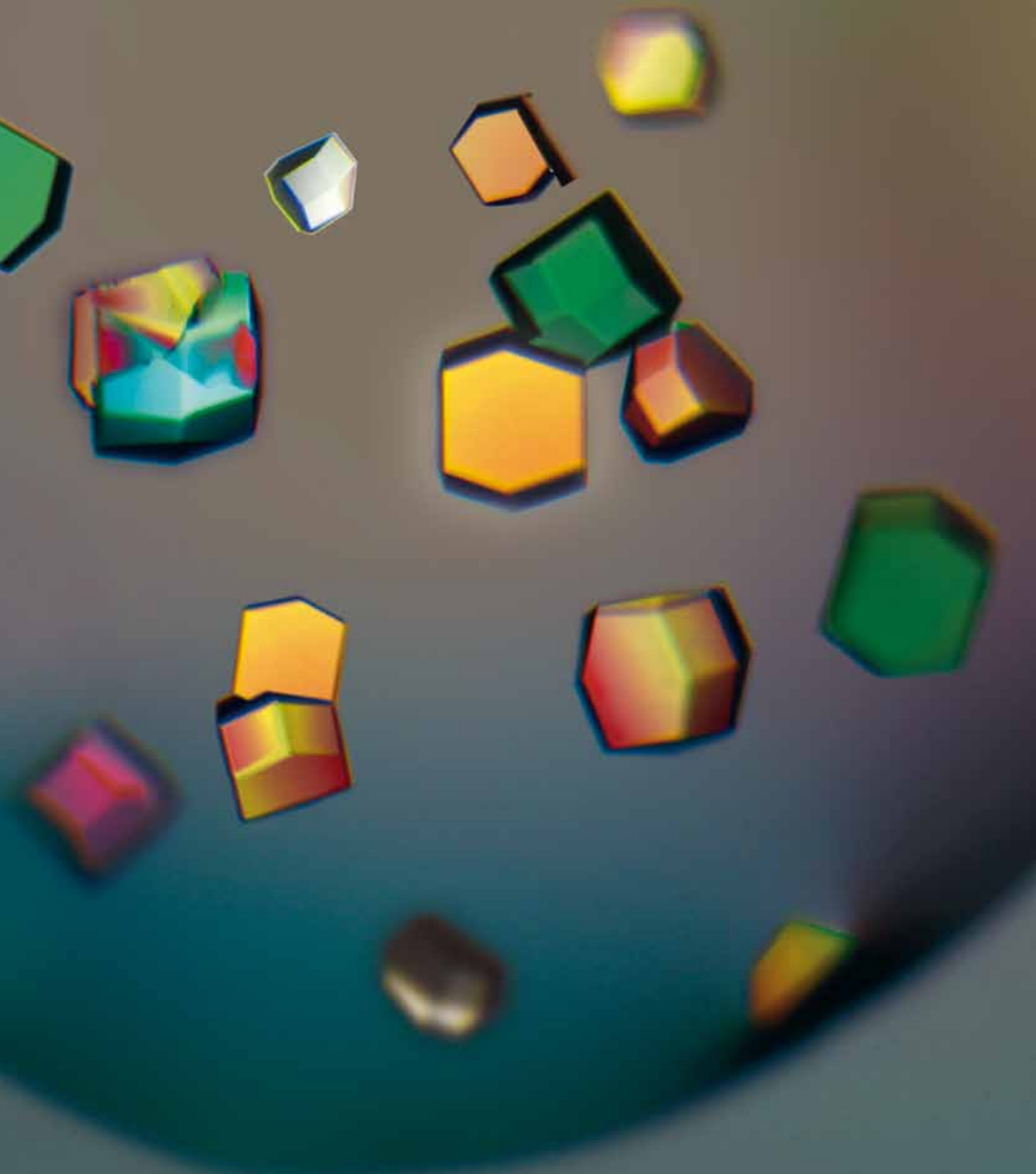


Link

www.biochemie.ch.tum.de

Proteasomforschung: Ansichten aus dem Innenleben eines Schredders

Die Forschungsgruppe um den Biochemiker Prof. Michael Groll von der TUM ist weltweit führend bei der Strukturaufklärung einer mächtigen Abbaumaschinerie für Eiweiße. Die ungeahnten Einblicke in das sogenannte Proteasom beflügeln auch die Suche nach neuen Medikamenten gegen Krebs und Autoimmunerkrankungen **Shredding protein: The secret life of proteasomes** Proteasomes are impressive complexes that are specialized in degrading protein. Biochemist Prof. Michael Groll and his team of researchers at TUM are world experts in exploring the structure of these powerful shredders. Their findings are also fueling research into new drugs to combat cancer and autoimmune diseases



