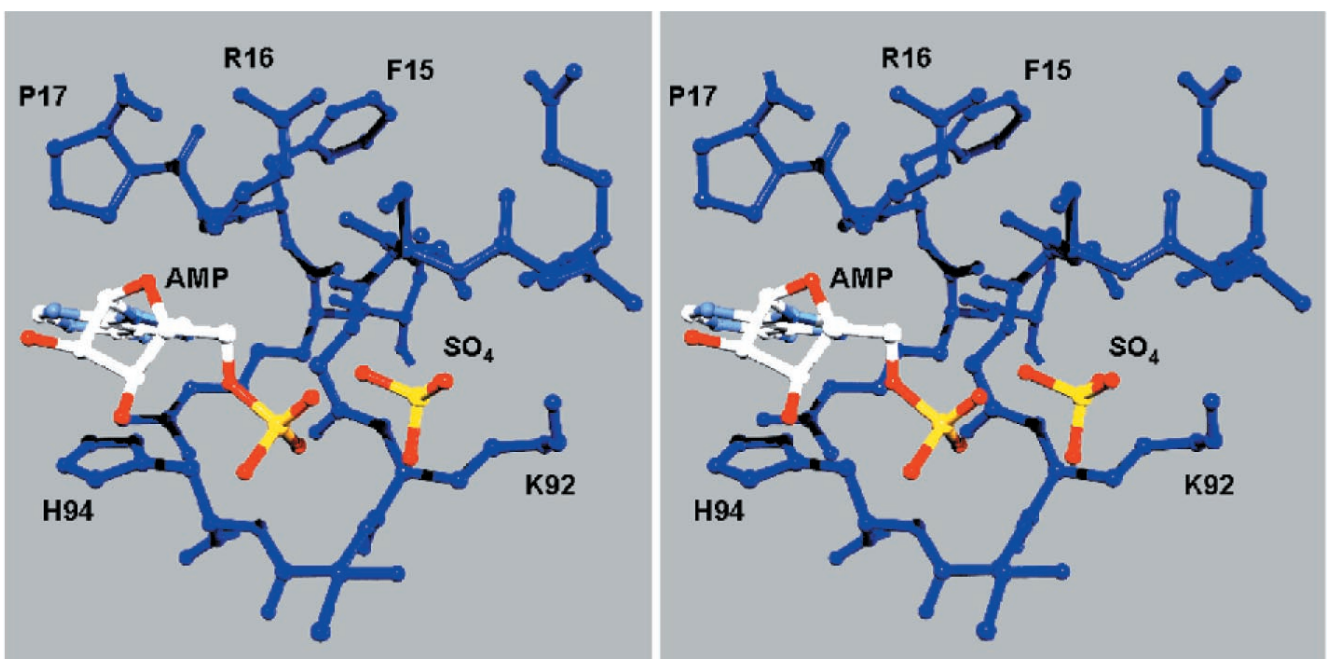


Abbildung 64: Stereobild der Nukleotidbindungstasche des Motorproteins Kinesin.

Motordomäne und verschiedenen langen Bereichen der sich anschließenden Stab-Domäne kloniert, in Bakterien exprimiert und in reiner Form dargestellt. Vor einiger Zeit ist es gelungen, die Röntgenstruktur eines monomeren und eines dimeren Konstruktes aus Rattenkinesin zu bestimmen. Beide Strukturen zeigen die Motordomäne in dem Zustand nach der Hydrolyse des ATP zu ADP. Um den Zustand vor der Hydrolyse oder einen Zwischenzustand zu bestimmen, wurde Kinesin in verschiedenen Pufferbedingungen mit diversen Nukleotid-Analogen kristallisiert. Die Analyse der Kristallstrukturen zeigte, dass das Motorprotein in allen bisher erhaltenen Kristallen dieselbe Konformation einnimmt (Abb. 64). Daraus wird geschlossen, dass die Konformationsveränderung für die Krafterzeugung erst dann erfolgt, wenn das Motorprotein an seiner Zielstruktur, den Mikrotubuli, andockt.

