

**II. Das unerreichte Vorbild:  
Die Zelle als nanotechnologischer  
Großbetrieb**

## Proteine – die Nanomaschinen der Zelle

Zellen können alles. Nicht jede für sich. Aber zu fast jeder Aufgabe, die man einem submikroskopisch kleinen Erwas stellen kann, gibt es eine Zelle, die sie erfüllen kann. Sie wollen einen lebenden Kompaß? Kein Problem, magnetotaktische Bakterien wissen, wo Norden ist. Ein Mittel gegen die Öpest? Auch dafür gibt's Bakterien. Einen Sauerstofftransporter? Unsere roten Blutkörperchen machen den lieben langen Tag nichts anderes. Einen Nanomotor? Unsere Muskelzellen enthalten Hunderte. Zwei spiegelbildliche Molekülformen bilden äußerlich identische Kristalle. Kann man sie dennoch auseinandersortieren? Man kann, wenn man Zellen um Hilfe bittet. Egal, ob man Silber anreichern, Toluol abbauen oder hochwirksame Gifte herstellen will, ob man ein Mineral in amorpher oder kristalliner Form abscheiden will, ob man chemische Energie in Bewegung, Wärme oder Licht umwandeln oder umgekehrt daraus gewinnen will, die Natur hat eine platzsparende Lösung für jedes dieser technischen Probleme.

Für die allermeisten Problemlösungen, die als Anregungen für Nanotechnologie dienen könnten, sind in der Zelle Proteine zuständig – insbesondere für die Chemie und die Feinmechanik der Zelle.

Proteine erledigen in der Zelle die Arbeit. Sie erfüllen eine immense Vielfalt von Aufgaben, für die eine nicht minder beachtliche Vielfalt von Proteinen bereitsteht. Selbst eine relativ einfache Zelle, etwa unser ständiger Begleiter, das Darmbakterium *Escherichia coli*, stellt fortlaufend mehrere tausend verschiedene Proteine her. Kleine und große, wasserlösliche und fettlösliche, die sich in die Zellmembran einlagern, saure und basische, kugelförmige und langgestreckte Proteine. Jedes ist ein Individuum, und allgemeine Aussagen, die über die chemischen Prinzipien des Aufbaus aus Aminosäuren hinausgehen, sind schwer zu treffen. So wie Biochemiker sich ein einzelnes Molekül oder eine kleine Gruppe als Studienobjekt herausgreifen (und dabei nur zu leicht der Versuchung erliegen, ihre Beobachtungen zu verallgemeinern und auf den Rest der Proteinwelt zu übertragen), wollen wir in den folgenden Kapiteln anhand einiger Beispiele sehen, was einige bestimmte Proteine können. Im Sinne der Expeditionen in ein weites, großenteils noch unbekanntes Land sollen nur einige kleine Streifzüge geschildert werden, einige Einblicke in die Funktionsweise dieser natürlichen Nanowelt gegeben werden, aus denen wir dann – Reisen bildet –

Grundlagen und Anregungen gewinnen können für die ersten Versuche des Menschen, eigene Bauwerke und Fabriken in der Nanowelt zu errichten.

### Molekulare Motoren in Aktion: Endlich Bewegung in der Muskelforschung

Mancher Zeitgenosse hält sich einiges auf seine Muskelkraft zugute. Doch dieser Stolz verträgt sich schlecht mit dem Snob-Appeal, den wir Angehörige der Spezies *Homo sapiens* mit unserer Stellung im Tierreich verbinden. Nicht nur die Skelettmuskeln der Wirbeltiere, auch die Schließmuskeln der Muscheln und anderer Wirbelloser funktionieren genauso wie unsere Kraftpakete. Ob also Arnold Schwarzenegger seinen Bizeps spielen läßt oder eine Jakobs-muschel ihre Schalen auf- und zuklappt, ist, auf molekularer Ebene, im Grunde das gleiche. Ein Muskel verkürzt sich (um ca. ein Drittel seiner Länge im entspannten Zustand), weil in jeder einzelnen Zelle die miteinander verzahnten dünnen und dicken Filamente aneinander vorbei gleiten. Das Protein Myosin, das mit seinem langen Schwanz in den dicken Filamenten verankert ist und mit seinem Kopf die hauptsächlich aus Actin bestehenden dünnen Filamente festhalten oder loslassen kann, wird als der Motor dieser Bewegung angesehen, deren Treibstoff der zelluläre Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) ist.

Obwohl diese Vorstellungen bereits in den fünfziger und sechziger Jahren entwickelt wurden, blieb die treibende Kraft, der Mechanismus, über den die aus dem Abbau von ATP gewonnene Energie in die Gleitbewegung der Filamente investiert wird, bis heute im dunkeln, und in der Muskel-forschung bewegte sich jahrelang kaum etwas voran.

Das könnte sich sehr bald ändern, nachdem in den Jahren 1993/94 geradezu eine Flut von (bisher schmerzlich vermiften) Detailinformationen über die räumlichen Strukturen der beteiligten Proteine hereingebrochen ist und es überdies den Biophysikern gelang, einzelne Moleküle der Motorproteine in ihrem Bewegungsablauf zu beobachten.

Den Aufakt für ein turbulentes Dreivierteljahr in der Erforschung dieser linearen molekularen Motoren lieferten Ivan Rayment und seine Mitarbeiter an der Universität von Wisconsin, die im Juli 1993 die Kristallstruktur des Myosinkopfes vorstellten. Um das Protein, das sie aus Hühnermuskeln gewannen, überhaupt kristallisierbar zu machen, mußten die Forscher den

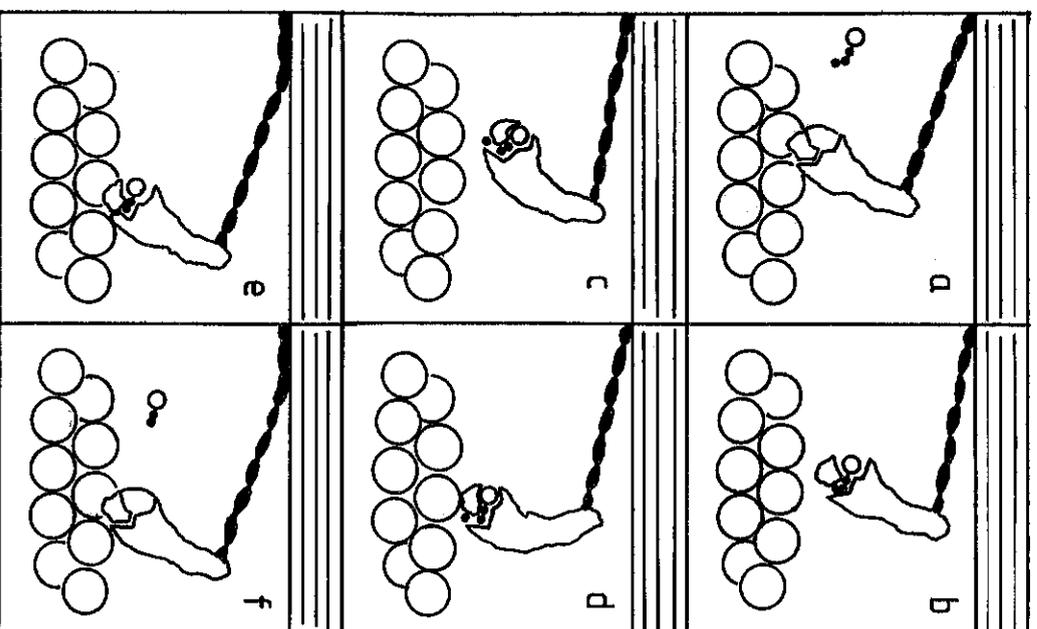


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Reaktionszyklus, den Myosin bei der Muskelkontraktion durchläuft. a) Der Myosinkopf ist an eine der Actin-Untereinheiten gebunden und enthält kein Nukleotid. b) ATP bindet an den Myosinkopf und bewirkt, daß dieser das Actin losläßt. c) Hydrolyse des ATP durch Myosin (Abspaltung des dritten Phosphatrests) führt zu d) Streckung des Myosins, das somit eine entferntere Actin-Untereinheit ergreifen kann. Die Bindung ist zunächst noch schwach. e) Abstoßen des abgetrennten Phosphatrests ermöglicht festere Bindung und Kraftausübung durch Zusammenziehen des Myosinmoleküls. f) Dissoziation des Spaltprodukts ADP führt zurück zum Ausgangszustand. Nach Rayment und Holden (1994).

ca. 160 Nanometer langen Schwanz abzwicken und leichte chemische Modifikationen an dem Kopf vornehmen, der alle wichtigen Funktionselemente enthält und auch ohne den Schwanz mit Actin-Filamenten wechselwirken kann. Aus dem atomaren Aufbau des Myosinkopfes und der bereits seit 1990 bekannten Struktur des Actin errechnete Rayments Arbeitsgruppe ein Modellbild für die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Komponenten und verfeinerte damit das herkömmliche Gleitfilament-Modell der Muskelkontraktion (Abbildung 6). Aufgrund der räumlichen Anordnung der beweglichen Teile des Actin-Myosin-Motors konnten die Forscher die Schrittweite bei einem einzelnen Bewegungszyklus (Abbau eines ATP-Moleküls) eingrenzen: Sie mußte zwischen sechs und zwanzig Nanometer betragen.

Ein sensorioneller Durchbruch konnte wenig später mit einem weiteren Motorprotein, dem Kinesin, erzielt werden. Karel Svoboda und seine Mitarbeiter brachten das Molekül, das sich in der Zelle an den Mikrotubuli entlanghangelt und dabei ganze Zellorganellen mitschleppen kann, dazu, ein Kügelchen aus Silicagel durch einen verengerten Laserstrahl hindurchzuziehen. Aus den Interferenzmustern des aufgefangenen Laserlichtes konnte die Bewegung mit unvorstellbarer Exaktheit bis auf einen Nanometer genau rekonstruiert werden. Die Forscher kamen zu dem Schluß, daß Kinesin sich in einzelnen Schritten von jeweils acht Nanometern bewegt.

Leider ist die molekulare Struktur des Kinesin noch nicht bekannt, so daß dieser Bewegungsablauf nicht genauer beschrieben werden kann. Deshalb war es wiederum ein bedeutender Fortschritt, als die Arbeitsgruppe um James A. Spudich in Stanford (Kalifornien) die Interferenzmethode nochmals verfeinern und dann auch auf (aus Kaninchenmuskeln isolierte) einzelne Myosinmoleküle anwenden konnte. In dieser Studie wurde auch eine Gegenkraft angelegt, die so lange gesteigert wurde, bis die Bewegung zum Stillstand kam. Auf diese Weise konnten nicht nur die Bewegungsschrittweite (11 nm), sondern auch die Kraft der Muskelmoleküle gemessen werden. Sie betrug 3–4 Piconewton (Ein pN ist ein millionstel Millinewton der Kraft, die man aufwenden muß, um eine Masse von 102 Gramm hochzuhalten).

Kurz nach dieser Arbeit erschien wiederum eine röntgenkristallographische Untersuchung eines Muskelproteins. Diesmal wurde aus dem Motor, der den Kammmuscheln (z.B. der Jakobsmuschel) zum Öffnen und Schließen ihrer Gehäuse und damit auch zum Schwimmen dient, sozusagen das Gas-

pedal herausgepickt: ein kleiner Bereich auf der von den dünnen Filamenten abgewandten Seite des Kopfes, welcher die Aktivität der ATP-abbauenden Funktion des Myosinkopfes drosseln kann. Ob diese sogenannte regulatorische Domäne Gas gibt oder drosselt, hängt von der Konzentration der Kalziumionen in der Muskelzelle ab.

Die Kristallstruktur, welche die Arbeitsgruppe von Carolin Cohen an der Brandeis University in Zusammenarbeit mit drei weiteren Gruppen erstellte, verspricht nicht nur Aufschluß über die Funktionsweise dieses Drosselventils, das im Myosin der Wirbeltiere nicht existiert, sondern ergänzt auch in anderer Hinsicht die oben erwähnte Struktur des ganzen Myosinkopfes. So waren in diesem Fall keine chemischen Modifikationen erforderlich, und das Muschel-Protein liefert in einem gewissen Bereich ein scharfes Bild, wo das Hühner-Myosin aufgrund verschiedener Unterarten (Isoformen) nur «verwackelte» Strukturen ergibt.

Zusammengenommen bedeuten diese Studien, daß die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Muskelkontraktion in greifbare Nähe gerückt ist. Sobald die Strukturkoordinaten über Datenbanken allgemein zugänglich sind, können die Arbeitsgruppen, die über die letzten drei Jahrzehnte geduldig kleine Teile des Puzzles sortiert haben, beginnen, aus den Teilen ein Ganzes zu machen. Nach langem Stillstand ist die Muskeelforschung in Bewegung gekommen.

### **Düngemittel aus der Luft: Die Wege der Natur sind eleganter als das Haber-Bosch-Verfahren**

Pflanzen stehen vor einem paradoxen Versorgungsproblem. Eines der Elemente, die sie zum Wachstum am dringendsten benötigen, ist Stickstoff. Und die Luft, die sie umgibt, besteht zu 78 Volumenprozent aus Stickstoff, doch da das Element so reaktionsträge ist, können sie mit diesem immensen Vorrat nichts anfangen. Die Umwandlung des elementaren Stickstoffs in für Pflanzen, Tiere und Menschen verwertbare Stickstoffverbindungen findet im wesentlichen auf zwei Wegen statt.

Einhundert Millionen Tonnen des Elements werden pro Jahr durch Reaktion mit Wasserstoff zu Ammoniak, dem Grundstoff für alle stickstoffhaltigen Synthesekemikalien und vor allem auch für die Düngemittelproduktion, umgesetzt. Zu diesem Zweck wird ein immenser technischer Auf-

wand betrieben: Nach dem Verfahren, das von Fritz Haber<sup>1</sup> entwickelt und von Carl Bosch<sup>2</sup> zur großtechnischen Anwendbarkeit geführt wurde, sind hohe Drücke (200 Atmosphären), hohe Temperaturen (500 Grad Celsius) und aufwendige Katalysatoren erforderlich, um magere 18 Prozent des eingesetzten Stickstoffs zur Reaktion zu bringen.

Ebenfalls einhundert Millionen Tonnen Stickstoff pro Jahr setzt die Natur in Gestalt einzelliger Mikroorganismen zu Ammoniak um, den sie als Grundbaustein für die stickstoffhaltigen Biomoleküle wie Proteine, Nucleinsäuren etc. benötigt. Über die Pflanzen, mit denen diese Organismen in Symbiose leben, gelangen die Stickstoffverbindungen in die Nahrungskette und erreichen indirekt alle Lebewesen. Die Natur geht jedoch sehr viel eleganter vor als der Mensch – sie führt die Reaktion (die man in diesem Zusammenhang als «Stickstoff-Fixierung» bezeichnet) bei Normaldruck und Normaltemperaturen durch und benutzt als Katalysator ein spezialisiertes Enzym: die Nitrogenase.

Die Frustration ganzer Chemikergenerationen, keinen Katalysator gefunden zu haben, der das nachvollziehen kann, was in der Natur offenbar so einfach ist, könnte jetzt bald ein Ende finden. Nachdem von den beiden Proteinen, die zusammen das Nitrogenase-Enzym bilden, nunmehr hochauflösende Strukturen vorliegen, bestehen gute Chancen für eine baldige Aufklärung des Mechanismus.

Bisher weiß man nur in etwa, wie die Arbeitsteilung zwischen den beiden Proteinen abläuft: Das Eisenprotein, das so genannt wird, weil es in seinem aktiven Zentrum einen Komplex aus Eisen- und Schwefelatomen enthält, pumpt Elektronen zu dem Molybdän-Eisen-Protein, das neben Eisen-Schwefel-Komplexen auch eine Verbindung des Eisens mit dem relativ seltenen Schwermetall Molybdän (bekannt als Legierungsbestandteil im Molybdänstahl) enthält. Jeder Stoß dieser Elektronenpumpe treibt das Molybdän-Eisen-Protein eine Stufe weiter voran in einem achtschritten Kreislauf von der Aufnahme des Stickstoffs bis zur Freisetzung des Ammoniaks, auf die eine erneute Stickstoffbindung folgen kann. Daß es acht Stufen

sein müssen, weiß man, weil acht Elektronen benötigt werden, um aus einem Stickstoffmolekül und acht Wasserstoffionen zwei Moleküle Ammoniak und ein Molekül Wasserstoff zu machen. Während die Elektronentransportvorgänge sich durch Analogieschluß anhand ähnlicher Gegebenheiten in der Photosynthese erklären lassen, liegen die Einzelheiten dieses Kreisprozesses noch vollkommen im dunkeln. Man kennt bisher nur ein einziges Zwischenprodukt, das sich isolieren läßt, wenn man die Nitrogenase im flagranti erwischt: nämlich das Hydrazin, eine Verbindung aus zwei Stickstoff- und vier Wasserstoffatomen.

Das Molybdän-Eisen-Protein ist allerdings nicht nur eine Kreiselpumpe, sondern auch ein Elektronenschwamm. Führt man nämlich die Reaktion im Reagenzglas aus, so wird die erste Charge des Produkts (Ammoniak und Wasserstoff) schon freigesetzt, bevor alle acht benötigten Elektronen vom Eisenprotein zum Molybdän-Eisen-Protein geflossen sind. Daraus schließt man, daß das Protein, genauer gesagt, die Metallkomplexe, die es in seinem aktiven Zentrum enthält, eine gewisse Speicherkapazität für Elektronen besitzt.

Wenn nun anhand der vorliegenden Strukturmodelle der Mechanismus vollständig, das heißt mit allen Zwischenstufen und strukturellen Details, aufgeklärt werden soll, dann sind interdisziplinäre Ansätze besonders gefragt. Das Herzstück des Molybdän-Eisen-Proteins, ein sogenannter Cluster aus einem Molybdän-, sieben Eisen- und vier Schwefelatomen, dessen genaue Struktur durch die vorliegenden Arbeiten noch nicht zweifelsfrei geklärt ist, ist ein typisches Untersuchungsobjekt für die moderne organische Chemie. Sie befäht sich schon seit geraumer Zeit mit mehr oder weniger spekulativen Modellverbindungen aus Molybdän, Eisen und Schwefel, die zwar von der Frage nach der Struktur und Funktion des aktiven Zentrums der Nitrogenase inspiriert waren, aber nicht einmal die korrekte Zusammensetzung an Metallatomen enthielten.

Demgegenüber sind die vorgeschlagenen Strukturen (Abbildung 7) zwar realistischer, aber immer noch nur Modelle, die sich eines Tages als falsch erweisen können. Von diesen ausgehend können Anorganiker und Biochemiker nun versuchen, den Molybdän-Eisen-Cluster zu imitieren oder Strukturvarianten zu entwickeln. Mit Hilfe dieser neuen Strukturen könnten sie nicht nur zum Verständnis der Funktion der Nitrogenase beitragen, sondern vielleicht auch eines Tages einen besseren Katalysator finden, der die technische Ammoniaksynthese bei Normaldruck und Raumtemperatur ermöglichen.

1 Fritz Haber (1868–1934) leitete 1911–1933 das Kaiser-Wilhelm-Institut für Physikalische Chemie in Berlin, emigrierte 1933 nach England. Nobelpreis für Chemie 1918.

2 Carl Bosch (1874–1940) wurde 1919 Vorstandsvorsitzender der BASF, 1935 Aufsichtsratsmitglied der IG Farben. Nobelpreis für Chemie 1931.



strukturbildern verfolgen, wenn man es schafft, die Reaktion so zu steuern, daß sie immer nur bis zu einem bestimmten Schritt abläuft.