Im Labor von Michael Groll entstehen diese weltweit einzigartigen Kristalle des Eiweißkomplexes Proteasom. Damit können die Wissenschaftler seine Struktur entschlüsseln / Michael Groll's team produces these unique crystals of the protein complex proteasome. This enables scientists to uncover its structure



Michael Groll entschlüsselte 1997 zum ersten Mal die Kristallstruktur der 20S-Kernkomponente des Hefeproteasoms. Seine Arbeitsgruppe ist bisher einzigartig erfahren, wenn es darum geht, Kristalle des Proteasoms für eine Strukturanalyse herzustellen / In 1997, Michael Groll uncovered for the first time the atomic structure of the 20S core component of the yeast proteasome. He and his team are leading experts in creating proteasome crystals for structure analysis

Lehrstuhl für Biochemie, TU München. Inhaber Prof. Michael Groll kommt im grünen Pullover daher. „So, Sie möchten unsere Kristalle sehen – dann kommen Sie mal mit“, erklärt der drahtige 41-Jährige und macht die Tür zu einem der Laborräume seiner Truppe auf: „Martin, könntest du mal ...“ Doktorand Martin Stein holt eine kleine Plastikplatte mit vielen winzigen Vertiefungen aus dem Kühlschrank, schiebt sie unter ein Mikroskop, sucht ein wenig herum und: „Bitte sehr, schauen Sie selbst.“ In der Tat, im polarisierten Licht funkelt ein ganzes Bündel an Kristallen.

Eiweißkristalle

Es sind schon besondere Exemplare. Die Arbeitsgruppe um Michael Groll ist weltweit einzigartig erfahren, wenn es darum geht, Kristalle des Proteasoms herzustellen – eines in zellulären Dimensionen riesigen Eiweißkomplexes, der andere Proteine abbaut. Grolls Team dominiert damit eine Schlüsseltechnologie. Nur in Kristallform lassen sich Proteine per Röntgenstrukturanalyse ihre räumliche Gestalt entlocken. „Auch wenn wir unsere Protokolle alle veröffentlicht haben, bleibt die Sache trickreich“, lächelt Groll. Einfach so

nachzukochen, das schaffe kaum einer. Dabei stand durchaus der Zufall Pate, als er vor Jahren sein Thema fand. Groll schloss 1995 gerade sein Diplomstudium in Chemie ab und wollte eigentlich Naturstoffforscher werden, unbekannte Substanzen aufklären, von denen es noch Millionen auf dem Globus gibt. Dann allerdings hörte er einen Vortrag von Nobelpreisträger Robert Huber, Direktor am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Und Huber, naja, äußerte sich recht despektierlich über die Naturstoffchemiker. Groll: „Der machte klar, dass reine chemische Aufklärung von Substanzen eine langweilige Sache ist.“ Man könne noch so viel Mühe darauf verwenden, unbekannte Stoffe zu reinigen und zu analysieren, solange man nicht wisse, an welchem Ziel im Organismus, neudeutsch Target, so ein Stoff wirkt und damit vielleicht für die Medizin nutzbar wird, bleibe das Kunst für die Kunst. Groll war beeindruckt und fragte bei Huber an, ob er seine Diplomarbeit bei ihm machen könne. Huber fragte zurück, ob er denn wisse, was das Proteasom sei. Groll hatte keine Ahnung. „Dann fangen Sie gleich nächsten Montag an oder Sie müssen nicht wiederkommen“, erwiderte Huber. Groll fing an. ▶



Ein Roboter für Hochdurchsatz-Screening hilft bei der Suche nach Kristallisationsbedingungen von Proteasomkomplexen / High-Throughput-Screening is used to find the conditions under which protein complexes such as the proteasome crystallize