Struktur der Ribosomen

Ribosomen sind die universellen Zellorganellen, an denen der elementare Prozess der Proteinbiosynthese, das heißt die Übersetzung des genetischen Codes, stattfindet.

Die prokaryotischen Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe, die entsprechend ihren Sedimentationskoeffizienten 50S bzw. 30S genannt werden. Die große 50S Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 1.45 Millionen Dalton und enthält neben 38 Proteinen zwei RNA-Ketten (5S und 23S) mit insgesamt 3000 Nukleotiden. Die kleine 30S Untereinheit dagegen besitzt ein Molekulargewicht von 0.85 Millionen Dalton und besteht aus 20–21 Proteinen und einer RNA-Kette (16S) mit etwa 1500 Nukleotiden.

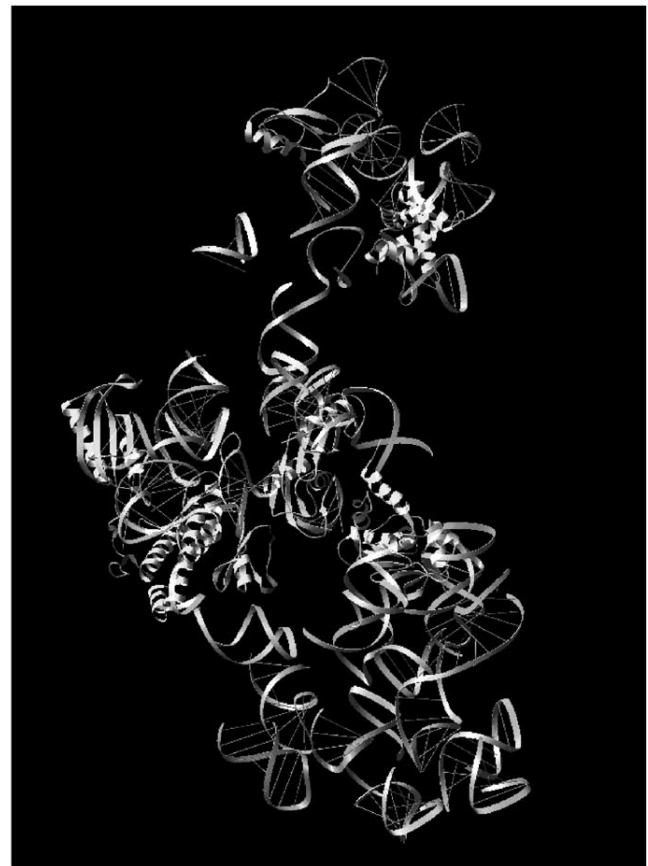
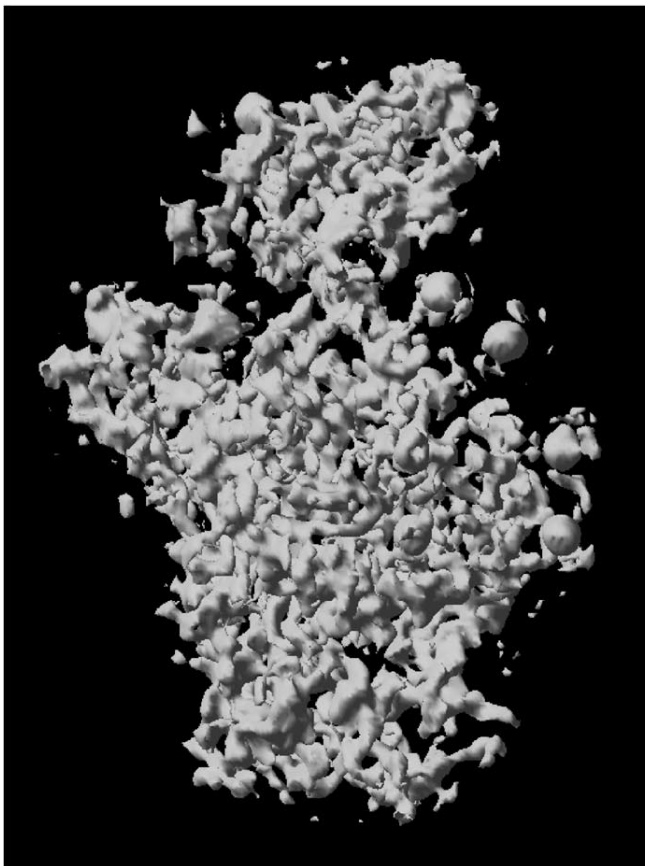


