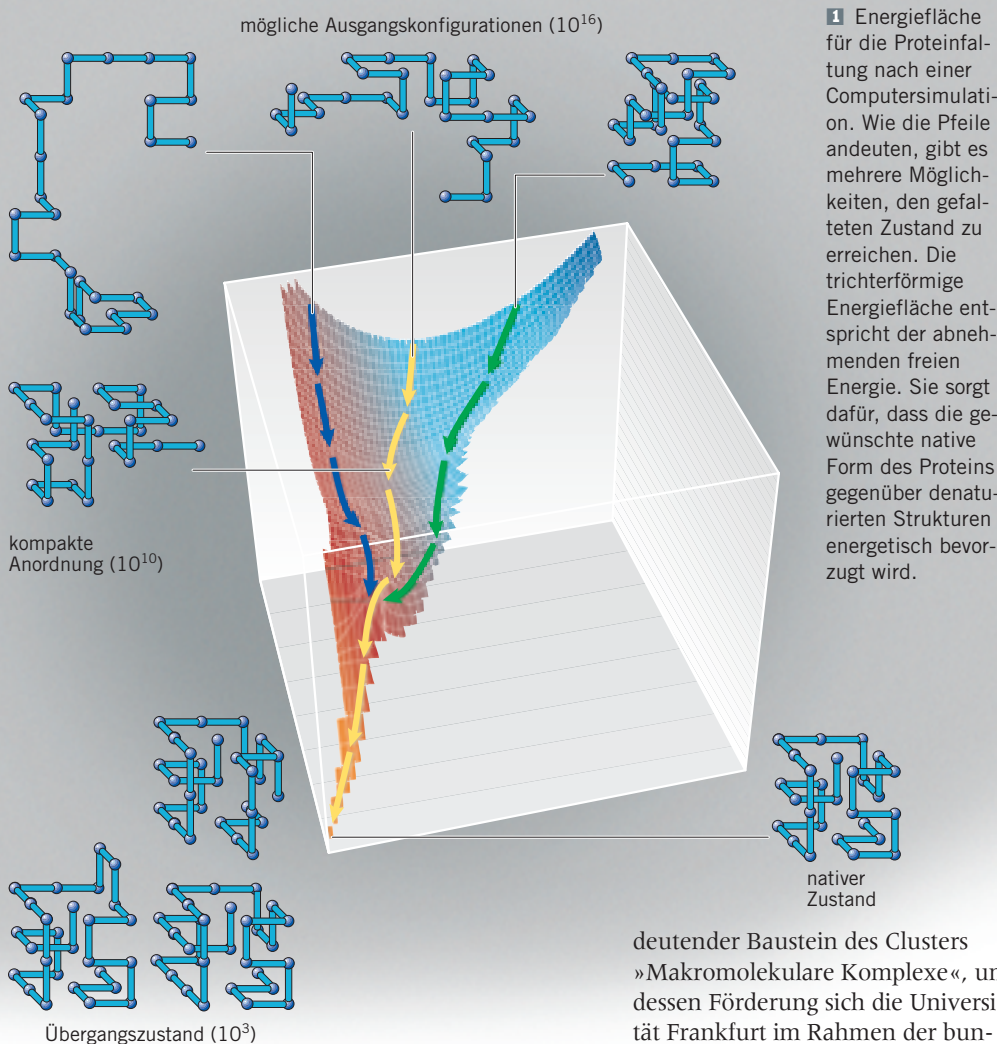


Auf die Faltung kommt es an

Sekundenbruchteile entscheiden über gesunde Proteinfunktion



Theorie und Therapie sind manchmal nur wenige Schritte voneinander entfernt. So ist es von den Regeln der Proteinfaltung bis zu einer kausalen Therapie von Alzheimer wahrscheinlich nicht weit. Das Problem ist nur, dass bis heute niemand diese Regeln genau kennt, wenngleich seit 50 Jahren nach ihnen gesucht wird. Immerhin zeichnen sich allmählich die Konturen einer Theorie der Proteinfaltung ab – wozu die Arbeitsgruppe von Harald Schwalbe, Professor für Strukturelle Chemie und Biologie und Dekan des Fachbereichs Biochemie, Chemie und Pharmazie wichtige Beiträge liefert. Die NMR-Spektroskopie, sein wichtigstes Werkzeug zur Strukturanalyse von Proteinen, ist als Querschnittstechnologie überdies ein be-

