

## Biochemie und Molekularbiologie 2003

*Hochdurchsatzmethoden führen zu ersten Erfolgen bei der Vorhersage der biologischen Aktivität funktionell nicht charakterisierter Proteine anhand von Strukturhomologien. Proteintherapeutika halten Einzug in den medizinischen Alltag. Die RNA, in ihrer Bedeutung lange unterschätzt, hat mit ihren verschiedenen Formen in Grundlagen- und Pharmaforschung ein Comeback erlebt.*

### Proteinkristallographie im Zeitalter der Strukturgenomik

Abb. 1. Aus der Strukturgenomik: Gab-Protein aus *E. coli* mit Strukturhomologie zu den Fe<sup>II</sup>-haltigen 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen.

◆ Der Trendbericht „Neue Proteinstrukturen“ im Jahr 2000 endete mit der Frage, ob die klassische Proteinkristallographie nach der Strukturanalyse des Ribosoms ihren Zenit überschritten hat und ob wir künftig mit Strukturen funktionell nicht charakterisierter Proteine überhäuft werden.<sup>1)</sup> Wir möchten, ausgehend

von dieser Frage, an Beispielen aus dem vergangenen Jahr Eindrücke von der Entwicklung der „klassischen Proteinkristallographie“ und der Strukturgenomik vermitteln.

#### Strukturgenomik

◆ Unter dem Begriff „Strukturgenomik“ versteht man die Strukturbestimmung zahlreicher Proteine eines Genoms durch eine Institution oder ein Konsortium, unabhängig davon, ob diese Proteine bereits funktionell charakterisiert wurden oder nicht.<sup>2)</sup> Durch neue Techniken und Automatisierung soll der Durchsatz bei der Strukturbestimmung deutlich erhöht werden, wie es bei der Bestimmung der Genomsequenzen in beeindruckender Weise gelungen ist. Seit der Gründung der ersten Initiativen dieser Art vor etwa fünf Jahren haben diese nun ihre „Produktionsphase“ erreicht.

Die Ziele waren hoch gesteckt: jedes Konsortium wollte pro Jahr Hunderte von Strukturen produzieren. Konnte dieser Durchsatz erreicht werden? Ein Korrespondent von *Science* schrieb dazu bereits Ende 2002 nach Besuch der Strukturgenomik-Konferenz in Berlin, dass die Pipelines der Initiativen Lecks

haben und statt einer Flut nur ein Rinnsal neuer Strukturen produzieren. Zweifellos wird der ursprünglich hoch angesetzte Durchsatz gegenwärtig noch nicht erreicht. Die Ursache ist darin zu sehen, dass die Strukturbestimmung sich (noch?) nicht in dem Maße automatisieren lässt wie die Genomsequenzierung. Auf dem Weg von der Gensequenz zur Proteinstruktur gibt es viele Hürden, die sich nicht mit einer Standardmethode überwinden lassen, insbesondere die lösliche Expression und Kristallisation der Proteine. Dies sind die Lecks, die dazu führen, dass von 100 anvisierten Zielproteinen zunächst nicht mehr als zehn die Pipeline als verfeinerte Struktur verlassen, bei den eukaryotischen oder menschlichen Proteinen deutlich weniger als bei den bakteriellen Proteinen. Nach der zentralen Datenbank <http://targetdb.pdb.org> wurden bis Ende November 2003 insgesamt 535 Strukturen bestimmt, etwa 400 davon in Nordamerika.

Dennoch ist davon auszugehen, dass mit neuen Hochdurchsatzmethoden und der Automatisierung die Kosten pro Proteinstruktur gesenkt werden und der Durchsatz zukünftig noch erhöht wird. Ein Groß-



