

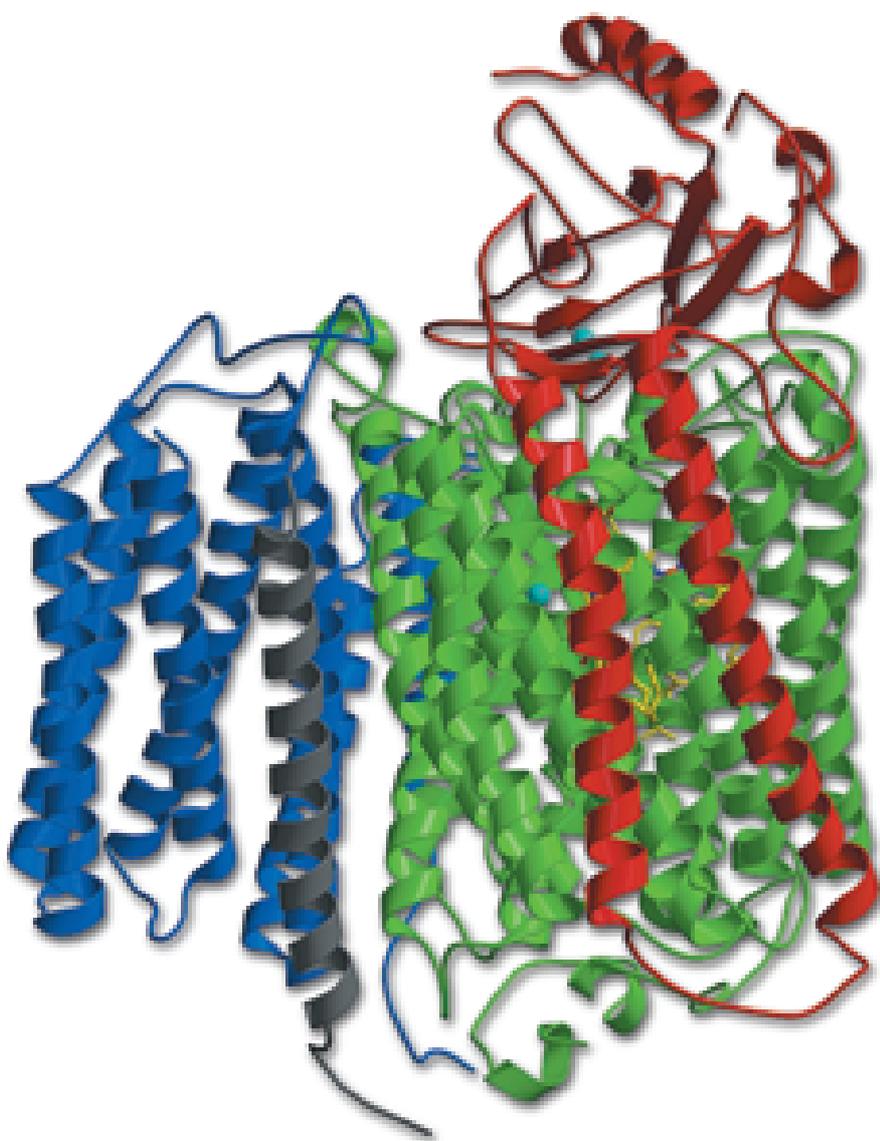
Mit der Röntgenstrukturanalyse Strukturen knacken