deutender Baustein des Clusters »Makromolekulare Komplexe«, um dessen Förderung sich die Universität Frankfurt im Rahmen der bundesweiten Exzellenzinitiative mit guten Erfolgsaussichten bewirbt.

Proteine sind die wichtigsten Moleküle des Lebens. Sie stützen das Skelett und steuern die Sinne, sie bewegen Muskeln und empfangen Signale, sie verdauen Nahrung, heilen Wunden und verarbeiten Gefühle. Sie sind rund wie ein Wollknäuel oder lang wie ein Zopf, fest wie ein Stahlseil oder elastisch wie ein Gummiband. Vor allem als Enzyme sind sie die unentbehrlichen Spielmacher des Lebens, denn diese Biokatalysatoren ermöglichen Reaktionen, die sonst, wenn überhaupt, millionenfach langsamer ablaufen. Ihre unvorstellbare Vielfalt gewinnen die Proteine aus einem Bausatz von nur 20 Grundelementen, den Aminosäuren.

Die Reihenfolge der Aminosäuren eines Proteins ist genetisch fest-

gelegt oder zumindest skizziert, denn ein Gen kann als Bauplan vieler Proteine dienen. Synthetisiert werden die Proteine, dem Knüpfen einer Kette vergleichbar, in einem minutenlangen Prozess an den Ribosomen des Zellplasmas. Sekundenlang, oft gar in Bruchteilen davon, faltet sich die eben synthetisierte Kette dann zu einem räumlichen Gebilde, das sie erst funktionsfähig macht.

Milliarden mal Milliarde Möglichkeiten

Diese Faltung ist keine chemische Reaktion, sondern gleicht dem Weben eines verschlungenen Musters in unzähligen Kraftfeldern zwischen den einzelnen Atomen des Moleküls und ihrer Umgebung. Selbst ein relativ kleines Protein mit 100 Aminosäuren hätte aber 2 hoch 100 Möglichkeiten, sich im Raum zu falten, wenn die drehbaren Teile seines Rückgrats in jeweils nur zwei verschiedenen Konformationen vorlägen. Das entspricht ungefähr einer 1 mit 30 Nullen. Auch wenn ein Protein in einer Sekunde 100 Milliarden verschiedene Konformationen ausprobieren kann, brauchte es demnach 100 Milliarden Jahre, um alle Möglichkeiten der Faltung zu überprüfen. Tatsächlich braucht es keine Sekunde, um seine biologisch aktive Form zu finden. Um diesem Paradox zu entkommen, postulierte Cyrus Levinthal 1969 die Existenz von definierten Wegen, auf denen die Proteinfaltung zügig ablaufen könne, gleichsam geführt wie auf Schienen.

»In den frühen 1970er Jahren, als ich mein Studium abschloss, war die Proteinfaltung eine der großen intellektuellen Herausforderungen«, erinnert sich Chris Dobson, Chemieprofessor im englischen Cambridge, der heute einer der weltbesten Forscher auf diesem Gebiet ist und im vergangenen Dezember eine der von Sanofi-Aventis gestifteten »perspective lectures« in Frankfurt gab. Damals seien mit röntgenkristallografischen Verfahren erst eine Hand voll Proteine in ihrer Raumstruktur entschlüsselt