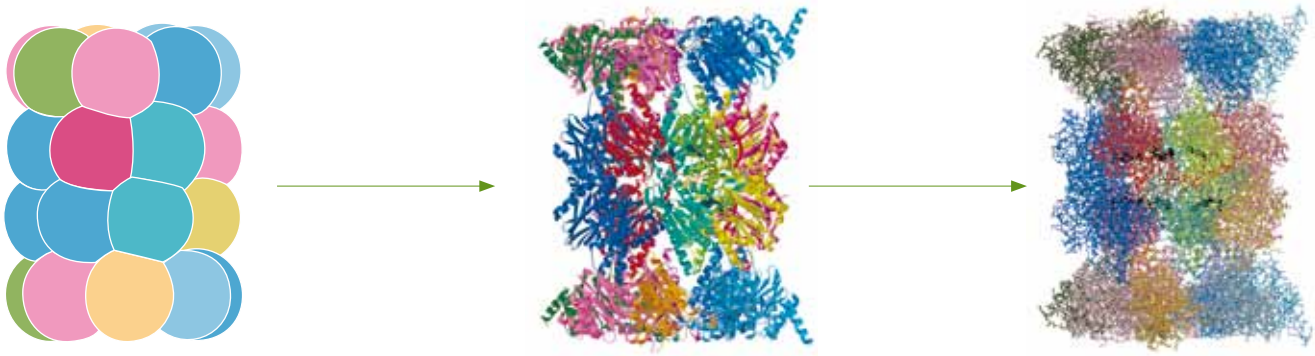
Professor Michael Groll, Chair of Biochemistry at TUM, makes a dynamic impression as he comes over to greet me in his green pullover. “So, you want to see our crystals? Follow me.” The wiry 41-year-old opens the door to one of his group’s labs and calls out to a Ph.D. student: “Martin, could you just....” Before he can finish, Martin Stein takes a small plastic tray with lots of tiny indentations out of the refrigerator, places it under a microscope, makes a few adjustments and invites me to take a look for myself. And yes, under the polarized light, I can clearly see a cluster of sparkling crystals.

Protein crystals

These are not just any crystals, however. Michael Groll and his team are the world’s leading experts in creating proteasome crystals. Proteasomes are huge (in cellular dimensions) protein complexes that degrade other proteins. Their structures can only be analyzed in crystalline form using x-ray crystallography. Groll’s team are streets ahead of the research community in this cutting-edge field. “Even though we have published all of our protocols, it is still a tricky process,” smiles Groll. It’s not just a matter of following a recipe. Although he currently

leads the field, Groll more or less stumbled into this line of research. Back in 1995, Groll was close to finish his degree in chemistry and had his sights set on natural product research. He was keen to investigate some of the millions of unknown substances on our planet. All this changed, however, when he attended a lecture by Nobel Prize winner Robert Huber, Director of the Max Planck Institute for Biochemistry in Martinsried, near Munich. Huber did not have a high opinion of natural product chemistry. “He said that pure chemical research into substances is actually quite boring,” recalls Groll. Huber believed that regardless of how much effort you put into purifying and analyzing unknown substances, it was all ‘art for art’s sake’ if you did not find out what target it acts upon in an organism and whether it could potentially benefit the medical world. Groll was impressed and asked Huber if he would supervise his diploma thesis. Huber immediately asked him if he knew what a proteasome was. Groll did not. And so Huber suggested that he start the following Monday or not at all. Groll decided to take the offer. Proteasomes are important. Without them, we would not be able to live; defective proteins would soon fill up all avail- ▶





Das 20S-Proteasom in drei verschiedenen Darstellungen: als Kugeln (links), etwas detaillierter mit den einzelnen Untereinheiten als Bändermodell (Mitte) und in atomarer Auflösung (rechts) / Three different illustrations of the 20S proteasome: as spheres (left), in more detail with the subunits illustrated as ribbons (middle), and in atomic resolution (right)

Ohne Proteasom wäre Leben nicht möglich: Defekte Eiweiße (Proteine) würden binnen kurzer Zeit alle Winkel einer Zelle verstopfen und zum Zelltod führen. Genau deshalb allerdings sehen hier längst auch Firmen ein Target, die über eine Blockade des Proteasoms Krebs, aber auch Autoimmunkrankheiten behandeln möchten. Denn solche Krankheiten zeichnen sich durch eine Überaktivität des Proteasoms aus.

