



„Wie ich zur Proteaseforschung kam oder, richtiger gesagt, wie die Proteaseforschung zu mir kam“

Robert Huber*

Protease · Proteinkristallographie · Röntgenbeugung · Strukturaufklärung

Alles begann an einem Tag im Jahr 1968, als mir Professor Ernst Auhagen (Abbildung 1), Leiter der Biochemieforschung bei Bayer, einen Besuch abstattete. Ich hatte ein kleines Laboratorium und Büro in der Schillerstraße am Münchener Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, das mit zwei Stühlen, einem Tisch, einem Richards-Kasten zum Bau von Proteinmodellen und einem Abzug ausgerüstet war.

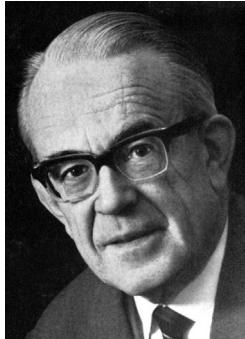


Abbildung 1. Ernst Auhagen.

Es war nicht einfach, sich an diesen sperrigen Gegenständen vorbeizuwängen, aber Auhagen war ein großer, schlanker Mann. Er wühlte in seiner Jackentasche und zog ein Reagenzglas hervor, an dessen Boden ich glitzernde Kristalle sehen konnte. Ein Chemiker forscht mit Augen und Nase. Ich öffnete deshalb das Gläschen, erstickte aber fast augenblicklich an dem intensiven Gestank von Ammoniak. Die Substanz war in konzentrierter Ammoniaklösung suspen-

diert, aus der sie zum Zwecke der finalen Aufreinigung kristallisiert worden war. Es war das bei Bayer produzierte Trasylol/Aprotinin, das, wie Auhagen mir erklärte, bei Eingriffen am Herzen zur Verminderung des Blutverlustes angewendet wurde. Es wurde in der Rinderlunge entdeckt und daraus isoliert und wirkte als Hemmstoff des von Kraut, Frey und Werle entdeckten Kallikrein-Kininogen-Systems, das bei der Regulation des Blutdrucks und vielen anderen physiologischen Prozessen eine zentrale Rolle spielt. (Kallikrein ist eine Trypsin-artige Protease, Kininogen ist eine Vorstufe der Kinin-Hormone.) Auhagen fragte mich, ob ich an einer kristallographischen und strukturellen Studie von Trasylol interessiert wäre. Ich war.

Bevor ich mit Trasylol/Aprotinin fortfahre, möchte ich einige Hintergründe erläutern und einen flüchtigen Blick auf die Situation 10 Jahre früher werfen: Ich hatte an der Technischen Hochschule München (THM) Chemie studiert und interessierte mich besonders für Mineralien und Kristalle, die ich auch bei meinen Klettertouren in den Alpen sammelte. Warum waren sie symmetrisch, hatten eine regelmäßige Gestalt, scharfe Kanten, glänzende Flächen und intensive Farben? Es war offensichtlich, dass es nur mittels Röntgenstrahlen gelingen würde, in das Innere zu schauen und eine Antwort zu finden. Ich fragte deshalb Professor Walter Hoppe (siehe Abbildung 3), ob ich meine Diplomarbeit und später auch die Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis an Günter Scheibes Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie an der THM (jetzt TUM) anfertigen könne.

Das Institut befand sich im Zentralgebäude der THM in der Luisenstraße und war damals, Ende der 50er Jahre, noch schwer von den Bombardierungen des Krieges gezeichnet. Heinz Gerischer war am Institut Professor für Elektrochemie, einer seiner Mitarbeiter war Gerhard Ertl. Unsere Wege kreuzten sich gelegentlich in dem alten Gebäude, wir nahmen aber keine Notiz voneinander. Unsere Forschungsobjekte waren in der Tat recht verschieden: Ich versuchte, das Innere von Kristallen (und Molekülen) sichtbar zu machen, er studierte ihre Oberfläche. Beide Forschungsfelder sollten sich als interessant und lohnend erweisen und dereinst mit Nobelpreisen gewürdigt werden.

In Deutschland war die molekulare Röntgenkristallographie damals ein vernachlässigtes Gebiet. Hoppe war hoch anerkannt für seine Erfindung und Konstruktion eines mechanischen Fourier-Synthesizers (elektronische Rechner für die Berechnung von Fourier-Serien waren noch nicht ver-

[*] Prof. R. Huber
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)
und
Universität Duisburg-Essen
Zentrum für Medizinische Biotechnologie
45117 Essen (Deutschland)
und
Cardiff University, School of Biosciences
Cardiff CF10 3US (Großbritannien)
und
Technische Universität München, Fakultät für Chemie
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