Motor der Wirkstoff-Entwicklung

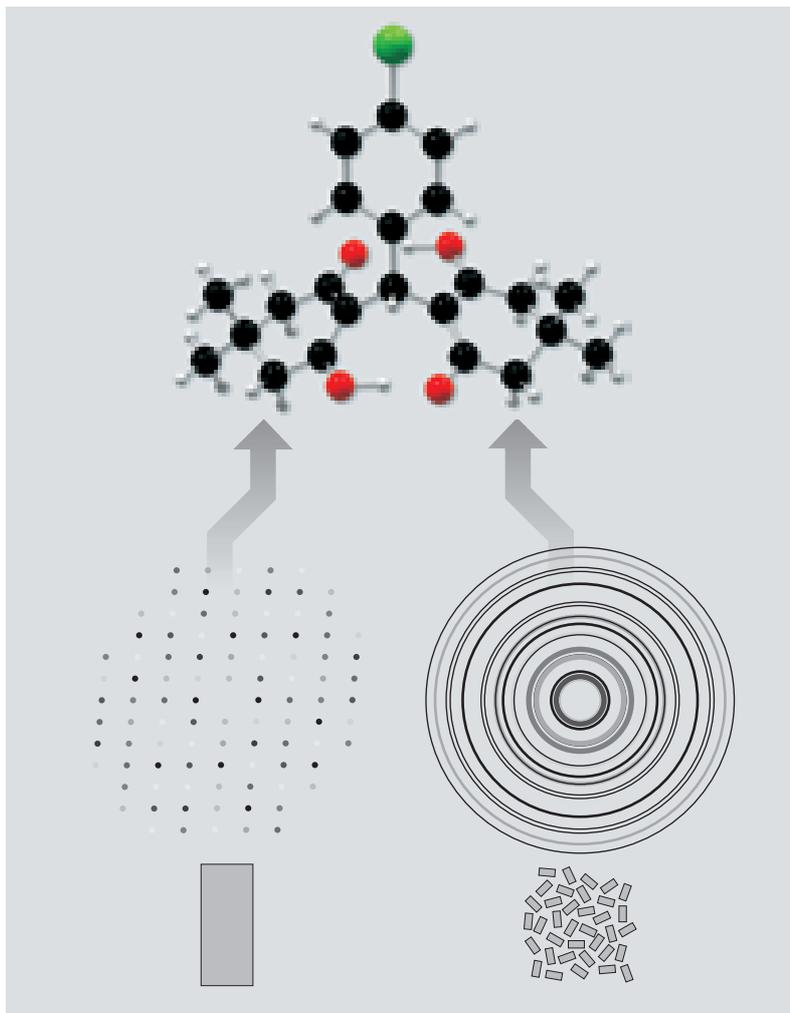
Chemiker stehen in ihrer Mentalität Architekten nahe: Sie planen und bauen Moleküle. Schon lange, bevor der atomare Aufbau der Materie experimentell bewiesen war, entwickelten sie genaue Vorstellungen über die Raumstruktur von Molekülen. Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden diese »Arbeitshypothesen« – zum Beispiel das von Jacobus van't Hoff postulierte Tetraedermodell für den vierbindigen Kohlenstoff – von den Physikern glänzend bestätigt.^{1/} Zwar ist es mittlerweile möglich, die Struktur von unbekanntem Molekülen zuverlässig vorherzusagen; doch nach wie vor sind genaue experimentelle Strukturbestimmungen ein unverzichtbarer Bestandteil vieler Forschungsprojekte.

Eine vielversprechende Strategie bei der Entwicklung neuer, noch leistungsfähigerer pharmazeutischer Wirkstoffe ist die Suche nach Beziehungen zwischen der Struktur von Molekülen und ihrer biologischen Funktion (»rational drug design«). Dies setzt voraus, dass die Strukturen von potenziellen Wirkstoffen oder zumindest ähnlichen Verbindungen zuverlässig und genau bestimmt werden können. Aus der Vielzahl von Strukturbestimmungsmethoden ragen zwei Verfahren aufgrund ihrer besonderen Leistungsfähigkeit heraus: die Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR) und die Röntgenstrukturanalyse. Diese beiden Verfahren sind heute in der chemischen Forschung unverzichtbar, so dass praktisch jede Forschungsabteilung innerhalb der Chemie zumindest Zugang zu den dazu erforderlichen Großgeräten besitzt. Im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität wird die Bedeutung der NMR-Spektroskopie und der Röntgenstrukturanalyse durch die Ausrichtung zweier Professuren besonders hervorgehoben. Hier werden diese beiden modernen Strukturbestimmungsmethoden nicht nur als Service für die synthetisch arbeitenden Forschungsgruppen betrieben, sondern auch kontinuierlich weiterentwickelt und auf besonders anspruchsvolle Probleme angewandt. Außerdem erhalten die Chemie-Studierenden an der Universität Frankfurt – im Gegensatz zu vielen anderen Universitäten – im Rahmen von Pflichtveranstaltungen einen grundlegenden Einblick in diesen Bereich.

von Ernst Egert



Die Cytochrom c-Oxidase ist ein zentrales Enzym der Atmungskette, einer Reaktionskaskade, bei der die Zelle die zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktion notwendige Energie bildet. Die Struktur dieses Proteins wurde durch Röntgenstrukturanalyse von Prof. Dr. Hartmut Michel am Max-Planck-Institut für Biophysik aufgeklärt. Die hier abgebildete Cytochrom c-Oxidase stammt aus dem Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans*. Die C(alpha)-Ketten der Polypeptiduntereinheiten I, II, III und IV sind in grün, rot, blau beziehungsweise schwarz dargestellt. Außerdem ist die Lage der gebundenen Kupferzentren (hellblau) und Hämgruppen (gelb) zu sehen.