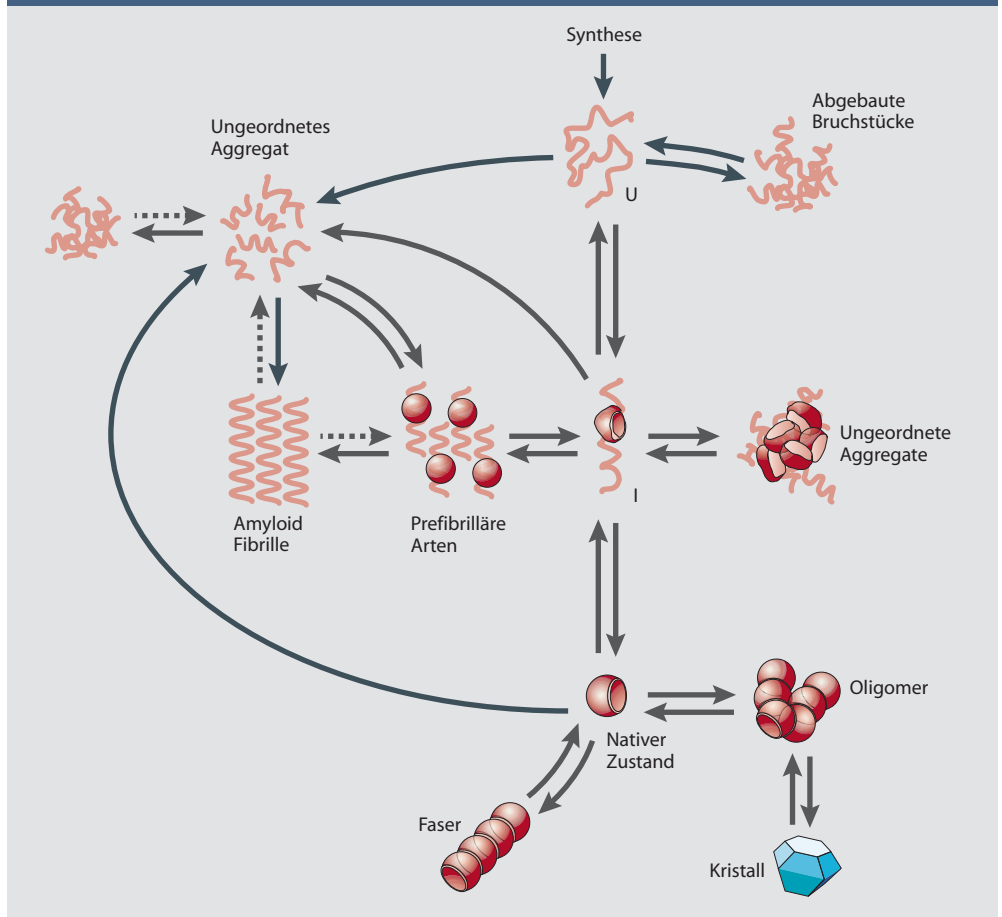
gewesen, und die Vorstellung, sie künftig theoretisch aus ihrer Aminosäuresequenz ableiten zu können, war verlockend. Beflügelt wurde diese Vorstellung auch durch die Verleihung des Chemie-Nobelpreises 1972 an Christian Anfinsen – für den experimentellen Nachweis, dass es allein die Aminosäuresequenz eines Proteins ist, die eindeutig die Form, zu der es sich faltet, festlegt. Aber wie sollte man diesen Code knacken, mit dem eine Aminosäurenkette astronomisch vielen Alternativen pfeilschnell die richtige entwand?

Der Kreisel im Innern des Kerns

Solange es keine Verfahren gab, mit denen man die natürliche Struktur von Proteinen in flüssiger Lösung beobachten und damit ihre Faltung nachvollziehen konnte, war an eine experimentelle Antwort auf diese Frage nicht zu denken. Denn Röntgenstrukturanalysen waren nur mit Proteinkristallen möglich. Sie lieferten eingefrorene Standbilder, strukturell korrekt, aber ohne Dynamik. Solange man keine Rechner hatte, deren Kapazität ausreichte, um die möglichen Wege der Faltung zumindest streckenweise in einer Computersimulation nachspielen zu können, war an eine theoretische Antwort nicht zu denken. Die Leistung der Rechner folgte dann jedoch tatsächlich der Mooreschen Vorhersage und stieg exponentiell an – und die Kernresonanzmagnetspektroskopie (NMR) wurde zu einer Perfektion entwickelt, die es 1984 zum ersten Mal erlaubte, die Struktur eines gelösten Proteins zu bestimmen.