Das Enzym, für das die Niederländer sich interessierten, spaltet Chlor aus chlorierten Kohlenwasserstoffen ab (Abbildung 8) und ist daher für eine mögliche biotechnologische Entschärfung dieser ozonschädigenden Substanzen im Gespräch. Tränkt man einen Kristall dieses Proteins im sauren Milieu (pH 5) bei 4°C mit einer Lösung eines geeigneten Substrats, etwa Dichloräthan, so wird dieses im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden, aber nicht «bearbeitet». Die Röntgenstrukturanalyse dieses Kristalls liefert somit einen Schnappschuß vom ersten Schritt einer Enzymreaktion, der Erkennung und Bindung des Substrats durch das Enzym.

Führt man dieselbe Prozedur hingegen bei 20°C durch, so geht die Reaktion einen Schritt weiter und endet bei einem Zwischenprodukt, in dem der Kohlenwasserstoffest kovalent an das Enzym gebunden ist, während das bereits abgespaltene Chloratom sich in Gestalt eines Chloridions im aktiven Zentrum befindet.

Den dritten Schnappschuß erhält man schließlich aus einem Kristall, der zwei Tage lang bei Raumtemperatur und nur noch schwach saurem pH der Substratlösung ausgesetzt wurde. In diesem Fall ist der Kohlenwasserstoffest wieder von dem Enzym getrennt und hat das aktive Zentrum verlassen, während das Chloridion immer noch dort verweilt.

Einschließlich der Kristallstruktur des unbeladenen Enzyms gibt es nun also vier Momentaufnahmen, die den Mechanismus dieser enzymkatalysierten Reaktion recht umfassend beschreiben. Zwischen den zwei Reaktionswegen, die bisher zur Diskussion standen, ist nun eine eindeutige Entscheidung möglich, denn nur einer von beiden verläuft über ein kovalentes Zwischenprodukt. Ein Film aus vier Bildern mag manch einem recht kurz erscheinen – es ist aber zu bedenken, daß Enzymreaktionen unter günstigen Bedingungen in Millisekunden ablaufen und daß dieser Kurzfilm damit die Bildfrequenzen von Fernsehen und Kino um Größenordnungen übertrifft. Im Vergleich zu den bisherigen Möglichkeiten der klassischen Kristallographie stellt diese Bilderserie einen enormen Fortschritt dar. War man bisher auf die Beschreibung eines einzelnen Standbilds beschränkt, welches das Enzym sozusagen in der Sackgasse zeigte, wenn es gerade einen unverdaulichen Brocken, etwa einen dem Substrat ähnelnden Inhibitor geschluckt hatte, so bringt die Methode der Groninger Arbeitsgruppe nicht nur mehr Information, sondern bleibt dabei auch näher am natürlichen Reaktionsweg.

Und gegenüber der modernen Methode, die Synchrotronstrahlung und Laserblitze benötigt, hat dieses Verfahren den Vorteil, daß es so einfach ist wie das Ei des Kolumbus. Und mit genial-einfachen Ideen kann man auch 500 Jahre nach Kolumbus noch (Welt-) Bilder in Bewegung bringen.

### **Maßgeschneiderte Kristalle: Proteine erkennen Kristalloberflächen und steuern deren Wachstum**

Warum, so fragte sich ein 25-jähriger frischgebackener Pariser Chemiker im Jahre 1848, warum vermochte die Traubensäure, die sich doch chemisch ebenso verhielt wie Weinsäure, im Gegensatz zu dieser die Ebene des polarisierten Lichts nicht zu drehen? Er stellte eine übersätrigte Lösung des Ammoniumsalses der optisch inaktiven Traubensäure her und ließ sie über Nacht auf der Fensterbank seines Labors kristallisieren. Tags darauf entdeckte er unter dem Mikroskop zwei Arten von Kristallen, die sich – wie ein rechter und ein linker Handschuh – nicht zur Deckung bringen ließen, obwohl sie sonst dieselbe Geometrie hatten. Geduldig klaubte er mit einer Pinzette und dem Mikroskop die links- und rechtshändigen Kristalle auseinander. Er stellte von je einer Probe der beiden Kristallsorten eine Lösung her und maß deren optische Eigenschaften in einem Polarimeter. Die Kristalle, die exakt die Form von Weinsäurekristallen hatten, ergaben eine rechtsdrehende Lösung ebenso wie diese. Die zweite Lösung drehte das polarisierte Licht auch, und zwar um den gleichen Betrag in die entgegengesetzte Richtung. Damit hatte Louis Pasteur<sup>3</sup> aus der Chiralität (Händigkeit) der Kristalle die Chiralität der Moleküle abgeleitet – zu einer Zeit, als man über deren Aufbau praktisch nichts wußte.

Knapp einhalb Jahrhundert später sortierten Wissenschaftler wiederum Kristalle spiegelbildlicher Moleküle unter dem Mikroskop auseinander. Diesmal handelte es sich um ein Salz der Weinsäure, das Kalziumtartrat. Das scheint unmöglich, da die beiden Spiegelbildversionen

<sup>3</sup> Louis Pasteur (1827–1895), französischer Chemiker, wurde vor allem durch die Entdeckung bekannt, daß Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen ausgelöst werden. Er entwickelte Sterilisationsmaßnahmen (Pasteurisierung) und Schutzimpfungen und gründete das *Institut Pasteur* in Paris.

(Enantiomere) dieser Verbindung dieselbe, symmetrische, das heißt nicht chirale Kristallform bilden. Streicht man jedoch lebende Zellen, etwa kultivierte Nierenzellen des Krallenfroschs *Xenopus laevis* auf einer gemischten Kristallsuspension aus, so können diese die scheinbar gleichen Kristalle sehr wohl unterscheiden und siedeln sich in der ersten Phase des Experiments ausschließlich auf bestimmten Flächen der Kristalle der RR-Enantiomeren an. Mit dem an Pasteur angelehnten Sortierexperiment konnten Lia Addadi und ihre Mitarbeiter am Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) zeigen, daß der Zellenbewuchs in den ersten Stunden des Experiments ein zuverlässiges Kriterium für die Trennung der enantiomeren Formen ist. Doch für die Zellen, die sich schnell für die «richtigen» Kristalle entschieden hatten, zeigt sich bald (d.h. nach etwa 24 Stunden) die Kehrseite der Medaille – die Bindung ihrer Zelloberflächenmoleküle an die kristalline Oberfläche ist so fest und starr, daß die Zellen absterben. Auf den «falschen» Kristallen hingegen, welche die Pioniergeneration der Zellen verschmährt hatte, siedelt sich nun langsam eine kleinere, weniger fest gebundene Population von Zellen an, die an diesem Standort tagelang überleben kann.

Daß die Moleküle der Zelloberfläche, wie hier demonstriert, in identischen Kristallformen die Chiralität der die Kristalle aufbauenden Moleküle erkennen können, ist nur ein Beispiel für die vielfältigen und oft verblüffend spezifischen Wechselwirkungen zwischen biologischen Makromolekülen und Kristallen. In einer neueren Arbeit konnte Addadis Gruppe zeigen, daß Antikörper gegen verschiedene Salze der Harnsäure und gegen die dem Harnsäure-Ion verwandte, aber neutrale Verbindung Allopurinol jeweils die Kristallisation genau der Verbindung, durch deren Kristalle die Antikörperbildung angeregt wurde, im Stadium der Keimbildung (Nukleation) fördern (Abbildung 9). Es handelt sich hier also gewissermaßen um eine völlig neue Art von katalytischen Antikörpern, die aus der Oberflächenbeschaffenheit ausgereifter Kristalle die spezifischen Bindungsstellen entwickeln, welche die Bildung des vielleicht aus 20 oder 30 Einheiten bestehenden Kristallisationskeims katalysieren.

Was sich in dieser Beschreibung wie eine interessante biochemische Spielerei anhört, ist tatsächlich ein alltäglicher physiologischer Vorgang von immenser medizinischer Bedeutung: Die Symptome eines Gichtanfalls sind nämlich genau darauf zurückzuführen, daß sich Kristalle eines Harnsäuresalzes in einem Gelenk anreichern und vom Immunsystem – das heißt zunächst

von Antikörpern – als Fremdstoff erkannt werden (obwohl dieselbe Verbindung in gelöster Form keine Immunantwort auslöst), was eine Entzündung des Gelenks zur Folge hat. Die Ergebnisse von Addadis Arbeitsgruppe zeigen, daß die Auslösung der Entzündungsreaktion über die spezifische Erkennung durch Antikörper die wahrscheinlichste Erklärung ist. Sie legen außerdem nahe, daß (wie bei manchen anderen Krankheiten auch) das Immunsystem die Sache nur noch schlimmer macht, indem nämlich die gegen die Kristalle gerichteten Antikörper die Bildung weiterer Kristalle begünstigen und die Schwelle zu neuen Gichtanfällen herabsetzen. Und zum Verschwinden der Störenfriede kann die Immunantwort in diesem Fall nicht beitragen, da ihr Vernichtungssystem auf Makromoleküle und Zellen, nicht aber auf Kristalle eingerichtet ist.

Proteine, welche mit Kristallflächen wechselwirken und dadurch die Bildung von Kristallen fördern, hemmen oder in eine bestimmte Kristallform (Morphologie) zwingen, können aber auch nützlich sein, etwa in der Biomineralisation oder zum Kälteschutz. Zur Erlangung von Frostresistenz bedienen sich höhere Organismen zweier genau entgegengesetzter Mechanismen. Manche Lebewesen verhindern das Gefrieren ihrer Körperflüssigkeiten durch Zusatz eines Frostschutzmittels – meist einer inerten organischen Verbindung, die einfach den Gefrierpunkt der Mischung herabsetzt, manchmal aber auch mit Hilfe von Frostschutzproteinen, welche die Kristallisationskerne des Eises so binden, daß sie nicht weiterwachsen können. Genau das Gegenteil machen Eismukleationsproteine: Gewisse Frosch- und Schildkrötenarten in Kanada überstehen den arktischen Winter, indem sie sich «freiwillig» einfrieren. Wie kanadische Wissenschaftler herausfanden, können die Tiere nach bis zu zwei Wochen Dauerfrost – wobei zeitweise 65 Prozent ihres Wassergehalts als Eis vorliegt – unbeschadet wieder aufgetaut werden. Sie reichern ihr Blut zu diesem Zweck mit Eismukleationsproteinen an, die bewirken, daß die extrazelluläre flüssige Phase mit einem Schlag und ohne Schaden für die Zellen gefriert.

Auch Bakterien aus den Gattungen der *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und *Erwinia* scheiden Eismukleationsproteine aus, um die Eisbildung in ihrer direkten Umgebung zu steuern. *Pseudomonas syringae* wird deshalb zur Herstellung künstlichen Schnees verwendet, was allerdings aus Umweltschutzgründen umstritten ist, da diese Bakterien bei bestimmten Pflanzenkrankheiten auslösen können. Gängige Modellvorstellungen über die Funktionsweise der Eismukleationsproteine besagen, daß die in ihrer Sequenz aus

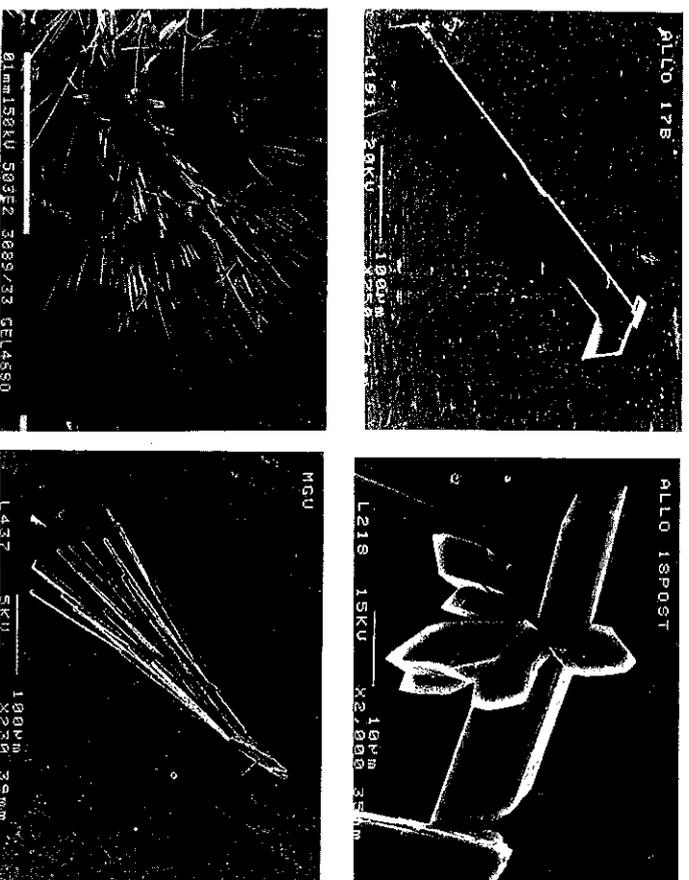
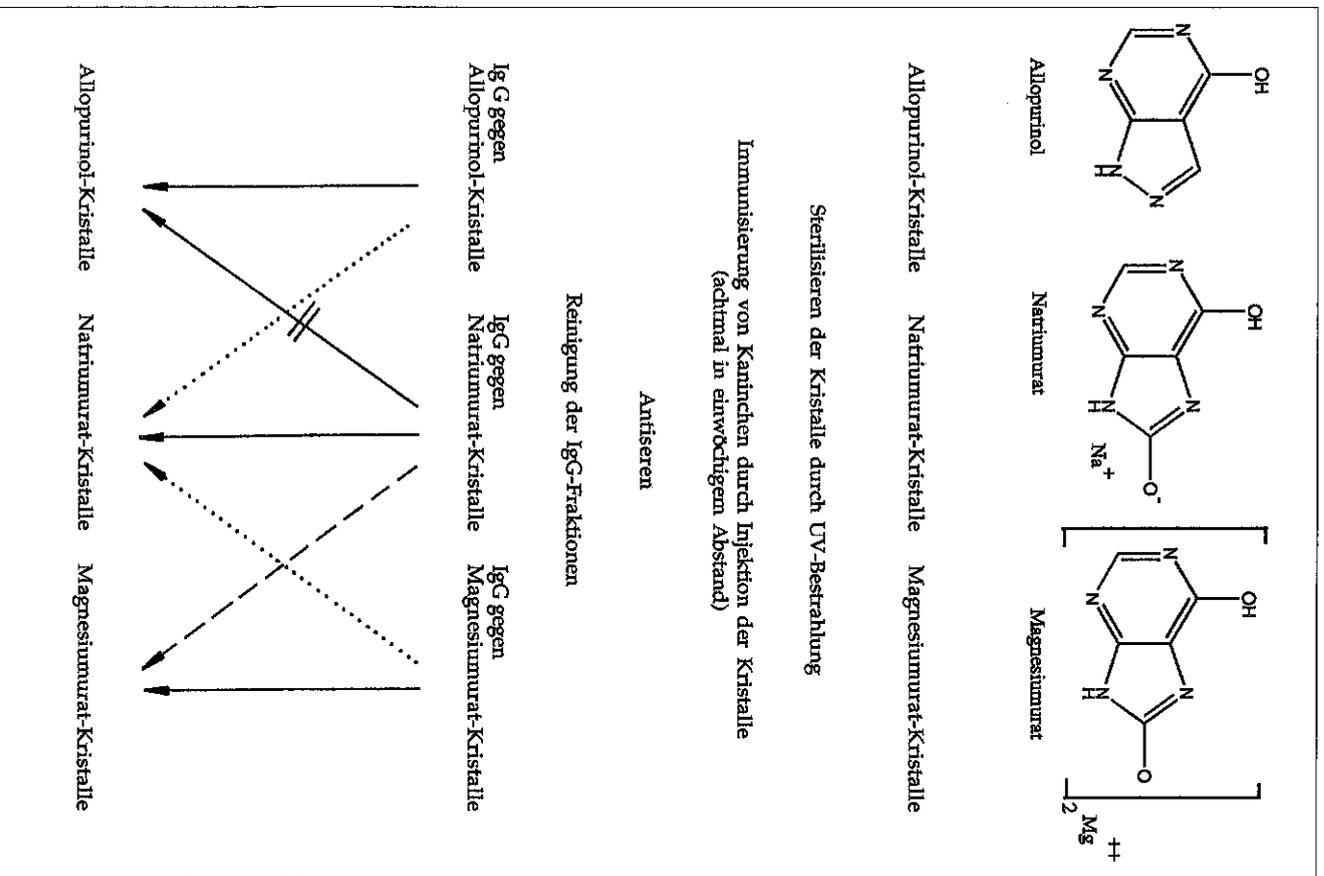


Abbildung 9:

< a) Schematische Darstellung des Experiments zur Überprüfung der Spezifität der gegen Harnsäure-Verbindungen und Analoge gerichteten Antikörper. Immunisiert man Kaninchen mit Kristallen der Verbindungen Allopurinol, Natriummurat oder Magnesiumurat, so erhält man Antiseren, aus denen man Antikörper (IgG) isolieren kann, die jeweils spezifisch die Kristallisation derjenigen Verbindung katalysieren, deren Kristalle die Immunantwort ausgelöst hatten (Pfeile). Kreuz-Experimente (unten) ergeben schwächere Förderung der Kristallisation (gestrichelte Pfeile) oder keinen signifikanten Effekt (gepunktete Pfeile), in einigen Fällen sogar eine Hemmung der Kristallbildung (durchgestrichene Pfeile).

b) Oben: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kristalle von Allopurinol (in Abwesenheit und in Anwesenheit des Antikörpers gezeichnet), Natriummurat und Magnesiumurat. Bei den letzteren beiden Verbindungen verändert die Gegenwart des spezifischen Antikörpers die Kristallform nicht.

zahllosen Wiederholungen relativ kurzer Aminosäureblöcke bestehenden Proteine eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ausbilden, die offenbar in ihrer Periodizität einer Kristallfläche des Eises entspricht.

Schließlich beruht der Vorgang der Biommineralisation, dem wir unsere Knochen und Zähne und zahlreiche Tiere wie Muschel, Schnecke, Krebse ihre Schalen verdanken, darauf, daß Biomoleküle die Bildung fester Phasen steuern können. Sie entscheiden, ob die Mineralisierung zu amorphem oder (mikro)kristallinen Phasen führt, und können auch die Kristallisation auslösen, zu bestimmten Kristallformen (Morphologien) lenken, die Kristallisation räumlich begrenzen und beenden. In vielen Fällen (allerdings nicht im Wirbeltierknochen) führt eine Klasse von Proteinen die Regie, deren Mitglieder ob ihrer exotischen Eigenschaften oft nicht als Proteine, sondern als «ungewöhnlich saure Makromoleküle» bezeichnet werden. Auffallend ist vor allem ihr extrem hoher Gehalt an sauren Aminosäureseitenketten – jede zweite bis dritte Aminosäure in der Sequenz ist Asparaginsäure – sowie eine große Zahl von Zucker- und Phosphorsäurebestandteilen, die an bestimmte Aminosäuren nach der Proteinbiosynthese angeknüpft werden. Zum Beispiel kann der Anteil der phosphorylierten Aminosäure Phosphoserin in einem solchen Molekül bis zu 50 Prozent betragen. All diese Eigenschaften bewirken, daß diese Proteine mit herkömmlichen Reinigungs- und Charakterisierungsmethoden nur schwer zu fassen sind. Oft lassen sich nicht einmal die Molekulargewichte mit hinreichender Genauigkeit bestimmen. Vermutlich können sie ähnlich wie die Eisnukleationsproteine ausgedehnte  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen bilden. Obwohl man im Reagenzglas nachweisen kann, daß die Anwesenheit dieser Moleküle die Kristallisation der Mineralstoffe, die etwa Muschel- oder Eierschalen bilden, beeinflußt und zu Materialien führt, die oft den natürlichen verblüffend ähneln, ist der Mechanismus ihrer Einwirkung in der lebenden Zelle umstritten. Denkbar wäre, daß die sauren Proteine in Lösung und/oder an eine Membran gebunden die Keimbildung, Orientierung der Keime und/oder das Wachstum der Kristalle beeinflussen.