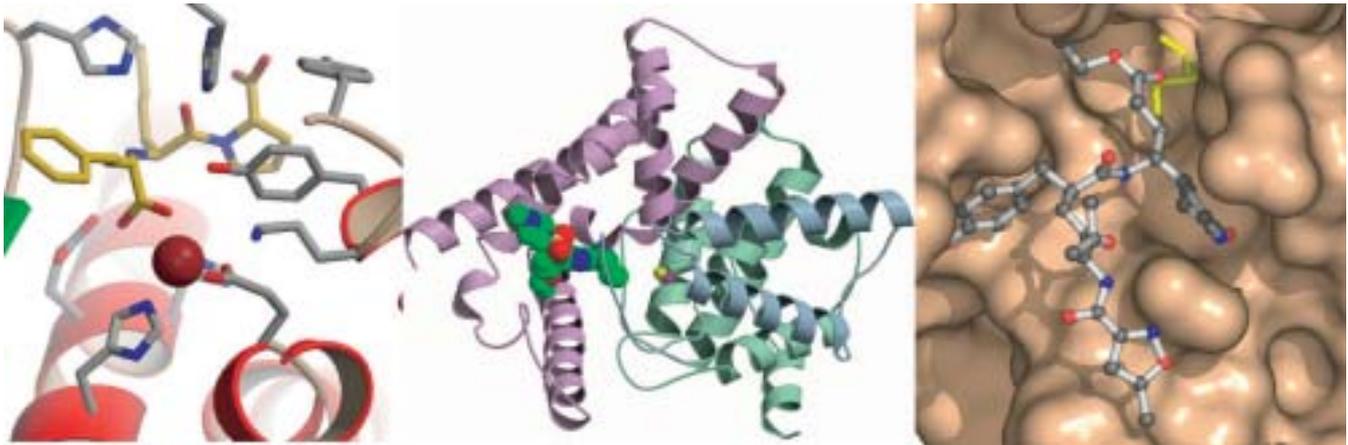


Abb. 2. **Wirkstoffe in Aktion:** Links: Bindung von Lisinopril an das Angiotensin-konvertierende Enzym mit Zinkion (rot). Mitte: Inhibierung der PDE-5 durch Sildenafil. Rechts: molekulare Oberfläche des aktiven Zentrums einer Coronavirus-Protease mit gebundenem synthetischem Inhibitor und katalytischem Cystein-Nukleophil (gelb).

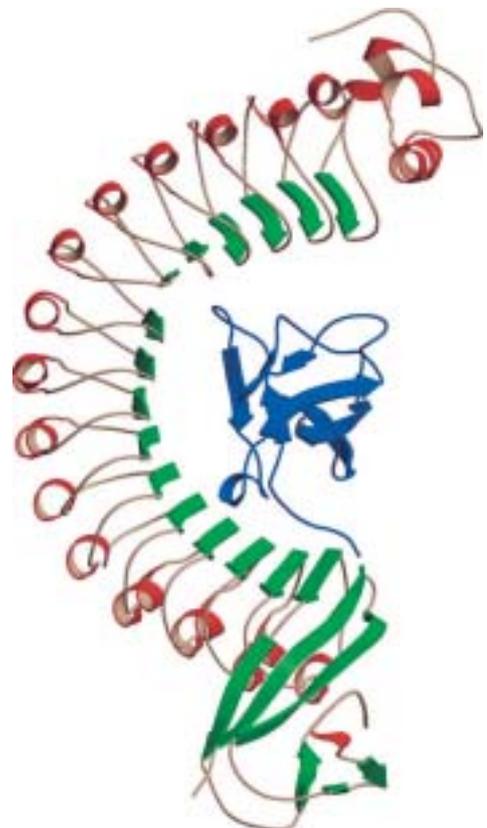
teil dieser Methoden und die Infrastruktur an Synchrotronstrahlrohren kommt zudem auch akademischen Projekten zugute. Schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob mit dem Hochdurchsatz der Strukturbestimmung auch ein adäquater Gewinn an biologisch relevanter Information einhergeht. Hier schwingt die eingangs erwähnte Befürchtung mit, dass mit der „Überhäufung“ nicht funktionell charakterisierter Proteine eben kein großer Erkenntnisgewinn über das bloße Resultat einer neuen Proteinfaltung hinaus erhalten wird. Während mit der Strukturbestimmung auf der Grundlage funktioneller Untersuchungen bisher häufig ein Vorschlag für die molekulare Funktionsweise des Proteins präsentiert werden konnte, wird künftig zunehmend mit der Strukturbestimmung eines funktionell noch nicht charakterisierten Genprodukts zunächst nur eine Struktur in der Datenbank hinterlegt. Hier müssen Biochemiker diese Information später zur Interpretation eigener funktioneller Studien nutzen. Generell wird der biologische Erkenntnisgewinn der Strukturbestimmung funktionell nicht charakterisierter Proteine zunächst sicherlich geringer ausfallen als für ein gut untersuchtes Protein. Jedoch können im Zusammenspiel mit anderen Ansätzen der Proteomik und Bioinformatik später neue Erkennt-

nisse erlangt und Felder erschlossen werden, die mit klassischen Ansätzen noch lange brach gelegen hätten. Hier sind Hochdurchsatz und klassischer Ansatz komplementär.

Da Tertiärstrukturen deutlich besser konserviert sind als Primärstrukturen, führte die Strukturbestimmung tatsächlich häufig zu unerwarteten Homologien, die Hinweise auf die biologische Aktivität des Proteins geben (Abbildung 1). So bestimmte das New-York-Strukturgenomik-Konsortium die Struktur des funktionell nicht charakterisierten Gab-Proteins des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Operons aus *E. coli* (1JR7), wobei sich eine Ähnlichkeit zu Enzymen aus der Gruppe der Fe<sup>II</sup>-haltigen 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen herausstellte.<sup>3)</sup> Damit ist zwar die katalytische Aktivität mit großer Wahrscheinlichkeit erkannt, das Substrat bleibt aber noch im Dunkeln, da die Enzyme dieser Familie eine große Vielfalt an Substanzen oxidieren. Ein weiteres Beispiel für eine unerwartete Homologie erbrachte die Strukturbestimmung des Proteins yggF (1NXZ) aus *Haemophilus influenzae* durch das North-east-Strukturgenomik-Konsortium: dieses Protein weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu RNA-Methyltransferasen auf.<sup>4)</sup> Jedoch ist auch beim Rückschluss von der Strukturähnlichkeit zu ähnlicher Funktion zumindest Vorsicht ange-

bracht. So bestimmten wir im vergangenen Jahr die Struktur einer Glucosidase mit einem NAD<sup>+</sup>-Kofaktor in unmittelbarer Nähe des Maltose-Substrates.<sup>5)</sup> Die Glucosidase hat eine verblüffende strukturelle Ähnlichkeit zur Lactat-Dehydrogenase. Die Struktur dieses Proteins wurde ebenfalls von einem Strukturgenomik-Konsortium bestimmt. Ohne die bio-