fügbar) und eines Einkristall-Diffraktometers (das später von Siemens vermarktet wurde) sowie für die Entwicklung von Methoden zur Kristallstrukturlösung. Wie wir heute wissen, bedeutete seine Entdeckung der Faltmolekülmethode^[1] zur Bestimmung der Orientierung und Position von Molekülen oder Molekülfragmenten bekannter Struktur in Patterson-Funktionen einer unbekannten Kristallstruktur eine Revolution der modernen Proteinkristallographie, denn die meisten Proteinstrukturen werden heute durch das auf sehr ähnlichen Prinzipien beruhende Verfahren des „molekularen Ersatzes“ gelöst, das Rossmann und Blow 1962 unabhängig entdeckten und entwickelten.^[2] Hoppes Veröffentlichung von 1957 wurde nicht sofort als ein Meilenstein erkannt, vielleicht weil sie auf Deutsch geschrieben war (obgleich so klar und prägnant, dass auch des Deutschen nicht mächtige Leser das Konzept leicht verstehen), vielleicht aber auch, weil die Analyse von Kristallen verwandter Moleküle – der Kern der Methode – in der Proteinkristallographie erst viele Jahre später wichtig wurde, als die Datenbasis der Proteinstrukturen auf eine genügende Größe angewachsen war. Zu jener Zeit wurden Patterson-Funktionen, die den Vektorsatz aller Atome in der Elementarzelle des Kristalls darstellen, und Faltmoleküle, die intra- oder intermolekularen Vektorsätze des Suchmodells, auf Transparenzpapier gezeichnet und per Hand gedreht und verschoben, bis beide zueinander passten. Dies konnte natürlich nur in zwei Dimensionen getan werden.

Als in den späten 50er Jahren Computer verfügbar wurden, begann ich mit der Entwicklung eines Programms für die Faltmolekülmethode. Ich bekam die Gelegenheit, es in einem herausfordernden Projekt anzuwenden, das mich mit einem neuen Forschungsfeld, der Biochemie, und berühmten Biochemikern, Peter Karlson (Abbildung 2) und Adolf Buten-

Hinzufügen und Entfernen von Atomen und Veränderung der Stereochemie gelang es mir, alle Substituenten, einschließlich der Wasserstoffatome und stereochemischen Zentren, zu lokalisieren und Ecdyson als $2\beta.3\beta.14\alpha.22\beta_F 25$ -Pentahydroxy- $\delta 7$ - 5β -cholesteron-6 zu identifizieren.^[3] Professor Wolfgang Steglich an der THM half mir mit dem erheblichen Nomenklaturproblem. Karlson war von meiner Entdeckung begeistert. Butenandt war als Präsident der Max-Planck-Gesellschaft für einen Doktoranden damals kaum erreichbar, er muss aber recht zufrieden damit gewesen sein, dass es in Insekten ein Hormon gab, das mit den von ihm 30 Jahre zuvor im Menschen entdeckten Sexualhormonen verwandt war, deren Erforschung ihm 1939 den Nobelpreis einbrachte. Zu dieser Zeit war Ecdyson die größte Molekül, dessen Struktur ohne die Einführung eines Schweratoms zur Phasenbestimmung gelöst worden war. Die Bestimmung der genauen Struktur schuf die Voraussetzung für die chemische Synthese des Ecdysons durch Forschungsgruppen bei Schering und Hoffmann-LaRoche – im Wettkampf mit dem kalifornischen Pharmaunternehmen Syntex –, und man vertraute darauf, dass Ecdyson eine neuartige Strategie für die Entwicklung von Insektiziden bieten könnte. Für mich war es die erste Begegnung mit der Pharmaindustrie.

Ich erfuhr später, dass Max Perutz von meinem Erfolg Kenntnis erlangte und gute Worte für mich einlegte, was für meine zukünftige Karriere hilfreich war und vor allem Walter Hoppe dazu brachte, dass er mir 1967 die Möglichkeit gab, eine kleine Arbeitsgruppe für die Proteinkristallographie zu gründen. Hoppes Arbeitskreis war inzwischen in die Schillerstraße an das Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung gezogen, wo sich auch mein Laboratorium befand. Dort isolierte ich zusammen mit Helmut Formanek aus Insektenlarven ein rotes Protein namens Erythrocyruorin. Durch klassischen isomorphen Schweratomersatz fanden wir – anfangs in niedriger, später dann in atomarer Auflösung –,^[4,5] dass die Polypeptidkette die gleiche Faltung besaß wie die von Perutz und Kendrew analysierten Moleküle Myoglobin und Hämoglobin.

Diese Entdeckung dokumentierte, dass Proteine in Säugetieren und Insekten – Spezies also, die in der Stammesentwicklung vor mehreren hundert Millionen Jahre divergierten – konserviert sind. Heute ist dies Lehrbuchwissen, abgeleitet aus der großen Menge von bekannten Gen- und Proteinsequenzen, stellte damals jedoch die erstmalige Beobachtung dieses Phänomens dar. Tatsächlich deckte sich der Befund mit dem, was ich bei einer völlig anderen chemischen Klasse, den Steroiden, am Beispiel des Ecdysons von Insekten und dem humanen Sexualhormonen gesehen hatte.

Mit dieser Arbeit war meine kleine Proteinkristallographiegruppe etabliert. Zu der Zeit, 1968, gab es weltweit nicht mehr als eine Handvoll solcher Gruppen, wir waren aber nun genügend Mitarbeiter, um ein neues Projekt – Trasylol/Aprotinin – in Angriff zu nehmen. Die Kristalle, die mir Auhagen gegeben hatte, waren gut geordnet und beugten bis zu hoher Auflösung (nach einigen Kunstgriffen und Austausch der Mutterlauge). Die Phasenbestimmung durch isomorphen Ersatz gelang problemlos. Ich konnte die erhaltene Elektronendichtekarte auf Basis der Aminosäuresequenz, die in zwei unabhängigen bestimmt und identischen (als Kalli-



Abbildung 2. Peter Karlson.