Abbildung 65: Struktur der 30S Untereinheit des Ribosoms aus *Thermus thermophilus*; links: Elektronendichte (Auflösung $\sim 4.5 \text{ \AA}$), rechts: Strukturmodell mit einem Teil der 16S RNA und mit allen ribosomalen Proteinen, soweit deren Struktur bekannt ist.

Im Zentrum der derzeitigen Untersuchungen stehen die kleine Untereinheit von *Thermus thermophilus* (T30S) und die große Untereinheit von *Haloarcula marismortui* (H50S), zweier Bakterienarten, die unter extremen Lebensbedingungen vorkommen.

Die H50S-Kristalle wachsen als dünne Plättchen mit Dimensionen von etwa $300 \times 300 \times 8 \mu\text{m}$. Obwohl diese Kristalle bis zu einer Auflösung von 2.7 \AA streuen, ist die Bestimmung der Kristallstruktur problematisch. Die Kristalle weisen ein sehr geringes Maß an Isomorphie auf und sind trotz ihrer geringen Dicke häufig in Schichten gewachsen, was die Datenqualität wesentlich beeinträchtigt. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass in Richtung der C-Achse kaum Kristallkontakte vorhanden sind, was sowohl die geringe Dicke der Kristalle als auch den geringen Isomorphiegrad und ihr Diffraktionsverhalten zu erklären vermag.

Die 30S Partikel sind aufgrund ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese in sich flexibel. Dies hat anfänglich dazu geführt, dass die T30S Kristalle eine Auflösung von $10\text{--}12 \text{ \AA}$ nicht übertroffen haben. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der 30S Untereinheiten haben ebenfalls gezeigt, dass die Population der 30S Partikel sehr inhomogen ist. Die Derivatisierung mit einem Wolfram-Komplex hat offensichtlich zu einer Stabilisierung der 30S Partikel im Kristallgitter geführt, denn damit konnte eine dramatische Verbesserung der

Auflösung erzielt werden, so dass Daten bis zu einer Auflösung von etwa 3 \AA gesammelt werden konnten.

Bislang konnte eine Elektronendichte mit einer Auflösung von etwa 4.5 \AA konstruiert werden (Abb. 65 links). Die Elektronendichte ist in grober Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Daten, aber naturgemäß sehr viel detaillierter. So konnten inzwischen der größere Teil der 16S RNA sowie alle ribosomalen Proteine, deren Struktur bekannt ist, in die Elektronendichte modelliert werden (Abb. 65 rechts).

Die Zuordnung zwischen der Sequenz der RNA und dem Modell, das aus den kristallographischen Daten gewonnen wurde, ist nicht eindeutig. Zwar kann man sich auf eine immense Bibliothek biochemischer Daten berufen, aber die Daten sind häufig nicht genau genug, um auf molekularer Ebene eine präzise Zuordnung zu gewährleisten. Daher wurde versucht, ganz spezifische Stellen der 30S Untereinheit mit Schweratomen zu markieren. Dies kann entweder durch die direkte Derivatisierung ribosomaler Komponenten geschehen, oder durch die Markierung von funktionellen Trägern, die eine hohe Affinität besitzen. Mögliche Kandidaten für diese Prozedur sind Antibiotika, komplementäre DNA-Stränge (cDNA), tRNA oder andere Faktoren, die unmittelbar in die Proteinbiosynthese involviert sind. Auf diese Art und Weise konnten verschiedene RNA-Ketten, die Positionen des 3'-Endes der RNA sowie zweier Cysteine, die zu den ribosomalen Proteinen S11 und S13 gehören, bestimmt werden.