Abb. 3. Anbindung von Internalin A des Pathogens *L. monocytogenes* (rot/grün) an die N-terminale Domäne des menschlichen E-Cadherin-Rezeptors (blau).



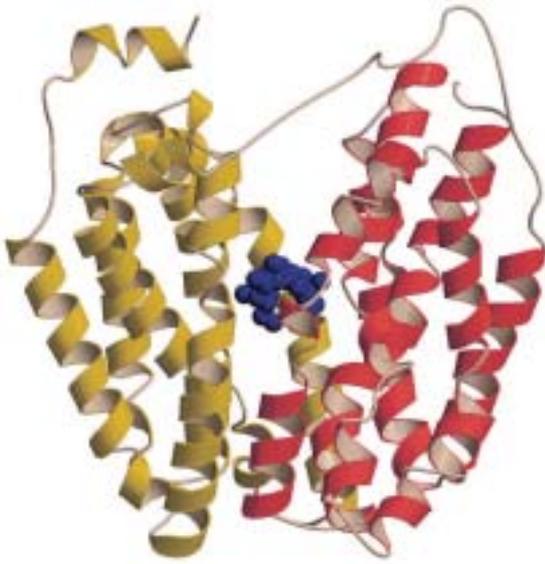


Abb. 4. Lactose-Permease mit gebundenem Lactose-Homolog (blau): Der Membrantransport soll durch eine Rotation der zwei Domänen (gelb und rot) des Proteins bewerkstelligt werden, wobei sich die Bindungstasche zur periplasmatischen Seite öffnet.

chemischen Daten zur hydrolytischen Aktivität des Enzyms wäre die Strukturhomologie als Weg zur Funktionsbestimmung hier eher irreführend.

#### Wirkstoffe in Aktion

◆ Eine wichtige praktische Anwendung der Proteinkristallographie ist das rationale Wirkstoffdesign auf der Grundlage von Komplexen des Proteins mit vorhandenen und potentiellen Wirkstoffen. Die meisten

dieser Strukturen verbleiben unverändert in den Archiven der Pharmafirmen, jedoch seien hier einige publizierte Highlights des vergangenen Jahres angeführt: Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) spaltet das His-Leu-Dipeptid des Angiotensins I ab, unter Bildung des gefäßverengend wirkenden Angiotensin II. ACE-Inhibitoren werden u. a. zur Therapie von Bluthochdruck und Herzversagen eingesetzt. Die Struktur des Proteins mit dem Wirkstoff Prinivil (Zestril) (1086<sup>6)</sup>) eröffnet die Möglichkeit des rationalen Designs von neuen Wirkstoffen mit veränderten pharmakologischen Profilen (Abbildung 2, links). Ein anderer buchstäblich potenter Inhibitor ist das Sildenafil, vor allem unter dem Handelsnamen Viagra bekannt. Sung und Mitarbeiter bestimmten die Bindung dieses Wirkstoffes an seinem Zielort, der humanen Phosphodiesterase 5 (1UDT<sup>7)</sup>) (Abbildung 2, Mitte).

Das Wirken dieser Medikamente wird vermutlich im aktiven Zentrum der Cytochrom-P450-Enzyme beendet, die oxidativ mehr als 90 % aller Wirkstoffe abbauen. Die Strukturaufklärung einer Isoform dieser Enzyme im Komplex mit dem Wirkstoff Warfarin (1OG2<sup>8)</sup>) zeigt eine große Sub-

stratbindetasche, wobei das Warfarin nicht in unmittelbarer Nähe der Hämgruppe gebunden hat. Dies könnte die primäre Bindestelle für Substrate sein, es ist jedoch noch genug Platz für ein weiteres Substratmolekül vorhanden. In diesem Fall würde das Warfarin einen Teil der Substratbindetasche bilden, was sowohl die allosterische Aktivierung des Enzyms durch eine Reihe von Substanzen erklären würde als auch die durch P450-Enzyme vermittelten Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen.

Bakterielle und virale Proteine können eine Rolle als Wirkstofftargets zur Abwehr von Infektionskrankheiten spielen. Die Furcht vor der Epidemie SARS beherrschte die Schlagzeilen am Anfang des vorigen Jahres. Die Protease des infektiösen Coronavirus ist ein möglicher Angriffspunkt für eine Therapie dieser Krankheit, da die Aktivität dieses Enzyms für die proteolytische Prozessierung von zwei Replicase-Polypeptiden des Virus notwendig ist. Nachdem zunächst die Strukturen von verwandten Coronaviren im Komplex mit synthetischen Inhibitoren aufgeklärt wurden (1P9T<sup>9)</sup>) (Abbildung 2, rechts), gelang später auch die Strukturbestimmung der SARS-Coronavirus-Protease (1UJ1<sup>10)</sup>).