Das Innere des Proteinschredders

In groben Grundzügen war der wichtigste Abbauweg für Eiweiße bei Hefe, Maus und Mensch 1995 bereits verstanden. Mit dem speziellen Signalmolekül Ubiquitin markieren Zellen Proteine, die abzubauen sind. Den Job selber erledigt dann ein großer Schredder – das Herzstück des Proteasoms, genannt 20S-Kernkomplex. Für mehr Details brauchte Groll allerdings zunächst Kristalle. Proteasome aus Hefe konnte er isolieren. Doch anders als Kochsalz liefert eine Lösung gereinigten Proteasoms noch lange keine Kristalle, wenn man sie eintrocknen lässt. Vielmehr gilt es, pingelig Zusammensetzung und Konzentration eines Fällungsmittels zu ermitteln, das einer Proteasomlösung per Dampfdiffusion genau so viel Wasser entziehen kann, dass tatsächlich Kristalle ausfallen. Dabei hilft heute ein Roboter, der in einer Stunde 3000 verschiedene Konzentrate von Lösungen in winzige Vertiefungen von Mikrotiterplatten gibt und in eine zweite Kammer daneben noch einen Tropfen des isolierten 20S-Proteasoms setzt. Danach muss der Experimentator aber immer noch selber am Mikroskop schauen, in welchem Tropfen Kristalle zu sehen sind. Nach zwei Jahren mühsamen Tüftelns hatte Groll 1997 endlich Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse und wenig später seine erste Publikation: die Aufklärung der atomaren Struktur der 20S-Kernkomponente des Hefeproteasoms. Zum ersten Mal war es gelungen, die Zentralstruktur des Proteasoms eines Organismus mit Zellkern, also eines Eukaryoten, darzustellen. ▶

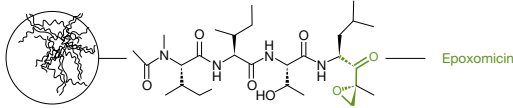
able space in cells and cause them to die. It is their ability to control intracellular protein levels that has made proteasomes a target for medical companies. Overactive proteasomes are a key characteristic of illnesses such as cancer and autoimmune diseases. Companies believe that these diseases can be treated by blocking proteasome function.

Inside the protein shredder

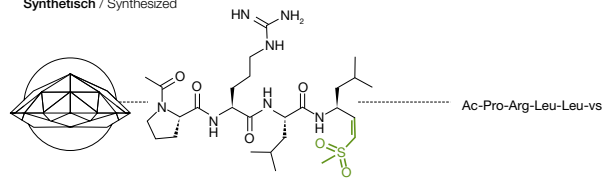
A basic outline of the most important protein degradation pathway in yeast, mice and humans had already been uncovered in 1995. Back then, it was clear that cells were using the signal molecule ubiquitin to mark proteins for degradation and that the actual reaction was carried out by a large shredder at the heart of proteasomes known as the 20S core particle.

To obtain greater insights into this process, though, Groll needed to create crystals. Although he succeeded in isolating yeast proteasomes, he was still a long way off creating crystals. A purified proteasome solution is not like a salt solution, for example, which only has to be left to dry to produce crystals. To create his crystals, Groll had to determine the exact composition and concentration of a clarifying agent that would be able to extract exactly the right amount of water, by steam diffusion, from a proteasome solution for crystals to form. An altogether much trickier task. Today, scientists use a robot capable – within one hour – of depositing 3,000 different concentrated solutions into tiny wells in microtiter plates plus a drop of the isolated 20S proteasome in a tiny adjacent well. It still has to be looked individually through the microscope to find out which drops have produced crystals. In 1997, after two years of meticulous research, Groll finally produced crystals suitable for x-ray crystallography. Shortly after this he published his first paper, entitled “Structure of the 20S proteasome from yeast”. This was the first time that a scientist had managed to represent a core proteasome structure based on an organism with a nucleus (eukary- ▶

α , β Epoxyketone / α , β Epoxyketones
 Actinomyces (Bakterium / Bacterium)