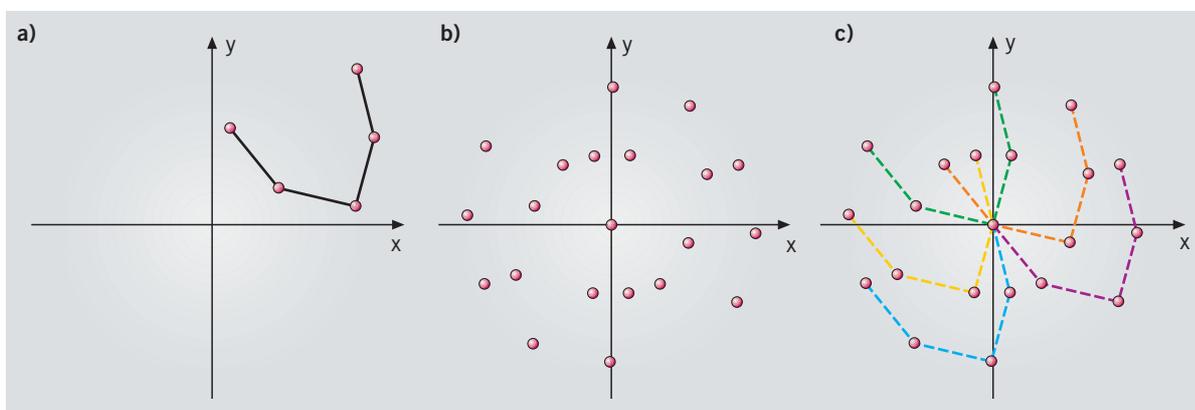


2 Setzt man Einkristalle Röntgenstrahlung aus, erhält man ein Beugungsdiagramm, aus dem man die Kristall- und Molekülstruktur bestimmen kann (links). Liegt nur ein feinkristallines Pulver vor, erhält man stattdessen nur die charakteristischen Pulverringe (rechts). Der Weg zur Struktur ist dann erheblich steiniger.

anderen Methode erreichte Zuverlässigkeit und Genauigkeit wettgemacht. Ursache dafür ist eine Fülle an experimentellen Daten. Wegen der unterschiedlichen Stärken und Schwächen gibt es zwischen Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie keine erbitterte Rivalität, sondern ein friedliches Miteinander. Die mit beiden Methoden erhältlichen Aussagen ergänzen sich hervorragend, so dass in vielen Fällen beide Verfahren angewandt werden.

Entwicklung der Röntgenstrukturanalyse

Kristalle üben seit Jahrtausenden eine große Faszination aus, doch erst seit knapp hundert Jahren weiß man, dass ein »Röntgenblick« durch kristalline Materie ihre innere Struktur offenlegt. Die Entdeckung Max von Laues (Nobelpreis 1914), dass Röntgenstrahlen an Kristallen gebeugt werden, und die blitzartige Erkenntnis von Vater und Sohn Bragg (Nobelpreis 1915), dass damit die atomare Struktur von Kristallen bestimmt werden kann, hat eine dramatische Entwicklung in Gang gesetzt. Seitdem ist der Fortschritt auf diesem Gebiet mit vielen weiteren Nobelpreisen gewürdigt worden. Darunter befinden sich auch James Watson und Francis Crick, die vor genau 50 Jahren die berühmte Struktur der DNA-Doppelhelix als Trägerin der Erbin-



3 Ein ebenes fünfatomiges Molekül (a) führt zu einer Pattersonfunktion mit 21 Maxima, die den Atom/Atom-Vektoren entsprechen (b). Verbindet man die Maxima geschickt miteinander, erhält man fünf Bilder der Molekülstruktur in der korrekten Orientierung, wobei in jedem Bild ein anderes Atom im Nullpunkt des Koordinatensystems liegt (c).