nandt (Abbildung 3) am Max-Planck-Institut für Biochemie, bekannt machte. Karlson und Butenandt hatten das Insektenverpuppungshormon Ecdyson isoliert, dessen Molekülstruktur und sogar Molekülmasse jedoch unbekannt waren. Man gab mir Kristalle, und ich nahm die ersten Röntgenbeugungsbilder auf, anhand derer ich die Molekülmasse bestimmte und frühere Werte korrigierte. Anschließend sammelte ich einen vollständigen Datensatz. Ich brütete lange über ein Modell für den Aufbau des Faltmoleküls, und nach vielen Versuchen hatte ich mit der Einpassung einer Steroideinheit in die Patterson-Karte Erfolg. Durch wiederholtes

krein-Inaktivator und als Trypsininhibitor des Rinderpankreas (BPTI) Versionen verfügbar war, leicht interpretieren.^[6]

In Anlehnung an die Prozedur der organischen Molekülkristallographie kam es mir in den Sinn, dass durch Hinzugabe weiterer Informationen zur Geometrie der Aminosäuren und Peptidbindungen Phasen verbessert und in höherer Auflösung erhalten werden könnten. Während wir aber bei der Kristallographie kleiner Moleküle üblicherweise atomare Auflösungen erhalten und einzelne Moleküle sehen, ist dies bei Proteinkristallen nicht der Fall. Bob Diamond in Cambridge, Großbritannien, hatte ein Computerprogramm entwickelt, das durch Drehen und Verschieben die Überlappung der Molekülfragmente mit der Elektronendichte maximiert, und zwar unter Beibehaltung der korrekten Bindungsgeometrien. Unsere Arbeitsgruppe (zwei Doktoranden aus der Physik, Wolfgang Steigemann und Johann Deisenhofer, hatten sich meiner kleinen Gruppe angeschlossen) war inzwischen im neuen Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried zu Hause, wo ich 1972 das Angebot angenommen hatte, Mitglied der Max-Planck-Gesellschaft und Direktor am Institut zu werden (Abbildung 3). Wir dachten an die Ver-

Hokuspokus. Es sollte noch einige Jahre dauern, bis die Verfeinerung von Proteinkristallstrukturen ein von der Fachwelt akzeptiertes Verfahren wurde. Heute ist es im Prozess der Strukturbestimmung natürlich Routine, nicht zuletzt auch dank massiv verbesserter Hard- und Software. Die Verfügbarkeit interaktiver Graphiksysteme und die Entwicklung eines Programms für die Anwendung in der Proteinkristallographie sowie dessen erste praktische Anwendung (Frodo) durch Alwyn Jones,^[9] der sich als Postdoktorand meiner Gruppe angeschlossen hatte, war ein entscheidender Schritt in diesem Prozess. Die Existenz eines genauen Modells eines relativ kleinen Proteins fand in der Fachwelt Beachtung, und BPTI wurde weltweit zu einem Modellprotein für experimentelle und theoretische Faltsungsstudien und molekulare Simulationen – die „Laborratte“ der Computerchemiker (ein von Michael Levitt geprägter Begriff). Die Firma Bayer lieferte anderen Forschern großzügig Material, vor allem für NMR-Experimente, eine Technik, deren Potential für die Proteinstrukturanalyse man gerade erst zu erforschen begann. Ein bemerkenswerter Fortschritt war die Identifizierung der aromatischen Spinsysteme und ihrer Dynamik in den homonuklearen eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren durch Wüthrich, Wagner, Sykes und anderen. Zweidimensionale Spektren und systematische Resonanzzuordnungen durch Ernst und Wüthrich sollten später folgen. Der Befund war, dass aromatische Reste, die in der Proteinstruktur scheinbar dicht gepackt waren, Ringflips eingehen. Eine detaillierte Analyse im Lichte der Molekülstruktur, die wir 1976 gemeinsam mit Wüthrichs Arbeitsgruppe durchführten, ergab eindeutige Beweise für großamplitudige, niederfrequente konzertierte Bewegungen im Proteinkern, die für die Kristallographie unsichtbar waren, weil die angeregten Konformationszustände nicht signifikant besetzt werden.^[10] Für viele war dies eine große Überraschung – am meisten vielleicht für die Kristallographen, die durch die wohldefinierten Elektronendichtekarten womöglich voreingenommen waren. Ich erinnere mich, dass Wüthrich und ich den zweifelnden Max Perutz in einer Podiumsdiskussion vor großer Zuhörerschaft überzeugen mussten. Wir wissen heute, dass viele – wahrscheinlich alle – untersuchten Proteine Flips der aromatischen Ringe zeigen. Auch im Zeitbereich langsamer dynamischer Prozesse diente BPTI als Beispiel, indem der Austausch der Amidwasserstoffe mit NMR-Techniken und mit Neutronenkristallographie, eine Methode, die Protonen und Deuteronen unterscheidet, gemessen und völlige Übereinstimmung gefunden wurde.^[42, 43]

Eine späteres Gemeinschaftsprojekt mit Wüthrichs Forschungsgruppe im Jahr 1986 hatte eine unabhängige und simultane Analyse des Amylase-Inhibitors Tendamistat in Kristallen und in Lösung zum Ziel und ergab identische Strukturen, was sehr überzeugend die Leistungsfähigkeit der NMR-Spektroskopie als ein Methode für die Proteinstrukturbestimmung demonstrierte.^[11, 12]