Vinyl Sulfone / Vinyl sulfones
 Synthetisch / Synthesized



Voilà, Groll offeriert eine 3-D-Brille und bittet zum virtuellen Durchflug durch das Molekül am Bildschirm. Das 20S-Proteasom erinnert an ein kleines Fass mit 18 Nanometer (10^{-9} Meter) Höhe und 16 Nanometer Breite. Es besteht aus 14 verschiedenen Untereinheiten, die in vier Ringen als Dimer angeordnet sind. Außen liegen die beiden sogenannten alpha-Ringe, während die beiden zentralen Ringe aus beta-Untereinheiten bestehen. Die Mitte der Abbaumaschinerie durchzieht ein Kanal. Hier, tief im Inneren des Proteasoms, steckt das Sägewerk, das für die Zelle unnötiges Eiweiß zerschreddert. Intakten Proteinen bleibt der Zugang verwehrt, der Kanal öffnet sich erst dann, wenn außen ein ausgetüftelter Regulatorkomplex, die 19S-Kappe, andockt und Ubiquitin-markierte Eiweiße selektiv bindet. „Binnen Mikrosekunden wird dieses Eiweiß in den Häcksler eingefädelt, und schon tauchen nur noch Restfragmente davon auf“, erklärt Groll. Geschnitten, auch das ein Resultat der Strukturanalysen, wird ausschließlich in drei der beta-Untereinheiten, genannt beta1, beta2 und beta5. Hier hinein, in die sogenannten katalytischen Zentren, müssen andererseits auch Hemmstoffe passen, wenn sie die Maschinerie blockieren sollen.

Selektive Medikamente

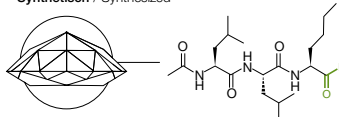
Seit wenigen Jahren fächert sich dieses Bild des Proteasoms weiter auf. Denn Säugetiere – Mensch wie Maus – haben sogar drei 20S-Proteasomtypen, die unterschiedliche Einflüsse auf das Zellverhalten nehmen. Das konstitutive Proteasom sorgt primär für das Schreddern nicht mehr benötigter Eiweiße. Eine noch nicht genauer verstandene Variante kommt nur im Thymus vor, jenem Organ, in dem auch beim Menschen Immunzellen heranreifen. Und ein drittes Immunoproteasom ist wichtig bei der Immunantwort. Wie ein Skalpell filetiert es vor allem in Zellen, die von Viren befallen sind, aus den Fremdeiweißen der Invasoren Bruch- ▶

ote). And Groll is just as thorough during my visit. He even provides me with 3D glasses and gives me a virtual tour of the molecule on screen. The 20S proteasome looks a bit like a small barrel, eighteen nanometers high (10^{-9} meters) and sixteen nanometers across. It comprises fourteen different subunits stacked as dimers in four rings. The two outer rings are known as alpha rings while the two center rings are made up of beta subunits. A channel runs through the middle of the degradation machine. Here, deep inside the proteasome, is the shredding engine that destroys the unwanted protein. Unmarked proteins cannot access the channel. It only opens when the sophisticated 19S regulatory complex docks on and selectively binds proteins that have been marked with ubiquitin. “This protein is fed into the shredder in microseconds. A few fragments are all that remain,” explains Groll. The structure analyses have also shown that degradation only takes place in three of the beta subunits, known as the catalytic cores beta1, beta2 and beta5. Inhibitors also have to translocate into these catalytic cores in order to block this mechanism.

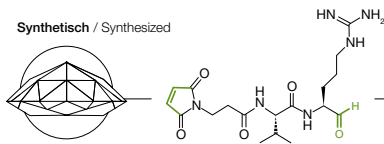
Selective drugs

Our knowledge of proteasome has been expanding rapidly in recent years. All mammals – from humans to mice – have three different types of 20S proteasomes, each of which has a distinct effect on cell behavior. Constitutively expressed proteasomes are primarily responsible for shredding unnecessary proteins. Another, less well understood, variant is expressed exclusively in the thymus, an organ in which immune cells mature. The third type, the immunoproteasome, plays an important role in immune response processes. Immunoproteasomes are like scalpels. They primarily function in infected cells by degrading proteins from invaders and bringing them back to the surface. These samples provide the immune system with a list of properties that it uses to ▶