Die Röntgenstrukturanalyse besitzt gegenüber der NMR-Spektroskopie zugegebenermaßen einige Nachteile: Während NMR-Untersuchungen im allgemeinen in Lösung stattfinden, muss eine Verbindung für eine Röntgenstrukturanalyse zunächst kristallisiert werden. Dadurch sind die Moleküle im Kristallverband zwangsläufig sehr regelmäßig und dicht gepackt, so dass über ihre Beweglichkeit (Dynamik) nur begrenzte Aussagen möglich sind. Dies wird allerdings durch die von keiner

formation erkannten, Max Perutz und John Kendrew, die die ersten Proteinstrukturen bestimmten, und Johann Deisenhofer, Robert Huber und Hartmut Michel – er ist am Frankfurter Max-Planck-Institut für Biophysik tätig – für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines photosynthetischen Reaktionszentrums 4. Insgesamt fast 30 Nobelpreisträger sprechen eine deutliche Sprache für die Bedeutung dieses Forschungsgebiets – insbesondere wenn man berücksichtigt, dass die Gesamtzahl der bisher wissenschaftlich tätigen »Kristallographen«, darunter viele Chemiker, weltweit nur etwa 10 000 beträgt.

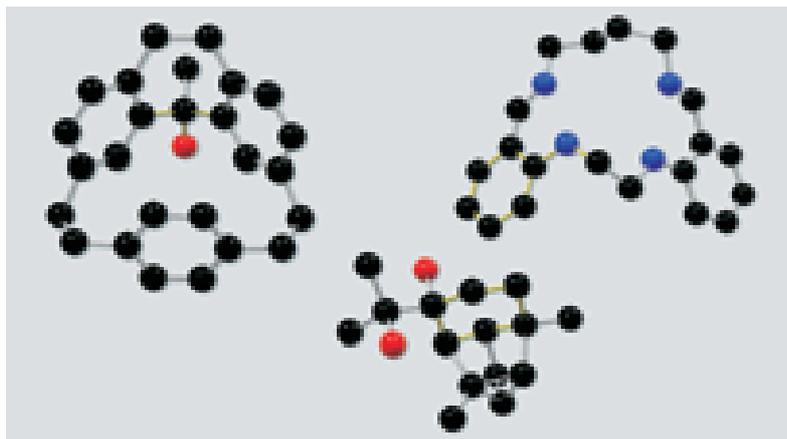
Die Röntgenstrukturanalyse beruht auf der Streuung von Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle von Atomen. Die in Kristallen vorhandene periodische Ord-

nung in allen drei Raumrichtungen führt zu einem dreidimensional-periodischen Beugungsmuster, das im Gegensatz zur kontinuierlichen Streuung diskrete Maxima von unterschiedlicher Stärke (Intensität) aufweist **2**. Durch Messung der Intensitäten – im allgemeinen mehrere tausend – an rechnergesteuerten automatischen Messgeräten, so genannten Diffraktometern, lässt sich im Prinzip die Elektronendichte im Kristall und damit die Struktur der den Kristall aufbauenden Moleküle ermitteln. Es gibt jedoch ein fundamentales Problem: Die zentrale Größe bei der Röntgenstrukturanalyse ist der Strukturfaktor, der die Information über die Positionen der Atome im Kristall enthält. Dabei handelt es sich um eine komplexe Zahl, die durch einen Betrag und eine Phase beschrieben werden kann. Könnte man den Strukturfaktor vollständig ermitteln, wäre mit Hilfe eines einfachen Rechenverfahrens, einer Fouriertransformation, die gesuchte Elektronendichte unmittelbar zugänglich. Aus den gemessenen Intensitäten erhält man allerdings nur den Betrag des Strukturfaktors und nicht seine Phase – dies gelingt nur in ganz wenigen Fällen unter hohem apparativem Aufwand. Mit anderen Worten: Die Hälfte der eigentlich benötigten Information fehlt. Dies ist das berühmt-berüchtigte Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse.^{12/}

Vor etwa 50 Jahren erkannte man einen Ausweg aus diesem Dilemma: Es zeigte sich, dass die gesuchten Phasen nicht unabhängig voneinander sind, sondern in vielfältigen Beziehungen miteinander stehen. Diese Beziehungen sind allerdings nicht streng gültig, sondern unterliegen einer berechenbaren Wahrscheinlichkeit. Dies führte über eine Entwicklungsarbeit von mehreren Jahrzehnten zu den äußerst leistungsfähigen so genannten Direkten Methoden, deren Pioniere Jerome Karle und Herbert Hauptman 1985 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Dank hervorragender Rechenprogramme ist damit die Röntgenstrukturanalyse von einer Kunst, die nur von wenigen Spezialisten beherrscht wurde, zumindest vordergründig zu einem »Routineverfahren« geworden. Ein eindrucksvoller Beweis dafür sind die mehr als 250 000 Kristallstrukturen, die – in Datenbanken gespeichert und ansprechend aufbereitet – für die Untersuchung vieler chemischer Probleme eine wahre Fundgrube sind. Auch die Anzahl der Proteinstrukturen, deren Bestimmung bis vor wenigen Jahren eine besondere Herausforderung darstellte, wächst inzwischen exponentiell an. Allerdings werden Strukturen von Makromolekülen nicht mit den Direkten Methoden, sondern mit speziell dafür entwickelten Verfahren aufgeklärt.