Das NMR-Verfahren macht sich dabei den inneren Magnetismus mancher Atomkerne zunutze, bevorzugt von Wasserstoffatomen. Dieser kommt zur Geltung, wenn ein starkes Magnetfeld von außen angelegt wird: Die betreffenden Atomkerne richten sich parallel zu diesem Feld aus. Bestrahlt man eine Proteinprobe in einem Magnetfeld nun mit elektromagnetischen Wellen im Radiofrequenzbereich, dann erhalten die dafür empfänglichen Atomkerne einen Stoß aus ihrem parallelen Grundzustand heraus. Sie werden mit Energie aufgeladen wie ein Kreisel, dem man einen Drall versetzt, damit er beim Loslassen beginnt, auf dem Boden zu tan-

Verschiedene Zustände, die ein Protein einnehmen kann



zen. Beim schnellen Dreh zurück in den Grundzustand emittieren die Atomkerne eine radiofrequente Strahlung, die man messen und in einem Spektrum darstellen kann.

Die Frequenz der emittierten Strahlen ist abhängig von der Art der Atomkerne und von der Stärke des angelegten Magnetfelds – und auch davon, welche anderen Atome dem emittierenden Kern benachbart sind. Deshalb senden chemisch identische Kerne – abhängig von ihrer Umgebung – verschiedene Signale aus, was die Analyse komplexer Strukturen überhaupt erst ermöglicht. Durch allerlei mathematische Kunstgriffe und aufwändige Rechenoperationen können die Forscher so den Abstand zwischen den Wasserstoffatomen bestimmen. Aus der Verknüpfung dieser Kenntnisse mit der Primärstruktur des untersuchten Proteins kann dessen dreidimensionale Struktur erschlossen werden.

Ein Fluss fließt nicht bergauf

In den Pionierjahren der NMR-Proteinstrukturanalysen begann Harald Schwalbe, in Frankfurt Chemie zu studieren. Bald faszinierte

ihn das Potenzial dieser Technologie – und auch der Vergleich zwischen Röntgen- und NMR-Analyse, die die beiden Nobelpreisträger Robert Huber (1988) und Kurt Wüthrich (2002) am Beispiel des Proteins Tetrahymena vornahmen. Fast identisch waren die Strukturbestimmungen der beiden – nur der Tyrosinrest an Position 15 wurde verschieden verortet, weil er in Lösung seine intramolekulare Dynamik zeigt. Eine ähnliche Dynamik einiger Seitenketten der Ribonuclease T1 beobachtete Schwalbe mit Hilfe einer bestimmten NMR-Variante in seiner Doktorarbeit, die er 1993 abschloss. Diese Beobachtung ließ ihn nicht los. »Ich wollte jetzt den dynamischsten aller Zustände untersuchen, den entfaltet«, berichtet er. Bei der Beobachtung statischer Zustände habe man einen stabilen Rahmen für alle Parameter, für flexible Zustände müsse man diesen erst entwickeln. Also habe er sich bei Chris Dobson, der damals noch in Oxford lehrte, um eine Post-Doc-Stelle beworben und ihm gesagt: »Ich möchte ein Modell entwickeln, um die Struktur eines entfalten Proteins zu beschreiben.« Drei

Die Herausforderung für die theoretische Analyse besteht darin, Strukturen, energetische Prozesse und kinetische Eigenschaften aller Zustände zu definieren, die ein Protein unter bestimmten Bedingungen einnehmen kann.

