

Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Heinrich Heine
HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

2006/2007

Heinrich Heine

**Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
2006/2007**

**Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
2006/2007**

**Herausgegeben vom Rektor
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. Dr. Alfons Labisch**

**Konzeption und Redaktion:
Univ.-Prof. em. Dr. Hans Süßmuth**

© Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2007
Einbandgestaltung: Wiedemeier & Martin, Düsseldorf
Titelbild: Schloss Mickeln, Tagungszentrum der Universität
Redaktionsassistentz: Georg Stüttgen
Beratung: Friedrich-K. Unterweg
Satz: Friedhelm Sowa, L^AT_EX
Herstellung: WAZ-Druck GmbH & Co. KG, Duisburg
Gesetzt aus der Adobe Times
ISBN 3-9808514-5-1

Inhalt

Vorwort des Rektors	11
Gedenken	17
Rektorat	19
ANNIKA MORCHNER, RAIMUND SCHIRMEISTER und ALFONS LABISCH (Rektor) Der Corporate-Identity-Prozess an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	21
ULF PALLME KÖNIG (Kanzler) Grundsätzliche Überlegungen zu Perspektiven der Zentralen Universitäts- verwaltung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zuge des Hoch- schulfreiheitsgesetzes	29
Medizinische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	53
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	55
BERND NÜRNBERG (Dekan) Chancen und Herausforderungen einer sich wandelnden Hochschulmedizin	63
ANTONIA M. JOUSSEN Wieder lesen können? Möglichkeiten und Grenzen in der Therapie der altersbedingten Makuladegeneration	69
MICHAEL SCHÄDEL-HÖPFNER und JOACHIM WINDOLF Handchirurgie – Ein neues Fachgebiet am Universitätsklinikum Düsseldorf	83
UTE SPIEKERKÖTTER und ERTAN MAYATEPEK Angeborene Störungen der Fettsäureoxidation – Erfolge des Neugeborenen Screenings, Mausmodelle und Pathogenese	93
RÜDIGER E. SCHARF, ANDREA GERHARDT, VOLKER R. STOLDT und RAINER B. ZOTZ Klinische und experimentelle Thromboseforschung – Genetische Deter- minanten, molekulare Mechanismen und therapeutische Strategien bei thrombotischen Komplikationen	105

STEPHAN ROTH, HANS GEORG BENDER, WILFRIED BUDACH, PETER FEINDT, HELMUT ERICH GABBERT, RAINER HAAS, DIETER HÄUSINGER, WOLFRAM TRUDO KNOEFEL, CAROLIN NESTLE-KRÄMLING, HANS-JAKOB STEIGER, JÖRG SCHIPPER und KLAUS-WERNER SCHULTE	
Aktuelle Entwicklungen der interdisziplinären Krebstherapie	127
NORBERT GATTERMANN	
Eröffnung der Universitätstumorambulanz	155
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät	
<i>Dekanat</i>	163
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	165
PETER WESTHOFF (Dekan)	
Die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät und die Herausforderungen der Zukunft	179
DETLEV RIESNER	
Infektiöse Moleküle: Viroide und Prionen	183
GEORG GROTH	
Strukturbestimmung von Proteinen als Schlüssel zum molekularen Mechanismus	215
THOMAS J. J. MÜLLER	
Multikomponenten- und Dominoreaktionen in der diversitätsorientierten Organischen Synthese	227
BETTINA M. PAUSE	
Emotionale Kommunikation mittels chemischer Signale	245
Philosophische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	255
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	257
ULRICH VON ALEMANN (Dekan)	
Die Zukunft der Düsseldorfer Geistes- und Sozialwissenschaften: Zwischen Humboldt und Henkel, Heine und Heute	261
DIETRICH BUSSE	
Sprache – Kognition – Kultur	
Der Beitrag einer linguistischen Epistemologie zur Kognitions- und Kulturwissenschaft	267
PETER MATUSSEK	
Stille Blicke. Zur Naturlyrik des ‚vorkritischen‘ Goethe	281

GERHARD VOWE	
Mediatisierung? Mediendemokratie? Mediokratie?	
Ein theoretischer Ansatz auf dem Prüfstand	295
PETER H. HARTMANN und INGA HÖHNE	
Freizeitmuster und soziale Strukturen in Düsseldorf –	
Ein Weg zur Bestimmung neuer Zielgruppen.....	311
RALPH WEISS	
Nach dem „Deutschen Sommermärchen“ zurück im alltäglichen Politik-	
verdruss – Wie Medien politische Stimmungslagen beeinflussen und von	
welchen Kontexten der Medieneinfluss abhängt	333
Gastbeitrag	
ULRICH VON ALEMANN	
Vorwort zum Gastbeitrag von Lothar Schröder	349
LOTHAR SCHRÖDER	
Heinrich Heine: „Die Pragueise“ (1824) oder:	
Rekonstruktion eines spektakulären Handschriftenfonds	351
Wirtschaftswissenschaftliche Fakultät	
<i>Dekanat</i>	361
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	363
CHRISTOPH J. BÖRNER (Dekan)	
Strategische Positionierung und Profilierung von Universitäten	
und Fakultäten aus betriebswirtschaftlicher Sicht	365
H. JÖRG THIEME	
Soziale Marktwirtschaft – Denkfehler oder Gestaltungsdefekte?	381
GUIDO FÖRSTER	
Steuerliche Probleme bei der Abfindung von Pensionszusagen an	
Gesellschafter-Geschäftsführer einer GmbH	391
Juristische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	407
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	409
JOHANNES DIETLEIN (Dekan)	
Die Düsseldorf Law School – Innovation im Zeichen des Hochschulfrei-	
heitsgesetzes	413
DIRK OLZEN	
Das Dr. med. Micheline Radzyner-Institut für Rechtsfragen der Medizin....	419