Lokalisierung von Molekülfragmenten

Damit scheint das Problem der Strukturbestimmung mit Hilfe von Röntgenbeugungsdaten gelöst zu sein. Die Direkten Methoden besitzen jedoch zwei Schwachpunkte: Zum einen benötigen sie gute experimentelle Daten. Diese Forderung ist nicht immer zu erfüllen, vor allem wenn die Kristallqualität zu wünschen übrig lässt, denn nicht alle Verbindungen liegen in Form von Einkristallen entsprechender Größe, etwa 0,3 Millimeter Kantenlänge, vor. Zum anderen sind die oben erwähnten statistischen Beziehungen prinzipiell unzuverlässig, insbesondere wenn die Größe der zu untersuchenden Struktur zunimmt. Daher gibt es viele Kristallstrukturen, die



4 Die Strukturen dieser drei Moleküle, die noch vor einiger Zeit als Problemstrukturen galten, wurden mit PATSEE ohne Schwierigkeiten gelöst. Die zur Strukturbestimmung erforderlichen minimalen Molekülfragmente sind durch gelbe Bindungen hervorgehoben (Kohlenstoff: schwarz, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoffatome sind weggelassen).

nicht automatisch bestimmt werden können, sondern die Expertise eines ausgebildeten Kristallographen erfordern. Übrigens: Eine Röntgenstrukturanalyse steckt in allen Stadien voller Fallen, in die selbst ausgebildete Kristallographen leicht tappen können; deswegen ist sie keineswegs ein »Routineverfahren« und wird dies auch auf absehbare Zeit nicht werden! Immer wieder treten Probleme auf, die trotz wiederholter Versuche mit diesen Methoden nicht gelöst werden können. Deshalb haben wir nach einem leistungsfähigen alternativen Verfahren gesucht.

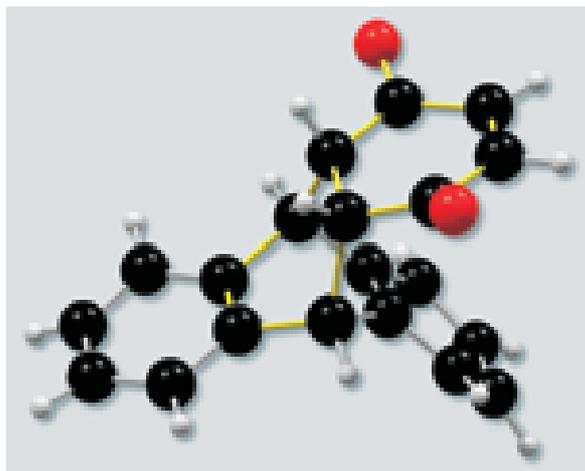
Die Direkten Methoden gehen nur von wenigen elementaren Voraussetzungen aus. Sie vernachlässigen jedoch damit die Strukturinformation, die gerade bei organisch-chemischen Verbindungen schon vor Beginn einer Röntgenstrukturanalyse wenigstens teilweise vorhanden ist, zum Beispiel der Aufbau des Molekülgerüsts oder die Anordnung vorhandener Atomgruppen. Wie kann man diese wertvolle Information direkt für die Strukturbestimmung ausnutzen? Den Schlüssel dazu