Jahre später veröffentlichten die beiden in *Biochemistry* die erste Strukturbeschreibung eines entfalteten Proteins.

In der zweiten Hälfte der 1990er Jahre entwickelte sich aus diesen und anderen Arbeiten allmählich die Theorie des thermodynamischen Trichters. Wie alle Vorgänge in der Natur hat nämlich auch die Proteinfaltung sowohl mit Materie als auch mit Energie zu tun – sie gehorcht also den Gesetzen der Thermodynamik.

Genauso wenig wie ein Fluss bergauf fließt, wird eine Aminosäurenkette sich zu einem Protein falten, dessen Energiegehalt höher ist als der eigene. Ein Protein faltet sich immer so, dass es einen möglichst geringen Energiegehalt hat –

Augen und lässt ihn in eine beliebige Richtung abschlagen, dann ist die Wahrscheinlichkeit, dass er ein Lochen kann, fast unendlich klein. Das gleiche gilt für ein Protein, das zufällig seine richtige Form finden sollte. Wenn alle Flächen des Golfplatzes aber als Hänge zu dem Loch abfallen, das am tiefsten Punkt dieser Landschaft liegt, dann hat der Golfspieler auch mit verbundenen Augen eine gute Chance, sein Ziel zu treffen. So ähnlich geht es Proteinen auf den Hängen abnehmender Energie.

In dieser thermodynamischen Landschaft, die für jedes Protein, abhängig von seiner Primärstruktur, anders aussieht, geht aber nicht alles glatt zu. Es gibt Abgründe und Irrwege, die ein sich faltendes Pro-

Falsche Faltung gefährdet das Gehirn

Von ihrer Existenz und dem Zusammenhang mit der Proteinfaltung erfuhr Chris Dobson in den 1990er Jahren von einem befreundeten Kliniker, der ihm von einem Patienten berichtete, in dessen inneren Organen sich buchstäblich kiloweise Proteinklumpchen abgelagert hatten. Dabei handelte es sich zur Überraschung von Dobson um Lysozym, jenes Protein, an dem er seit Jahren die Mechanismen der Faltung untersuchte, ohne es mit irgendeiner Pathologie in Verbindung zu bringen. Bei diesem Patienten war es an einer Stelle mutiert, hatte sich dadurch falsch gefaltet und war verklumpt.

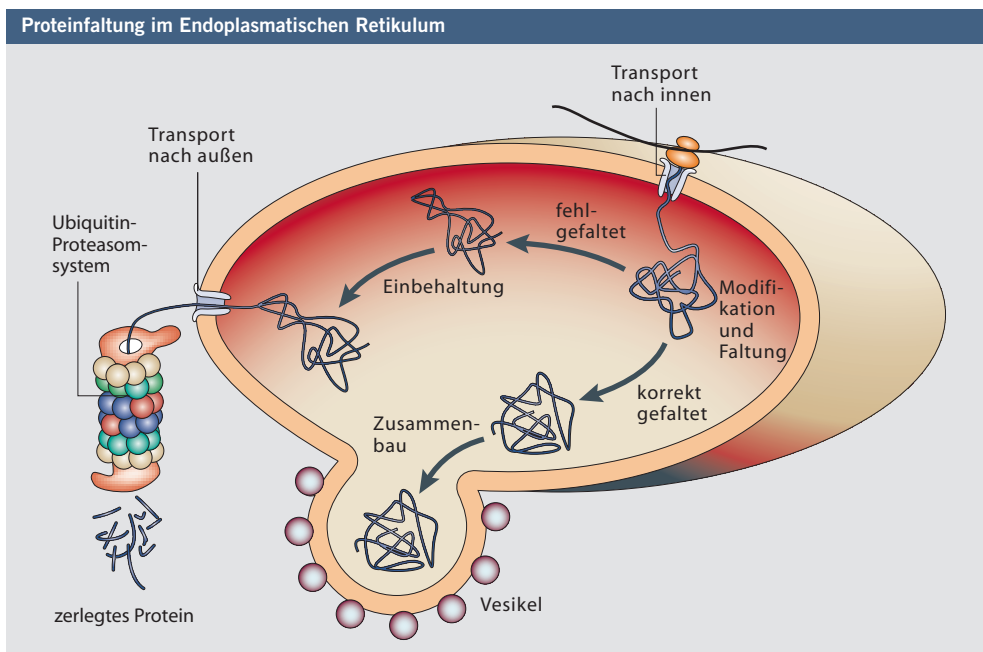
Diese Klumpen lassen sich enzymatisch nicht aufspalten. Ihre geordnete Struktur gibt ihnen kristalline Eigenschaften: Sie bestehen aus langgestreckten Fäden (Fibrillen), zu denen sich jeweils identische Proteine in dicht aufeinandergepackten β -Faltblättern zusammengeformt haben. Es gibt etwa 20 verschiedene Proteine, die als Bausteine solcher Fibrillen dienen können. Jedes von ihnen ist mit einer anderen Krankheit verknüpft. Bei einer systemischen Amyloidose, die Dobson hier sah, werden die Vorläufer dieser Klumpen durch den Blutkreislauf von ihrem Entstehungsort zu ihrem Ablagerungsort transportiert. Klinisch bedeutsamer sind die lokalisierten Amyloidosen. Sie betreffen vor allem das zentrale Nervensystem. Ihre bekannteste Vertreterin ist die Alzheimersche Krankheit, bei der sich unlösliche β -amyloid-Klumpen im Gehirn ansammeln.