In vielen Fällen – etwa bei den stets in derselben Richtung spiralig gewundenen Schneckenhäusern – führt die Steuerung der Kristallisation durch chirale Biomoleküle dazu, daß das resultierende makroskopische Objekt ebenso wie Pasteurs Kristalle der Traubensäure eine Händigkeit aufweist, obwohl die Bausteine (Kalziumphosphat) in diesem Fall achiral sind.

## Vom Gen zum Protein

Nachdem wir uns nun von der Nützlichkeit der Proteine überzeugen haben, bleibt die Frage: Wie macht man ein Protein? Wie macht die Zelle ihre Proteine? Man ahnt es fast – mit Hilfe anderer Proteine! Und wie kann man ähnlich wirksame Nanomaschinen für nichtbiologische Systeme herstellen? In der Zelle ist der Weg festgelegt: Vom Bauplan (DNA) zur Boten-RNA, zur unstrukturierten Aminosäurekette, zum gefalteten Protein und schließlich, nach Ablauf des Verfallsdatums, zum Abbau. Entlang dieses Weges finden sich viele hochaktuelle Forschungsgebiete, vom Genomprojekt über die Faltungshelfermoleküle bis zum «Proteasom». Deshalb wollen wir dem Lebensweg eines Proteins folgen und dabei auch einige kleine Abstrecher zu aktuellen Forschungsprojekten machen. Auf allen Stationen werden uns wiederum Proteine begegnen, die als Polymerisationskatalysatoren, Faltungshelfer und als Zerstörungsmaschinen tätig sind. Doch zunächst wollen wir einen Blick in die Baupläne werfen.

### Die Sprache der Gene: Methoden der Linguistik helfen bei der Entschlüsselung der Erbsubstanz

Victor F., Student der Naturphilosophie zu Genf, versuchte es mit Brachialmethoden. Knochen aus dem Schlachthaus und dem Sezierzimmer waren das Baumaterial, aus dem er versuchte, einen Menschen zu fabrizieren. Das Ergebnis war mehr ein Monster als ein Mensch und brachte am Ende seinen Schöpfer ums Leben und die Zunft der Wissenschaftler nachhaltig in Verfall.

Da Mary Shelleys Roman *Frankenstein* 1816 erschien, konnte ihre Kreatur noch nicht wissen, daß der Bauplan des Menschen, der festlegt, wie sich eine befruchtete Eizelle zu einem hochkomplexen und in der Regel nicht monströsen Lebewesen entwickelt, in jedem einzelnen Vertreter der Spezies in Milliardenauflage vervielfältigt wird. Jede Zelle enthält in ihrem Kern eine doppelte Abschrift der mindestens 30000 Gene, die alle unsere erblichen Eigenschaften bestimmen, sichtbare, wie Augenfarbe und abstrahende Ohren, ebenso wie unsichtbare, etwa Gestalt und Funktion der den Stoffwechsel regulierenden Enzyme. HUGO (Human Genome Project) ist ein weltweites Forschungsprojekt, das 1988 ins Leben gerufen wurde, um diesen Plan

zu entschlüsseln. Anstatt fortwährend bestimmte Gene, etwa für Erbkrankheiten, Krebsanfälligkeit etc., wie Nadeln im Heuhaufen zu suchen, hat man sich vorgenommen, den Heuhaufen Strohhalme für Strohhalme auseinanderzusortieren und zu beschreiben. Das Unternehmen, das auch aus ethischen Gründen umstritten ist, scheint auf den ersten Blick aussichtslos – mit den Techniken von 1990 wären dafür mehr als 100000 Forscherjahre notwendig.

Diesem Problem versuchen die Genforscher durch die Entwicklung effizienterer und weitestgehend automatisierter Methoden zur Bestimmung der Abfolge (Sequenz) der Bausteine des Erbmateri als DNA zu begegnen. Doch selbst wenn man die Methoden und Arbeitskräfte zur Sequenzierung aller menschlichen Gene verfügbar hätte, stellte sich sofort ein weiteres schweres Problem: Die Gene verteilen sich wiederum auf einem noch gigantischeren Heuhaufen aus scheinbar nichtssagenden DNA-Abschnitten, und man würde nur zu gerne, wie man die biologisch relevanten DNA-Abschnitte schnell und einfach von den sie umgebenden «sinnlosen» Bereichen unterscheiden könnte. Dafür könnte sich ein ungewöhnlich interdisziplinärer Ansatz als nützlich erweisen, über den Graziano Pesole und Mitarbeiter von der Universität Bari (Italien) im Jahre 1994 berichteten. Statistische Methoden der Linguistik sollen helfen, diejenigen Sequenzabschnitte ausfindig zu machen, die eine «Botschaft» haben. Weiterhin könnten sie auch dazu beitragen, diese Botschaften zu entziffern und in Beziehung zu verwandten Sequenzen zu setzen.

Parallelen zwischen der genetischen «Sprache» und den Sprachen der Menschen sind zahlreich – nicht umsonst verwenden Genetiker und Biochemiker viele aus dem Bereich der Sprache übernommene Begriffe. Sie sagen etwa, daß der genetische Code die *Übersetzung* (Translation) zwischen Nukleinsäuren und Proteinen festlegt. Dabei besteht die Sprache der Gene nur aus vier Buchstaben. Die Wörter (Codons) der Genetik enthalten jeweils drei Buchstaben, deren Gruppierung durch den Leserahmen bestimmt wird. Prinzipiell könnte eine Reihe aus  $n$  Nukleinsäurebausteinen (Nukleotiden)  $4^n$  mögliche «Sätze» bilden. Schon für kurze DNA-Abschnitte steigt diese Zahl schnell ins Astronomische. Ein typisches Startsignal für die Transkription eines Gens in eine Boten-RNA enthält sieben Bausteine – macht 16384 Variationsmöglichkeiten. Daraus, daß nur sehr wenige dieser Möglichkeiten in der Natur genutzt werden, schließt man, daß es so etwas wie eine Grammatik der DNA geben muß, der es allerdings an Interpunktion

mangelt sowie an der Möglichkeit, sprachliche Umsetzung durch Zwischenräume zu strukturieren. Auch in ihrer Nicht-Eindeutigkeit ähnelt die genetische eher der gesprochenen als der geschriebenen Sprache.

Jenseits dieser Ebene der anschaulichen Ähnlichkeiten zwischen genetischer und menschlicher Sprache sind die linguistisch-statistischen Methoden jedoch äußerst abstrakt und können nur durch einen Wust von Gleichungen beschrieben werden. Genlinguisten analysieren zum Beispiel, wie sich eine gegebene Abfolge von DNA-Nukleotiden in kürzere Wörter zerlegen läßt. Da sie aber nicht von vornherein wissen, ob der betrachtete DNA-Abschnitt einen Sinn ergibt, müssen sie alle möglichen Unterteilungen betrachten und statistisch auswerten. Sie untersuchen etwa die linguistische Homogenität eines «genetischen Textes», den sie in «Markowsche Ketten» zergliedern, oder beschreiben die «Komplexität» einer gegebenen Sequenz, indem sie sich wiederholende Motive durch einfache Abkürzungen ersetzen.

Auf diesen Vorgehensweisen bauen sie dann komplizierte Algorithmen (Rechenvorschriften) auf, die zur Beschreibung genetischer Sequenzen und zur Prognose ihrer biologischen Relevanz verwendet werden können. Diese Algorithmen ähneln in gewisser Weise jenen, die Evolutionsforscher zum Auffinden von Verwandtschaftsgraden ersannen. Kein Wunder, schließlich sind unsere Sprachen ja auch, ebenso wie der genetische Code, ein Produkt der Evolution.

### **Fünf Minuten Frist für einen lebenswichtigen Auftrag: Das kurze Leben eines Insulinmoleküls**

Der Bauplan des Lebens liegt in dem Erbmateri als DNA, aber die Bausteine und Maschinenteile, mit deren Hilfe der Plan verwirklicht wird, sind andere Moleküle: Proteine, Kohlenhydrate, Fette. Die größte Vielfalt in ihren Eigenschaften weisen die Proteine auf, obwohl sie alle nach demselben Prinzipien als lange Kettenmoleküle aus denselben Bausteinen, den Aminosäuren, aufgebaut werden. Sie beschleunigen und kontrollieren als Enzyme die chemischen Reaktionen des Stoffwechsels, sie bilden Faserstrukturen, erkennen als Teile des Immunsystems Fremdstoffe und Krankheitserreger, sorgen für Bewegung im Muskel und für die Klarheit der Augenlinse. Ihre kleineren Verwandten, die Peptidhormone, bestehen aus weniger als 100 Aminosäurebausteinen und dienen der Übermittlung einfacher Infor-

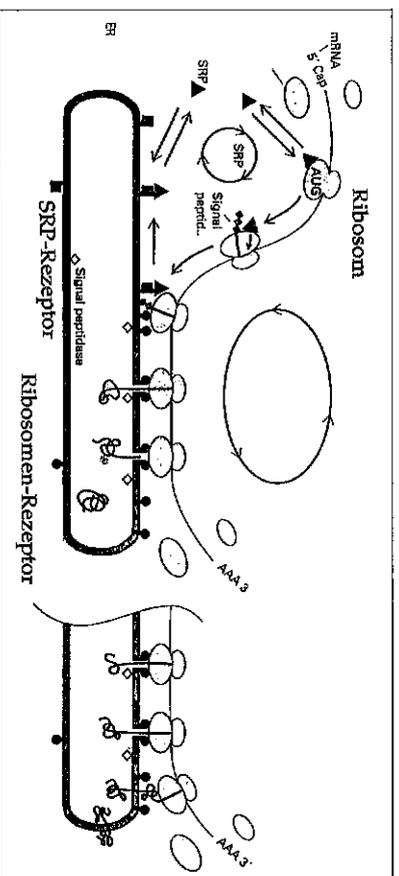


Abbildung 10: Weg eines Proteins von der Proteinbiosynthese in das endoplasmatische Retikulum bzw. zur Sekretion. Nach T. E. Creighton: *Proteins. Structures and molecular properties* (2. Auflage).

mationen zwischen verschiedenen Zellen. Je nach ihrer Funktion ist die Lebensdauer von Proteinen sehr unterschiedlich. Peptidhormone, die ein Signal übermitteln, müssen zerstört werden, sobald die Information nicht mehr «aktuell» ist. Die Proteine der Augenlinse von Wirbeltieren hingegen müssen ein Leben lang halten, sonst wird die Linse trübe. Eines der kurzlebigen Proteine ist zum Beispiel das Insulin, dessen aktive Form im Blut eine Lebenserwartung von etwa fünf Minuten hat. Es ist zu klein, um ein richtiges Protein zu sein, deshalb sagt man «Peptidhormon», aber die meisten allgemeinen Erkenntnisse aus der Biochemie der Proteine gelten für Insulin genauso wie für die Großen, die Enzyme, Antikörper und Strukturproteine.

Der Lebensweg des Insulins im Organismus (Abbildung 10) beginnt wie der aller Proteine mit der Proteinbiosynthese. Ort der Handlung ist in diesem Fall eine der sogenannten B-Zellen der Langerhansschen Inseln (daher der Name Insulin) in der Bauchspeicheldrüse. Die Maschine, die Proteine herstellt, ist das Ribosom, das seinerseits wieder aus mehr als 80 Proteinkomplexen und vier Nukleinsäuresträngen besteht.<sup>4</sup> Die Information, welcher Ami-

4 Diese Angaben gelten für Eukaryonten. Die wesentlich besser erforschten Bakterien-Ribosomen enthalten «nur» 55 Protein- und drei RNA-Moleküle.

nosäurebaustein wann eingebaut werden soll, liest das Ribosom von einem Nukleinsäuremolekül, der Boten-RNA, ab. Weil die Information dabei aus der Sprache der Nukleinsäuren in die Sprache der Proteine übersetzt wird, heißt der Vorgang der Proteinbiosynthese auch «Translation». Die intensive Erforschung der Proteinbiosynthese und der Ribosomenstruktur in den letzten 25 Jahren durch relativ wenige, hochspezialisierte Arbeitsgruppen hat zwar ein grobgerastertes Bild von Aufbau und Funktion der beteiligten Moleküle erbracht, viele Detailfragen sind aber immer noch unbeantwortet.

Das Ribosom synthetisiert ein Vorläufermolekül des Insulins, eine 103 Aminosäuren lange Kette. Da es pro Sekunde etwa fünf Aminosäuren einbauen kann, braucht es dafür nicht länger als 20 Sekunden. Die ersten 19 Bausteine sind eine sogenannte Signalsequenz. Das ist die Postleitzahl, die angibt, in welchen Bereich der Zelle das frisch hergestellte Protein verschickt werden soll. Kaum schaut die Signalsequenz aus dem Ribosom heraus, so tritt auch schon der Transportmechanismus der Zelle in Aktion. Ein freundlicher Helfer, das sogenannte Signalerkennungspartikel, erkennt die Signalsequenz, unterbricht die Translation für kurze Zeit und dirigiert das entstehende Protein mitsamt dem Ribosom zu der Membran eines Zellkompartiments, das auf den schwierigen Namen Endoplasmatisches Retikulum hört, aber meistens nur ER genannt wird. Das Ribosom wird an dieser Membran angelockt und die Proteinkette sofort beim Entstehen durch die Membran hindurchgefädelt. Auf der anderen Seite der Membran, also im ER, wird die Signalsequenz abgespalten, da sie nun nicht mehr benötigt wird. Adressierung und Transport von Proteinen sind in den achtziger Jahren intensiv erforscht worden und sind auch heute noch ein wichtiges Thema der aktuellen zellbiologischen Forschung. Die lange Kette aus nunmehr 84 Aminosäurebausteinen beginnt nun ohne fremde Hilfe, sich in ihre dreidimensionale Struktur zu falten, die das Protein später zur Ausübung seiner spezifischen Funktion brauchen wird. Ohne fremde Hilfe heißt, daß die ganze Information, die zur Ausbildung der räumlichen Struktur benötigt wird, in der Abfolge der Aminosäurebausteine enthalten ist. Aus der Membran des ER schnürt sich dann ein Kügelchen (Vesikel) ab, welches das Insulin weitertransportiert zum Golgi-Apparat, der Sortierstation der Zelle. Hier wird aus dem Molekül, das bis jetzt immer noch inaktiv war, ein 30 Aminosäuren langer Abschnitt entfernt. Dadurch wird das Insulin in zwei Teile – die A- und die B-Kette – zerteilt, die aber durch zwei Querverbindungen zusammengehalten werden. Diese Bindungen nennt man Disulfidbrücken, weil die entscheidende chemische Bin-

dung zwischen zwei Schwefelatomen geknüpft wird. Die Zusammensetzung des Insulins aus zwei disulfidverbrückten Ketten und die Abfolge der Aminosäurebausteine innerhalb der Ketten wurden von dem britischen Biochemiker Frederick Sanger<sup>5</sup> aufgeklärt, der für diese Leistung 1958 den Chemie-Nobelpreis erhielt.

Das aktive Insulin wird wiederum in kleine Membrankügelchen verpackt, die sogenannten Speichergranula. Bemerkenswert ist, daß der Blutzuckerspiegel – z. B. nach einer Mahlzeit – zu hoch ist, was bedeutet, daß Glucose (Traubenzucker) verwertet oder als Glykogen gespeichert werden muß, so verschmelzen diese Membrankügelchen mit der Zellmembran und setzen damit das Insulin frei, das so in den Blutkreislauf gelangt. Durch das Blut wird das Insulin zu seinem Ziel gebracht, einem Rezeptorprotein in der Membran einer Leberzelle. Allein die insulinbindende Untereinheit dieses Membranproteins ist mehr als zwanzigmal so groß wie das Insulin selbst. Hat der Rezeptor das Insulinmolekül gebunden, so bedeutet das für die Leberzellen Befehl, daß sie verstärkt Glucose aus dem Blut aufnehmen und verarbeiten muß. Der weitere Weg der Information im Inneren der Leberzelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Hat das Insulinmolekül seine Aufgabe erfüllt, so wird es in der Leber inaktiviert, indem die chemischen Bindungen zwischen A- und B-Kette gelöst werden. Die beiden getrennten Ketten können sich dann nicht wieder zu einem aktiven Molekül zusammenfinden, denn dazu fehlt ihnen die Hilfe des herausgeschrittenen Mittelteils. Sie werden dann von Enzymen, die auf die Vernichtung nicht mehr gebrauchter Proteine spezialisiert sind, abgebaut, das heißt in ihre Aminosäurebausteine zerlegt. Insulin übermittlelt also die Nachricht, daß im Blutkreislauf reichlich Nährstoff vorhanden ist, an die Leber, die hauptsächlich für Speicherung und Verwertung zuständig ist, sowie an andere Zellen zum Beispiel im Fett- und im Muskelgewebe. Kann die Bauchspeicheldrüse kein oder nicht genügend Insulin produzieren, so führt dies zum Krankheitsbild des Diabetes. Dieses ist hauptsächlich durch erhöhten Glucose- und Fettsäuregehalt im Blut charakterisiert. Die Nährstoffe können nicht verwertet werden, weil die Nachricht vom Nährstoffüberschuß nicht ankommt, und werden mit dem Harn ausgeschieden. Zu

5 Frederick Sanger (geb. 1918) erhielt zwei Nobelpreise für Pionierarbeiten in der Sequenzanalyse – 1958 für die der Proteine und 1980 für die der Nukleinsäuren.

Anfang dieses Jahrhunderts konnte Diabetikern praktisch nicht geholfen werden. Im Jahre 1921 gelang es Banting und Best<sup>6</sup>, Insulin zu isolieren und nachzuweisen, daß es bei diabetischen Hunden den Blutzuckerspiegel senkt. Seit 1923 kann Schweineinsulin, das sich nur in einem Aminosäurebaustein vom menschlichen Insulin unterscheidet, in großen Mengen gewonnen werden. Der Austausch der einen Aminosäure – die Umwandlung von Schweineinsulin in Humaneinsulin – ist auf biotechnologischem Wege seit 1983 möglich. Die Pläne der Firma Hoechst, mit Hilfe gentechnisch veränderter Bakterien Humaneinsulin zu produzieren, wurden 1989 wegen der unsicheren Rechtsgrundlage zum Betrieb gentechnischer Anlagen durch ein Gerichtsurteil vorläufig gestoppt, was zur beschleunigten Verabschiedung des Gentechnik-Gesetzes führte. Inzwischen ist jedoch die Anlage genehmigt und der Produktionsbeginn für 1997 geplant.