KARSTEN ALTENHAIN und MICHAEL HAIMERL Die Praxis der Urteilsabsprachen in Wirtschaftsstrafverfahren – Ergebnisse eines drittmittelfinanzierten juristischen Forschungsprojekts	421
DIRK LOOSCHELDERS und LOTHAR MICHAEL Zur Gründung eines Instituts für Versicherungsrecht	437
JOHANNES DIETLEIN Interessenkonflikte bei der Besetzung von Sparkassengremien	443
Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V.	
OTHMAR KALTHOFF Jahresbericht 2006	469
Forscherverbünde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
ANDREA VON HÜLSEN-ESCH, MONIKA GOMILLE, HENRIETTE HERWIG, CHRISTOPH AUF DER HORST, HANS-GEORG POTT, JOHANNES SIEGRIST und JÖRG VÖGELE Kulturelle Variationen und Repräsentationen des Alter(n)s	473
Nachwuchsforschergruppen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
ANNETTE M. SCHMIDT Magnetoaktive weiche Materie – Von der Kombination magnetischer Zwerge mit flexiblen Kettenmolekülen	491
Institute an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
<i>Das Düsseldorfer Institut für Außen- und Sicherheitspolitik</i>	
RALPH ALEXANDER LORZ und RAINER WINKLER Das Düsseldorfer Institut für Außen- und Sicherheitspolitik – Ein unabhängiges interdisziplinäres Forum an der Heinrich-Heine-Universität	505
<i>Institut „Moderne im Rheinland“</i>	
GERTRUDE CEPL-KAUFMANN Der „Arbeitskreis zur Erforschung der Moderne im Rheinland“ als An-Institut an der Heinrich-Heine-Universität	515
Kooperationen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
<i>Konfuzius-Institut Düsseldorf</i>	
PETER HACHENBERG und LI XUETAO Das Konfuzius-Institut Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V. – Gründung, Programm und Perspektiven	533

Ausgründungen aus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

KARL-ERICH JAEGER, WERNER HUMMEL und THORSTEN EGGERT evocatal GmbH – Eine neue Biotech-Firma aus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	545
--	-----

Zentrale Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Universitäts- und Landesbibliothek

IRMGARD SIEBERT Die Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf als Teil der Landesbibliotheksstruktur in Nordrhein-Westfalen	555
---	-----

Zentrum für Informations- und Medientechnologie

STEPHAN OLBRICH und SEBASTIAN MANTEN Hochleistungsrechnen und parallele Programmierung: Service für sowie Gegenstand von Forschung und Lehre	575
--	-----

Geschichte der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

MAX PLASSMANN <i>Public Private Partnership</i> in der Nachkriegszeit – Das Rheinisch-Westfälische Institut für Übermikroskopie und die Medizinische Akademie Düsseldorf	593
---	-----

Forum Kunst

ANDREA VON HÜLSEN-ESCH Zum Sterben schön! Alter, Totentanz und Sterbekunst von 1500 bis heute – Eine Ausstellungsreihe in Nordrhein-Westfalen von September 2006 bis April 2007	605
--	-----

Chronik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

ROLF WILLHARDT Chronik 2006/2007	635
---	-----

Campus-Orientierungsplan	653
---------------------------------------	-----

Daten und Abbildungen aus dem Zahlenspiegel der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	659
--	-----

Autorinnen und Autoren	673
-------------------------------------	-----

GEORG GROTH

Strukturbestimmung von Proteinen als Schlüssel zum molekularen Mechanismus

Einleitung

Das Arbeitsgebiet der Molekularen Strukturforschung hat sich zu einem wichtigen Feld der modernen Lebenswissenschaften entwickelt. Diese enorme Entwicklung und die zunehmende Bedeutung dieser Disziplin erklärt sich durch die Tatsache, dass für ein genaues Verständnis der Funktion und der molekularen Arbeitsweise eines Proteins detaillierte Informationen zum räumlichen Aufbau absolut essenziell sind. Auf der Grundlage dieser Strukturinformationen, insbesondere der Bindungsstellen von Enzymen und Rezeptoren, lassen sich gezielt spezifische Wirkstoffe entwickeln. Bei medizinisch relevanten Proteinen eröffnet sich damit die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Medikamente und Therapeutika, bei agrarwirtschaftlich interessanten Proteinen erschließen sich neue Möglichkeiten im Bereich des gezielten Pflanzenschutzes und der Ertragssteigerung von Nutz- und Kulturpflanzen.

Dieser Beitrag befasst sich mit der Struktur- und Funktionsanalyse einer besonderen Proteinfamilie – den Membranproteinen. Nach einer kurzen Betrachtung zu Vorkommen und Aufgaben dieser Proteine in der Zelle sowie einer kurzen Darstellung der Grundlagen der röntgenkristallographischen Strukturbestimmung werden exemplarisch zwei pflanzliche Membranproteine und die Arbeiten aus unserer Abteilung zur Charakterisierung ihrer Struktur und molekularen Wirkweise vorgestellt.

Membranproteine spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen

Eine typische pflanzliche Zelle besitzt eine Vielzahl von durch Membranen abgegrenzten Reaktionsräumen, in denen die unterschiedlichsten biochemischen Reaktionen ablaufen. Die Membranen, die diese unterschiedlichen Reaktionsräume umgeben, bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in die eine Vielzahl von Proteinen eingebettet ist. Man geht derzeit davon aus, dass etwa ein Drittel der gesamten in einer Zelle vorhandenen Proteine in den Membransystemen der verschiedenen Organellen lokalisiert ist. Die Aufgaben dieser Proteine sind vielfältig und reichen vom Transport von Stoffen und der Erkennung und Weitergabe von externen Signalen bis hin zu Systemen, die in der Lage sind, verschiedene Energieformen ineinander umzuwandeln. Um die Funktion und das molekulare Prinzip, nach dem diese Proteine arbeiten, verstehen zu können, ist es entscheidend, die genaue chemische Struktur dieser Proteine zu entschlüsseln. Dazu müssen die Proteine zunächst aus ihrer natürlichen Membranumgebung herausgelöst werden, ohne dass ihre ursprüngliche Struktur zerstört wird. Dies geschieht mit Hilfe milder Detergenzien, die aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften die natürliche Membranumgebung nachahmen. Die

Bestimmung der Struktur der isolierten Proteine kann dann über verschiedene Techniken, wie z. B. NMR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse oder Einzelmolekülelektronenmikroskopie, erfolgen. Um den detaillierten strukturellen Aufbau eines Proteins mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmen zu können, einem Verfahren, das bislang die höchste räumliche Auflösung liefert, muss das gereinigte Protein zunächst in regelmäßiger dreidimensionaler Anordnung kristallisiert werden. Dieser Abschnitt der Strukturbestimmung stellt in den meisten Fällen den limitierenden Schritt des gesamten Prozesses der Strukturaufklärung dar, da in einem Trial-and-Error-Prozess zahlreiche Parameter, wie z. B. der pH-Wert, die Konzentration und die Natur des Präzipitationsmittels oder der Zusatz von Additiven, systematisch variiert werden müssen. Sobald die geeigneten Kristallisationsbedingungen identifiziert worden sind und regelmäßige dreidimensionale Kristalle des Proteins gewonnen werden konnten, schließt sich der nächste Schritt der Strukturbestimmung, die Beugung von Röntgenstrahlung am Kristall und die Ermittlung der detaillierten Struktur aus dem Beugungsmuster mit Hilfe von mathematischen Verfahren, an.