Die Bausteine der β -amyloid-Klumpen entstehen durch proteolytische Spaltung aus APP, dem Amyloid-Precursor-Protein, das auch bei gesunden Menschen vorkommt. Lösliche β -amyloid-Proteine sind ein regulärer Bestandteil des Gehirngewebes. Wie kommt es dann bei Alzheimer-Patienten zur massiven Verklumpung dieser Proteine? Vermutlich durch einen Fehler bei der Proteinfaltung. Normalerweise verbergen sich hydrophobe Aminosäuren gleich nach Beginn der Faltung im Inneren des Proteins – zeigen sie nämlich zu lange nach außen, dann suchen sie schnell die Nähe von wasserabsto-

so wie wir uns beim Einschlafen die bequemste Lage suchen, in der wir uns möglichst wenig bewegen müssen. Das notwendige Gefälle auf dem Weg zum gefalteten Protein schränkt die astronomisch hohe Zahl der theoretischen Möglichkeiten erheblich ein. Feste Reaktionswege sind nicht nötig, jedes Protein sucht sich seinen eigenen Weg zur natürlichen Form durch einen Trichter abnehmender Energie. Verbindet man einem Golfspieler die

tein vom richtigen Weg abbringen und zu einer Missfaltung führen können.

Eine Mutation, die zum Austausch einer einzigen Aminosäure führt, reicht aus, um ein Protein gleichsam im Energiegebirge abstürzen zu lassen. Dann kann es vorkommen, dass sich ein Übermaß falsch gefalteter Proteine wie eine wilde Kippe molekularen Mülls anhäuft. Das ist bei den Amyloidosen der Fall.