Der Autor

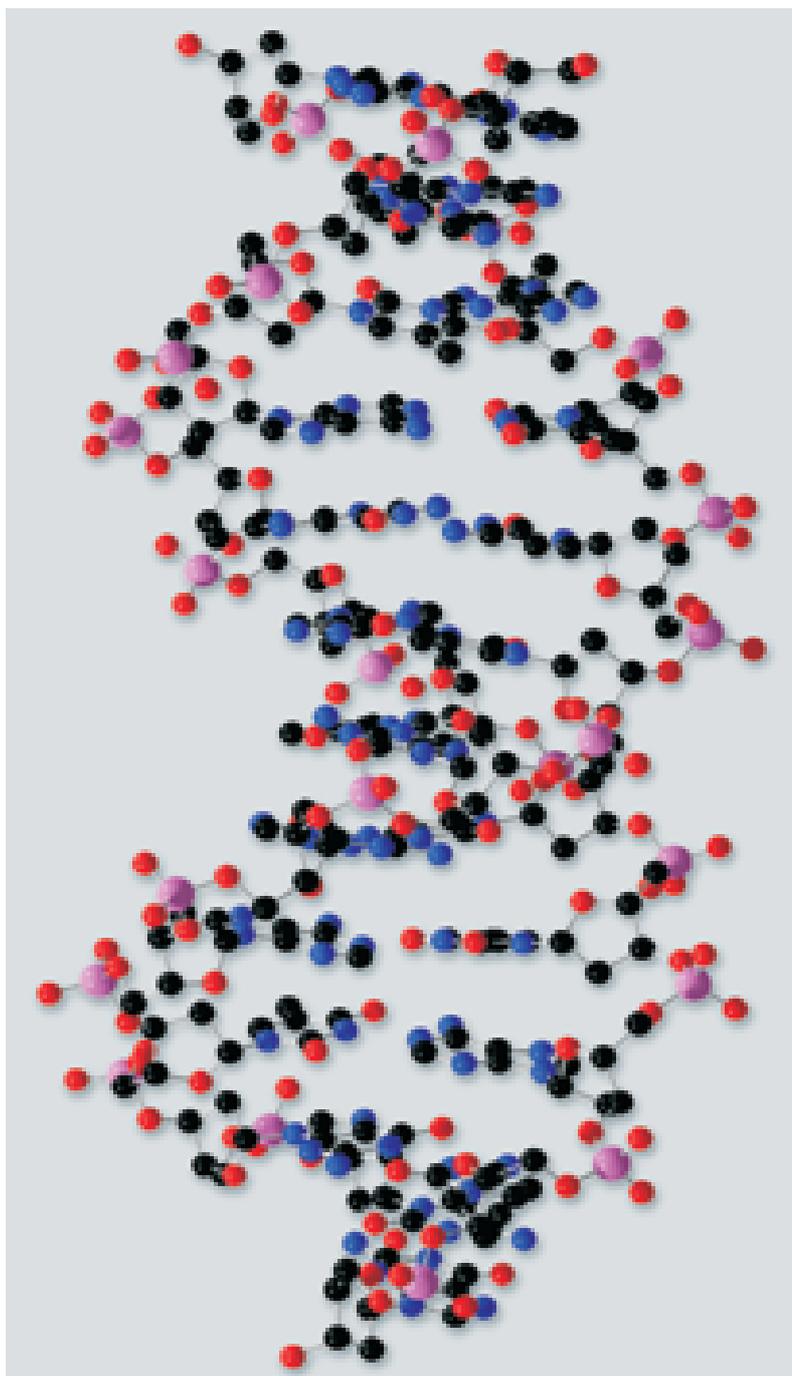


Prof. Dr. Ernst Egert, 53, studierte und promovierte an der Technischen Universität Darmstadt. Nach einem zweijährigen Postdoc-Aufenthalt an der University of Cambridge bei Dr. Olga Kennard ging er zu Prof. Dr. George M. Sheldrick an die Universität Göttingen, wo er sich 1988 habilitierte. Seit 1989 ist er im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie (Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) tätig. Er war zwei Jahre Dekan des Fachbereichs Chemie und ist jetzt Vorsitzender des Studienausschusses Chemie. Außerdem ist er zusammen mit Prof. Dr. Hans Joachim Bader verantwortlich für die Chemie-Ausbildung der Medizin- und Zahnmedizin-Studierenden. Seit zwei Jahren ist er Vorsitzender des Arbeitskreises Chemische Kristallographie (ChemKrisT) innerhalb der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Er war Sprecher des Graduiertenkollegs »Chemische und biologische Synthese von Wirkstoffen«.

liefert die so genannte Pattersonfunktion, die unmittelbar aus den gemessenen Intensitäten berechnet werden kann. Die Maxima dieser Funktion entsprechen den Atom/Atom-Vektoren – also den gerichteten Abständen – in der Kristallstruktur. Da die Vektoren zwischen Atomen mit höheren Ordnungszahlen im Periodensystem zu besonders auffälligen Maxima führen, bot die Pattersonfunktion als »Schweratommethode« vor der Entwicklung der Direkten Methoden die einzige zuverlässige Strategie zur Lösung des Phasenproblems. Für Moleküle ohne Schweratome wie Selen, Brom und Iod – also für die meisten organischen Moleküle – ist dieses Verfahren nicht anwendbar, doch es gibt einen Ausweg: In der Pattersonfunktion sind n-Bilder eines n-atomigen Moleküls versteckt. Da die Anzahl der Vektoren quadratisch mit der Anzahl der Atome wächst, sind diese Bil-



6 Die Struktur dieses Moleküls wurde mit PATSEE aus Pulverdaten bestimmt. Das erfolgreich lokalisierte Suchfragment ist durch gelbe Bindungen hervorgehoben und besteht aus ungefähr der Hälfte des Moleküls (Kohlenstoff: schwarz, Sauerstoff: rot, Wasserstoff: hellgrau).