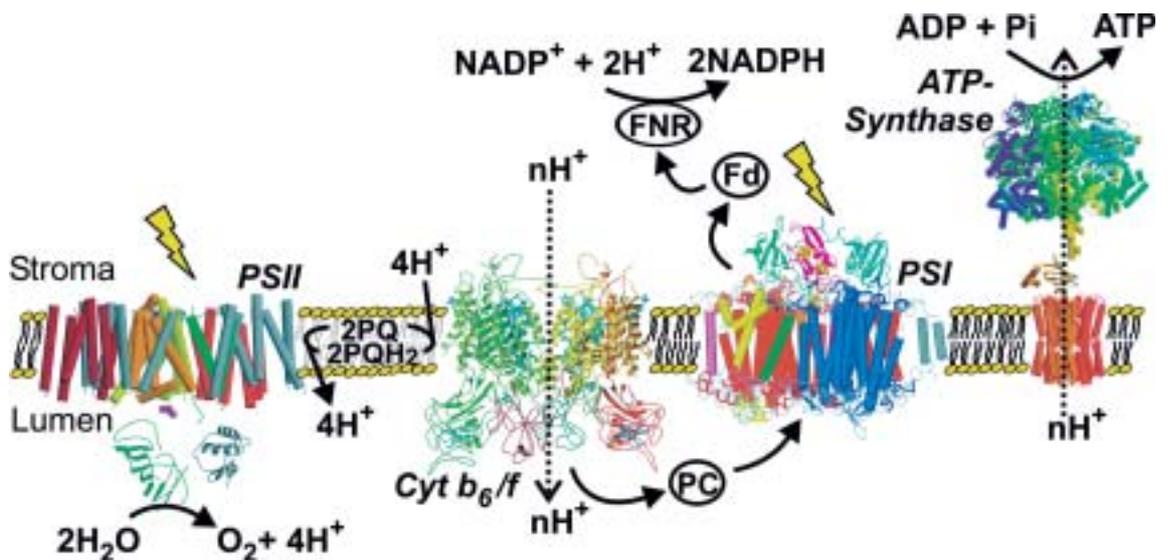


Abb. 5. Strukturbiologie der oxygenen Photosynthese. Die Photosysteme I (PSI) und II (PSII) werden durch Lichtenergie angeregt, PSII erzeugt dabei Sauerstoff. Elektronen werden von PSII über das lipophile Plastochinon (PQ) auf den Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex (Cyt  $b_6/f$ ) und von dort über Plastocyanin (PC) auf PSI übertragen, das die Elektronen über Ferredoxin (Fd) der Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) zur Reduktion von NADP<sup>+</sup> zur Verfügung stellt. Der während des Elektronentransports aufgebaute elektrochemische Protonengradient wird von der ATP-Synthase zum Aufbau von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt.

Zum Eindringen in die Wirtszellen nutzen pathogene Bakterien häufig spezifische Interaktionen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche. Das in Lebensmitteln vorkommende Pathogen *Listeria monocytogenes* dringt zunächst in die Epithelzellen im Darm ein. Der Schritt der Bindung des bakteriellen Proteins Internalin A an die N-terminale Domäne des menschlichen Rezeptors E-Cadherin konnte nun auf molekularer Ebene visualisiert werden (1O6S).<sup>11)</sup> Eine Domäne mit der für leucinreiche Wiederholungsmotive typischen Hufeisenfaltung erkennt dabei spezifisch den Rezeptor des menschlichen Wirts (Abbildung 3).

### Membrankanäle

◆ Die Strukturen von Membrankanälen sind zweifelsohne ein Highlight der letzten Jahre. Auch im vergangenen Jahr wurden weitere Fortschritte erzielt, insbesondere mit der Strukturbestimmung eines potenzielgesteuerten (1ORQ<sup>12)</sup>) sowie eines geschlossenen (1P7B<sup>13)</sup>) Kaliumkanals, der eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen spielt. Diese Strukturen wurden erst kürzlich im Hinblick auf die Verleihung des Chemie-Nobelpreises auf diesem Gebiet in den *Nachrichten* berücksichtigt (Nachr. Chem. 2003, 51, 1234). Der elektrochemische Ionengradient kann von speziellen Transportproteinen genutzt werden, um Verbindungen entgegen einem Konzentrationsgradienten zu transportieren. Hier konnte mit der Lactose-Permease aus *E. coli* ein biochemisch bereits besonders gut charakterisiertes Transportprotein strukturell aufgeklärt werden (1PV6<sup>14)</sup>) (Abbildung 4). Die Permease besteht aus zwei Domänen mit jeweils sechs Transmembranhelices, die so angeordnet sind, dass eine große hydrophile Tasche gebildet wird, welche zur cytosolischen Seite geöffnet ist. Mit dem Transport des Substrates könnte eine Konformationsänderung in Form einer Rotation der Domänen verbunden sein, wobei die

Tasche mit dem gebundenen Substrat sich nun zur periplasmatischen Seite öffnet. Für diese Konformation liegen aber noch keine Strukturdaten vor.