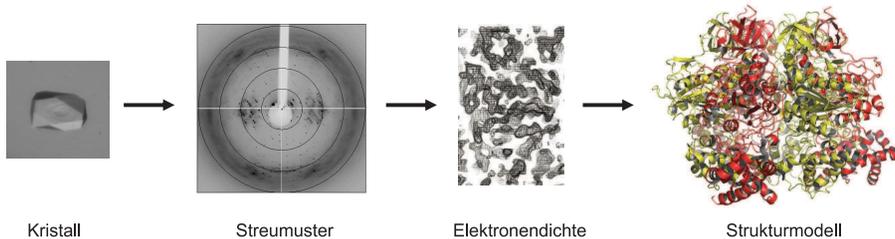


Abb. 1: Schematische Darstellung des Prinzips der Strukturbestimmung eines Proteins. Bestrahlt man einen Proteinkristall mit Röntgenstrahlen, so erhält man ein charakteristisches Beugungsmuster. Aus diesem Beugungsmuster kann mit Hilfe von mathematischen Verfahren auf die Elektronendichteverteilung um die Atomkerne und damit auf die Positionen der einzelnen Atome geschlossen werden.

ATP-Synthase – ein universelles Protein des Energiestoffwechsels

ATP-Synthasen, die häufig auch als F-Typ-ATPasen bezeichnet werden, sind zentraler Bestandteil des Energiestoffwechsels in Pflanzen, Tieren und Bakterien. Eingebettet in die Thylakoidmembran der Chloroplasten, die innere Membran der Mitochondrien oder die Zytoplasmamembran der Bakterien können sie die in dem durch die Membran aufrechterhaltenen Protonengradienten gespeicherte Energie in die universelle Energiewährung der Zelle – das Molekül ATP – überführen oder durch die Hydrolyse von ATP zum Aufbau eines Protonengradienten in den verschiedenen Membransystemen beitragen.

Insbesondere aufgrund der enormen Fortschritte, die in den vergangenen zehn bis 15 Jahren auf dem Gebiet der ATPase-Forschung gemacht wurden, verfügen wir heute über ein recht detailliertes Bild dieses Enzyms. Dies ist vor allem den präzisen Strukturinformationen, die an den aus verschiedenen Organismen isolierten ATPasen gesammelt werden

konnten,¹ sowie ausgeklügelten Messungen an einzelnen Enzymmolekülen² zu verdanken. Diese Experimente konnten zeigen, dass das Enzym – wie Abbildung 2 verdeutlicht – aus zwei abgegrenzten Strukturbereichen besteht, die jeweils aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind.

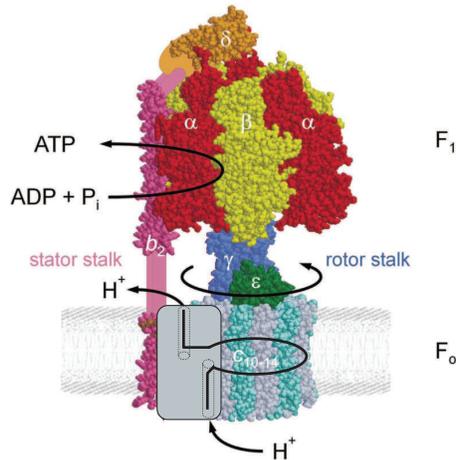


Abb. 2: Schematisches Strukturmodell der ATP-Synthase. Verändert nach Weber und Senior (2002).

Die Kernstruktur des membranassoziierten F_1 -Bereichs wird von nur zwei verschiedenen Untereinheiten gebildet, von denen drei Kopien in alternierender Abfolge gleich den Segmenten in einer Orange angeordnet sind. An der Kontaktfläche dieser beiden Untereinheiten befinden sich die Reaktionszentren, in denen das ATP-Molekül gebildet werden kann. In der Mitte des F_1 -Bereichs sind zwei kleine Untereinheiten lokalisiert, die als γ - und ϵ -Untereinheit bezeichnet werden. Durch die Drehung dieser beiden Untereinheiten im Zentrum des Kernkomplexes ergeben sich Konformationsänderungen an den Kontaktflächen der beiden großen Untereinheiten, die die Bildung bzw. die Spaltung von ATP ermöglichen.

Für die Bildung von ATP müssen Protonen von der Innenseite der Membran auf die Außenseite transportiert werden. Die Spaltung kann der membranassoziierte F_1 -Komplex, der sich relativ einfach von der Membran ablösen lässt, auch allein katalysieren. Die graue Box im Membranbereich macht deutlich, dass wir für den in diesem Bereich des Enzyms vermuteten Protonentransportweg noch keine genauen Strukturinformationen besitzen. Derzeit wird auf der Grundlage eines von Wolfgang Junge³ postulierten Modells allgemein angenommen, dass in dieser Untereinheit zwei Halbkanäle existieren, die durch einen Protonentransportweg, der die Drehung des zylinderförmigen Untereinheit-c-Multimers bewirkt, verbunden sind. Die Drehung des zylinderförmigen Multimers soll letztendlich die Drehung der γ - und der ϵ -Untereinheit im F_1 Bereich bedingen. Die ge-

¹ Vgl. Abrahams *et al.* (1994), Shirakihara *et al.* (1997), Bianchet *et al.* (1998) sowie Groth und Pohl (2001).

² Vgl. Yasuda *et al.* (2001), Itoh *et al.* (2004) sowie Rondelez *et al.* (2005).