### **Kompaßnadeln auf dem Faltungsweg: Kernresonanzspektroskopie hilft, die Entstehung der Raumstruktur von Proteinen zu verstehen**

Ein richtiges Enzym, doppelt so groß wie Insulin und enorm geschichtsträchtig, ist das Protein, anhand dessen wir noch einen genaueren Blick auf die Proteinfaltung werfen wollen, jenen Prozeß also, bei dem sich eine lange, ungeordnet umherflatternde Peptidkette in ein wohlgeordnetes dreidimensionales, durch ein Netzwerk von Wechselwirkungen zusammengehaltenes Gebilde verwandelt. Bei Faltungsstudien kehrt man den Prozeß der Protein-denaturierung um, wie er zum Beispiel auftritt, wenn wir ein Ei kochen. Max Perutz<sup>7</sup> nannte den Vorgang scherzhaft «unboiling an egg» – ein Ei entkochen. Mit solchen Rückfaltungsexperimenten versucht man, die Wege, auf denen aus der eindimensionalen Information der Aminosäuresequenz die dreidimensionale Struktur entsteht, herauszufinden. Diese «zweite Hälfte

6 Sir Frederick Grant Banting (1891–1941) erhielt 1923 den Nobelpreis für Medizin. Charles Herbert Best (1899–1978) war Professor in Toronto.

7 Max Perutz (geb. 1914) gründete das Laboratorium für Molekulare Biologie in Cambridge, England, das er bis 1979 leitete. Für die erste Röntgenstrukturanalyse eines Proteins (Hämoglobin) erhielt er 1962 den Nobelpreis für Chemie.

des genetischen Codes» ist nämlich bis heute ein Rätsel geblieben. Und angesichts der Tatsache, daß man heute nahezu beliebige Aminosäuresequenzen in beliebigen Mengen von Bakterien erzeugen lassen kann, ist der Umstand, daß man nicht vorhersehen kann, ob eine neu erfundene Sequenz eine definierte dreidimensionale Struktur annimmt – und wenn ja, welche –, ein erhebliches Ärgernis. Zunächst wollen wir, in diesem und dem folgenden Kapitel, die Faltung im Reagenzglas («in vitro») betrachten, bevor wir uns in den darauffolgenden Kapiteln in den Dschungel der Faltung in der Zelle («in vivo») vorwagen.

Unser Modellprotein wurde im Jahre 1922 von Alexander Fleming<sup>8</sup> entdeckt, der sechs Jahre später mit der Entdeckung des Penicillins zu Weltruhm und 1945 zu dem Nobelpreis für Medizin kommen sollte. Fleming hatte im wahrsten Sinne des Wortes den richtigen Riecher, denn ein Tropfen aus seiner Nase, der die Bakterien auf einer Agarplatte angriff, verhalf ihm zu der Erkenntnis, daß menschliche Körpersekrete (z. B. Tränen, Nasenschleim) ein Enzym enthalten, das für viele Bakterien tödlich ist. Der ersten natürlichen Substanz mit dieser (vor der Entdeckung des Penicillin) unerhörten Eigenschaft gab Fleming den Namen Lysozym (ein Enzym, das Bakterien lysiert, d. h. ihre Zellwände zerstört).

Lysozym, insbesondere in der Variante, die sich leicht aus Eiklar gewinnen läßt, gehört heute zu den Veteranen der Enzymologie; außerdem ist es das Standardsystem der Proteinkristallographie, und wir wissen über kaum ein Protein soviel wie über dieses. Solch ein solider Unterbau aus Daten und Fakten gibt Mut zum Erproben neuerer Techniken, und so wurde Lysozym wiederum zum Modellprotein erkoren, als die Arbeitsgruppe von Christopher M. Dobson an der Universität Oxford sich daran machte, mit Hilfe der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR, für engl. *nuclear magnetic resonance*) die Struktur des Proteins in Lösung zu bestimmen (im Gegensatz zu der Röntgenstrukturanalyse, welche lediglich die Struktur eines kristallisierten Moleküls ermitteln kann) und Details über den Weg zu ermitteln, auf dem es, von der entfalterten und ungeordneten Aminosäurekette ausgehend, diese Struktur erwirbt.

Die NMR-Spektroskopie beruht darauf, daß Radiowellen Atomkerne, die sich in einem starken Magnetfeld befinden, in einen höheren Energiezu-

<sup>8</sup> Alexander Fleming (1881–1955) war Professor in London.

stand versetzen können. (Die Elementarmagnete, die sich normalerweise in Richtung des Magnetfeldes orientieren, werden «ungeklappt», wie wenn man eine Kompaßnadel um 180 Grad dreht.) Da sich benachbarte Atomkerne in ihrem Verhalten gegenseitig beeinflussen, kann man aus NMR-Spektren auf die Abstände der Atome und damit auch auf die Struktur der Verbindung zurückschließen. Waren NMR-Untersuchungen zunächst nur auf kleine organische Moleküle beschränkt, so konnten in den achtziger Jahren mehrdimensionale NMR-Techniken entwickelt werden, deren höhere Auflösung auch die Untersuchung kleinerer Proteine mit bis zu 200 Aminosäurebausteinen ermöglicht. So konnten etwa von den sogenannten Amidprotonen (das sind die Wasserstoffatome, die direkt an ein Stickstoffatom im Rückgrat der Proteinkette gebunden sind; es gibt davon in der Regel eins pro Aminosäurebaustein) des Lysozyms sämtliche zugehörigen NMR-Signale identifiziert werden. Damit verfügt man über eine Methode, mit der man Veränderungen in der direkten Umgebung jeder einzelnen der 126 Aminosäuren des Proteins beobachten kann.

Aufgrund der mit den modernen NMR-Techniken gegebenen günstigen Voraussetzung konnten die Wissenschaftler überraschende Erkenntnisse über den Faltungsmechanismus des Lysozyms gewinnen. Zwar kann man die schnellen Faltungsprozesse mit NMR nicht in Echtzeit verfolgen, aber man kann für verschiedene kurze Zeitintervalle während der Faltung den Austausch von Wasserstoffatomen gegen das schwere Wasserstoffisotop Deuterium ermöglichen. Rund die Hälfte der Amidprotonen sind im gefalteten Zustand gegen diesen Austausch geschützt, im entfalterten jedoch nicht. Nach Abschluß der Rückfaltung kann man also per NMR untersuchen, an welcher Stelle des Proteins dieser Schutzeffekt zu welchem Zeitpunkt eingetreten ist.

Auf diese Weise fand man heraus, daß verschiedene Bereiche des Proteins verschieden schnell falten, außerdem wählte ein Teil der Moleküle einen anderen Faltungsweg als der Rest. Diese Ergebnisse brachten das sogenannte Zwei-Zustands-Modell zu Fall, das einen einfachen direkten Weg zwischen völlig strukturierterm (gefaltetem) und völlig unstrukturierterm (entfalteterm) Lysozym vorsah.

Auch über die Struktur des Lysozyms bringt die NMR-Technik neue Erkenntnisse. Zwar gibt es bereits Dutzende von Kristallstrukturen von Lysozym – gemessen bei verschiedenen Temperaturen, Pufferbedingungen, Salzkonzentrationen, bei Wassermangel und unter hohem Druck, mit verschiedenen Inhibitormolekülen etc. Doch der entscheidende Vorteil der

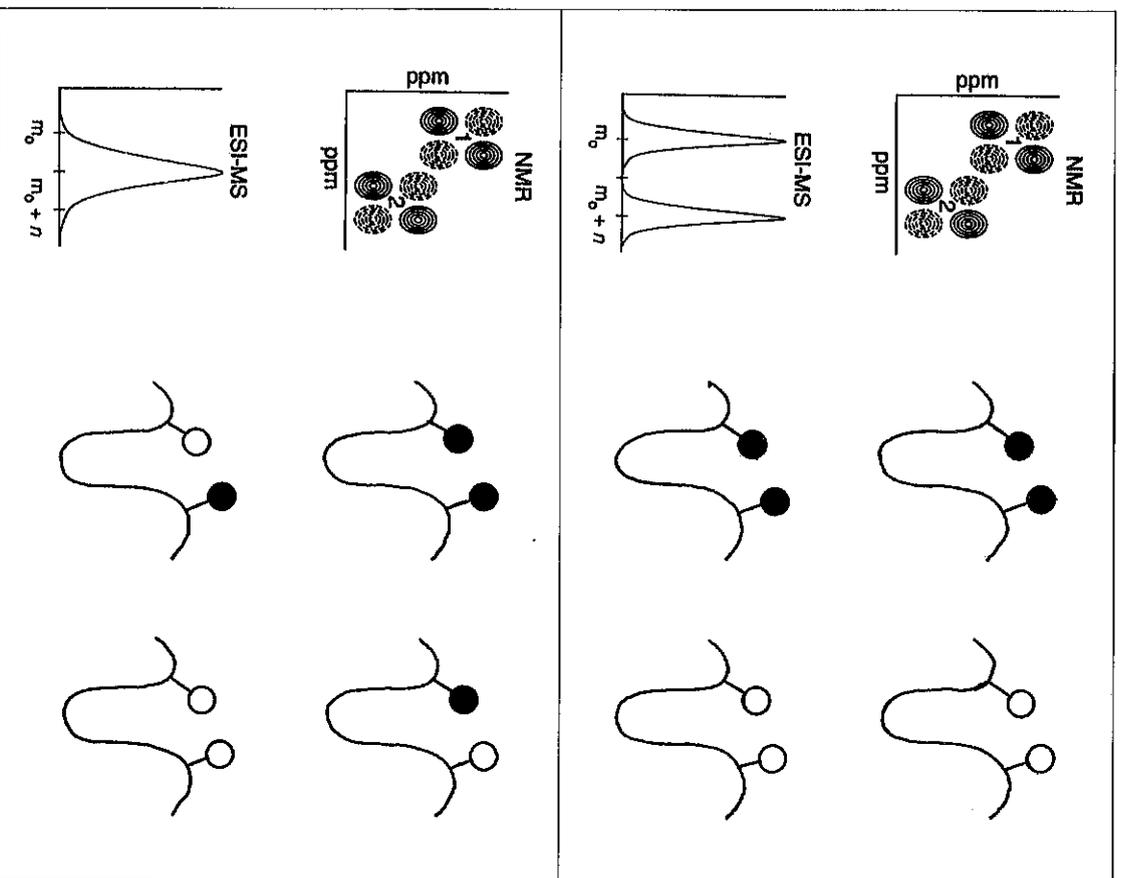


Abbildung 11: Die Untersuchung des Wasserstoff-Isotopenaustauschs mittels NMR und Massenspektrometrie ergibt komplementäre Informationen. Massenspektrometrie ist zwar nicht ortsspezifisch, kann also nicht zwischen den einzelnen Amidprotonen eines Moleküls unterscheiden. Das hier gezeigte Problem, zwischen verschiedenen Populationsverteilungen zu unterscheiden, die im statistischen Mittel denselben Deuterierungsgrad besitzen, ist aber nur mit Massenspektrometrie, nicht mit NMR zu lösen.

NMR-Analyse ist der, daß man das Protein nicht kristallisieren muß, da es in der gelösten Form untersucht werden kann, in der es ja schließlich auch in der Zelle und bei biochemischen Untersuchungen im Reagenzglas normalerweise vorliegt. Bei der Röntgenkristallographie bleibt immer die Ungewißheit, ob die dreidimensionale Struktur des kristallisierten Proteins auch tatsächlich mit der Struktur in Lösung übereinstimmt.

Die 1993 vorgelegte NMR-Struktur ist in der Anordnung des Rückgrats mit den Kristallstrukturen im wesentlichen identisch. Leichte Unterschiede finden sich in der Anordnung und Beweglichkeit einiger Seitenketten, insbesondere an der Oberfläche des Proteins. Im großen und ganzen jedoch ist mit dieser Untersuchung bewiesen, daß im Fall von Lysozym die Proteinstruktur im Kristall und in Lösung übereinstimmen.

Doch das ist noch längst nicht alles, was man von diesem klassischen Enzym über Faltung und Strukturen von Proteinen lernen kann. Dobson setzt auf die Verwendung neuer, möglichst komplementärer Methoden. In einer neueren Arbeit seiner Gruppe wird zum Beispiel gezeigt, wie sich die Elektrospray-Massenspektrometrie in Faltungsuntersuchungen nach der oben erwähnten Wasserstoff-Deuterium-Austauschmethode in geradezu idealer Weise mit der NMR-Spektroskopie ergänzt. Wo die letztere Methode einen Mittelwert liefert, gibt die erstere die Verteilung an, aus der der Mittelwert entsteht (Abbildung 11). Weitere Ergänzungsmethoden entstammen dem Arsenal spektroskopischer Verfahren sowie der Peptidchemie, die es erlaubt, kurze Segmente eines Proteins, etwa des Lysozyms, zu synthetisieren und damit die frühen Schritte seiner Faltung zu studieren. Lysozym ist auch für solche Untersuchungen ein ideales Modell, weil hier in einem relativ kleinen Protein alle gängigen Strukturmodule enthalten sind.

Alexander Fleming sagte seinerzeit: «We shall hear more about lysozyme» – über Lysozym werden wir noch einiges hören. Ein klassischer Fall von Understatement.

## Öl in Wasser: Die Rolle der hydrophoben Wechselwirkung in der Diskussion

Obwohl Entfaltung- und Rückfaltungsübergänge an einfachen Modellproteinen wie Lysozym oder Ribonuklease leicht auszuführen sind,

herrscht über die Rolle der einzelnen Kräfte und Wechselwirkungen immer noch keine Einigkeit. Besonders umstritten ist die Rolle der hydrophoben Wechselwirkung, jener Zusammenlagerungstendenz der wassermeidenden Molekülteile, die daraus resultiert, daß diese ihre Kontakte mit dem wäßrigen Lösungsmittel so weit als möglich reduzieren.

Wie ein Öltröpfchen, so stellte es sich Walter Kauzmann<sup>9</sup> im Jahre 1959 vor, sollte das Innere eines Proteinmoleküls aufgebaut sein. Die hydrophoben (wassermeidenden) Aminosäurebausteine werden bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur bevorzugt innen eingebaut und bilden zusammen den «hydrophoben Kern» des Moleküls (Abbildung 12). Die Stabilität dieser Anordnung führte Kauzmann auf unvorreitliche Nebenwirkungen zurück, die auftraten, wenn man die hydrophoben Seitenketten voneinander trennt und der wäßrigen Umgebung aussetzt. Wassermoleküle sind in der Nähe dieser wasserscheuen Gruppen dichter und mit einem höheren Grad von Ordnung gepackt, als wenn sie unter sich bleiben. Kauzmanns Annahme, daß diese Besonderheit der Lösungsmittelestruktur in der Umgebung hydrophober Molekülteile, die sogenannte hydrophobe Solvation, letztendlich die Triebkraft für die Zusammenlagerung im hydrophoben Kern und damit für die Proteinfaltung sei, war dreißig Jahre lang ein Dogma der Biochemie.

Während die Vorstellung, daß der hydrophobe Kern einem Öltröpfchen gleiche, schon lange aus der Mode gekommen ist, begann das Dogma von der strukturfördernden Wirkung der Wasserordnung erst zu bröckeln, als Peter Privalov (Moskau) und Stan Gill (Boulder, Colorado) 1988 aufgrund von komplizierten thermodynamischen Überlegungen und Modellexperimenten an einfachen wassermeidenden Molekülen verkündeten, das genaue Gegenteil sei wahr: Die höhere Wasserordnung begünstige die Entfaltung der dreidimensionalen Proteinstruktur, und lediglich die schwachen Anziehungskräfte zwischen Atomen (van-der-Waals-Wechselwirkung) halten die Struktur trotzdem zusammen. Entscheidend sei mithin die Anordnung, in der möglichst viele schwache Wechselwirkungen ausgebildet werden können.

In die seither entbrannte Kontroverse platzte im Jahre 1993 ein sicherlich für beide Seiten überraschender Befund der Arbeitsgruppe um Philip A. Evans in Cambridge: Es geht auch ohne den Ordnungseffekt. Wie die

9 Walter Kauzmann ist emeritierter Chemieprofessor an der Princeton University.

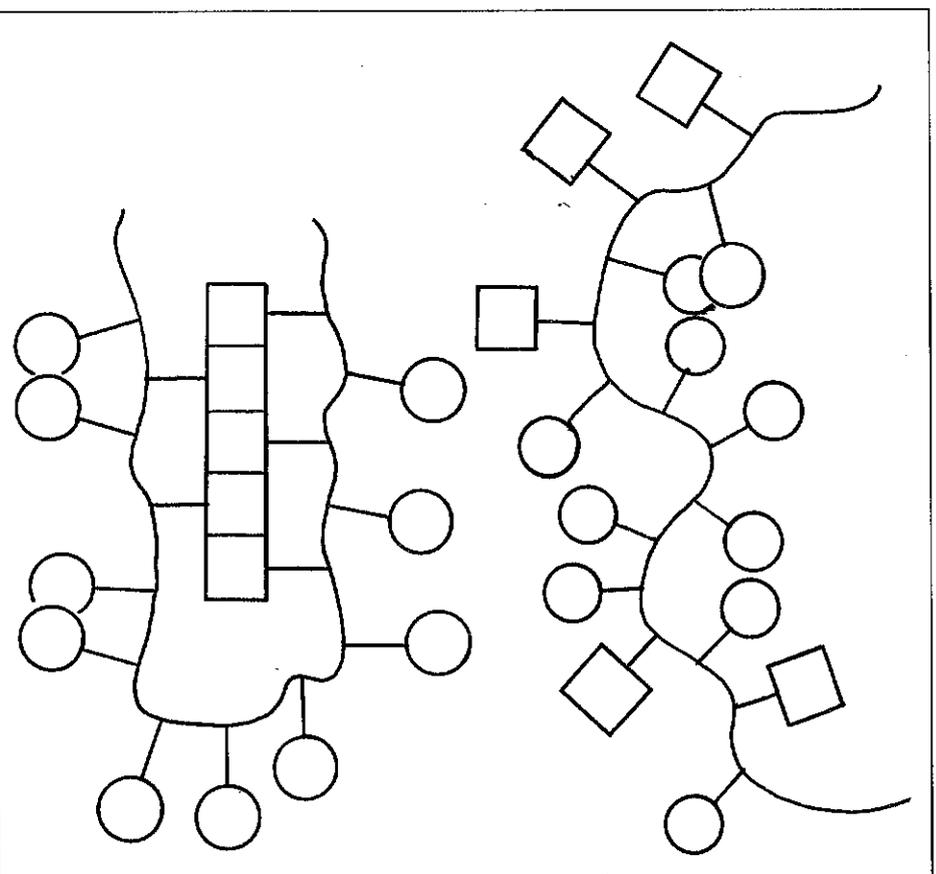


Abbildung 12: Die Zusammenlagerung der wassermeidenden Aminosäuren (z.B. Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, hier durch Quadrate symbolisiert, während Kreise wasserliebende Aminosäurereste darstellen) im Innern der Proteinstruktur gilt als Triebkraft der Proteinfaltung.

Arbeitsgruppe herausfand, konnte ein Protein seine dreidimensionale Struktur in einem Lösungsmittelgemisch (ca. 30 Prozent Methanol in Wasser) bewahren, in dem der Effekt der hydrophoben Solvation nachweislich nicht vorhanden ist. Die Autoren betonen, daß ihre Ergebnisse den Streit,

ob die geordnete Lösungsmittelschale nun der Faltung nutzt oder schadet, nicht entscheiden können. Fest steht nur, daß dieser Effekt entbehrlich ist und daß man nicht darum herumkommen wird, sich die Beiträge anderer Wechselwirkungen und Ordnungsprozesse bei der Strukturbildung sehr genau anzuschauen, wenn man die Grundlage der Proteinstabilität eines Tages verstehen will. Ein einfaches Bild als Nachfolger des Öltröpfchen-Modells ist jedenfalls nicht in Sicht.