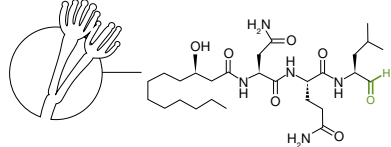
Aldehyde / Aldehydes
Synthetisch / Synthesized



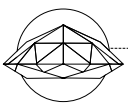
Synthetisch / Synthesized



Penicillium fellutanum (Pilz / Fungus)

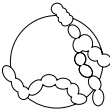


Boronate / Boronates
Synthetisch / Synthesized



Lactone / Lactones

Streptomyces (Bakterium / Bacterium)



Streptomyces spectabilis (Bakterium / Bacterium)

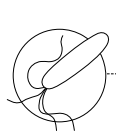


Salinospora tropica (Bakterium / Bacterium)

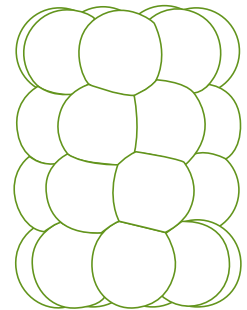
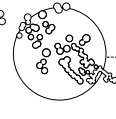


Syrbactine / Syrbactines

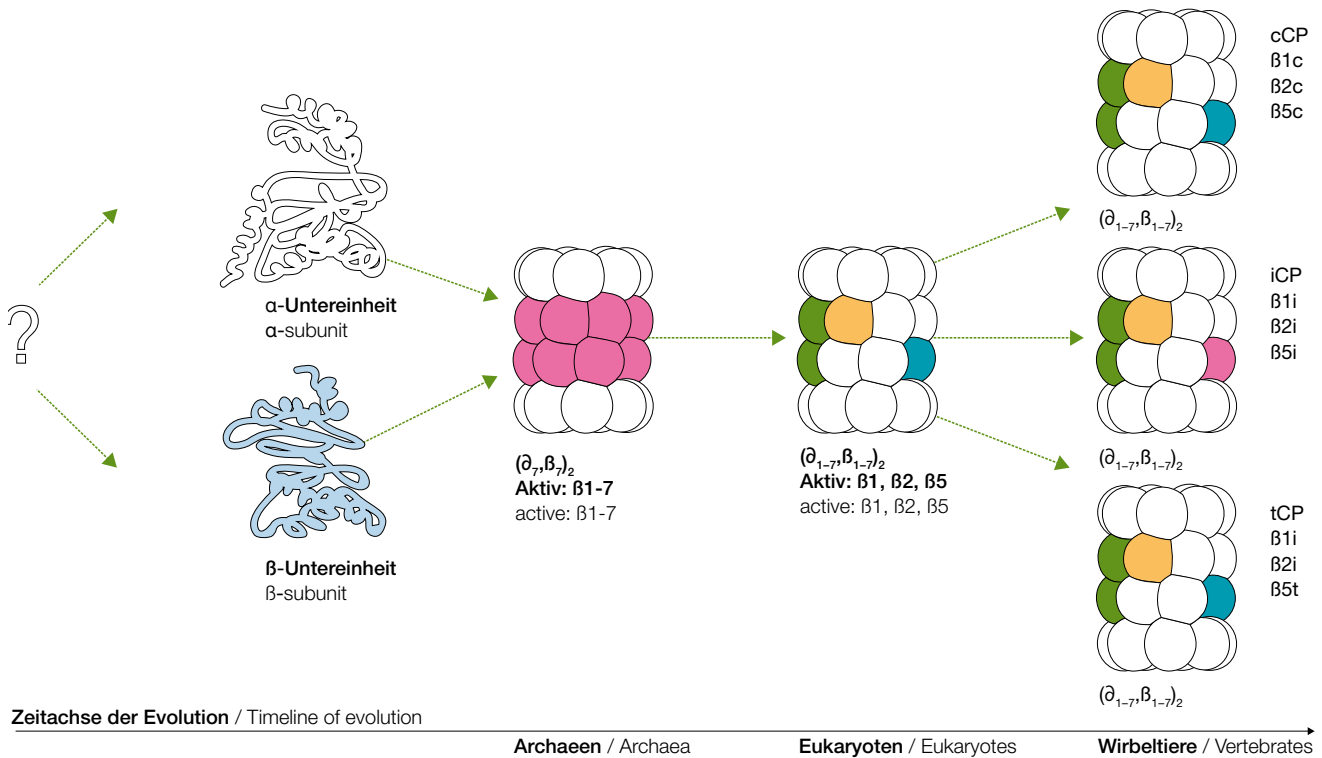
Pseudomonas syringae (Bakterium / Bacterium)