³ Vgl. Junge *et al.* (1997).

samte molekulare Maschine-ATPase hat in etwa die Dimension von einem Zweitausendstel des Durchmessers eines menschlichen Haars – die in der wissenschaftlichen Literatur inzwischen eingebürgerte Bezeichnung vom kleinsten molekularen Motor ist also durchaus angebracht.

Spezifische Charakteristika der pflanzlichen ATP-Synthase

Die chloroplastidäre ATP-Synthase unterscheidet sich in ihrer Aktivierung und Regulation deutlich von den homologen bakteriellen und mitochondrialen Enzymen. Die hochaffine Bindung von Adeninnukleotiden an eine katalytische Bindungsstelle und die Modulation der Enzymaktivität durch den Redoxzustand von zwei Cysteinsten in der γ -Untereinheit verhindern, dass eine bei niedrigen pH-Gradienten thermodynamisch begünstigte, dissipative ATP-Spaltung erfolgt. Die Redoxmodulation der Enzymaktivität ist nur in höheren Pflanzen und Grünalgen zu finden, während die entsprechende regulatorische Sequenz in der γ -Untereinheit in Bakterien und Mitochondrien fehlt. *In vivo* wird die reversible Reduktion der γ -Untereinheit durch das Thioredoxinsystem kontrolliert, das wiederum durch Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette reduziert wird. Neue Einblicke in den molekularen Mechanismus der Redoxmodulation konnten in Einzelmolekülexperimenten an einem chimären $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplex gewonnen werden, der neben den Untereinheiten aus einem thermophilen Bakterium auch den regulatorischen Bereich der chloroplastidären γ -Untereinheit enthält. In diesen Experimenten, deren Aufbau in Abbildung 3 schematisch veranschaulicht ist, konnte die Rotationsbewegung der zentralen γ -Untereinheit über eine Markierung mit Kunststoffkügelchen im Phasenkontrastmikroskop direkt sichtbar gemacht werden. Die Messungen zeigten eindeutig, dass die verringerte Aktivität des oxidierten F_1 -Komplexes im Vergleich zum reduzierten Enzym auf häufigere und längere Pausen in der Rotation der γ -Untereinheit im $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon zurückzuführen ist.⁴ Die Klärung der molekularen Ursache dieser eingeschränkten Rotation erfordert allerdings noch weitere, detaillierte Strukturinformationen über die reduzierte und oxidierte Form der chloroplastidären oder chimären γ -Untereinheit, an denen wir zurzeit arbeiten.

Die Aktivität der chloroplastidären ATPase kann durch Phytotoxine manipuliert werden

Phytotoxine hemmen selektiv die Aktivität der Chloroplasten-ATPase, zeigen aber keinen Effekt auf mitochondriale und bakterielle Enzyme und eignen sich damit als potenzielle selektive Herbizide. Tentoxin, ein zyklisches Tetrapeptid aus dem phytopathogenen Pilz *Alternaria alternata*, fungiert als nicht-kompetitiver Inhibitor der Chloroplasten-ATPase. Das Toxin beeinflusst die Chloroplastenentwicklung und bewirkt eine Chlorose der Blätter, so dass es letztendlich zum Absterben der Pflanze kommt. Die exakte Bindungsstelle und der vermutliche molekulare Wirkmechanismus von Tentoxin konnten durch Kristallisation und Strukturaufklärung eines CF_1 -Tentoxin-Inhibitor-Komplexes aus Spinatpflanzen bestimmt werden.⁵ Die Strukturdaten zeigen, dass der nicht-kompetitive Inhibitor annähernd senkrecht zur Molekülachse an die katalytische $\alpha\beta$ -Kontaktfläche bindet. Die Wech-

⁴ Vgl. Bald *et al.* (2001).

⁵ Vgl. Groth (2002).

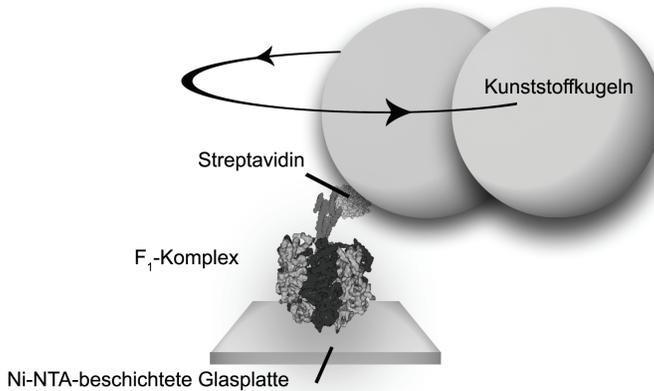


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Rotationsversuche. Der F₁-Komplex wird auf einer Glasplatte immobilisiert und durch eine Biotin-Streptavidin-vermittelte Bindung mit Kunststoffkugeln (Durchmesser: 350 Nanometer) markiert. Die Rotation kann nach Zugabe von ATP durch ein Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden.

selwirkung mit dem CF₁-Komplex erfolgt in der β -Untereinheit über Wasserstoffbrücken, in der α -Untereinheit dagegen hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen. Die Hemmwirkung von Tentoxin beruht den Strukturdaten zufolge vermutlich auf der Unterbrechung der im Zuge des katalytischen Mechanismus stattfindenden Umwandlung der Nukleotidbindungsstellen von der geschlossenen in die offene Konformation.

Mit Hilfe der am pflanzlichen Enzym gewonnenen Strukturinformationen und der Erkenntnisse zum mutmaßlichen molekularen Mechanismus der Tentoxinhemmung konnten über gerichtete Mutagenese in der Folge verschiedene bakterielle Enzyme, die normalerweise nicht durch Tentoxin gehemmt werden, in tentoxinsensible Enzyme umgewandelt werden.⁶ Diese Beispiele unterstreichen nachhaltig die große Bedeutung genauer Strukturinformationen für die Entwicklung selektiver Wirkstoffe bzw. für die Anpassung natürlich vorkommender Proteine an existierende Wirkstoffe.