### **Gelutschutz für heranwachsende Proteine: Molekulare Anstandsdamen verhindern gefährliche Liebschaften**

In den siebziger Jahren, als Faltungsuntersuchungen im Reagenzglas en vogue waren, nahm man ganz selbstverständlich an, daß die Proteine, die sich ja offenbar ohne äußere Hilfe falten können, dies auch in der Zelle tun. Erst Ende der achtziger Jahre fand man heraus, daß dies keineswegs der Fall ist, und ein beinahe ausgestorbenes Wort war plötzlich wieder in aller Munde.

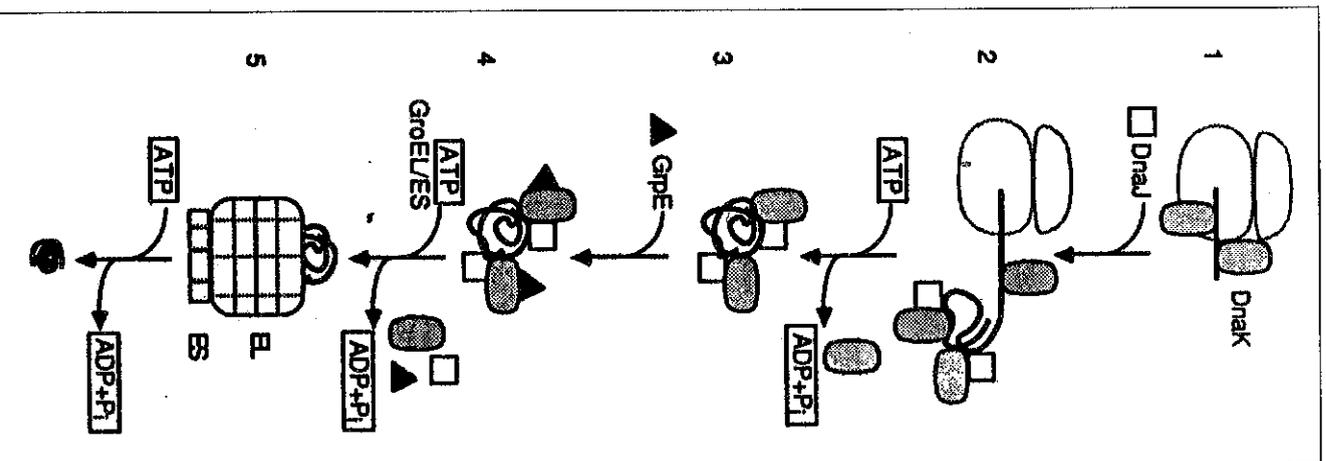
«Eine Person (meist ehrwürdigen Alters), die ein Mädchen oder eine junge Frau aus Rücksicht auf die Schicklichkeit begleitet», so weiß der *Peit Robert*, bezeichnet man im Französischen seit 1690 mit einem Wort, das ursprünglich ein Kleidungsstück, nämlich eine Kragenkapuze oder Haube benannte: *Chaperon*<sup>10</sup>. Auch im Deutschen und Englischen kennt man dieses Wort für die Anstandsdamen, die in der guten alten Zeit darüber wachten, daß die Töchter aus gutem Hause keine unerwünschten Wechselwirkungen eingingen.

Ganz ähnlich stellt man sich auch die Funktionsweise einiger Proteine vor, die man in Anlehnung an diese altmodische Institution molekulare *Chaperone* nennt. Glaube man vor zwanzig Jahren, daß Proteine in der Zelle ihre «Reifezeit» – die Entwicklung von der ungeordneten Aminosäurekette zum funktionstüchtigen Endprodukt – ebenso selbständig durchstreifen können, wie man das im Modellversuch im Reagenzglas nachvollziehen konnte, so sind in den letzten zehn Jahren geradezu Horden von Anstandsdamen aufgefunden worden, die den heranwachsenden Proteinen den rechten Weg weisen.

<sup>10</sup> Die ursprüngliche Bedeutung des Wortes ist in «Le petit Chaperon Rouge» – Rotkäppchen – erhalten geblieben.

Obwohl die allermeisten Proteine in stark verdünnter Lösung im Reagenzglas selbstständig zur gefalteten und biologisch aktiven Struktur finden, stellt sich die Situation in der Zelle schwieriger dar. Das Ribosom, die Proteinfabrik der Zelle, reiht die Aminosäuren zu einer Kette auf, die zwar eine definierte Abfolge (Sequenz), aber noch keine geordnete räumliche Struktur hat. Bindungsstellen, die später im Innern des ausgereiften Moleküls für Zusammenhalt sorgen sollen, sind noch offen zugänglich. Aufgrund der enorm hohen Konzentration an Proteinen, vor allem auch an frisch hergestellten und noch nicht ausgereiften Ketten, kann es leicht passieren, daß diese Bindungsstellen zuerst einem falschen Partner aus einem anderen Molekül begegnen und eine *Mésalliance* eingehen. So bilden sich dann Aggregate aus vielen ungefalteten Ketten, die aus der Lösung ausfallen und völlig unbrauchbar werden. Um das zu vermeiden, fängt ein erstes Schutzprotein, das nach dem zugehörigen Gen *Dnak* genannt wird, die wachsende Aminosäurekette schon ab, wenn sie sich aus dem Ausgangskanal des Ribosoms herauschiebt. (Es sei denn, der Beginn der Proteinkette enthält eine Signalsequenz, die anzeigt, daß es sich um ein «Exportprodukt» handelt, dann geht das Protein den Weg, den wir oben am Beispiel des Insulin verfolgt haben.) Den Weg, auf dem die Kette dann von einem *Chaperon* zum anderen weitergereicht wird, hat die Gruppe des von der Ludwig-Maximilians-Universität München an das Rockefeller-Forschungslaboratorium in New York übergewechselten Ulrich Hartl 1992 in einer vielbeachteten Studie aufgeklärt (Abbildung 13). Nach den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe erkennt *Dnak* die entstehende Polypeptidkette bereits, wenn sie noch zu kurz ist, um sich zu irgendwelchen Strukturen zu verknäulen. In der Phase des kompakten, aber noch nicht mit der endgültigen Struktur versehenen Proteinknäuels übernimmt ein ebenso unaussprechliches Protein namens *Dnaj* den Begleitschutz, wobei bereits ein Teil der *Dnak*-Moleküle freigesetzt wird. Sobald die Synthese der Kette abgeschlossen ist, gibt ein weiteres Protein, das jedoch nur mit den *Chaperonen*, nicht aber mit dem neu synthetisierten Protein wechselwirkt, das Signal zur letzten Übergabe der schutzbedürftigen Kette. Endstation auf dem Reifungsweg der löslichen Proteine, die ihre Funktion im Zytoplasma, dem wässrigen «Innenraum» der Bakterienzelle, ausüben, ist ein färbartiger Proteinkomplex, der aus zwei Ringen mit je sieben Einheiten besteht und *GroEL* genannt wird. Für dieses Faß gibt es noch einen Boden oder Deckel, bestehend aus sieben Einheiten des kleineren Proteins *GroES*. In Zellextrakten werden üblicherweise Parti-

Abbildung 13: Weg der von molekularen Chaperonen unterstützten Faltung eines neu synthetisierten Proteins in der Zelle. DnaK und DnaJ binden schon an die unfertige Polypeptidkette. GrpE ist an der Regulation der Übergabe an GroEL beteiligt. Nach Langer et al. (1992).



kel mit einem Deckel pro Faß (d.h. 14 Einheiten EL plus 7 Einheiten ES) gefunden, es wurde aber auch schon über «fußballförmige» Partikel mit zwei Deckeln berichtet. Dieser komplizierte Apparat stellt der Wissenschaft einige der schwierigsten Rätsel im Zusammenhang mit der Synthese und Reifung von Proteinen. Das ungefaltete Substratprotein wird auf jeden Fall an diesen Komplex (oder in seinem Innern?) gebunden und verläßt ihn schließlich, nach mehreren Zyklen aus Loslassen und erneutem Binden und einem enormen Energieverbrauch, als fertig gefaltetes Protein.

Die einzige eindeutig enzymatische Funktion des Komplexes besteht darin, daß GroEL während der Proteinfaltung, aber auch in Abwesenheit eines Substratproteins, die Energieträgersubstanz Adenosintriphosphat (ATP) abbaut, also Energie verbraucht, wobei offenbar jede einzelne Untereinheit ein aktives Zentrum besitzt, so daß 14 Moleküle ATP gleichzeitig umgesetzt werden können. Die «reine» ATPase-Aktivität – ohne Proteinfaltung – ist umfassend beschrieben worden (insbesondere von den Arbeitsgruppen von Tony Clarke in Bristol und George Lorimer bei DuPont, Wilmington) und gestaltet sich schon schwierig genug. Während in Abwesenheit des «Deckelproteins» GroES alles ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) umgesetzt wird, tritt in Gegenwart von GroES ein komplexer Regelmechanismus in Aktion. In dem vollständigen EL-ES-Komplex setzt bereits nach dem ersten Durchgang eine Art Produkthemmung ein, das gebildete ADP inaktiviert jeweils die Hälfte der 14 Einheiten. Diese zweite, halbaktive Phase wird schließlich durch eine völlige Inhibition beendet, deren Eintritt von den Konzentrationen an ATP und Kaliumionen abhängt.

Im Jahre 1993 wagte Hartis Arbeitsgruppe den Versuch, einen Reaktionszyklus für GroEL aufzustellen, der alle Komponenten (EL, ES, Substrat, ATP) einschließt. Das Modell beruht hauptsächlich auf Bindungsstudien, in denen die Reaktionsgemische in verschiedenen Stadien durch Gelfiltration getrennt wurden. Dieses chromatographische Verfahren stellt im wesentlichen ein Sortieren nach Molekülgröße dar – gemeinsames Auftreten verschiedener großer Komponenten läßt dabei auf Bindung schließen. Zeitweise Freisetzung von Liganden kann auch getestet werden, indem man zwei Populationen GroEL einsetzt, von denen eine zum Beispiel GroES und Substratprotein 1, die andere nur Substratprotein 2 enthält. Ist die Reaktivierung des Substratproteins 2 von GroES abhängig, so kann sie als Test für die Freisetzung des Liganden aus dem Komplex mit Substratprotein 1 verwendet werden. Ferner wurde ein schonender Proteaseverdau verwenden

der, um den von GroES abgewandten EL-Ring zu markieren – der an ES gebundene Ring ist vor der Protease geschützt.

Mit diesen und ähnlichen Methoden ergab sich folgender Ablauf der Ereignisse (Abbildung 14): Das ungefaltete Substratprotein wechselwirkt mit GroEL vermutlich über hydrophobe Gruppen. Diese sind in gefalteten Proteinen im Inneren für die Stabilität des «hydrophoben Kerns» der Proteinstruktur verantwortlich. Ihre Zugänglichkeit in ungefalteten Ketten führt zu unerwünschten intermolekularen Kontakten und damit zur Aggregation, der entgegenzuwirken genau die Aufgabe der molekularen Chaperone darstellt. Der Komplex, den das neu ankommende Substratprotein zunächst antrifft, wird höchstwahrscheinlich GroES und ADP enthalten. Bindung des Substrats verringert allerdings die Affinität für diese beiden Liganden, so daß sie zunächst entlassen werden. Statt des ADP wird nun wieder ATP gebunden. Die ATP-Konformation des Komplexes bindet ES auch in Anwesenheit des Substrats. Die Hydrolyse des ATP zu ADP löst die kurzzeitige Freigabe des Substrats aus: Dieses bleibt zwar in der Nähe oder sogar in dem Innenraum des Komplexes, erhält aber die Bewegungsfreiheit, die es zur Ausführung jener Reaktionen benötigt, die letztendlich zum korrekt gefalteten Zustand führen. Entsteht bei diesem Rearrangement ein fehlerfrei gefaltetes Protein, das keine hydrophoben Flecken mehr präsentiert, so wird dieses entlassen, und die Reaktion ist abgeschlossen. Sind hingegen noch bindungsfähige hydrophobe Stellen zugänglich, so wird das Substrat erneut an GroEL gebunden, Abspaltung von ADP und GroES führt uns wieder zum Zustand 1.

Der Komplex durchläuft also wiederholte Zyklen des Bindens und Entlassens von Substratprotein und GroES, gesteuert von der Hydrolyse des ATP. Der ADP-Zustand entläßt GroES und bindet das Substrat, der ATP-Zustand bindet ES und entläßt das Substrat, wobei ES die ATPase-Aktivität reguliert. Hard und seine Mitarbeiter gehen davon aus, daß die Hydrolyse des ATP die Freisetzung des Substrats auslöst. Unklar bleibt dann, wann und warum das Substrat wieder gebunden wird. Als Alternative wäre denkbar, daß die ATP-Hydrolyse den Timer für die Rückfaltungszeit des Substrats darstellt; sobald alle 14 gebundenen ATP-Moleküle umgesetzt sind, wird das Substrat wieder gebunden. Der Konformationsunterschied zwischen ATP- und ADP-Zustand ist immerhin so ausgeprägt, daß er im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden kann. Wie die Arbeitsgruppe von Helen Saibil am Birkbeck College in London herausfand, werden die

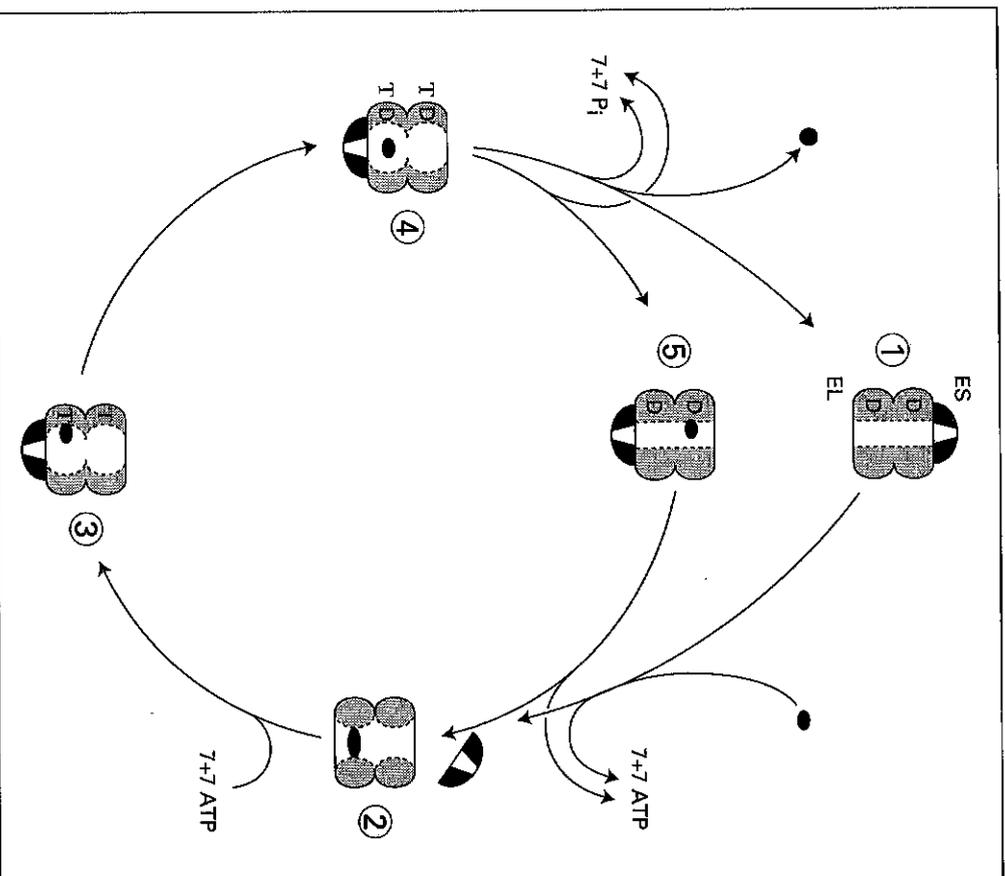


Abbildung 14: Reaktionszyklus für GroEL/ES. 1: ADP-Zustand, unbeladen. 2: Bindung des Substratproteins an GroEL. Im ADP-Zustand führt zur Freisetzung von GroES und ADP. 3: Nach Aufnahme von ATP kann auch GroES wieder gebunden werden. 4: Die Hydrolyse des ATP löst die Freisetzung des Substratproteins aus, das somit die Gelegenheit erhält, in geschützter Umgebung seine Faltung fortzusetzen. 5: Präsentiert das Protein nach diesem Schritt noch potentielle Bindungsstellen, so wird es wieder an die ADP-Form des GroE-Komplexes gebunden, was nach Freisetzung von ADP und GroES wiederum zu Zustand 2 führt. Sind keine hydrophoben Flecken mehr zugänglich, so wird das korrekt gefaltete funktionfähige Protein entlassen, der GroE-Komplex kehrt zum Zustand 1 zurück. Schema modifiziert nach Martin et al. (1993).

einzelnen Untereinheiten, bezogen auf die Symmetrieachse des Komplexes, um ca. 10 Grad gekippt.

Natürlich stellt dieser grobgezimmerte Reaktionszyklus nur einen Ausgangspunkt für Versuche zum tieferen Verständnis der Aktivität von GroEL dar. Das vorliegende Modell sagt uns noch nicht, ob die «Aktivität» des Chaperons sich tatsächlich auf Festhalten und Loslassen beschränkt oder ob darüber hinausgehende Wechselwirkung mit dem Substratprotein stattfindet. Derzeit ist der Anfinsen-Käfig eine populäre Modellvorstellung, benannt nach Christian B. Anfinsen<sup>11</sup>, dem Begründer der Proteinfaltungssurden im Reagenzglas ohne biologische Faktoren. Demnach stellt in der Zeit, in der das Substratprotein sich faltet, GroEL lediglich den geschützten Raum für diesen spontanen und autonomen Prozeß bereit und greift nicht im Sinne einer Katalyse oder Formvorgabe in den Vorgang ein. Auch die Annahme, daß GroEL hydrophobe Flecken erkennt, ist bisher nur eine Vermutung. Eine frühere Annahme, die Substraterkennung sei auf entstehende  $\alpha$ -Helices im Substratprotein angewiesen, konnte durch die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen GroEL und einem nur aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebauten Substratprotein widerlegt werden. Unbekannt ist auch, warum diese Reaktion soviel ATP verbraucht, ob das Substrat zwischen den beiden Ringen hin- und hergereicht wird und vieles mehr.

Dies war der Strand der Chaperon-Forschung bis Mitte 1994, der Ära vor der Kristallstruktur von GroEL. Den Beginn einer neuen Ära werden wir im folgenden Kapitel erleben.

### **Faß mit Fenstern: Erstmals ist die Struktur eines molekularen Chaperons in atomarer Auflösung bestimmt worden**

Eine Portion Glück hat manche wissenschaftliche Entdeckung begünstigt oder ermöglicht, und viele Wissenschaftler, darunter etwa Louis Pasteur und Alexander Fleming, verdanken ihren Ruhm der scharfsinnigen Interpretation einer zufällig gemachten Beobachtung. Manchmal zeigt der Zufall den Wissenschaftlern den Weg zu neuen Werten, von deren Existenz sie nichts ahnten, und manchmal nimmt Fortuna ihnen die Arbeit ab, aus einer

<sup>11</sup> Christian B. Anfinsen (1916–1995) erhielt 1972 den Nobelpreis für Chemie für die Aufklärung von Struktur und Funktion der Ribonuklease.

astronomischen Zahl von möglichen Versuchsbedingungen die einzig erfolgreiche herauszusuchen.