Einen Protonengradienten zum Export von Wirkstoffen aus der Zelle nutzen Multidrug-Exporter, die für Probleme sowohl bei der Krebschemotherapie als auch bei der Therapie von bakteriellen Infektionen sorgen. Nach der Strukturaufklärung des Transporters AcrB aus *E. coli*<sup>15)</sup> wurden nun Komplexe mit mehreren Liganden bestimmt (Rhodamin 6G, Ethidium, Dequalinium und Ciprofloxacin).<sup>16)</sup> Diese Verbindungen binden an eine Reihe von Orten des etwa 5000 Å<sup>3</sup> großen zentralen Hohlraums des Trimers, was die breite Substratspezifität des Transporters erklärt.

### Bioenergetik

◆ Besondere Fortschritte sind für 2003 bei der Untersuchung weiterer Mitglieder der membranständigen Elektronentransportketten der oxygenen Photosynthese und der mitochondrialen Atmungskette zu verzeichnen. Mit der Strukturbestimmung des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes (1UM3<sup>17)</sup>) sowie den Röntgenstrukturen der Photosysteme I<sup>18)</sup> und II<sup>19,20)</sup> und der beteiligten kleineren löslichen Proteine sind damit alle Komponenten des Elektronentransportes und der Protonentranslokation der oxygenen Photosynthese strukturell charakterisiert (Abbildung 5). Der Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex überträgt Elektronen zwischen den Photosystemen I und II und erzeugt dabei den später zur Energiegewinnung genutzten elektrochemischen Protonengradienten.

In der Gruppe von Iwata gelang die Strukturaufklärung der membranständigen Succinat-Dehydrogenase aus *E. coli* bei 2,6 Å Auflösung (1NEK, 1NEN)<sup>21)</sup> (Abbildung 6). Diese ist verwandt mit dem Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase) der mitochondrialen Atmungskette und kann als Modell zu dessen Beschreibung dienen. Aus der räumlichen Anordnung aller am

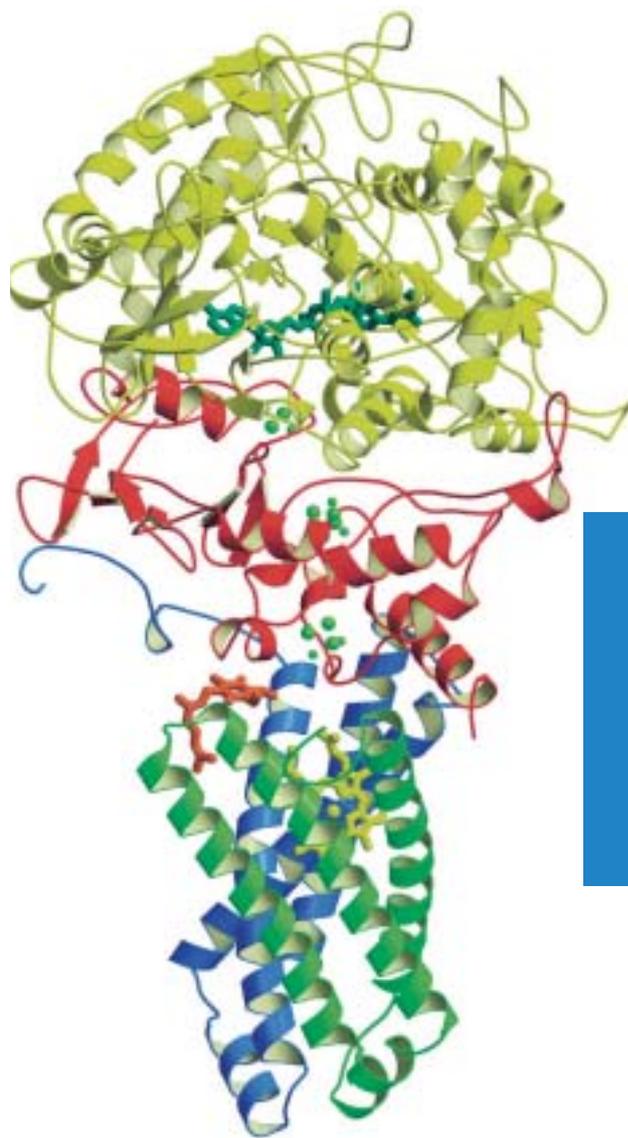
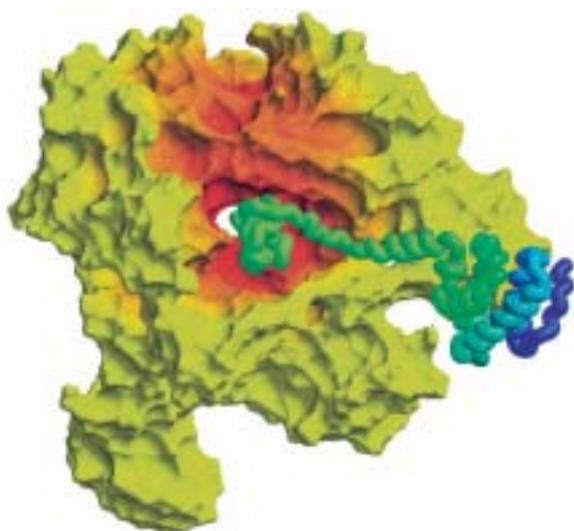