Neben der hochaffinen, hemmenden Bindungsstelle existiert in der Chloroplasten-ATPase noch eine weitere Bindungsstelle für ein zweites Tentoxinmolekül. Die Besetzung dieser Bindungsstelle hebt die Hemmung der katalytischen Aktivität auf und führt zu einer Stimulation der ATPase-Aktivität.⁷ Tentoxin ist somit eher als selektiver Modulator der Enzymaktivität denn als klassischer Inhibitor anzusehen, da es, anders als andere Wirkstoffe, je nach Konzentration die Aktivität des Enzyms sowohl inhibieren als auch stimulieren kann. Einzelmolekülexperimente bei verschiedenen Tentoxinkonzentrationen lassen erkennen, dass die Rotation der zentralen γ -Untereinheit bei geringen hemmenden Konzentrationen merklich verlangsamt ist und in manchen Fällen sogar komplett zum Erliegen kommt. Bei höheren Konzentrationen ist die Rotation dagegen wieder deutlich beschleunigt, gleicht aber nicht der Ausgangssituation. Über die genaue Analyse der Ro-

⁶ Vgl. Groth *et al.* (2002) sowie Schnick *et al.* (2002).

⁷ Vgl. Steele *et al.* (1978), Reimer und Selman (1978) sowie Dahse *et al.* (1994).

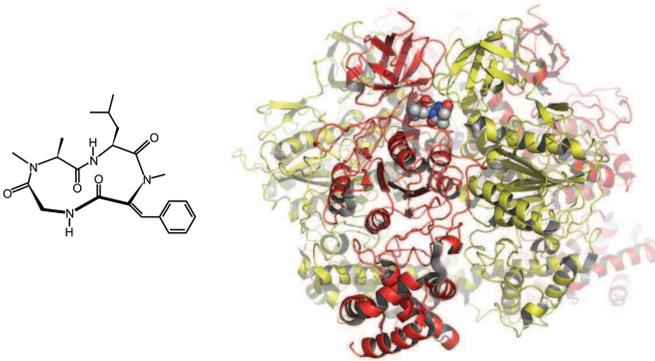


Abb. 4: Struktur des zyklischen Tetrapeptids Tentoxin (links). Bindungsstelle des Toxins in der Chloroplasten-ATPase. Der sich im oberen Bereich der Struktur befindende Bindungsort ist relativ weit von den Reaktionszentren des Enzyms entfernt, die sich etwa in der Mitte der Struktur befinden.

tationsparameter konnte ein Modell für den molekularen Mechanismus der Reaktivierung abgeleitet werden.⁸ Die Hemmung kommt demnach durch eine Blockierung der durch die Drehung der γ -Untereinheit vermittelten Konformationsänderungen zustande. Die Reaktivierung ist dagegen auf einen anderen Prozess zurückzuführen, nämlich auf eine durch das Tentoxin vermittelte verringerte Sensibilität des Enzyms gegenüber einer Hemmung durch Adenosindiphosphat, dem Produkt der Hydrolyse-reaktion.

Ethylenrezeptorproteine – pflanzliche hochsensible Gasetektoren

Phytohormone spielen in Pflanzen sowohl bei der Wahrnehmung von Umweltreizen als auch bei der Steuerung von Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle. Das Phytohormon Ethylen wirkt auf zahlreiche Prozesse in unterschiedlichen Abschnitten des pflanzlichen Lebenszyklus. Es kontrolliert Wachstums- und Differenzierungsprozesse, wie z. B. die Zellstreckung, die Blütenentwicklung, den Blattfall, die Frucht- und die Samenreifung. Die so genannte „Induzierte Reifung“ von Früchten oder Gemüse ist im Allgemeinen der in der Öffentlichkeit wohl bekannteste Prozess, der durch Ethylen vermittelt wird. Dieser Prozess findet in den Pflanzen natürlicherweise durch das in ihnen endogen gebildete Ethylen statt; er kann aber auch von außen durch exogene Ethylenzufuhr gezielt ausgelöst werden. Diese kontrollierte exogene Zufuhr spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung von Bananen, die in grüner, unreifer Form über große Distanzen transportiert und kurz vor dem Verkauf an den Verbraucher mit Ethylen oder Ethylenanaloga behandelt werden. Ohne kontrollierte Ethylenzufuhr würden die Bananen bereits während des Transports ausgelöst durch Pathogenbefall oder eine Erhöhung der Temperatur vollständig reifen. Dieser unkontrollierte Prozess würde jedoch Nachernteverluste von bis zu 50 Prozent verursachen.

⁸ Vgl. Meiß (2007).

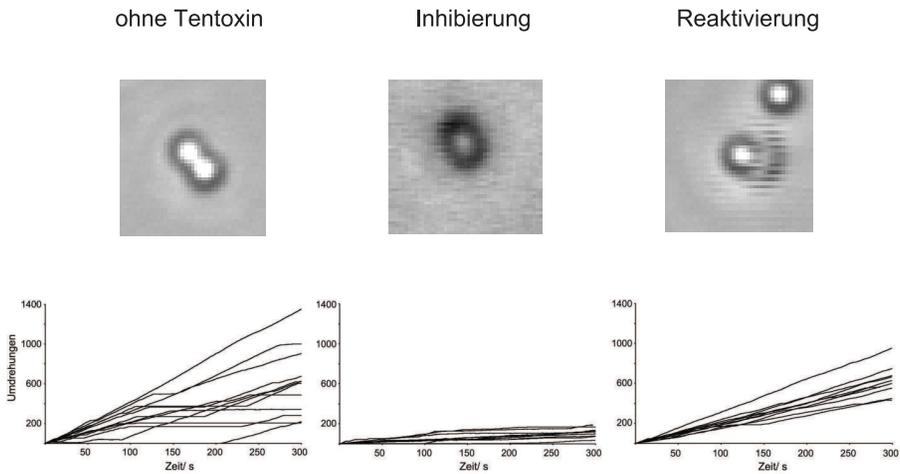


Abb. 5: Darstellung von Zeitverläufen der ATP-getriebenen Rotation der γ -Untereinheit über die gesamte Messzeit des Einzelmolekülexperiments bei verschiedenen Tentoxinkonzentrationen (unten). Waagerechte Abschnitte charakterisieren Rotationspausen. Die Rotation der an die γ -Untereinheit angehefteten Kunststoffkugeln wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops beobachtet und analysiert (oben).