Die Forschungen am BPTI führten mich bald auch zu dessen Rezeptor, der prototypischen Serinprotease Trypsin. Wir wollten herausfinden, wie die beiden Proteine wechselwirken. Funktionelle Studien hatten gezeigt, dass die Bindung extrem stark und der Komplex sehr langlebig ist. Der erste



Abbildung 3. Direktoren am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (Aufnahme von 1974). Erste Reihe (von links nach rechts): Heinz Dannenberg, Adolf Butenandt, Feodor Lynen, Gerhard Ruhstroth-Bauer. Zweite Reihe: Robert Huber, Pehr Edman, Erich Wünsch, Gerhard Braunitzer, Peter Hans Hofschneider, Walter Hoppe, Kurt Hannig, Klaus Kühn, Wolfram Zillig. Butenandt und Hoppe werden im Essay erwähnt. Der Bau und die Eröffnung des Max-Planck-Instituts für Biochemie im Jahr 1973 war ein Signal für den Ausbau des Campus Martinsried, der zu einem der größten Forschungs- und Technologiezentren in Europa gewachsen ist.

wendung dieses Werkzeugs, wollten es aber in Zyklen einsetzen, indem wir die Phasen aus dem verbesserten Proteinmodell immer wieder neu berechneten. Dies funktionierte ausgezeichnet und lieferte uns Elektronendichtekarten von nie gesehener Klarheit und Auflösung.^[7, 8]

John Kendrew besuchte mich zu dieser Zeit und meinte: „Eine solche Elektronendichte hätte ich gerne für Myoglobin erhalten, aber wir sind gescheitert.“ Ich fühlte mich geschmeichelt, viele aber dachten, es sei unwissenschaftlicher

Schritt war, ein Modell zu entwickeln. Hierzu begannen wir eine Zusammenarbeit mit David Blow, Cambridge, der die Struktur von Chymotrypsin, einem nahen Verwandten von Trypsin und ebenfalls ein starker Ligand von BPTI, bestimmt hatte. Docking-Experimente im Jahr 1971 sahen anders aus als heute, wo man sich der Computergraphik bedient. Man musste aus Schrauben und Drähten aufgebaute Molekülmodelle physikalisch in Kontakt bringen. Ich verstaute also mein BPTI-Modell in meinem Auto und fuhr nach England. Ein erstes Hindernis war die Grenze nach Großbritannien, wo der Zollbeamte wissen wollte, was es mit diesem Haufen Drähten und Schrauben auf sich hätte. „Ein Modell eines Proteins“, war meine Antwort. „Was ist es wert?“, war seine nächste Frage. „Nichts“, sagte ich. „Wieviel hat es gekostet?“ „Einige zehntausend Pfund, wenn wir Arbeitszeit, Material und Aufwendungen zusammenrechnen“. Er starnte mich an und sortierte mich offenbar in die Gruppe der harmlosen Verrückten ein und ließ mich passieren.

Die Docking-Studien in Davids Laboratorium in Cambridge waren harte Arbeit, denn mein Modell, obschon kleiner als Chymotrypsin, war schwer zu drehen und zu verschieben. Zurück in Martinsried fuhren wir mit der experimentellen Strukturbestimmung des Trypsin-BPTI-Komplexes fort.

Der stöchiometrische Komplex kristallisierte bereitwillig, und auch die isomorphe Phasenbestimmung lief gut und lieferte eine leicht interpretierbare Elektronendichtekarte. Das Modell bestätigte im Wesentlichen unser Docking-Modell.^[7,13]

Wolfram Bode, der sich 1972 unserer Abteilung angegeschlossen hatte, bestimmte die Struktur des bovinen Trypsins. Damit bestand nun die Möglichkeit, für alle drei Spezies, für die der Komplex und die freien Komponenten verfügbar waren, Strukturunterschiede zu kartieren. Abgesehen von einigen unterschiedlichen Seitenkettenrotameren – und insbesondere eines Lysins, das in die Spezifitätstasche des Enzyms eingeschoben wird –, wurden keine Strukturunterschiede beobachtet. Was wir hatten war ein exemplarisches „Schlüssel-Schloss“-Modell der Protein-Protein-Wechselwirkung, und zwar das erste, das je beobachtet wurde.

Natürlich wollten wir nun mehr über den Mechanismus wissen, durch den die inaktive Vorstufe Trypsinogen in das aktive Enzym Trypsin umgewandelt wird. Dieser Prozess umfasst die Spaltung eines N-terminalen Hexapeptids unter Bildung eines neuen N-terminalen Isoleucins, wie die Biochemiker Hans Neurath und Earl Davie 1955 aufgedeckt hatten. David Blow hatte vorhergesagt, dass die Bildung einer internen Salzbrücke durch Ile16 und Asp194, wie sie in Chymotrypsin und identisch dazu in Trypsin beobachtet wurde, ein entscheidendes Element in diesem Prozess ist. Wir kristallisierten Trypsinogen und bestimmten die Phasen, stießen aber bei der Interpretation der Elektronendichtekarte auf ein ernsthaftes Problem, denn nach der Verfeinerung fanden wir keine Spur von der Elektronendichte der drei Peptidsegmente (oder vier, wenn man das N-terminale Segment hinzuzählt), die eine wohldefinierte kohärente Domäne im Trypsin bilden. Wir nannten diese Domäne aus offensichtlichen Gründen die „Aktivierungsdomäne“. Im Trypsin

bildet sie die hauptsächliche Wechselwirkungsfläche mit BPTI und dem Substrat.^[14,15]