Ein hoffnungsloses Unternehmen der letzteren Art, das letztendlich mit Fortunas Hilfe gelang, ist die Strukturaufklärung des Chaperonin-Proteins GroEL, das als molekulare Anstandsdame anderen Proteinen bei der Faltung zur richtigen dreidimensionalen Struktur hilft und unerwünschte Nebenreaktionen abblockt. Mehrere Arbeitsgruppen in aller Welt haben versucht, von diesem Protein Kristalle zu züchten, die sich zur Röntgenstrukturanalyse eignen – doch die siebenfache Symmetrie der Doppelring-Struktur, die aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen bereits bekannt war, ist natürlich ein Alptraum für Kristallographen. Und für Strukturuntersuchungen mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) ist bereits eine einzelne der 14 Untereinheiten mit 57,2 Kilodalton Molekulargewicht um den Faktor 2 bis 3 zu groß.

Das Glück überraschte die Arbeitsgruppe von Arthur L. Horwich in Yale in Gestalt einer zufälligen Mutation zweier Aminosäuren, die sich bei dem Versuch einstellte, GroEL in *Escherichia coli* überzuexprimieren, das heißt, durch gentechnische Manipulation die Ausbeute an Protein pro Gramm Zellen zu erhöhen. Die Zufallsmutante, die in Funktionsstress von der normalen Version (Wildtyp) des Proteins nicht unterscheidbar ist, lieferte von allen untersuchten Varianten die besten Kristalle und die, mit denen dann die Strukturaufklärung gelang. (Da jede der 547 Aminosäuren in der Sequenz von GroEL durch 19 andere ersetzt werden kann, gibt es genau 10393 Möglichkeiten für Punktmutationen. Betrachtet man auch Mehrfachmutanten, so potenzieren sich die Möglichkeiten ins Astronomische.)

Ein glücklicher Umstand wollte auch, daß Horwichs Nachbar im Institut ein renommierter Proteinkristallograph, nämlich Paul B. Sigler ist, mit dem er gemeinsam den großen Coup landen konnte, den die Fachwelt im Oktober 1994 auf dem Titelblatt von *Nature* bestaunen durfte.

In Übereinstimmung mit den bisherigen, aus elektronenmikroskopischen und biochemischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen zeigt die Kristallstruktur ein faßartiges Gebilde aus zwei Ringen, die je sieben identische Einheiten (Monomere) enthalten. Auffälligstes Merkmal der nun erkennbaren Feinstruktur der Untereinheiten ist, daß jede von ihnen so stark sechsfach gekrümmt ist, daß zwischen den benachbarten Untereinheiten ein Loch bleibt (Abbildung 15). Diese Fenster, die an der engsten Stelle etwa

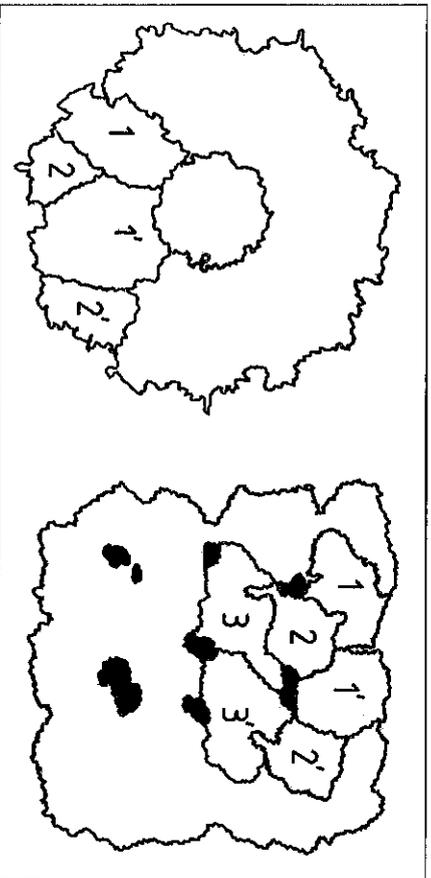


Abbildung 15: Umrisszeichnung eines raumfüllenden Modells der in atomarer Auflösung bestimmten Struktur des Chaperonproteins GroEL. Der aus zwei Ringen zu je sieben identischen Untereinheiten bestehende Komplex ist im linken Bild aus der Perspektive entlang der siebenfachen Symmetrieachse dargestellt. Im rechten Bild steht diese Achse senkrecht. Zwei der 14 Untereinheiten sind mit ihren je drei Domänen hervorgehoben: die am oberen Rand des Fasses liegende apikale Domäne (1, 1'), die Zwischen-Domäne (2, 2'), und die äquatoriale Domäne (3, 3'). Bezogen auf den oberen Ring, werden die seitlichen Fenster in der Struktur hauptsächlich von der jeweils rechts davon liegenden Untereinheit begrenzt. Die äquatoriale und die mittlere Domäne der jeweils linken Untereinheit haben nur einen kleinen Anreiß an der Fensterbildung. Im linken Bild ist der zylindrische Innenraum des Komplexes zu sehen, in dem vermutlich die Proteinfaltung stattfindet. Es ist allerdings noch nicht klar, inwieweit die im äquatorialen Bereich in die Mitte hineinragenden Kettenenden diesen Hohlraum unterteilen.

2 nm lang und 1 nm breit sind, können problemlos Wassermoleküle in das Innere des Fasses, wo man das gebundene Substratprotein vermutet, eintreten lassen. Auch die anhand von Mutationsexperimenten in der Sequenz lokalisierte Bindungsstelle für die Energieträgersubstanz ATP findet sich am Rande dieser Fenster. Bemerkenswert ist weiterhin, daß die beiden Enden des Aminosäurestrangs (Amino- und Carboxy-Terminus) einer jeden Untereinheit, die offenbar zu beweglich und ungeordnet sind, als daß man sie in der Kristallstruktur entdecken könnte, sich vermutlich in der Mitte des Fasses befinden. Die den Enden am nächsten stehenden, noch lokalisierten Aminosäuren jedenfalls sind alle in der äquatorialen Domäne zu finden und weisen eindeutig ins Innere. Möglicherweise bilden die 28 «losen

Enden» in der Mittelebene einfach ein großes Knäuel, das den Zusammenhalt der ganzen Struktur sichern hilft.

Für die Erforschung der Funktion der molekularen Anstandsdamme bildet diese Struktur eine solide Grundlage, aber noch lange keine Erfolgsgarantie. Die Aufgabe besteht aus zwei Teilen, da GroEL nicht nur die Faltung des Substratproteins fördert, sondern gleichzeitig auch in einem damit gekoppelten Prozeß ATP in Adenosindiphosphat und anorganisches Phosphat spaltet (hydrolysiert). Die ATPase-Funktion sollte der leichtere Teil sein, zumal die ATP-Bindungsstelle schon identifiziert werden konnte und eine Kristallstruktur der mit ATP beladenen Form des Proteins von Horwich und Siglers Arbeitsgruppen derzeit ausgearbeitet wird. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Chaperonin mit und ohne ATP schlossen Helen Saibil und ihre Mitarbeiter am Birkbeck College in London, daß die Bindung des Nucleotids eine Öffnungsbewegung der äußeren (apikalen) Domänen auslöst, die in Anwesenheit des Co-Chaperonins GroES noch verstärkt ist.

Grundsätzlich schwieriger ist die Frage, was GroEL mit dem Substratprotein macht. Selbst wenn die Kristallisation eines Komplexes aus Chaperonin und gebundenem Substrat gelänge, ist doch nach den bisherigen Erkenntnissen so gut wie sicher, daß letzteres zu ungeordnet wäre, als daß man irgendeine Information über seine Struktur erhalten könnte. Ebenso charakterlos steht die zweite wichtige Methode zur Strukturauflklärung biologischer Makromoleküle, die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR), vor diesem Problem. Zwar fallen viele Substratproteine in den NMR-tauglichen Größenbereich (relatives Molekulargewicht unter 25 000), doch die Bindung an eine Partikel von 800 000 relativer Masse verschlechtert die Bedingungen entsprechend. Ganz zu schweigen davon, daß die für NMR-Proben benötigten Konzentrationen von ca. 2 Millimol pro Liter in diesem Fall vermutlich um Größenordnungen jenseits der Löslichkeitsgrenze liegen.

Deshalb haben wir in Oxford im Rahmen eines Projekts unter Federführung von Sheena E. Radford einen völlig neuen Ansatz zur Charakterisierung der Struktur des Substratproteins gewählt (Abbildung 16). Unsere Methode beruht auf der Analyse des Austauschs zwischen den Wasserstoffisotopen H («normaler» Wasserstoff, relatives Molekulargewicht 1) und <sup>2</sup>H oder D (Deuterium, Molekulargewicht 2). Insbesondere die an die Stickstoffatome des Peptid-Rückgrats der Proteine gebundenen Wasserstoffatome

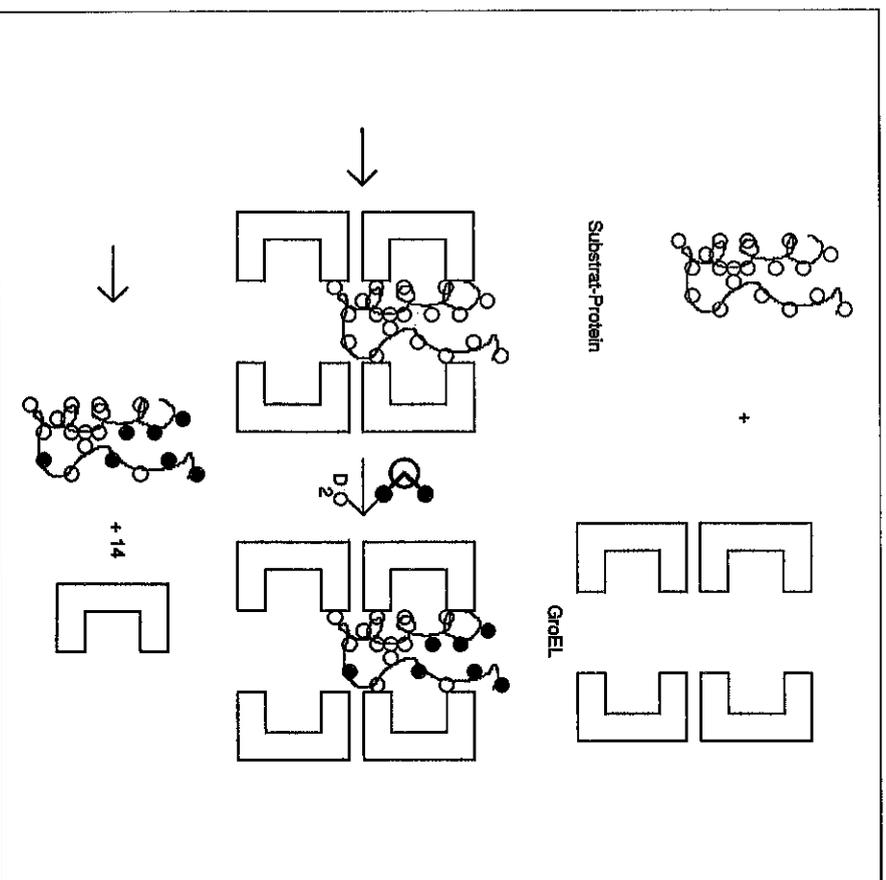


Abbildung 16: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur Untersuchung des Wasserstoff-Isotopenaustauschs in Komplexen aus molekularem Chaperon und (nichtkovalent) gebundenem Substratprotein. Zunächst werden alle austauschbaren Wasserstoffatome im Substratprotein durch Deuterium (ausgefüllte Kreise) ersetzt. Der Komplex wird in schwerem Wasser ( $D_2O$ ) gebildet und durch fünfmaliges Waschen mit  $D_2O$  von jeglichen Salzen und Puffersubstanzen gereinigt. Der Isotopenaustausch wird durch Verdünnen in normales Wasser ( $H_2O$ ) ausgelöst. In regelmäßigen Zeitabständen nach diesem Verdünnungsschritt werden dann Massenspektren nach dem Elektrospray-Ionisations-Verfahren aufgenommen. Dabei wird die Lösung zunächst in einem starken elektrischen Feld in feinste Tröpfchen zerstäubt, aus denen dann im Hochvakuum das Wasser entfernt wird. Zurück bleiben nackte, verschieden stark geladene Moleküle, also Protein-Ionen, deren Quotient aus Masse und Ladung aus ihrer Flugbahn im elektrischen Feld bestimmt werden kann. Für jede Molekülgröße erhält man eine Serie von Peaks verschiedener Ladung, aus deren Verteilung man die Molekülgröße berechnen kann. Die Differenz der erhaltenen Molekülgröße zu der des undeuterten Proteins gibt die Anzahl

me (Amidprotonen) sind sehr leicht austauschbar, wenn das Protein (zumindest in ihrer unmittelbaren Umgebung) entfaltet, das heißt weitgehend unstrukturiert ist. Befinden sie sich jedoch in einer Umgebung von stabilen Strukturen (etwa  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die ja durch Wasserstoffbrücken der Amidprotonen zu Sauerstoffatomen des Peptid-Rückgrats stabilisiert werden), so findet der Austausch – wenn überhaupt – zehn- bis hunderttausendmal langsamer statt.

Den Austausch von Wasserstoffisotopen kann man mit vielen verschiedenen Methoden messen. Kaj Linderström-Lang<sup>12</sup>, der Anfang der fünfziger Jahre am Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen erstmals Isotopenaustausch an Proteinen untersuchte, ließ Tröpfchen des von der Probe absublimentierten Wassers in eine halbmeterhohe Röhre mit einem flüssigen Dichtegradienten aus zwei organischen Lösungsmitteln einsinken. Aus der Höhe, in der die Tröpfchen im Schwebezustand verharrten, konnte er die Dichte der Lösung und somit den Anteil des Isotopenaustauschs erschließen. Heute jedoch sind zweidimensionale NMR-Methoden die am häufigsten verwendeten. Sie erlauben, zumindest bei kleinen Proteinen, die Austauschgeschwindigkeit einzelner Amidprotonen (z.B. das NH der 47. Aminosäure des Lysozyms) getrennt zu verfolgen, sind also ortsspezifisch. Eine komplementäre Information kann man durch Massenspektrometrie erhalten. Hier wird die gesamte Masse jedes einzelnen Moleküls bestimmt. Man kann also nicht die Aminosäurereste eines Moleküls unterscheiden, wohl aber Populationen von in verschiedenen Ausmaß gegen Austausch geschützten Molekülen voneinander abgrenzen. Man kann etwa herausfinden, daß zu einer gegebenen Zeit 60 Prozent der Moleküle in der Probe je 20 Deuteronen enthalten, und 20 Prozent je 95 Deuteronen. Diese Information kann aus NMR-Daten nicht gewonnen werden.

Die Kombination dieser beiden Analysemethoden hat die detaillierte Untersuchung der Faltungsmechanismen von Lysozym aus Hühnerweiß ermöglicht und hat ergeben, daß verschiedene Populationen der Moleküle auf verschiedenen Wegen zurückfalten (S. 57).

Für die an GroEL gebundenen Substratproteine kann, wie bereits erwähnt, NMR-Spektroskopie nicht ohne weiteres verwendet werden – es sei denn, man dissoziiert den Komplex wieder vor der Analyse und nimmt da-

<sup>12</sup> Kaj Ulrik Linderström-Lang (1896–1959) war seit 1938 Direktor des Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen.

durch verfälschte Ergebnisse in Kauf. Massenspektrometrie nach dem erst Ende der achtziger Jahre entwickelten Verfahren der Elektrospray-Ionisation erlaube uns jedoch – überraschenderweise – den intakten Komplex aus GroEL und Substrat direkt zu beobachten. Erst bei der vollständigen Verdampfung des Lösungsmittels (Wasser) fällt der Komplex auseinander, so daß kein Isotopenaustausch im dissoziierten Zustand das Ergebnis verfälschen kann. Wir konnten auf diese Weise zeigen, daß das an GroEL gebundene Substrat (in diesem Fall  $\alpha$ -Lactalbumin aus Kuhmilch) keineswegs, wie gelegentlich in Veröffentlichungen behauptet wurde, völlig unstrukturiert ist. Vielmehr sind die Amidprotonen in einem Umfang gegen Austausch geschützt, der dem in einem (kompakteren, aber teilweise fehlgeordneteren) «molten globule»-Zustand («geschmolzenes Kügelchen») entspricht. Neue massenspektrometrische Methoden, die eine ortsspezifische Zuordnung und Deutung dieser Befunde erlauben, werden gerade entwickelt.

Außer ATP und dem Substratprotein geht noch eine dritte Komponente Wechselwirkungen mit GroEL ein – das kleinere, aus sieben Untereinheiten aufgebaute Co-Chaperonin GroES. Bei manchen Substraten wird GroES benötigt, damit nach Bindung des Substrats dieses auch in gefalteter Form wieder entlassen werden kann. In die verwirrende Vielfalt und Widersprüchlichkeit der Ergebnisse konnten die Arbeitsgruppen von Johannes Buchner an der Universität Regensburg und George Lorimer bei DuPont in Wilmington 1994 etwas Klarheit bringen. Offenbar wird GroES für die Freisetzung des korrekt gefalteten Proteins benötigt, wenn die Bedingungen für nicht-unterstützte Faltung ungeeignet sind. Unter «permissiven» Bedingungen jedoch, wenn also die Faltung ohne Chaperone auch möglich ist, kann das Substrat auch ohne Mitwirkung von GroES freigesetzt werden. Ein erbitterter Streit herrscht jedoch noch in der Frage, ob die unter gewissen Bedingungen beobachteten «football», das heißt Partikel, die ein dem American Football ähnliches Ellipsoid bilden und aus dem GroEL-Faß und zwei konischen GroES-Deckeln bestehen, biologische Relevanz haben oder nicht.

Drei Arbeitsgruppen aus der «Schule» um George Lorimer, die im Sommer 1994 eine Serie von drei Arbeiten über Fußball-Komplexe in Science veröffentlichten, glauben, daß diese symmetrischen Komplexe im Funktionskreislauf der Chaperon-assistierten Faltung eine wichtige Rolle spielen. Ulrich Hartl hingegen, dessen Arbeitsgruppe am Sloan-Kettering-Krebsforschungszentrum in New York 1993 ein Funktionsmodell für GroEL vorge schlagen hatte, das die Wechselwirkung mit allen drei Komponenten ein-

schließt (siehe oben), bestreitet, daß die doppelköpfigen Komplexe nötig sind. Solche Fragen sind allerdings schwer zu beantworten, da Bindungsgleichgewichte empfindlich von Ionenkonzentrationen abhängen, die man in der lebenden Zelle nicht genügend genau bestimmen kann.

Wie wird es nun weitergehen? Die Anstrengungen, herauszufinden, was genau GroEL mit seinen Substraten anstellt, werden sich wohl vervielfachen. Die Kristallstruktur des Co-Chaperonins GroES wird vermutlich noch im Jahre 1995 veröffentlicht werden. Mit der vorliegenden Kristallstruktur des ligandenfreien GroEL, der nahe bevorstehenden Variante mit gebundenem ATP, unzähligen Mutationsstudien und einem stetig wachsenden Arsenal biochemischer und biophysikalischer Methoden, die teils speziell für dieses vertrackte Problem entwickelt wurden, als solider Grundlage sollte das Rätsel noch in diesem Jahrtausend zu lösen sein – notfalls mit etwas Nachhilfe von der Glücksgöttin.