Abb. 6. Struktur der Succinat-Dehydrogenase aus *E. coli*, aufgebaut aus den cytoplasmatischen Untereinheiten A (gelb) und B (rot), und den Transmembran-Untereinheiten C (blau) und D (grün). Am Elektronentransfer nehmen die Cofaktoren Ubichinon (orange), mehrere Eisen-Schwefel-Cluster (grün) und FAD (blaugrün) teil, das gebundene Häm (gelb) verringert vermutlich die Bildung toxischer reaktiver Sauerstoffspezies.

Elektronentransport beteiligten Cofaktoren und der sie koordinierenden Reste wird deutlich, dass die Natur in den Komplex II zahlreiche Schutzmechanismen gegen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eingebaut hat. Eine Reihe von Erbkrankheiten des Menschen, die in Aminosäure-Austauschen im Komplex II resultieren, schädigen offenbar genau diese Schutzfunktionen, und die Ursache für die assoziierten Schädigungen könnte in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zu suchen sein.

Abb. 7. **Transkription**

Bindung des Elongationsfaktors TFIIIS an die RNA-Polymerase II. Die C-terminale Domäne von TFIIIS (Röhrenmodell, blau bis grün in C-terminale Richtung gefärbt) dringt tief in einen Tunnel zum aktiven Zentrum der RNA-Polymerase II (Oberflächendarstellung) vor.

◆ Die RNA-Polymerase II transkribiert in höheren Lebewesen proteinkodierende Gene in messengerRNA und geht dabei normalerweise prozessiv vor. Bestimmte DNA-Sequenzen können jedoch eine Rückwärtsbewegung der RNA-Polymerase II in einem nichtproduktiven Zustand führen. Aus diesem kann sie erst wieder durch Bindung des Elongationsfaktors TFIIIS befreit werden, der die Nuclease-Aktivität der RNA-Polymerase II erhöht und ihr ermöglicht, Teile des neusynthetisierten RNA-

Stranges abzubauen. Die RNA-Polymerase II im Komplex mit TFIIIS (IPQV)<sup>22)</sup> (Abbildung 7) unterscheidet sich in ihrer Struktur deutlich von der freien RNA-Polymerase II. Eine Domäne des Elongationsfaktors dringt dabei tief in einen Tunnel in der RNA-Polymerase ein und löst eine Umordnung des aktiven Zentrums aus, die vermutlich die nucleolytische Aktivität begünstigt. Dabei wird eine Schlaufenregion von TFIIIS mit sauren Resten nahe an das 3'-Ende der gebundenen RNA herangeführt und ist womöglich an der Bindung eines Metallions in einem Bimetallzentrum beteiligt, das die Spaltung des RNA-Stranges katalysiert.

### Enzymkatalyse

◆ Zum Schluss noch ein kontrovers diskutiertes Beispiel aus dem Bereich der Enzymkatalyse. Die Kristallographie kann molekulare Strukturen bis zu atomarer Auflösung sichtbar machen. Diese hochaufgelöste und weitgehend „objektive“ Elektronendichte muss jedoch zur Erstellung eines atomaren Modells stets interpretiert werden. Allen und Mitarbeiter untersuchten die Struktur einer Phosphoglucomutase in Gegenwart der natürlichen Substrate des Enzyms, welches die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom Substrat auf eine Asparaginsäure des Enzyms katalysiert (1O03).<sup>23)</sup> Die Elektronendichte zeigte bei einer hohen Auflösung von 1,2 Å die Gegenwart eines Liganden mit fünfbindigem Atom (Abbildung 8). Der Ligand wurde als Phosphoran-Intermediat (pentavalenter Phosphor) interpretiert, womit erstmals die direkte Visualisierung dieses für viele In-line-Phosphoryl-Transferreaktionen angenommenen Übergangszustands oder Intermediats gelungen wäre. Später kamen jedoch Zweifel an der Interpretation der Autoren auf und die trigonal-planare Gruppe wurde als  $MgF_3^-$ -Ion gedeutet, welches sich im Kristallisationspuffer aus 10 mM  $Mg^{2+}$  und 100 mM  $NH_4F$  gebildet haben sollte und als Analogon an Stelle des energiereichen Phospho-

ran-Übergangszustands bindet.<sup>24)</sup> Die Autoren der Strukturanalyse bleiben jedoch bei ihrer Deutung und führen als stärkstes Argument für die Gegenwart eines Phosphoran-Intermediats die Stärke des Signals der anomalen Dichtekarte an, wobei sich P und Mg um mehr als den Faktor zwei unterscheiden sollten.<sup>25)</sup>