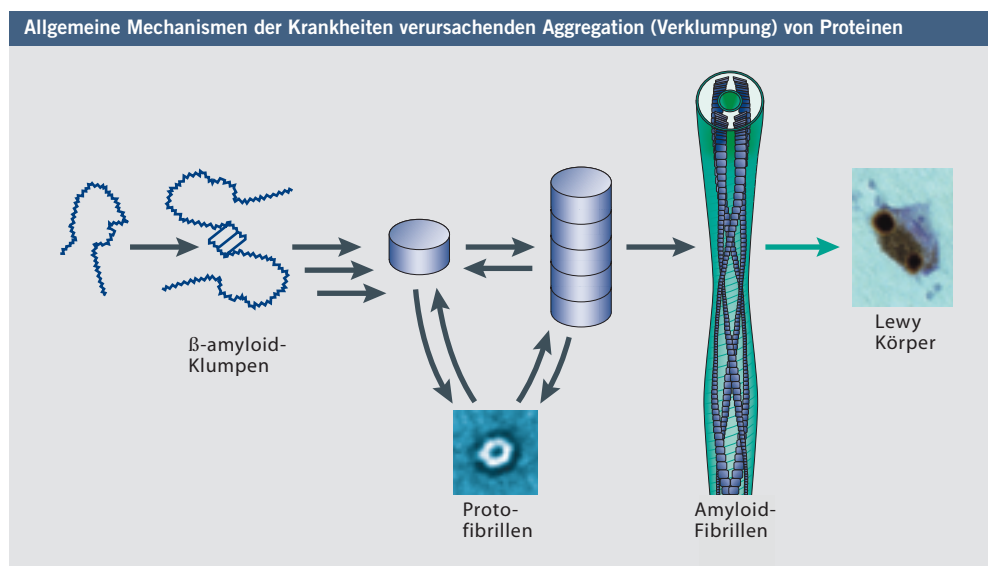
3 Frisch synthetisierte Proteinketten werden in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie verschiedene Modifikationen erfahren. Unter anderem helfen ihnen molekulare Anstandsdamen »chaperone proteins« (nicht eingezeichnet), sich korrekt zu falten. Richtig gefaltete Proteine werden in den Golgi-Komplex transportiert, wo sie in Membranen (Vesikel) eingepackt und zu ihrem Bestimmungsort geschickt werden. Fehlgefaltete Proteine, die von einem Kontrollmechanismus aufgespürt werden, bleiben dagegen zunächst im Endoplasmatischen Retikulum. Sie gelangen über andere Reaktionswege in das Ubiquitin Proteasomsystem, wo sie zerlegt werden.

βenden Gruppen anderer Proteine und formen unlösliche Aggregate. So könnte auch die Aggregation der β-amyloid-Klumpen zustandekommen – durch eine partielle Entfaltung, bei der bisher normale Proteine plötzlich ausrasten und ihre hydrophoben Abschnitte aggregationsbereit nach außen kehren.

Hypothese nach einem langen Wochenende

Was wäre aber, wenn die fibrilläre Verklumpung die Regel und die korrekte Faltung die Ausnahme ist? Dieser Gedanke kam Dobson, nachdem einer seiner Post-Docs bei der Rückkehr von einem langen Wochenende die Proteinlösung, die er im NMR-Probenröhrchen zurückgelassen hatte, in ein Gel verwandelt vorfand. Das kam bei Proteinen manchmal vor. Diesmal jedoch liefen gerade die NMR-Versuchsreihen mit mutierten Lysozymen, um die Entstehung der Amyloidose zu erforschen. Warum sollte man also nicht das Gel, das aus den Andockstellen von intrazellulären Signalproteinen, den SH3-Domänen, entstanden war, spektroskopisch analysieren? Was man sah, waren flach aufeinander gepackte β-Faltblätter, fibrillär miteinander verbacken wie Wäscheklammern im Doppelpack. Das war erstaunlich, weil die SH3-Untereinheiten als regulärer Baustein lebenswichtiger Proteine nicht als amyloidogen bekannt waren.

Kann also jedes Protein fibrillär verklumpen? Selbst Myoglobin ließ sich unter bestimmten Bedingungen in fibrilläre Aggregate verwandeln, erkannte Dobson – und formulierte folgende Hypothese: Nimmt man an, dass ein Protein durchschnittlich aus 300 Aminosäuren besteht, dann lassen sich 20 hoch 300 mögliche Proteine herstellen – eine Zahl von schier unendlicher Größe. Ein Mensch kommt mit etwa 100 000 Proteinen aus, einem verschwindend kleinen Bruchteil davon. Offenbar hat die Natur während der Evolution nur diejenigen Proteine als Funktionsträger selektiert, deren Primärsequenz sich seitenkettengetrieben falten kann – mit intramolekular abgesättigten Wasserstoffbrücken und nach innen gepackten hydrophoben Resten. Alle anderen Primärsequenzen falten sich rückgratgetrieben zu wohlgeordneten, aber funktionslosen Fibrillen. Unter ge-