5 Die mit PATSEE bestimmte Struktur eines Oligonukleotids. Trotz signifikanter Abweichungen von der zu lösenden Struktur wurde das Suchfragment korrekt lokalisiert.

der schon bei mittelgroßen Molekülen so verwischt, dass man sie nicht erkennen kann. Falls jedoch ein signifikanter Teil der Molekülstruktur a priori bekannt ist, ergibt sich daraus ein ganzes Muster von Vektoren, nach dem man gezielt suchen kann 5. Bei dieser Suche werden für das bekannte Molekülfragment durch Rotation und Translation alle möglichen Positionen erzeugt und jedes Mal die berechneten Vektoren mit den entsprechenden Werten der Pattersonfunktion verglichen. Die korrekte Position sollte sich durch eine besonders gute Übereinstimmung zu erkennen geben. Ist das Molekülfragment erst einmal lokalisiert, ist es im allgemeinen nicht schwierig, die fehlenden Atome zu finden und damit das Strukturmodell zu vervollständigen.^{13/}

Große Moleküle und winzige Kristalle

Während meiner Postdoktorandentätigkeit in Cambridge erzielte ich erste Erfolge mit dieser Struktur Lösungsstrategie. Die Idee, die Methode zu automatisieren, entwickelte sich zu einem Langzeitprojekt. Wiederholt führten neue Ideen zu signifikanten Verbesserungen bei dem Bemühen, die Strukturen immer größerer Moleküle mit möglichst kleinen Fragmenten zu bestimmen. Das dabei entstandene Rechenprogramm PATSEE wird mittlerweile von Kristallographen auf der ganzen Welt benutzt und hat eine beachtliche Zahl von Kristallstrukturen gelöst, die zuvor als »unlösbar« galten. Darunter befinden sich einige spektakuläre Erfolge, zum Beispiel im Bereich der Oligopeptide und Oligosaccharide.^{14/} Falls ein verlässliches Molekülfragment von ausreichender Größe – etwa ein Fünftel des gesuchten Moleküls reicht oft aus – zur Verfügung steht und die experimentellen Daten nicht zu schlecht sind, findet PATSEE mit großer Wahrscheinlichkeit die richtige Lösung 4.

Woher stammen die Suchfragmente? Eine ganz wichtige Quelle sind die oben erwähnten kristallographischen Datenbanken; eine Suche nach ähnlichen Verbindungen liefert sehr oft ein brauchbares Molekülfragment. Eine konkurrenzfähige Alternative stellen so genannte Kraftfeldmethoden dar, bei denen mit Hilfe eines empirischen Ansatzes die Strukturen von meist

organischen Molekülen schnell und zuverlässig berechnet werden können.

Unsere aktuellen Forschungsanstrengungen verfolgen zwei Ziele: die Bestimmung noch größerer Molekülstrukturen und die Strukturaufklärung aus Pulverdaten. Vor einiger Zeit ist es uns am Beispiel von Oligonukleotiden, die als Doppelhelix vorliegen, erstmals gelungen, Strukturen mit mehr als 500 Atomen mit Hilfe der Fragmentsuche zu bestimmen ^{1/}. Dies ist deshalb von Bedeutung, weil es bei der Röntgenstrukturanalyse eine »Lücke« bei mittelgroßen Strukturen gibt: Während die Strukturen »kleiner« Moleküle mit weniger als 200 Atomen und großer Moleküle, vor allem von Proteinen, mit mehr als 1000 Atomen mit Hilfe gut etablierter Verfahren bestimmt werden können, bestehen im Zwischenbereich noch erhebliche Probleme. Da viele der heutzutage untersuchten Moleküle, insbesondere auch biologisch interessante Moleküle, diese Größenordnung aufweisen, ist die Entwicklung noch besserer Strukturbestimmungsmethoden ein wichtiges Forschungsziel. Hier wollen wir auch in Zukunft einen Beitrag leisten.