Norbert Sträter

Fakultät für Chemie und Mineralogie

Universität Leipzig

Timm Maier

Institut für Chemie, FU Berlin

strater@bbz.uni-leipzig.de

- 1) K. Niefind, *Nachr. Chem.* 2000, 48, 291.
- 2) T. Szyperki, *Nachr. Chem.* 2002, 50, 1128.
- 3) M. R. Chance et al., *Protein Sci.* 2002, 11, 723.
- 4) F. Forouhar, J. Shen, R. Xiao, T. B. Acton, G. T. Montelione, L. Tong, *Proteins* 2003, 53, 329.
- 5) J. A. Lodge, T. Maier, W. Liebl, V. Hoffmann, N. Sträter, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 19151.
- 6) R. Natesh, S. L. U. Schwager, E. D. Sturrock, K. R. Acharya, *Nature* 2003, 421, 551.
- 7) B.-J. Sung, K. Y. Hwang, et al., S. Ro, J. M. Cho, *Nature* 2003, 425, 98.
- 8) P. A. Williams, J. Cosme, A. Ward, H. C. Angove, D. M. Vinkovic, H. Jhoti, *Nature* 2003, 424, 464.
- 9) K. Anand, J. Ziebuhr, P. Wadhvani, J. R. Mesters, R. Hilgenfeld, *Science* 2003, 300, 1763.
- 10) H. Yang, M. Yang, Y. Ding, Y. Liu, Z. Lou, Z. Zhou, L. Sun, L. Mo, S. Ye, H. Pang, G. Gao, K. Anand, M. Bartlam, R. Hilgenfeld, Z. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 13190.
- 11) W.-D. Schubert, C. Urbanke, T. Ziehm, V. Beier, M. P. Machner, E. Domann, J. Wehland, T. Chakraborty, D. W. Heinz, *Cell* 2002, 111, 825.
- 12) Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* 2003, 423, 33.
- 13) A. Kuo, J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahmann, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki, D. A. Doyle, *Science* 2003, 300, 1922.
- 14) J. Abramson, I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, S. Iwata, *Science* 2003, 301, 610.
- 15) S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, A. Yamaguchi *Nature* 2002, 419, 587.
- 16) E. W. Yu, G. McDermott, H. I. Zgurskaya, H. Nikaido, D. E. Koshland Jr., *Science* 2003, 300, 976.

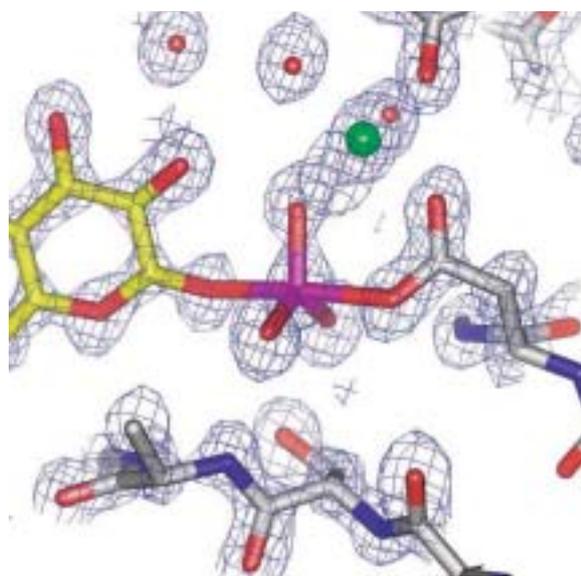


Abb. 8. Intermediat mit pentavalentem Phosphor oder „nur“ ein  $MgF_3^-$ -Ion als Analogon des Übergangszustands? Die 1,2-Å-Elektronendichte ist in Blau gezeigt.

- 17) G. Kurisu, H. Zhang, J. L. Smith, W. A. Cramer, *Science* 2003, 302, 1009
- 18) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, *Nature* 2001, 411, 909
- 19) A. Zouni, H.T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth, *Nature* 2001, 409, 739
- 20) N. Kamiya, J. R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 98
- 21) V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, S. Iwata, *Science* 2003, 299, 700
- 22) H. Kettenberger, K. J. Armache, P. Cramer, *Cell* 2003, 114, 347
- 23) S. D. Lahiri, G. Zhang, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *Science* 2003, 299, 2067.
- 24) G. M. Blackburn, N. H. Williams, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, *Science* 2003, 301, 1184c.
- 25) K. N. Allen, D. Dunaway-Mariano, *Science* 2003, 301, 1184d.



**Norbert Sträter** (Jahrgang 1965) studierte Chemie an der Universität Münster, wo er 1994 bei Bernt Krebs promovierte. Von 1994 bis 1997

war er als Postdoc bei William N. Lipscomb in Harvard. Anschließend wechselte er an das Institut für Chemie der FU Berlin (Labor Wolfram Saenger), wo er im Jahr 2001 habilitierte. Seit 2002 hat er die Professur für Strukturanalytik von Biopolymeren an der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig im Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrum inne. Seine Arbeitsgebiete sind die strukturelle Biochemie und die Proteinkristallographie.