### **Wertstoff-Recycling in der Zelle: Erste Einblicke in die Funktionsweise des Proteasoms**

Von der Herstellung und Reifung der Proteine kommen wir nun direkt zu ihrer Entsorgung. Wir werden sehen, daß überraschende Parallelen zwischen beiden Vorgängen bestehen und daß die Zelle sehr sparsam mit ihren Rohstoffen umgeht. Recycling von Wertstoffen ist, auch wenn der eine oder andere zeitgenössische Politiker sich gerne als Erfinder dieses Prinzips betrachtet sehen würde, vermutlich einige Milliardern Jahre älter, als besagte Politiker glauben. Diese Schlußfolgerung läßt sich aus dem Umstand ziehen, daß die Zellen nahezu aller Lebensformen über Recyclingssysteme verfügen, die beschädigte oder nicht mehr benötigte Proteine in ihre Aminosäurebausteine zerlegen, aus denen dann wieder neue Proteine hergestellt werden können. Im Prinzip könnten Zellen ihren Proteinabbau einfach wegwerfen, indem sie ihn durch die Membran ausschleusen. Daß dies nicht geschieht, läßt darauf schließen, daß sich im Wertstreit der Evolution kein Lebewesen ein solches Ex-und-hopp-Verfahren leisten konnte.

Das Recyclingssystem der Zelle besteht im wesentlichen aus einem Markierungs- und einem Abbauschritt. Die Markierung ist in diesem Fall kein grüner Punkt, sondern ein in mehreren Exemplaren an das wiederzuwertende Protein angehängtes kleineres Protein, das Ubiquitin. Und für die

Zerlegung der Proteinkette in einzelne wiederwertbare Aminosäuren ist ein äußerst kompliziertes Gebilde aus mehreren Dutzend Protein-Untereinheiten zuständig, das Proteasom. Verglichen mit den einfach gebauten und umfassend untersuchten sekretorischen Proteinasen (Trypsin, Chymotrypsin etc.) sind die intrazellulären Proteinasen, zu denen auch das Proteasom gehört, noch ein recht neues Forschungsgebiet, auf dem mehr Fragen offen als beantwortet sind.

Proteasomen wurden aufgrund ihrer Verbreitung über alle Organismenreiche und ihrer komplizierten Unterstrukturen viele Male unabhängig entdeckt und auf mehr als 20 verschiedene Namen getauft, bevor man die Gemeinsamkeiten erkannte. Schon früh (1968) entdeckten Zellbiologen in Eukaryonten (Tiere, Pflanzen, Hefen etc.) zylindrische Proteinpartikel, deren Aufgabe allerdings zwei Jahrzehnte lang unklar blieb, bis man bemerkte, daß sie mit der von Enzymologen seit 1980 untersuchten «multikatalytischen Proteinase» identisch waren. Der Zylinder, den man heute nach seiner Sedimentationsgeschwindigkeit als «20S-Proteasom» bezeichnet, stellt in vielen Zellen den Kern einer größeren, unregelmäßig geformten Partikel dar, die man heute «26S-Proteasom» nennt.

Das 20S-Proteasom der Eukaryontenzelle erwies sich unglücklicherweise – trotz seiner regelmäßigen äußeren Form – als ein buntes Gemisch von jeweils 28 Untereinheiten, die bis zu 14 verschiedenen Molekülorten angehören konnten. Da war es ein Glücksfall, daß die Arbeitsgruppe von Wolfgang Baumeister am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München im Jahre 1989 herausfand, daß in dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* die Verhältnisse etwas klarer sind. Hier gibt es nur zwei Arten von Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Das 20S-Proteasom besteht – bei Thermoplasma ebenso wie bei Eukaryonten – aus vier gestapelten siebengliedrigen Ringen. In Thermoplasma-Proteasomen enthalten die mittleren Ringe des Stapels ausschließlich  $\beta$ -, die äußeren Ringe ausschließlich  $\alpha$ -Untereinheiten. Die für die Peptidspaltung verantwortlichen Molekülteile schienen sich in den  $\beta$ -Untereinheiten zu befinden.

Nachdem es den Martinsriedern 1992 gelungen war, das Thermoplasma-Proteasom von dem beliebtesten «Arbeitspferd» der Molekularbiologen, dem Darmbakterium *Escherichia coli*, herzustellen zu lassen, waren günstige Voraussetzungen für die systematische Untersuchung dieses Komplexes und seiner katalytischen Aktivität und damit auch des Aminosäuren-Recyclings gegeben. Nach vierjähriger Beackung dieses Feldes war Ende 1994 die

Erntezeit gekommen. In einer Serie von sechs Publikationen, die in dem halben Jahr von November 1994 bis April 1995 erschienen, konnte Baumeisters Gruppe die meisten Rätsel des Proteasoms – zumindest für das einfache Modellsystem aus Thermoplasma – knacken.

Es begann mit der Beschreibung der sonderbaren Art und Weise, wie das Protein seine aus vier Ringen bestehende Faßstruktur aufbaut – ein schönes und recht verzwicktes Beispiel für die Selbstorganisation in der Zelle. Merkwürdigerweise sind die den Mittelteil bildenden  $\beta$ -Untereinheiten allein nicht fähig, sich zusammenzuschließen. Die  $\alpha$ -Untereinheiten können hingegen selbständig Siebenringe bilden und dienen der  $\beta$ -Untereinheit als «Baugerüst» zur Zusammenlagerung, was auch die Voraussetzung für die von der Untereinheit selbst katalysierte Abspaltung einer kurzen Peptidkette, der «Pro-Sequenz», ist.

In einer im März 1995 erschienenen Arbeit aus Baumeisters Gruppe wird nun analysiert, wie das 20S-Proteasom seine Substratproteine erkennt und aufnimmt. Offenbar werden nur völlig entfaltete Proteine in das Innere des aus vier Ringen aufgebauten Fasses eingelassen. Den Entfaltungsschritt begünstigen (in der Eukaryontenzelle) Komponenten des 26S-Proteasoms, die dabei auch Energie in Form des energiereichen Nucleotids ATP verbrauchen. Zusätzlich sind die äußeren «Deckel» des 26S-Proteasoms auch für die Erkennung und Abspaltung der Ubiquitin-Markierung zuständig. Das Ubiquitin wird nicht mit abgebaut und kann direkt wiederverwendet werden.

Nach den neuesten Erkenntnissen ist das Einlaßkriterium für die proteolytische Kerneinheit nicht der Entfaltungszustand an sich, sondern die Dicke der Partikel. Das konnten Baumeister und Mitarbeiter demonstrieren, indem sie ein völlig entfaltetes Protein ( $\alpha$ -Lactalbumin aus Kuhmilch) mit einem Goldcluster von 2 nm Durchmesser koppelten. Die Peptidkette «mit Knoten» blieb am Eingang der Faßstruktur stecken und wurde nicht verdaut. Die hohe Elektronendichte des Goldkörnchens erlaube es den Forschern, dieses in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu lokalisieren und nachzuweisen, daß es genau an der Öffnung des Fasses hängenbleibt.

Die strikte Regulierung der «zersetzenden» Aktivität durch mindestens drei Schritte (Markierung mit Ubiquitin, energieabhängige Entfaltung, Einlaß nur, wenn völlig entfaltet) ist sinnvoll, da eine intrazelluläre Protease ja eine potentielle Gefahr für das Proteininventar der Zelle darstellt. Sie soll zwar beschädigte, falsch gefaltete und nicht mehr benötigte Proteine zerle-

gen, aber auf keinen Fall die Mehrheit der Proteine, die noch gebraucht werden. Eine unregulierte Proteinase in der Zelle wäre der direkte Weg zum schnellen Selbstmord.

Den krönenden Abschluß bildeten zwei gleichzeitig in *Science* erschienene Arbeiten, in denen die genaue Struktur in atomarer Auflösung (im Zusammenarbeit mit der am selben Institut befindlichen Arbeitsgruppe von Robert Huber) sowie ein interessanter und neuartiger enzymatischer Mechanismus für die Proteasefunktion des Proteasoms präsentiert werden. Die mittels der Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 0,34 nm bestimmte Struktur brachte eine ganze Reihe von Überraschungen. So stellte es sich zum Beispiel heraus, daß die Konformation des Peptid-Rückgrats in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten nahezu deckungsgleich ist, obwohl die beiden Proteine praktisch keine nennenswerte Übereinstimmung in der Abfolge der Aminosäurebausteine (Sequenz) aufweisen. Zusätzlich konnten sich die Kristallographen freuen, ein neues Faltungsmuster entdeckt zu haben. Trotz der exponentiell anwachsenden Zahl neuer Kristallstrukturen ist die Zahl der neuen Faltungsmuster rückläufig. Man vermutet, daß es nur einige hundert grundlegend verschiedene Strukturmuster gibt, die in vielfacher Variation und Kombination immer wieder verwendet werden.

Interessant ist auch der Vergleich mit der im September 1994 veröffentlichten Struktur des Faltungshelferproteins GroEL (siehe oben), das ebenfalls ein Faß mit siebenzähliger Symmetrie darstellt. Im Gegensatz zu dem löcherigen Gewand der «molekularen Anstands dame» ist die «Recycling-Tonne» der Zelle jedoch rundum dicht verschlossen. Der zentrale, etwa 5 nm weite Tunnel stellt die einzige Höhlung des Proteasoms dar. Was die Konformation der Aminosäurekette angeht, gibt es nicht die geringste Ähnlichkeit zwischen beiden Proteinen. Die Evolution scheint also die Architektur des aus siebengliedrigen Ringen aufgebauten Fasses mehrmals erfunden zu haben.

Auch die Aufklärung der enzymatischen Funktion des Proteasoms brachte einige Überraschungen mit sich. Untersuchungen mit Protease-Hemmstoffen (Inhibitoren), die jeweils für eine der herkömmlichen Klassen von proteolytischen Enzymen spezifisch sind, lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Mit dem Expressionssystem für Thermoplasma-Proteasomen in *E. coli* in Händen konnten Baumeister und seine Mitarbeiter einen Weg beschreiben, der normalerweise zur Auffindung des aktiven Zentrums führen muß. Aufgrund der bekannten Sequenzen der  $\beta$ -Untereinheiten aus verschiede-

nen Organismen identifizierten sie die wenigen in allen Sequenzen übereinstimmenden Aminosäurereste, postulierten, daß einer von diesen das aktive Zentrum sein müsse, und tauschten sie einzeln durch gezielte Mutagenese aus. So logisch und einleuchtend der experimentelle Ansatz auch ist, das Ergebnis war eine Riesenüberraschung. Bei dem aussichtsreichsten Kandidaten brachte die Ersetzung durch eine garantiert unverdächtige Aminosäure eine Verstärkung der proteolytischen Aktivität. Und selbst wenn man geeignete Aminosäuren einbezieht, die zwar nicht in allen Untereinheiten identisch, aber schlimmstenfalls durch eine chemisch ähnliche Struktur ersetzt sind – in keinem Fall konnte durch Mutation die Aktivität des Proteasoms völlig unterdrückt werden.

Es blieb nur eine mögliche Schlussfolgerung: daß in dem bunten Mix verschiedener  $\beta$ -Untereinheiten des Eukaryonten-Proteasoms nicht alle katalytisch aktiv sind. Statt der Forderung, daß die «verdächtigere» Aminosäure in allen  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms einer Eukaryontenspezies vorkommen muß, wurde nur noch die Bedingung gestellt, daß sie in mindestens einer Version pro Spezies vorhanden sein muß. Aus dem so erweiterten Kreis von Verdächtigen konnte Baumeisters Arbeitsgruppe dann relativ leicht den Schuldigen identifizieren. Im nachhinein werden sich die Forscher geängert haben, daß sie ihre Mutationsstudien nicht einfach am Anfang der Sequenz begonnen haben. Der aktive Aminosäurerest ist nämlich das Threonin in Position 1. Inhibitorstudien deuten darauf hin, daß dieses Threonin eine ähnliche Funktion hat wie das Serin in den schon seit Jahrzehnten intensiv erforschten Serin-Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin etc.). Und das Proteasom ist somit der erste Vertreter der neuen Familie der Threonin-Proteasen. Übrigens läßt es sich auch durch Mutagenese leicht in eine Serin-Protease umwandeln.

Die Aufklärung von Struktur und Funktion des Thermoplasma-Proteasoms, das in idealer Weise ein vereinfachtes Modellsystem für Eukaryonten-Proteasomen darstellt, wird auch der Erforschung dieses komplizierteren Systems, das ja auch die Bildung der 26S-Struktur einschließt, einen kräftigen Schub geben.

Da der Ubiquitin-abhängige Abbauweg (über den Abbau überzähliger Enzymmoleküle) an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt ist und auch im Immunsystem bei der Antigen-Prozessierung eine Rolle spielt, könnte es sich erweisen, daß in der Eukaryontenzelle der Recycling-Hof eine der Schaltstellen der Macht ist.

## Gute, böse und kuriose Zellen

Manchmal verwenden Zellen ihre Nanostrukturen auch für Tätigkeiten, deren Sinn wir nicht unbedingt verstehen (z.B. Orientierung im Magnetfeld) oder die uns außerordentlich unangenehm sind (z.B. Auslösung von Krankheiten). Ein bioanorganisches Kuriosum und zwei bitteremste medizinische Anwendungen der Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Zellen sollen den Abschluß dieses Teils über die Moleküle der Natur bilden.

### Orientierungshilfe für Einzeller: Magnetotaktische Bakterien wissen, wo's lang geht

Einzeller haben, wie wir Menschen auch, unterschiedlichste Vorlieben und Neigungen: Manche schwimmen zu Licht- oder Wärmequellen hin, andere fliehen davor, wieder andere orientieren sich an der Konzentration bestimmter chemischer Substanzen im Wasser. Alle diese Orientierungen lassen sich im Rahmen der Evolutionstheorie mehr oder weniger schlüssig mit überlebenswichtigen Verhaltensweisen erklären. Nicht so einfach ist der Fall, wenn Bakterien sich an den Kraftlinien eines Magnetfelds orientieren und zum Beispiel zielstrebig auf den Nordpol einer Kompaßnadel zuschwimmen.

Genau dieses Verhalten, das man als Magnetotaxis bezeichnet, hat der Mikrobiologe Richard P. Blakemore erstmals 1975 beobachtet – die betrachteten Bakterien ließen sich weder durch Bewegungen des Mikroskops noch durch Veränderung der Lichtverhältnisse von dem Weg nach Norden abbringen, den ihnen ihr eingebauter Kompaß in Form mehrerer, jeweils wenige zehntausendstel Millimeter großer Kristalle des Eisenminerals Magnetit (Magnetisenstein) wies. In den folgenden Jahren konnten magnetotaktische Bakterien, die dank ihrer charakteristischen Eigenschaft leicht zu «fangen» sind, in verschiedensten Bereichen gefunden werden. Ihre Entdeckung im Boden einer «typischen Weidlandschaft» bei Haindläng im Ampertal widerlegte 1990 die bis dahin gültige Vermutung, daß Magnetitvorkommen im Boden ausschließlich anorganischen Ursprungs seien. Eine Arbeitsgruppe in Tokio hat 1993 das ohnehin schon breite Spektrum der magnetischen Bakterien

nach weiter ausgedehnt – sie konnten sogar in Umgebungen gefunden werden, wo das Fehlen molekularer Sauerstoffs und die Anwesenheit reduzierender Schwefelverbindungen die Synthese des aus Eisen und Sauerstoff aufgebauten Magnetits erschweren. Das neuartige Bakterium muß demnach bei der Einlagerung der Magnetitkristalle einen anderen Syntheseweg beschreiben als die bisher bekannten magnetotaktischen Organismen. Als weitere Überraschung stellt das Bakterium neben den in der Zelle gefundenen Magnetitkristallen auch ein – ebenfalls magnetisches – Eisen-Schwefel-Mineral her, welches es ausscheidet. Dieser Befund könnte die Erklärung für das bisher unverstandene Vorkommen magnetischer Mineralien in Erdöllagerstätten liefern.

Außer der kaum zu beantwortenden Frage nach dem Evolutionsvorteil des eingebauten Kompasses werfen die linientreuen Mikroorganismen eine Reihe weiterer interessanter Fragen auf, etwa im Zusammenhang mit der geographischen Orientierung höherer Lebewesen, der Bildung magnetischer Sedimentgesteine und sogar der Entstehung des Lebens. Die weitere Verbreitung der Fähigkeit zur Bildung von Magnetit und anderer kristalliner Eisenverbindungen über verschiedenste Klassen einzelliger Lebewesen läßt darauf schließen, daß diese in der Frühgeschichte des Lebens eine wichtige Rolle gespielt haben könnte. Lange bevor der Luftsauerstoff verfügbar und für das Leben auf der Erde bestimmend wurde, so die Idee, hätten Eisensulfide und Eisenoxide dessen Rolle bei der «Verbrennung» der Nährstoffe spielen können. (Auch in den vielbeachteten Theorien des Münchner Parentanwalts Günter Wächtershäuser spielt ein Eisen-Schwefel-Mineral, der Pyrit [Katzengold], eine zentrale Rolle für den Ursprung des Lebens.) Oder aber sie hätten einfach als Speicher für Eisenionen gedient, eine Funktion, die heute von einem Protein (dem Ferritin) wahrgenommen wird. So läßt sich vermuten, daß die Frage nach dem Warum der magnetischen Orientierung falsch gestellt ist. Die Bakterien entwickelten die Fähigkeit, Eisenmineralien aufzubauen, und erhielten ihre magnetischen Eigenschaften und damit die Festlegung auf die Nord-Süd-Route als Nebenwirkung. So betrachtet, sollten wir Menschen froh sein, daß die Evolution als Baustein für die Biominalisation in unserem Körper ein anderes Metallion vorgesehen hat: das Kalzium.

### Laßt die Bäume leben: Das Krebsmittel Taxol<sup>13</sup> kann jetzt auch synthetisch hergestellt werden

Ein wesentlicher Grund, warum Chemiker immer neue Moleküle herstellen, ist der, daß Wirkstoffe gegen viele Krankheiten, einschließlich Krebs, noch nicht auf rationalen Wege entworfen werden können. Der irrationale Weg ist der, daß man Tausende verschiedene Moleküle herstellt, durchtestet und dann 99,9 Prozent davon verwirft. Umgekehrt kommt es auch vor, daß die Natur ein pharmakologisch interessante Molekül herstellt – wenn auch nur in zu kleinen Mengen – und daß sich dieses hartnäckig den Bestrebungen der Synthetiker widersetzt.

Die Pazifische Eibe (*Taxus brevifolia*), ein in Nordamerika heimischer Nadelbaum, enthält in ihrer Rinde etwa 0,3 Gramm Taxol. Dieser Naturstoff, der 1964 entdeckt und dessen Struktur 1971 aufgeklärt wurde, gilt unter Experten der Krebsmedizin als die wichtigste Neuerrungenschaft der letzten dreißig Jahre. In klinischen Testreihen wurde seine Wirksamkeit gegen Leukämie, Brust-, Eierstock- und Lungentumoren belegt. In einer klinischen Phase-II-Prüfung an Patientinnen, deren Eierstockkrebs auf andere Therapien nicht angesprochen hatte, betrug die Heilungsquote 30–35 Prozent bei beherrschbaren Nebenwirkungen. Für die Behandlung eines Patienten müssen sechs ausgewachsene Eiben geopfert werden. Zu dumm, daß der Baum als bevorzugter Nistplatz einer seltenen Eulenart mittlerweile unter Naturschutz steht.