Inzwischen hatten wir mit der Hilfe von Peter Colman und Alwyn Jones, zwei Postdoktoranden unseres Instituts, mehr Beispiele von ausgedehnter Fehlordnung in Proteinstrukturen gesammelt. Ein besonderer Fall war die Kristallstruktur eines Antikörpers, dessen gesamter Fc-Teil von 50 kD Masse unsichtbar war.^[16] Wir hatten unsere Methode der kristallographischen Verfeinerung validiert und waren daher sicher, dass das Fehlen von Elektronendichte in Trypsinogen eindeutig das Vorhandensein molekularer Fehlordnung anzeigen. Im Gegensatz dazu fanden unsere Konkurrenten, die an der gleichen Struktur arbeiteten und dabei unverfeinerte Phasen verwendeten, schwache und fragmentierte Elektronendichten, was zu einer irreführenden Interpretation mit einem geordneten Modell führte.^[17] Sowohl im Antikörper als auch in Trypsinogen sind die Übergänge zwischen geordneten und ungeordneten Segmenten streng diskontinuierlich und in Glycin-reichen Aminosäuresequenzen zentriert.

Mit dem vollständigen System in Händen stützten wir unsere weiteren Studien auf die Beobachtung, dass BPTI ebenfalls einen stabilen und kristallisierbaren Komplex mit Trypsinogen bildete. Diese Spezies ist isomorph zum Trypsin-PTI-Komplex und hat in Abwesenheit des N-terminalen Ile16, eine geordnete Aktivierungsdomäne. Das Ile16 kann seine aktivierende Funktion durch Bindung eines exogenen Ile-Val-Dipeptids unter Entstehung eines ternären Komplexes, der strukturell nicht vom Trypsin-BPTI-Komplex unterscheidbar ist, ausüben. Diese Strukturen und thermodynamischen Daten definierten ein allosterisches System eines aus einer einzelnen Untereinheit bestehenden Proteins, des ersten dieser Art, das entdeckt und analysiert wurde. Max Perutz lud mich ein, diese Befunde auf einer Konferenz über Allosterie in Großbritannien vorzutragen, worüber ich mich enorm freute.

Fehlordnung kann dynamisch oder statisch oder eine Mischung aus beidem sein. Welche Form vorliegt, lässt sich durch Tieftemperatur-Kristallographie erkennen. Die Trypsinogenkristalle vertrugen einen hohen Prozentsatz an Methanol, was Strukturbestimmungen bei sehr niedriger Temperatur, ohne die Bildung von Wassereis, ermöglichte. Keine signifikante Elektronendichte der Aktivierungsdomäne erschien nach dem Abkühlen, wie für ein Vorliegen von hauptsächlich statischer Fehlordnung zu erwarten war. Die Frage aber blieb: Wie viele verschiedene Konformere sind nötig, um die Elektronendichte auf ein insignifikantes Niveau abzuschwächen? Wir markierten ein spezifisches Disulfid innerhalb der Aktivierungsdomäne mit einem Quecksilberatom (durch Reduktion und Insertion), fanden aber erneut keine Spur von Elektronendichte, was auf eine ausgeprägte Heterogenität hinwies; jedoch tauchte nach der Umwandlung in den Trypsin-Zustand durch Komplexbildung mit BPTI ein großes Signal mit der erwarteten Intensität auf.^[18,19] Weitere Untersuchungen dieses Systems durch Eberhard Neumann, der eine elegante Temperatursprungtechnik einsetzte, offenbarten die allosterische Kupplung zwischen dem Substratartigen Liganden und dem N-terminalen Peptid mittels „induced fit“.

Was wir erstmals am Trypsin-System beobachtet und mechanistisch erklärt hatten, nämlich den Übergang zwischen einer ungeordneten und einer geordneten Domäne zur Erzeugung einer substratbindenden Oberfläche und einer geeigneten Konfiguration des aktiven Zentrums, erwies sich innerhalb der Serinproteasefamilie als allgemeingültig. Insbesondere schlugen Wolfram Bode und ich 1976 vor,^[20] dass innerhalb der Trypsin-artigen Serinproteasefamilie die Insertion eines N-terminalen Segments ein allgemeiner Mechanismus aktivierender Cofaktoren sein könnte und bezeichneten dies als „Hypothese der molekularen Sexualität“. Mehr als zwanzig Jahre später, im Jahr 2003, wurde dieser Mechanismus bei einem bakteriellen Aktivator des Gerinnungsfaktors Thrombin tatsächlich entdeckt und im atomaren Detail aufgezeigt (durch Staphylokoagulase, in Zusammenarbeit mit unserem US-Kollegen Paul Bock).^[21]

In den komplexen, mehrdomänenigen HtrA/DegP-Proteasen, die eine Trypsin-artige katalytische Domäne besitzen, lösen verschiedene Auslösereize den Ordnungsprozess der Aktivierungsdomäne und die Oligomerisierung aus. Ein Beispiel dafür ist die Bindung eines Liganden an eine PDZ-Domäne, wie Michael Ehrmann und Tim Clausen zeigen konnten. Die Mechanismen der biologischen Regulierung sind daher vielseitig und nutzen auf verschiedenste Weise die grundlegenden Prinzipien der Serinproteaseaktivierung durch die Bildung einer geeigneten Ligandenbindungsstelle durch Fehlordinations-Ordnungs-Übergänge der Aktivierungsdomäne.^[22,23]