**Timm Maier** (Jahrgang 1974) studierte Biochemie an der Universität Tübingen, und fertigte bei Wolfgang Voelter im Jahr 1999 seine Diplomarbeit an. Anschließend wechselte er an die Freie Universität Berlin, wo er bei Wolfram Saenger in seiner Doktorarbeit die Struktur von zwei Proteinen des humanen Sphingolipid-Stoffwechsels aufklärte. Nach der Promotion im Dezember 2003 begann er Anfang 2004 einen Postdoc-Aufenthalt in der Gruppe von Nenad Ban an der ETH Zürich und beschäftigt sich weiter mit der Kristallstrukturanalyse von Proteinen.

## Engineering therapeutischer Proteine

### Der Paradigmenwechsel zu den Biopharmazeutika

◆ Lange erschienen Proteine für die pharmazeutische Industrie wenig attraktiv. Als Haupthindernis für deren therapeutische Anwendung galt die fehlende orale Verfügbarkeit. Die Gentechnik wurde deshalb in erster Linie zur Herstellung rekombinanter Proteine als Wirkstoff-Targets für Struktur-Funktions-Analysen sowie zur Etablierung von Screening-Assays in der Medizinischen Chemie eingesetzt. Dagegen beschränkte sich die Produktion „therapeutischer Proteine“ zunächst auf klassische humane Biomoleküle, wie Insulin, Blutgerinnungsfaktoren oder Wachstumshormon, die sich in konventionellen Substitutionstherapien einsetzen ließen und dementsprechend große Märkte eroberten.

Die pessimistische Einschätzung hinsichtlich der Eignung von Proteinen als originäre „biopharmazeutische“ Wirkstoffe hat sich in den letzten Jahren allerdings gewandelt, wie unter anderem zwei jüngst erschienene Monographien belegen.<sup>1,2)</sup> Den Wendepunkt dieser rasanten Entwicklung illustriert vermutlich am besten Herceptin (Entwicklungsname: Trastuzumab), ein bei Genentech entwickelter humanisierter Antikörper (Abbildung 1), der in Kombination mit konventionellen Cytostatika zur Behandlung von metastatisierendem Brustkrebs eingesetzt wird. Dessen Entstehungsgeschichte, von der Entdeckung des Targets über die Entwicklung als Wirkstoff in einem Biotechnologie-Unternehmen bis zu den regulatorischen Entscheidungsprozessen, ist inzwischen in einem Sachbuch nachzulesen.<sup>3)</sup>

Proteine mit ihrer hochentwickelten molekularen Erkennungsfähigkeit sind den klassischen niedermolekularen Arzneimitteln zumindest im Hinblick auf die Spezifität der pharmakologischen Wirkung häufig überlegen. In der Regel ist ih-

re Toxizität geringer, da die Polypeptide letztlich auf physiologischem Weg zu Aminosäuren abgebaut werden. Der Nachteil der notwendigen Verabreichung über die Blutbahn durch Injektion oder Infusion wird gerade im Fall lebensbedrohlicher Erkrankungen von den Patienten in Kauf genommen. Das zunehmende Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen der Proteine bietet zudem die Möglichkeit, derartige Wirkstoffe für medizinische Anwendungen „maßzuschneidern“.

Dies betrifft nicht nur den biologischen Wirkmechanismus, sondern auch pharmakologische Parameter, die durch Variation der Aminosäuresequenz beeinflusst werden können: also Targetspezifität und -affinität sowie Pharmakokinetik und Toxizität/Metabolisierung (s. den Artikel „Neuartige Biopharmazeutika durch gezielte Manipulation pharmakologischer Parameter“, *Nachr. Chem.*, im Druck). Zudem eröffnen sich sogar andere, nicht mehr mit Eingriffen verbundene Darreichungswege.<sup>4)</sup> Aufgrund dieser Produktvorteile wird für Proteintherapeutika ein schnell wachsendes Marktpotential von über 59 Mrd. US\$ bis zum Jahr 2010 erwartet.<sup>5,6)</sup> Weltweit waren im September 2003 bereits 148 gentechnisch hergestellte Arzneimittel auf dem Markt. Davon haben 64 Biopharmazeutika, die insgesamt 30 Proteinwirkstoffe repräsentieren, erst in den letzten drei Jahren die Zulassung der Behörden erhalten.<sup>7)</sup>

### Neuartige therapeutische Proteine

◆ Das Anwendungspotential von durch Protein-Engineering gewonnenen Biopharmazeutika verdeutlichen einige in jüngerer Zeit zugelassene Medikamente sowie Produktkandidaten, die sich in fortgeschrittenen klinischen Prüfungsphasen befinden. Abgesehen von der hier zitierten Fachliteratur finden sich detaillierte Informationen zu deren Zusammensetzung und Eigenschaften im Fall der bereits zugelassenen Proteintherapeutika auf den Web Sites der U.S. Food and Drug Administration ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) oder der European