Dieses Beschaffungsproblem hat zu fieberhaften Forschungsaktivitäten mit dem Ziel der teilweisen (von verwandten Naturstoffen ausgehenden) oder vollständigen (von einfachen organischen Verbindungen ausgehenden) Synthese geführt – an die dreißig Arbeitsgruppen sollen weltweit auf diesem Gebiet tätig sein. Nachdem bereits 1992 eine Teilsynthese geglückt war, gingen beim Rennen um die Totalsynthese im Winter 1993/94 zwei Teams nahezu gleichzeitig ins Ziel. Die Gruppe von Robert Holton von der Florida State University hat ihre Arbeit zwar früher eingereicht als die Konkurrenten um Kyracos Nicolaou am Scripps Institut in La Jolla, Kalifornien, mußten jedoch mitansehen, wie die Publikation der Mitbewerber um eine Woche früher in *Nature* erschien als ihre eigene im *Journal of the American Chemical Society*.

<sup>13</sup> Taxol<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Bristol-Myers-Squibb.

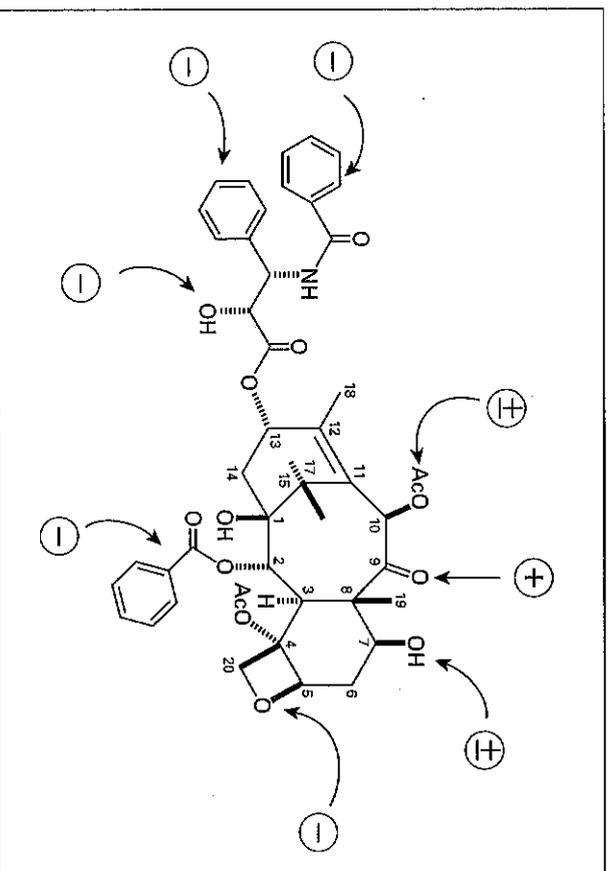


Abbildung 17: Struktur und Struktur-Funktions-Beziehungen von Taxol. Molekülteile, deren Veränderung sich auf die Aktivität steigend auswirken kann, sind mit +, solche, deren Weglassen oder Modifizierung die Aktivität behindert oder ganz unterbindet, mit – gekennzeichnet. +/- bedeutet, daß Weglassen des Molekülteils keine signifikante Wirkung hat. Nach Kingston (1994).

Doch nicht nur wegen der großen Teilnehmerzahl, der attraktiven Trophäe und des spannenden Finales, sondern auch aufgrund der atemberaubenden Schwierigkeit des Parcours erregte dieses Rennen soviel Aufsehen. Die Struktur, die sich um vier miteinander verschmolzene Ringe gliedert (Abbildung 17), ist keineswegs so flach und übersichtlich, wie sich das auf dem Titelblatt von *Nature* ausmacht. Der zentrale achthedrige Kohlenstoffring («B-Ring») ist in Wirklichkeit so stark gewellt, daß die an gegenüberliegenden Ecken gebundenen Molekülteile sich gegenseitig im Wege stehen, was die Stabilität der Verbindung schwächt und die Synthese schwieriger macht. Damit nicht genug des Unheils, muß das Achteck zwei Kanten mit dem benachbarten Sechsring A und eine mit dem Sechsring C teilen, an den wiederum ein Vierling («D») angelagert ist – das geht nicht ohne verbotene Bindungen und gequetschte Atomradien ab. Schon die

flexiblen Kugel-Stab-Modelle wehren sich gegen den Aufbau einer solchen Struktur – bei den hölzernen, in ihrer Raumerfüllung naturgerechteren Kalotrenmodellen wird man wohl nicht ohne eine Säge auskommen.

Kein Wunder also, daß die Herstellung dieser Verbindung, wie K. Nicolaou in einem Übersichtsartikel in der *Angewandten Chemie* schreibt, ursprünglich «nur die masochistischsten unter den Synthesechemikern» interessierte. Seine Totalsynthese besteht aus 28 chemischen Reaktionen, ausgehend von zwei Zwischenprodukten, die im wesentlichen den Ringen A und C entsprechen und ihrerseits auch erst einmal synthetisiert werden müssen. Elf der Kohlenstoffatome in der Struktur sind chiral, das heißt, die Anordnung ihrer vier verschiedenen Bindungspartner kann in zwei spiegelbildlichen Versionen auftreten, von denen nur eine erwünscht ist. Jedes einzelne Chiralitätszentrum ist bereits eine Herausforderung bei der Synthese.

Zwar ist diese Synthese zu aufwendig, um für die industrielle Gewinnung von Taxol selbst in Frage zu kommen – in diesem Bereich werden teilsynthetische Verfahren in Kürze die ursprünglich für die medizinische Verwendung ausschließlich zugelassene Gewinnung des Naturstoffs aus der Rinde der Pazifischen Eibe verdrängen. Doch die Totalsynthese bleibt extrem wichtig als Zugang zu der Stoffklasse der Taxane, das heißt der mit Taxol strukturell verwandten Verbindungen. Nachdem es den Synthetikern nun gelungen ist, die zentrale, allen Taxanen gemeinsame Struktur der Ringe A–C aufzubauen, können sie Variationen zum Thema spielen und dürfen hoffen, auf weitere Stoffe mit ähnlich interessanten pharmakologischen Eigenschaften zu stoßen.

Neu an Taxol und den verwandten Taxanen ist nämlich nicht nur die abenteuerliche Struktur – der Mechanismus, durch den es den Zyklus der Zellvermehrung behindert, ist auch einzigartig. Die faserige Grundstruktur, die wie ein Baugerüst die Zelle stabilisiert, das Zytoskelett, besteht aus den sogenannten Mikrotubuli, und diese submikroskopisch kleinen Röhren entstehen durch Zusammenschluß von 13 langgezogenen Fäden (Protofilamenten), die aus den Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut werden. Kannte man bisher bereits etliche Verbindungen, die den Aufbau der Mikrotubuli blockieren, so ist Taxol das erste Zellgift, das seine Wirkung durch eine Verstärkung der Röhrenbildung entfaltet. Der Haken an der Sache ist der, daß die unter Mitwirkung von Taxol gebildeten Röhren nur zwölf Protofilamente enthalten und einen geringeren Durchmesser haben als richtige Mikrotubuli. Diese falschen Bauwerke haben die (für die teilungswillige Zelle) unan-

genehme Eigenschaft, daß sie zu beständig sind. Normale Mikrotubuli sind dynamische Systeme, die zum Beispiel an einem Ende wachsen und gleichzeitig am anderen schrumpfen können und in bestimmten Phasen des Zellzyklus schnell die erforderlichen Tubulinbausteine zum Aufbau neuer Strukturen, etwa der für die Teilung essentiellen Mitose-Spindel, bereitstellen müssen. Die Zwölfer-Röhren hingegen ziehen alle einmal eingebaute Tubulineinheiten auf Dauer aus dem Verkehr, bilden unnatürliche und nutzlose bündelartige Strukturen und blockieren damit die Zellteilung. Da sich Krebszellen sehr viel öfter teilen als normale Körperzellen, werden sie durch diese Behandlung stärker geschädigt.

Nach Aufklärung von Struktur und Wirkungsweise des Taxols sowie verschiedener Wege zu seiner Gewinnung sind nun alle Voraussetzungen gegeben, um aus der interessanten Stoffklasse der Taxane neue, auf spezifische Anwendungen optimierte Krebstherapeutika zu entwickeln. Taxol selbst wird wohl als erstes zum Einsatz kommen und dann nach einem von Robert Holton entwickelten Verfahren aus dem Naturstoff 10-Desacetyl-baccatin III (der aus den Nadeln verschiedener Eibenarten ohne bleibenden Schaden für den Baum isoliert werden kann) teilsynthetisch hergestellt werden. Auch aus pflanzlichen Zellkulturen sowie aus den Zellen einer auf Eiben ansässigen Pilzart kann Taxol gewonnen werden.

Für die Gewinnung anderer Taxane werden sich die masochistischen Bemühungen der Synthesechemiker nützlich erweisen – schließlich hat das Rennen um die Totalsynthese entlang der Strecke auch vielerlei Informationen über chemische Eigenschaften der Zwischenstufenverbindungen geliefert – davon zeugen nicht zuletzt die 386 Strukturformeln in Nicolaous oben erwähntem Übersichtsartikel. Und nach alledem wird die Pazifische Eibe, die, so Nicolaou, vor Beginn des Taxol-Fiebers «hauptsächlich als Gestrüpp angesehen» wurde, – und zugleich die auf ihr ansässige gefleckte Eule – wieder in Ruhe und Frieden gedeihen.

### **Mikrobenjäger in der Klemme: Die rasante Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen macht die Suche nach Alternativen zum Dringlichkeitsfall**

Zu dem reichhaltigen Reservoir pharmakologisch interessanter Moleküle, die von Pilzen hergestellt werden, zählen auch die Antibiotika, mit denen

diese sich konkurrierende Bakterien vom Leibe halten. Doch was Mediziner zunächst für ein Geschenk des Himmels hielten, könnte sich langfristig als trojanisches Pferd entpuppen.

*Microbe Hunters* von Paul de Kruif, ein Klassiker der populärwissenschaftlichen Literatur und bis in die achtziger Jahre hinein immer wieder aufgelegt, erschien – man glaubt es kaum – erstmals im Februar 1926. Dabei fing die Jagd auf die Mikroben eigentlich erst zwei Jahre später richtig an, als Alexander Fleming zufällig entdeckte, daß *Penicillium notatum* aus der Gattung der Pinselschimmel eine Substanz absondert, die Bakterien lysiert, das heißt ihre Zellwand zerstört. Mit der Identifizierung des Penicillins und seiner klinischen Erprobung begann vor etwa fünfzig Jahren das Antibiotika-Zeitalter.

Im Jahre 1954 verkündete ein Buchtitel dann den «Sieg über die Seuchen». Doch diese Euphorie ist inzwischen längst verflogen: Die Gejagten schlagen zurück, und das neueste Werk des britischen Mikrobekenners Bernard Dixon ist keinesfalls ein Epitaph, sondern trägt den Titel: *Power insects* – die unsichtbare Macht. Nachdem es eine Zeitlang so ausgesehen hatte, als ob Viren – die durch Antibiotika grundsätzlich nicht angreifbar sind – die letzten wirklich bedrohlichen Krankheitserreger seien, sind jetzt pathogene Bakterien, wie etwa *Mycobacterium tuberculosis* wieder auf dem Vormarsch. Die Weltgesundheitsorganisation WHO berichtete 1994 einen bedrohlichen Anstieg der Tuberkuloseerkrankungen in Osteuropa und der ehemaligen Sowjetunion mit 29000 Todesfällen in fünf Jahren. Erstmals seit Jahrzehnten sind sogar für Schwindsuchtpatienten in den Industriestaaten die Heilungschancen ungewiß, da resistente Stämme der Erreger überall aufgefunden werden. Das Wissenschaftsmagazin *Science* widmete im April 1994 einen Sonderteil mit rund einem Dutzend Beiträgen ausschließlich dem Thema Antibiotikaresistenz.

Was zunächst aussah wie ein simpler Wettlauf – der Mensch mußte mindestens ebenso schnell neue Antibiotika entwickeln, wie sich unter den Bakterien Resistenzgene gegen die alten ausbreiteten –, erinnert nun eher an das Rennen zwischen Hase und Igel oder an die von der Evolutionsforschung aus Lewis Carrolls *Through the Looking Glass* entlehnten «Red Queen», die immer schneller laufen muß, um auf derselben Stelle zu bleiben.

Wie Julian Davies von der University of British Columbia in Vancouver in einem Übersichtsartikel in der oben erwähnten Ausgabe von *Science* ausführt, scheitert eine genaue Erforschung der Ausbreitungswege von Resistenzen in der Natur schon daran, daß nur ein Bruchteil der auf der Erde

lebenden Bakterien bekannt und erforscht ist. Deshalb können Ausbreitungswege und -mechanismen allenfalls in stark vereinfachten Modellen, nicht aber in der Natur studiert werden. Es zeichnet sich jedoch ab, daß die Antibiotika selbst in mehrfacher Hinsicht die Entstehung und Verbreitung der Resistenzgene begünstigen.

Zum ersten, und damit hatte man natürlich bereits bei der Einführung gerechnet, erzeugt ihre Anwendung einen Selektionsdruck: Wenn von den Millionen Bakterien im Körper eines Kranken ein einziges zufällig eine Mutation trägt, die es gegen das verwendete Antibiotikum resistent macht, erhält dieses einen enormen Selektionsvorteil gegenüber den anderen, die mehr oder weniger effizient abgetötet werden, und kann sich um so besser vermehren. Selbst wenn das Immunsystem des Kranken letztendlich die Oberhand gewinnt und die Bakterien besiegt, sind doch diejenigen Bakterien, die an die Umgebung abgegeben werden und andere anstecken können, mit hoher Wahrscheinlichkeit resistent.

Der zweite Mechanismus, den man ursprünglich für extrem selten und deshalb in der Klinik irrelevant gehalten hatte, betrifft die Verbreitung der Resistenz durch Übertragung genetischen Materials (oft in Form von höchst effizienten ringförmig geschlossenen DNA-Doppelsträngen, den sogenannten R-Plasmiden) auf nicht resistente Bakterien. Erst in jüngster Zeit hat man entdeckt, daß dabei keineswegs, wie bisher angenommen, Übertragungsbartieren, etwa zwischen den großen Gruppen der gram-negativen und gram-positiven Bakterien, bestehen. Nicht genug damit, daß der Gentransfer leichter ist als bisher angenommen, er wird durch Anwesenheit von Antibiotika auf bisher unbekanntem Wege erleichtert.

Die schlimmste Hiobsbotschaft erhielten die modernen Mikrobengäger jedoch, als Vera Webb und Julian Davies 1993 entdeckten, daß die Apotheker die Resistenzgene möglicherweise gleich mit dem Antibiotikum mitgeliefert haben. DNA aus den einzelligen Pilzen, die in den Fermentern der Pharmafirmen die Antibiotika herstellen, ist nur schwer restlos von dem Produkt zu trennen, und bei der Analyse der mitgeschleppten DNA fanden Webb und Davies auch Gene für Antibiotikaresistenzen. Seitdem man weiß, daß Bakterien Fremd-DNA sehr viel leichter aufnehmen und verwenden können, als man ursprünglich annahm, muß man davon ausgehen, daß auch auf diesem Wege Antibiotikaresistenzen verbreitet werden.

Auf welche Weise erzielen Resistenzgene ihre Wirkung? Grob gesprochen können Bakterien sich gegen chemische Angriffe zur Wehr setzen, indem

sie das Eindringen des Wirkstoffs in die Zelle verhindern, indem sie ihn zerstören oder indem sie die Angreifbarkeit des Zielenzymus herabsetzen. Alle drei Resistenzmechanismen werden in der Natur beobachtet, gelegentlich sogar in demselben Organismus.

Die wichtigste (und für die Medizin lästigste) Klasse von Resistenzgenen gehört zu der zweiten Gruppe. Sie kodiert für die Herstellung des Enzyms  $\beta$ -Lactamase, welches die Spaltung der Ringstruktur der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, also zum Beispiel des Penicillins, katalysiert. Immer neue Penicillin-Derivate wurden entwickelt, gegen die sich die Mikroorganismen mit immer neuen Varianten des Enzyms zur Wehr setzten. Eine Punktmutation, das heißt der Austausch einer einzigen Nucleotidbase der DNA, kann die Substratspezifität der  $\beta$ -Lactamase verschieben. Deshalb versuchen die Pharmaforscher gleichzeitig auch, Hemmstoffe (Inhibitoren) zu entwickeln, die zusammen mit dem Antibiotikum verabreicht werden können und dieses davor schützen, von der  $\beta$ -Lactamase aufgelockert zu werden. Nachdem sich kleine Inhibitormoleküle in klinischen Tests als ineffektiv erwiesen hatten, ruhen die Hoffnungen der Forscher nun auf einem Protein namens BLIP –  $\beta$ -Lactamase Inhibierendes Protein. Für eine große Zahl von Varianten der  $\beta$ -Lactamase ist BLIP der wirkungsvollste bekannte Inhibitor. Aufschluß über den Mechanismus der Inhibition erhofft man sich von der Kristallstruktur, die 1994 veröffentlicht wurde. Doch obwohl  $\beta$ -Lactamase eines der am besten untersuchten Proteine ist und für kaum ein Enzym so viele Inhibitoren entdeckt und untersucht wurden, ist eine endgültige Ausschaltung dieses Resistenzfaktors noch lange nicht in Sicht.

Deshalb suchen andere Arbeitsgruppen auch rasch nach neuen antimikrobiell wirksamen Substanzen, welche die klassischen Antibiotika ersetzen könnten – und möglicherweise weniger leicht Resistenzen hervorrufen. Auf eine Goldgrube stieß Ende der achtziger Jahre Michael Zasloff von der University of Pennsylvania in Philadelphia, als er in der Haut des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* ein Peptid fand, das er nach dem hebräischen Wort für Schild Magainin nannte. Zwar hatte man schon vorher bemerkt, daß die Haut der Frösche geradezu eine Giftküche darstellt, in der eine ganze Reihe von pharmakologisch aktiven Substanzen zu finden sind, und auch afrikanische und indische Völker scheinen schon seit Jahrhunderten von der Wirkung der Froschhaut gewußt zu haben. Doch Magainin war das erste «Breitband-Antibiotikum», das aus dieser Quelle gewonnen wurde. Genau genommen handelt es sich um zwei verwandte

Peptide Magainin 1 und 2, die jeweils aus 23 Aminosäuren bestehen und keinerlei Sequenzähnlichkeit mit irgendeiner vorher bekannten Substanz aufweisen. Ihre Wirksamkeit gegen Einzeller entspricht der von herkömmlichen Antibiotika. Zasloff, der aus seiner Entdeckung nun im Rahmen einer eigenen Firma, Magainin Pharmaceuticals, marktreife Antibiotika entwickelt, sucht auch weiter nach antibakteriellen Substanzen in bisher nicht genutzten Quellen. Seine neueste Entdeckung, das Steroid-Antibiotikum Squalamin, kommt im Blut von Haifischen vor.

Neben der Entwicklung immer neuer synthetischer Varianten der klassischen Antibiotika, der Erforschung von Inhibitoren Resistenz vermittelnder Enzyme und der Erschließung völlig neuer Substanzklassen für die Jagd auf die Krankheitserreger ist vor allem ein Faktor wichtig: der verantwortliche Umgang mit den existierenden Antibiotika. Jede überflüssige oder nicht zu Ende geführte Anwendung vergrößert unnötig den «Gen-Pool» mit Antibiotikaresistenzen in der Natur und erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß längst vergessene Seuchen zurückkehren und die Mikroben auf Menschenjagd gehen.