Neben den zahlreichen Effekten, die Ethylen auf die pflanzlichen Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse hat, spielt das Phytohormon auch bei der Vermittlung verschiedener externer Stressfaktoren eine wichtige Rolle, wie z. B. bei Trockenheit, Hitze oder Kälte. Ethylen kann in nahezu allen pflanzlichen Geweben aus der Aminosäure Methionin gebildet werden, wobei die Syntheserate allerdings stark vom Gewebetyp und Entwicklungszustand der Pflanze abhängt. Die molekularen Komponenten, die an der Ethylenwahrnehmung und -weiterleitung beteiligt sind, und ihre vermutliche Abfolge in der Signalkaskade konnten mit Hilfe eines molekulargenetischen Testsystems identifiziert werden, das auf der phänotypischen Ausprägung (*triple response*) von Keimlingen im Dunkeln in Gegenwart von Ethylen beruht.⁹ Die schematische Darstellung des Signalweges in Abbildung 6 veranschaulicht, dass an diesem Signalprozess verschiedene Membranproteine beteiligt sind, die für die Wahrnehmung und Weiterleitung des Ethylensignals verantwortlich sind.

Die Abbildung verdeutlicht, dass an den Prozessen der Ethylenwahrnehmung und Signalweitergabe zahlreiche Komponenten beteiligt sind. Die Abteilung für biochemische Pflanzenphysiologie konzentriert sich in ihren Arbeiten vor allem auf die an der Signalkette beteiligten Membranproteine. Wir wollen mit unseren Arbeiten herausfinden, wie die am Beginn der Kaskade lokalisierten Ethylensensoren auf molekularer Ebene funktionieren, über welche Änderungen in diesen Proteinen das Signal innerhalb der Kaskade weitergegeben und die spezifische Antwort auslöst wird, aber auch, wie das im Zentrum

⁹ Vgl. Bleecker *et al.* (1988) sowie Guzman und Ecker (1990).

des Signalweges befindliche Membranprotein EIN2 das Ethylen signal aufnimmt und an die nachgeschalteten Komponenten der Signalkette weitergibt.

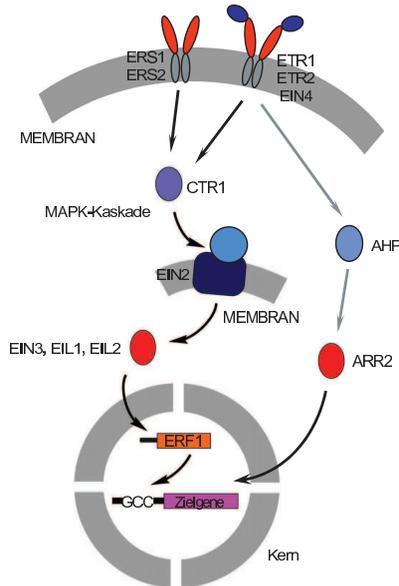


Abb. 6: Schematische Darstellung des Ethylensignalweges in *Arabidopsis thaliana*.

Betrachtet man die am Beginn der Wirkkaskade befindlichen Rezeptorproteine, von denen in *Arabidopsis thaliana* fünf verschiedene Formen identifiziert werden konnten, unter rein schematischen Gesichtspunkten, so kann man feststellen, dass sie alle einen ähnlichen modularen Aufbau besitzen. Sie gliedern sich in eine in der Membran befindliche Bindedomäne, an die das Ethylenmolekül mit hoher Affinität bindet, und eine außerhalb der Membran liegende Kinase- und Regulatoromäne. Einigen Formen fehlt die Regulatoromäne, anderen fehlt ein charakteristischer Aminosäurerest in der Kinasedomäne.

Um die räumliche Struktur und den molekularen Mechanismus der Rezeptorproteine zu verstehen, sind große Mengen dieser Proteine erforderlich. In den Membranen der pflanzlichen Zellen sind die Proteine jedoch nur in geringen Mengen vorhanden. Also muss man versuchen, die Proteine in geeigneter Weise auf anderem Wege herzustellen. Dies ist für kleine lösliche Proteine inzwischen Routine, nämlich die Produktion in einem Bakterium oder in eukaryontischen Zellen. Für Membranproteine ist es jedoch jedes Mal eine neue Herausforderung, d. h., es ist extrem schwierig, andere Zellsysteme zu „überzeugen“, diese aufgrund ihrer Membrandomäne teilweise sehr hydrophoben Proteine in größeren Mengen zu produzieren. In unserer Abteilung ist es uns jedoch gelungen, das ETR1-Rezeptorprotein, das als Prototyp der Ethylenrezeptorfamilie gilt, in einem Bakterium herzustellen und aus diesem Bakterium in größeren Mengen zu reinigen.¹⁰ Den gereinigten Rezeptor versuchen wir derzeit zu kristallisieren, um dann mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse

¹⁰ Vgl. Voet van Vormizeele und Groth (2003).

detaillierte Aussagen zum räumlichen Aufbau dieses Sensors machen zu können, der, wie Experimente in Pflanzen vermuten lassen, bereits auf nanomolare Konzentrationen von Ethylen reagiert.

Bevor man über aufwändige Verfahren die Struktur eines isolierten Proteins bestimmt, muss man selbstverständlich nachweisen, dass das isolierte Protein die Reinigung gut überstanden hat und noch in seiner „ursprünglichen räumlichen Konstruktion“ vorliegt. Dies gelingt meist über den Nachweis, dass das gereinigte Protein noch die Aktivität besitzt, die es in der Zelle zeigt. Experimente *in planta* legen nahe, dass der Ethylenrezeptor durch die Übertragung eines aus einem ATP-Molekül stammenden Phosphatrestes in bestimmten Positionen spezifisch modifiziert wird.

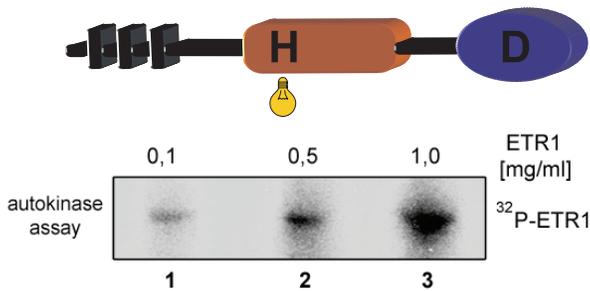


Abb. 7: Schematischer Aufbau des Ethylenrezeptorproteins ETR1, das aus einer Ethylenbindedomäne, bestehend aus drei transmembranen Helices (grau), einer Histidinkinasedomäne (rot) und einer Antwortregulatordomäne (blau) besteht. Der mutmaßliche Aminosäurerest, der phosphoryliert wird, ist durch ein Symbol hervorgehoben (oben). Einbau von radioaktivem Phosphat in das gereinigte rekombinante Rezeptorprotein (unten).