BPTI blieb nicht lange einzigartig. Mehr kleine natürliche proteinische Serinproteaseinhibitoren wurden entdeckt und strukturell charakterisiert.^[24] Viele von ihnen gehorchten dem gleichen Mechanismus der festen Bindung an die Zielprotease durch vorab gebildete komplementäre Oberflächen, gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, das Emil Fischer zur Erklärung der Enzymspezifität über 100 Jahre vorher vorschlagen hatte. Andere Proteasefamilien wurden erforscht, und man fand natürliche Inhibitoren, die die Bindung des Substrats mit hoher Spezifität und Wirksamkeit blockieren und, zumindest teilweise, in einer substratähnlichen Weise wechselwirken. Einige dieser Inhibitoren sind größer als ihre Zielproteasen und setzen ausgedehnte Exostellen zur Bindungsverstärkung ein, wie wir 1997 am Beispiel der Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteasen, den TIMPs, beobachten konnten.^[25] Natürliche Inhibitoren des Gerinnungsenzyms Thrombin zeigten jedoch unkonventionelle Bindungsweisen, unterschiedlich von Substrat, aber teilweise damit überlappend, wie wir 1990 in Hirudin,^[26] dem Hauptgerinnungsinhibitor des Blutegels, sahen. In anderen blutsaugenden Parasiten, Zecken, entdeckten wir 1996 einen Thrombin-Inhibitor mit zwei tandemartig angeordneten BPTI-Domänen, die nicht über ihre kanonische, im BPTI-Trypsin-Komplex festgelegte Oberflächenschleife binden, sondern stattdessen den N-Terminus verwenden.^[27] Die Natur kennt viele Kniffe.

Die Strukturen und Mechanismen der Proteasehemmung schienen also wiederkehrende Charakteristika aufzuweisen und in feinen Details zu divergieren, deren Erforschung, vor allem mit Blick auf ihre pharmakologische Bedeutung, lohnend war.

Die Serpine (Serinproteasehemmer) hatten jedoch eine atemberaubende Überraschung parat: ein Sprungfeder-artiges Molekül. Die Serpine sind im Blut von Säugetieren reichlich vorhanden und bilden eine gut bevölkerte Überfamilie von Proteinen, die größer sind als die meisten ihrer Zielstrukturen. In der belebten Welt sind sie fast allgegenwärtig, und einige üben andere als inhibierende Funktionen aus. Wir entschieden uns, mit α 1-Antitrypsin (α 1-PI) zu arbeiten, einem reichlich vorhandenen Blutbestandteil. Wir setzten Kristallisationen eines stöchiometrischen Komplexes von α 1-PI mit Chymotrypsinogen an, fanden jedoch in der Elektronendichtekarte der Kristallstruktur (veröffentlicht 1984) keinerlei Anzeichen der Protease.^[28,29]

Stattdessen beobachteten wir nur das Inhibitormolekül, dessen Peptidbindung im reaktiven Zentrum gespalten war. Die neu entstandenen N- und C-Termini waren im Abstand von 70 Å an den beiden gegenüberliegenden Polen des Moleküls positioniert, wobei das C-terminale Segment als zentraler (antiparalleler) Strang in das dominante architekturelle Merkmal der Molekülstruktur, ein fünfsträngiges β -Faltblatt, integriert war. Dieser Befund war aus zwei Gründen überraschend. Zum einen durch den Vergleich mit gespaltenen kanonischen kleinen Serinproteaseinhibitoren, deren Termini in engem Abstand beieinander bleiben, um so für die Resynthese durch ihre kognate Protease bereit zu sein: Das gespaltene α 1-PI ist als Inhibitor komplett und irreversibel inaktiviert. Zum zweiten bei Betrachtung der Reorganisation der Proteinarchitektur: Die Aufweitung eines β -Faltblatts durch die Auftrennung eines existierenden (parallelen) Paares von β -Strängen und die Insertion eines neuen Stranges war, unserem Vorschlag zufolge, die minimalste erforderliche Strukturperturbation, die aber bis dahin beispiellos war. Die Umwandlung geht mit einer drastischen Stabilisierung gegen thermische oder Tensid-induzierte Entfaltung einher.

Es brauchte sechs weitere Jahre, um den Mechanismus durch die Bestimmung der Kristallstrukturen von Plakalalbumin (in Zusammenarbeit mit Tonie Wright)^[30] und Albumin^[31] zu beweisen. Plakalbukin ist die proteolysierte Form von Albumin, einem nicht-inhibierenden Mitglied der Serpin-Überfamilie, das die in α 1-PI beobachtete Umwandlung nicht eingeht. Die Beobachtung einer ungesättigten Peptidbindungsstelle in intakten Serpinen erinnerte mich an unsere Experimente mit Trypsinogen und dem aktivierenden Ile-Val-Dipeptid, und tatsächlich konnten wir zeigen, dass ein Peptid, das das inserierte C-terminale Segment nachahmt, eine Umwandlung zu einem Molekül mit den Eigenschaften des gespaltenen α 1-PI auslöste.^[32] Wir schlugen vor, dass dies ein zentraler Vorgang beim Prozess der Selbstaggregation bei Serpinopathien ist. Die Entdeckung einer latenten, intakten Form eines Serpins, des Plasminogenaktivatorinhibitors, mit der charakteristischen Sekundärstruktur der gespaltenen Spezies durch Elisabeth Goldsmith in Dallas sowie die Vielzahl von strukturellen und funktionellen Studien durch Robin Carrell und Mitarbeiter in Cambridge fügten dem allgemeinen Mechanismus äußerst wichtige Details hinzu. Klar ist allerdings, dass die Aufweitung des β -Faltblatts, die wir in unseren anfänglichen Studien entdeckt hatten, im Zentrum der facettenreichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Serpin-Überfamilie steht.