4 Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson werden durch fehlgefaltete Proteine verursacht, die sich zunächst zu Protofibrillen und anschließend zu Amyloid-Fibrillen zusammenlagern. Bei Parkinson-Patienten sind die Lewy Körper typische Erkennungszeichen für die Krankheit.

wissen Bedingungen – dazu gehören Mutationen, denaturierende Chemikalien oder einfach das Altern – fallen die funktionstragenden Proteine zurück auf die primitive Stufe des fibrillären Einerleis und verursachen dadurch degenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Rinderwahnsinn oder Typ-2-Diabetes. Therapeutisch käme es also darauf an, die gefaltete Form der funktionsfähigen Proteine zu stabilisieren.

Frankfurt als Knoten im europäischen Netz

Nun gibt es freilich nicht nur den korrekt gefalteten und den fibrillär retardierten Zustand eines Proteins, sondern auch korrekt entfaltete Proteine, wie die Forscher aus der Analyse des Humangenoms gelernt haben. Deren Funktion aufzuklären, zählt genauso zu den Forschungsschwerpunkten von Harald Schwalbe wie die Beobachtung der ganz schnell durchlaufenen Übergangszustände zwischen den verschiedenen Formen eines Proteins. Am Diagramm der Proteinstadien erläutert er die Logik seines Forschungsprogramms. »In meiner Doktorarbeit habe ich die Struktur eines gefalteten Proteins untersucht, als Post-Doc die eines entfaltenen, und jetzt bin ich den Übergängen auf der Spur.« Das ist eine Frage von Millisekunden – und stößt an die äußersten Grenzen der gegenwärtigen Strukturbiologie. Als Professor am MIT im amerikanischen Cambridge war es Schwalbe dennoch gelungen, die Übergangs-

struktur eines Proteins strukturell dingfest zu machen – in einer Sackgasse übrigens, einer vorübergehend falschen Faltung.

Solche Sackgassen und Irrwege der Proteinfaltung mit Hilfe der NMR-Technologie zu identifizieren, ist auch das Anliegen des europäischen Forschungsprojekts »Understanding Protein Misfolding and Aggregation by NMR«, in dem Schwalbe unter anderem mit Nobelpreisträger Kurt Wüthrich und Chris Dobson zusammen die Wissenslücke zwischen genetischer Information und Proteinfunktion weiter schließen will.

Oxford, Zürich, Utrecht, Florenz, Stockholm, Kopenhagen, Tallinn und Frankfurt sind die Knoten dieses Forschungsnetzes, das Schwalbe zusammen mit Kurt Wüthrich und Chris Dobson innerhalb des sechsten Rahmenprogramms der Europäischen Kommission ausgeworfen hat.

»Manche Forscher meinen ja, dass die Proteinfaltung ein System ist, das vielleicht gar keinen expliziten Regeln folgt«, sagt Harald Schwalbe. »Aber je höher man den Abstraktionsgrad wählt, desto eher wird man eine Regel finden.« ♦

Der Autor

Joachim Pietzsch, 47, Diplom-Journalist (Dortmund) mit Physik (Hamburg), arbeitete nach einer Lehrzeit im Deutschen Krebsforschungszentrum fast 15 Jahre lang in der globalen Unternehmens- und Forschungskommunikation von Hoechst und Aventis, bevor er die Freiheit eines selbständigen Wissenschaftsjournalisten wählte. Er war langjähriger Autor und Ideengeber für *Future – The Aventis Magazine* und begründete zusammen mit der Nature Publishing Group die *Horizon Symposia – Connecting Science to Life*.