Dieser autokatalytische Einbau von Phosphat in den gereinigten Rezeptor konnte mit Hilfe einer radioaktiv markierten ATP-Verbindung erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 7). Bei gleicher Menge an markiertem ATP erhält man mit zunehmender Proteinmenge einen zunehmenden Einbau des Phosphates in den isolierten Rezeptor. Der Rezeptor verfügt also über einen spezifischen molekularen Schalter, mit dem er ein- und ausgeschaltet werden kann. Aber wann ist er aktiv und wann inaktiv? Studien mit verschiedenen Mutanten des Ethylensignalweges lassen vermuten, dass der Rezeptor in Abwesenheit von Ethylen aktiv ist und durch die Bindung des Phytohormons inaktiviert wird. Messungen mit dem gereinigten rekombinanten ETR1-Rezeptor konnten diese Hypothese erstmals bestätigen. In Gegenwart von Cyanid, einer Verbindung, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften und ihrer Elektronenverteilung die Wirkung von Ethylen nachahmt, zeigt der Rezeptor keinen Einbau von Phosphat in das Protein mehr.

Das Membranprotein EIN2 ist eine zentrale Komponente des Ethylensignalweges

Das Rezeptorprotein EIN2 nimmt molekulargenetischen Untersuchungen zufolge eine zentrale Rolle im Ethylensignalweg ein und vermittelt die Signalübertragung zwischen

der löslichen Ser-Thr-Kinase CTR1 und den Transkriptionsfaktoren der EIN3-Familie.¹¹ Der Mechanismus der Signalaufnahme und -weitergabe ist jedoch noch nicht geklärt. Die Frage, wie CTR1 das Ethylensignal an EIN2 weiterleitet und wie EIN2 die EIN3-Transkriptionsfaktoren aktiviert, gehört derzeit sicher zu den interessantesten und spannendsten Aspekten des Ethylensignalweges. Auch ist EIN2 das einzige derzeit bekannte Gen, bei dem Funktionsverlustmutationen zur vollständigen Unempfindlichkeit sowohl gegenüber endogenem als auch gegenüber exogen verabreichtem Ethylen führen.¹² Die Expression hoher Mengen der C-terminalen, vermutlich außerhalb der Membran liegenden Domäne von EIN2 (Aminosäuren 454–1294) in EIN2-Funktionsverlustmutanten bewirkt in den adulten Pflanzen eine konstitutive Ethylenantwort und belegt, dass dieser Bereich eine wichtige Funktion bei der Weiterleitung des Ethylensignals zu den Zielgenen hat. Bei der Expression des hydrophoben N-terminalen Bereichs (Aminosäuren 1–480) oder des Volllängenproteins ist dagegen keine konstitutive Ethylenantwort in den transgenen Pflanzen nachzuweisen.¹³ Im Gegensatz zu den in den adulten Pflanzen beobachteten Effekten reicht die Expression der hydrophilen C-terminalen Domäne des EIN2-Proteins allerdings nicht aus, um in Keimlingen eine vollständige *triple response* zu induzieren; d. h., dass entweder die Menge an überexprimiertem und funktionellem C-terminalem EIN2-Fragment für die Auslösung der *triple response* zu gering ist oder dass die Membrandomäne von EIN2 für die während der Keimung in der Dunkelheit vermittelten Ethyleneffekte ebenfalls erforderlich ist. Um die Struktur und den molekularen Mechanismus des EIN2-Rezeptors aufzuklären, benötigt man ausreichende Mengen des isolierten Proteins. Ebenso wie die Proteine der Ethylenrezeptorfamilie kommt EIN2 in der Pflanze allerdings nur in sehr geringer Menge vor und muss daher rekombinant hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde EIN2 aus einer c-DNA-Bank etiolierter *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge in verschiedene Vektoren eines bakteriellen Expressionssystems kloniert. Neben dem vollständigen Protein wurden außerdem der N-terminale Membranbereich (Aminosäuren 1–486) und die C-terminale, außerhalb der Membran lokalisierte Domäne (Aminosäuren 479–1294) kloniert. In systematischen Expressionsstudien konnten mit diesen unterschiedlichen Konstrukten dann Bedingungen identifiziert werden, unter denen die C-terminale Extramembrandomäne exprimiert wird, die *in planta* zur Rettung von EIN2-Funktionsverlustmutationen ausreicht. Mit Hilfe verschiedener chromatographischer Verfahren kann die Extramembrandomäne des EIN2-Rezeptors aus dem bakteriellen Expressionssystem isoliert und gereinigt werden.

Sowohl bei den Proteinen der Ethylenrezeptorfamilie als auch beim Rezeptorprotein EIN2 halten wir damit nun ausreichende Proteinmengen in Händen, um systematische Kristallisationsstudien durchführen zu können. Ziel der Abteilung für biochemische Pflanzenphysiologie in den kommenden Jahren ist es, die Struktur der am Ethylensignalweg beteiligten Membranproteine mit hoher Auflösung zu bestimmen, um den molekularen Mechanismus von Ethylenwahrnehmung und -weiterleitung zu verstehen und damit bis in die molekularen Dimensionen vorzudringen, die bei der ATPase schon Realität sind.

¹¹ Vgl. Roman *et al.* (1995) sowie Chao *et al.* (1997).

¹² Vgl. Roman *et al.* (1995) sowie Chen und Bleecker (1995).

¹³ Vgl. Alonso *et al.* (1999).