Mit diesen Betrachtungen über die Anfänge meiner Proteaseforschung und einem flüchtigen Blick auf meinen Werdegang als Proteinkristallograph will ich diesen Essay schließen – nicht aber ohne hinzuzufügen, dass Proteasen und ihre Regulation ein Schwerpunkt meiner Arbeitsgruppe geblieben sind. Die Proteasen, die wir studieren konnten, wurden komplexer und größer, vor allem auch dank neuartiger Werkzeuge und Methoden, die alle Stufen im Arbeitsgang der Proteinkristallographie, Proteinpräparation, Kristallisation, Strukturbestimmung und funktionelle Interpretation durch biochemische und biologische Analyse einbeziehen. Zu einigen dieser Entwicklungen haben wir, wie oben erwähnt, nützliche Beiträge geliefert.

Dies ermutigte uns, oftmals in Zusammenarbeit mit Kollegen, Untersuchungen der sehr großen intrazellulären, aus vielen Untereinheiten aufgebauten Proteasen wie dem Proteasom, dem bakteriellen HslVU-Komplex, den Tricorn- und DegP-Proteasen in Angriff zu nehmen.^[22,23,33–36]

Meine Arbeitsgruppe wuchs allmählich an und wurde von vielen Doktoranden bevölkert, die oftmals mit klar umrissenen Vorstellungen über ihre bevorzugte Forschung zu uns kamen. Durch sie und durch die Zusammenarbeit mit akademischen und industriellen Kollegen und Partnern wurden viele neue Projekte und biologische Systeme an uns herangetragen, die unsere Kenntnisse der Strukturbioologie erweiterten und dazu beitrugen, ein grundlegendes Verständnis der Strukturen und Funktionen einer Fülle von Proteinsystemen zu erlangen. Besonders erwähnenswert sind Untersuchungen von Proteinen mit einer zentralen Rolle in der Photosynthese – lichtsammelnden Organellen, Phycobilisomen der Cyanobakterien^[37–39] und des photosynthetischen Reaktionszentrums eines Purpurbakteriums, eine biologische Photozelle und ein Membranprotein.^[40,41] Diese Arbeiten trugen entscheidend zu einem Verständnis der physikalischen Vorgänge bei, die der primären photosynthetischen Lichtreaktion und Ladungstrennung zugrundeliegen, sowie zur Aufklärung grundlegender Prinzipien der Strukturen integraler Membranproteine.

Diese Arbeit wurde 1988 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt, den ich mit Deisenhofer und Michel teilte (Abbildung 4).

Es war eine glückliche Fügung, dass ich die Proteinkristallographie bald nach ihrer Begründung durch Perutz und Kendrew als den Schwerpunkt meiner Forschungen wählte und ihre Reifung eine zeitlang begleiten konnte. So durfte ich Zeuge werden, wie sie ihre fundamentale Rolle in der Aufklärung biologischer Strukturen und Prozesse eingenommen hat. Die Rolle von Proteinstrukturen in der Medizin und den Agrarwissenschaften sowie deren Anwendung bei der Entdeckung und Entwicklung aktiver Substanzen für Therapie, Diagnose und Pflanzenschutz fasziniert mich außerordentlich, zumal die meisten der Proteine, die wir studiert haben, tatsächlich wichtige Funktionen für die Gesundheit und Krankheitsentwicklung von Menschen und Pflanzen haben. Meine eigenen Anfänge in der Proteinkristallographie waren, wie eingangs erwähnt, mit Bayers Proteaseinhibitor und Wirkstoff Trasylol verknüpft.

Allerdings geht die Entwicklung therapeutischer Wirkstoff über den Spielraum einer akademischen Institution hinaus. Ich war deshalb offen für Kollaborationen mit der Industrie, die, sofern die unterschiedlichen Interessen und Missionen und natürlich die rechtlichen Rahmenbedingungen respektiert werden, für beide Seiten lohnend sind. Einen besonderen und engen Kontakt gab es mit Boehringer, Mannheim (später Roche), durch die Gründung einer gemeinsamen Forschungsgruppe unter der Leitung von Richard Engh, die in meinem Institut ansässig war.

Diese Zusammenarbeit war außerordentlich lohnend und brachte mehr als 40 gemeinsame Veröffentlichungen über die Struktur und Funktion von Kinasen und Proteasen hervor, die beiderseits im Fokus standen. Um die Umsetzung akademischer Forschung zu intensivieren, gründete ich gemeinsam mit Mitarbeitern und Kollegen zwei Firmen, Proteros (<http://www.proteros.de>) und Suppremol (<http://www.suppremol.com>) (beide in Martinsried ansässig), deren Geschäftsmodelle anfänglich auf Forschungsmethoden und Projekten meiner Forschungsgruppe gründeten und erfolgreich in das industrielle Umfeld implementiert wurden.



Abbildung 4. Nobelpreis für Chemie 1988: Hans Deisenhofer, Robert Huber, Hartmut Michel.