Viele Verbindungen kristallisieren notorisch schlecht; bestenfalls erhält man ein kristallines Pulver, das beim Röntgenbeugungsexperiment kein dreidimensional aufgelöstes Muster, sondern die typischen Pulverringe ^{2/} ergibt – dies bedeutet letztendlich die Reduktion der Daten auf eine Dimension. Eine Strukturbestimmung mit einer solch geringen Datenmenge ist eine äußerst schwierige Aufgabe. Ist der Datenverlust durch die Kenntnis eines Molekülfragments kompensierbar? Nach vielen Tests mit bekannten Strukturen sind die Parameter jetzt so weit optimiert, dass uns vor kurzem erstmals die Bestimmung einer unbekannt Struktur aus Pulverdaten gelang. Nachdem wir danach doch noch gut ausgebildete Kristalle erhalten hatten, führten wir zur Kontrolle eine »klassische« Röntgenstrukturanalyse durch – mit dem zufriedenstellenden Ergebnis, dass die beiden Strukturen sehr gut übereinstimmen ^{3/}.

Mit Hilfe von Struktur-/Funktions-Beziehungen ist – wie oben erwähnt – eine gezielte Suche nach Wirkstoffen möglich. Allerdings erfordert dieser Ansatz leistungsfähige Methoden zur Bestimmung der Strukturen bekannter und unbekannter Verbindungen, damit die biologische Wirkung potenzieller Kandidaten beurteilt werden kann, ohne dass die Verbindungen tatsächlich durch chemische Synthese hergestellt werden müssen. Aus diesem Grund hat unsere Arbeitsgruppe auch ein Computerprogramm zur Vorhersage von Molekülstrukturen entwickelt, das »Molecular Modelling«-Programm MOMO, aber das ist eine andere Geschichte. ◆

Literatur

^{1/} G. Quinkert, E. Egert, C. Griesinger. Aspekte der Organischen Chemie – Band 1: Struktur. 1995. Basel. Verlag Helvetica Chimica Acta.

^{2/} W. Massa. Kristallstrukturbestimmung. 2002. Stuttgart. B. G. Teubner.

^{3/} E. Egert. Eine »chemische« Methode zur Aufklärung von Kristallstrukturen. Nachr. Chem. Tech. Lab. 36 (1988) 498–505.

^{4/} K. Wagner, J. Hirschler, E. Egert. Structure solution with PATSEE. Z. Kristallogr. 216 (2001) 565–572.

Link

<http://www.chemie.uni-frankfurt.de/egert/>



Abonnement FORSCHUNG FRANKFURT

FORSCHUNG FRANKFURT, das Wissenschaftsmagazin der Johann Wolfgang Goethe-Universität, stellt viermal im Jahr Forschungsaktivitäten der Universität Frankfurt vor. Es wendet sich an die wissenschaftlich interessierte Öffentlichkeit und die Mitglieder und Freunde der Universität innerhalb und außerhalb des Rhein-Main-Gebiets.

- Hiermit bestelle ich FORSCHUNG FRANKFURT zum Preis von 14 Euro pro Jahr einschließlich Porto. Die Kündigung ist jeweils zum Jahresende möglich.
- Hiermit bestelle ich FORSCHUNG FRANKFURT zum Preis von 10 Euro als Schüler- bzw. Studentenabo einschließlich Porto (Kopie des Schüler- bzw. Studentenausweise lege ich bei).

Name Vorname

Straße, Nr. PLZ, Wohnort

(nur für Universitätsangehörige:) Hauspost-Anschrift

Datum Unterschrift

Widerrufsrecht: Mir ist bekannt, dass ich diese Bestellung innerhalb von zehn Tagen schriftlich beim Präsidenten der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Vertrieb FORSCHUNG FRANKFURT, widerrufen kann und zur Wahrung der Frist die rechtzeitige Absendung des Widerrufs genügt. Ich bestätige diesen Hinweis durch meine zweite Unterschrift.

Datum Unterschrift

- Ich bin damit einverstanden, dass die Abonnementgebühren aufgrund der obigen Bestellung einmal jährlich von meinem Konto abgebucht werden.

Konto-Nr. Bankinstitut

Bankleitzahl Ort

Datum Unterschrift

- Ich zahle die Abonnementgebühren nach Erhalt der Rechnung per Einzahlung oder Überweisung.

Bitte richten Sie Ihre Bestellung:
An den Präsident der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
»FORSCHUNG FRANKFURT«
Postfach 11 19 32, 60054 Frankfurt