Ausblick

Von großer Bedeutung für die röntgenkristallographische Strukturanalyse von biologischen Makromolekülen war der Erwerb einer zur Untersuchung von Proteinkristallen geeigneten Röntgenanlage an der Heinrich-Heine-Universität, die Ende 2006 durch die gemeinsame Initiative des Kollegen Lutz Schmitt (Biochemie, Abteilung für Membrantransport) und mir, Georg Groth (Biochemie der Pflanzen, Abteilung für Biochemische Pflanzenphysiologie), mit der Unterstützung zahlreicher Geldgeber beschafft werden konnte. Mit der neuen Röntgenanlage, der in der Abteilung für biochemische Pflanzenphysiologie und der Abteilung für Membrantransport vorhandenen Infrastruktur und dem Know-how beider Abteilungen in der Kristallisation und Strukturanalyse von Membranproteinen sowie durch die enge Kooperation mit dem Forschungszentrum Jülich besitzt die Heinrich-Heine-Universität die maßgeblichen Voraussetzungen, um den angestrebten Profilbereich Strukturbiologie erfolgreich realisieren zu können. Die Beschaffung der Röntgenanlage, die nur durch das Zusammenwirken vieler Geldgeber gelingen konnte, ist ferner ein sehr gutes Beispiel für die lebendige und gelungene Kooperation zwischen den Fächern der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät sowie zwischen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen und der Medizinischen Fakultät an unserer Universität.

Danksagung

Der Autor dankt den Sonderforschungsbereichen 575 und 590, dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität, der Wissenschaftlichen Einrichtung Biologie und der Wissenschaftlichen Einrichtung Chemie, dem Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät sowie der Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V. für die finanzielle Unterstützung bei der Beschaffung der Röntgenanlage und der Anton Betz Stiftung der Rheinischen Post e.V. für die finanzielle Unterstützung bei der Beschaffung eines Kryoflexsystems zur Untersuchung der Proteinkristalle bei kryogenen Temperaturen.

Literatur

- ABRAHAMS, J. P., A. G. W. LESLIE, R. LUTTER und J. E. WALKER (1994). „Structure at 2.8 Å resolution of the F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria“, *Nature* 370, 621–628.
- ALONSO, J. M., T. HIRAYAMA, G. ROMAN, S. NOURIZADEH und J. R. ECKER (1999). „EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis“, *Science* 284, 2148–2152.
- BALD, D., H. NOJI, M. YOSHIDA, Y. HIRONO-HARA und T. HISABORI (2001). „Redox regulation of the rotation of F_1 -ATP synthase“, *Journal of Biological Chemistry* 276, 39505–39507.
- BIANCHET, M. A., J. HULLIHEN, P. L. PEDERSEN und L. M. AMZEL (1998). „The 2.8 Å structure of rat liver F_1 -ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis“, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 95, 11065–11070.
- CHAO, Q., M. ROTHENBERG, R. SOLANO, G. ROMAN, W. TERZAGHI und J. R. ECKER (1997). „Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins“, *Cell* 89, 1133–1144.

- CHEN, Q. und A. B. BLEECKER (1995). „Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant Arabidopsis“, *Plant Physiology* 108, 597–607.
- DAHSE, I., S. PEZENNE, G. GIRAULT, G. BERGER, A. FRANCOIS und B. LIEBERMANN (1994). „The interaction of tentoxin with CF₁ and CF₁-ε isolated from spinach chloroplast“, *Journal of Plant Physiology* 143, 615–620.
- GROTH, G. und E. POHL (2001). „The Structure of the Chloroplast F₁-ATPase at 3.2 Å Resolution“, *Journal of Biological Chemistry* 276, 1345–1352.
- GROTH, G. (2002). „Structure of spinach chloroplast F₁-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin“, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99, 3464–3468.
- GROTH, G., T. HISABORI, H. LILL und D. BALD (2002). „Substitution of a single amino acid switches the tentoxin resistant thermophilic ATP synthase into a tentoxin sensitive enzyme“, *Journal of Biological Chemistry* 277, 20117–20119.
- ITOH, H., A. TAKAHASHI, K. ADACHI, H. NOJI, R. YASUDA, M. YOSHIDA und K. KINOSITA (2004). „Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase“, *Nature* 427, 465–468.
- JUNGE, W., H. LILL und S. ENGELBRECHT (1997). „ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics“, *Trends in Biochemical Sciences* 22, 420–423.
- MEISS, E. (2007). *Chloroplastidäre F-ATPase – Molekulare Regulation durch das Phytotoxin Tentoxin*. Dissertation. Düsseldorf.
- REIMER, S. und B. R. SELMAN (1978). „Tentoxin-induced energy-independent adenine nucleotide exchange and ATPase activity with chloroplast coupling factor“, *Journal of Biological Chemistry* 253, 7249–7255.
- ROMAN, G., B. LUBARSKY, J. KIEBER, M. ROTHENBERG und J. ECKER (1995). „Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway“, *Genetics* 139, 1393–1409.
- RONDELEZ, Y., G. TRESSET, T. NAKASHIMA, Y. KATO-YAMADA, H. FUJITA, S. TAKEUCHI und H. NOJI (2005). „Highly coupled ATP synthesis by F₁-ATPase single molecules“, *Nature* 433, 773–777.
- SCHNICK, C., N. KÖRTGEN und G. GROTH (2002). „Complete inhibition of the tentoxin resistant F₁-ATPase from *Escherichia coli* by the phytopathogenic inhibitor tentoxin after substitution of critical residues in the α- and β-subunit“, *Journal of Biological Chemistry* 277, 51003–51007.
- SHIRAKIHARA, Y., A. G. W. LESLIE, J. P. ABRAHAMS, J. E. WALKER, T. UEDA, Y. SEKIMOTO, M. KAMBARA, K. SAIKA, Y. KAGAWA und M. YOSHIDA (1997). „The crystal structure of the nucleotide-free α₃β₃ subcomplex of F₁-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer“, *Structure* 5, 825–836.
- STEELE, J. A., T. UCHTYL und R. D. DURBIN (1978). „The stimulation of coupling factor 1 ATPase by tentoxin“, *Biochimica et Biophysica Acta* 504, 136–141.
- VOET VAN VORMIZEELE, J. und G. GROTH (2003). „High-level Expression of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor protein ETR1 in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein“, *Protein Expression and Purification* 32, 89–94.
- WEBER, J. und A. E. SENIOR (2002). „The molecular mechanism of ATP synthesis by F₀F₁-ATP synthase“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1553, 188–211.
- YASUDA, R., H. NOJI, M. YOSHIDA, K. KINOSITA JR. und H. ITOH (2001). „Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase“, *Nature* 410, 898–904.