Ich entschuldige mich bei allen unerwähnt gebliebenen Kollegen und Mitarbeitern (von denen viele in akademischen Positionen sind), ohne deren entscheidende Beiträge und enthusiastische Arbeit die meisten der genannten Forschungsprojekte nicht erfolgreich zu Ende geführt worden wären oder gar nicht erst begonnen worden wären. Ihre Namen (als Autoren) können jedoch in den Originalarbeiten meiner Abteilung gefunden werden (<http://www.biochem.mpg.de/xray/publications/index.html>). Ich danke ganz besonders Richard Engh und Matthias Bochtler für ihre Hilfe mit dem Manuskript.

Eingegangen am 24. Juli 2012
Online veröffentlicht am 3. Dezember 2012

-
- [1] W. Hoppe, *Acta Crystallogr.* **1957**, *10*, 750–751.
 - [2] M. G. Rossmann, D. M. Blow, *Acta Crystallogr.* **1962**, *15*, 24–31.
 - [3] R. Huber, W. Hoppe, *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 2403–2424.

- [4] R. Huber, H. Formanek, O. Epp, *Naturwissenschaften* **1968**, *55*, 75.
- [5] R. Huber, O. Epp, H. Formanek, W. Steigemann, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *19*, 42–50.
- [6] R. Huber, D. Kukla, A. Rühlmann, O. Epp, H. Formanek, *Naturwissenschaften* **1970**, *57*, 389.
- [7] R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, W. Steigemann, *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 73–101.
- [8] J. Deisenhofer, W. Steigemann, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1975**, *31*, 238–250.
- [9] T. A. Jones, *J. Appl. Crystallogr.* **1978**, *11*, 268–272.
- [10] R. Hetzel, K. Wüthrich, J. Deisenhofer, R. Huber, *Biophys. Struct. Mech.* **1976**, *2*, 159–180.
- [11] J. W. Pflugrath, G. Wiegand, R. Huber, L. Vertes, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 383–386.
- [12] A. D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 377–382.
- [13] D. M. Blow, C. S. Wright, D. Kukla, A. Rühlmann, W. Steigemann, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1972**, *69*, 137–144.
- [14] W. Bode, H. Fehlhammer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1976**, *106*, 325–335.
- [15] H. Fehlhammer, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1977**, *111*, 415–438.
- [16] R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman, M. Matsushima, W. Palm, *Nature* **1976**, *264*, 415–420.
- [17] A. A. Kossiakoff, J. L. Chambers, L. M. Kay, R. M. Stroud, *Biochemistry* **1977**, *16*, 654–664.
- [18] W. Bode, P. Schwager, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1978**, *118*, 99–112.
- [19] J. Walter, W. Steigemann, T. P. Singh, H. Bartunik, W. Bode, R. Huber, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1982**, *38*, 1462–1472.
- [20] W. Bode, R. Huber, *FEBS Lett.* **1976**, *68*, 231–236.
- [21] R. Friedrich, P. Panizzi, P. Fuentes-Prior, K. Richter, I. Verhamme, P. J. Anderson, S. Kawabata, R. Huber, W. Bode, P. E. Bock, *Nature* **2003**, *425*, 535–539.
- [22] T. Krojer, M. Garrido-Franco, R. Huber, M. Ehrmann, T. Clausen, *Nature* **2002**, *416*, 455–459.
- [23] M. Merdanovic, T. Clausen, M. Kaiser, R. Huber, M. Ehrmann, *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 149–168.
- [24] W. Bode, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 433–451.
- [25] F. X. Gomis-Rüth, K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, W. Bode, *Nature* **1997**, *389*, 77–81.
- [26] T. Rydel, K. G. Ravichandran, A. Tulinsky, W. Bode, R. Huber, J. W. Fenton, C. Roitsch, *Science* **1990**, *249*, 277–280.
- [27] A. van de Locht, M. T. Stubbs, W. Bode, T. Friedrich, C. Bollschweiler, W. Höffken, R. Huber, *EMBO J.* **1996**, *15*, 6011–6017.
- [28] H. Löbermann, R. Tokuoka, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1984**, *177*, 531–556.
- [29] R. Huber, R. W. Carrell, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8951–8966.
- [30] H. T. Wright, H. X. Qian, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 513–528.
- [31] P. E. Stein, A. G. W. Leslie, J. T. Finch, W. G. Turnell, P. J. McLaughlin, R. W. Carrell, *Nature* **1990**, *347*, 99–102.
- [32] A. J. Schulze, U. Baumann, S. Knof, E. Jaeger, R. Huber, C. B. Laurell, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 51–56.
- [33] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- [34] M. Bochtler, C. Hartmann, H. K. Song, G. Bourenkov, H. Bartunik, R. Huber, *Nature* **2000**, *403*, 800–805.
- [35] H. Brandstetter, J. S. Kim, M. Groll, R. Huber, *Nature* **2001**, *414*, 466–470.
- [36] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, R. Huber, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 222–256.
- [37] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, W. Sidler, H. Zuber, *J. Mol. Biol.* **1985**, *184*, 257–277.
- [38] R. Ficner, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 103–106.
- [39] W. Reuter, G. Wiegand, R. Huber, E. Than, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1363–1368.
- [40] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *Nature* **1985**, *318*, 618–624.
- [41] R. Huber, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 849–871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 848–869
- [42] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, *160*, 343–361.
- [43] A. Wlodawer, J. Walter, R. Huber, L. Sjölin, *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 301–329.