Burkholderiales (Bakterium / Bacterium)



Wirkstoffe aus der Natur und aus der chemischen Synthese: In Schwämmen, Pilzen, Bakterien oder Pflanzen sucht Groll nach hochselektiven Hemmstoffen des proteasoms. Alternativ werden synthetische Varianten hergestellt / Natural and synthetic agents: Groll investigates sponges, fungi, bacteria and plants in search of highly selective inhibitors of the proteasome. Alternatively, he synthesizes variations of these compounds



Im Lauf der Evolution schlossen sich aus Eubakterien und Archaeen die späteren Untereinheiten α und β zusammen. Daraus entwickelte sich das eukaryontische Proteasom, das wiederum die Grundlage der Wirbeltier-Proteasome ist. Die aktiven Zentren des Proteasoms sind farblich hervorgehoben / In the course of evolution, archae and eubacteria formed the later α and β subunits. Subsequently, the eukaryotic proteasome evolved, which is the base for the proteasomes of vertebrates. The active centres of the proteasome are highlighted in specific colours

stücke heraus, die dann an der Zelloberfläche präsentiert werden. Mit diesem Steckbrief wird das Immunsystem informiert und aufgefordert, die infizierten Zellen zu eliminieren. Letztes Jahr konnte eine Gruppe um Groll und seine Doktorandin Eva Huber erstmals auch die Struktur von konstitutivem und Immunoproteasom der Maus aufklären. Ein für Medikamentenentwickler besonders wichtiges Fazit der Arbeit: „Weil die beta5-Untereinheit bei beiden Proteasomvarianten unterschiedlich ist, haben wir die Möglichkeit, hochselektive Wirkstoffe zu entwickeln, die gezielt nur eine der beiden Varianten hemmen“, erklärt Groll. Die bislang zugelassenen Medikamente seien dazu jedoch noch nicht in der Lage. „Selektive Inhibitoren gegen das Immunoproteasom könnten zum Beispiel zu nebenwirkungsarmen Medikamenten gegen Krankheiten wie Diabetes Typ 1, Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis führen“, hofft Eva Huber.

Hemmstoffe aus der Natur

Noch ein Fazit hat Groll gezogen: selber Wirkstoffe entwickeln, besser gesagt suchen. Denn quasi nebenbei hat er

längst zur Naturstoffchemie zurückgefunden. Ein Target hat er heute schließlich, das Proteasom. Und rein am Bildschirm Hemmstoffe entwickeln, geht nicht, obwohl alle Strukturdaten vorhanden sind. Die Szene spricht von Rational Drug Design, bei dem Substanzen virtuell so lange am Bildschirm variiert werden, bis sie optimal in ein aktives Zentrum etwa einer beta5-Untereinheit des Immunoproteasoms passen. Danach erst wird der Kandidat im Labor synthetisiert. „Doch können solche Designerwirkstoffe noch so gut passen, wir wissen nicht, ob sie im Körper später überhaupt in Zellen vordringen“, wehrt Groll ab.

Nein, im riesigen Stoffareal der Natur vermutet er selektive und hochwirksame Inhibitoren des Proteasoms und seiner Varianten. Denn das Proteasom sei für Organismen so wichtig, dass es im Laufe der Evolution ein permanentes Angriffsziel für diverse Giftstoffe aus den verschiedensten Parasiten gewesen sei. Groll: „Solche Hemmstoffe sind auch dafür optimiert, zum Proteasom im Körper vorzudringen. Haben wir sie erst mal identifiziert, dann, aber erst dann, können wir durchaus am Bildschirm weitere Optimierungen ▶



Eine Studentin in Grolls Labor prüft die von ihr durchgeführte chemische Synthese eines Proteasominhibitors / A student in Groll's laboratory controls the chemical synthesis of a proteasome inhibitor, which she carries out

eliminate the infected cells. Last year, a team of researchers headed by Groll and his Ph.D. student Eva Huber succeeded in presenting the structure of constitutive and immunoproteasomes in mice for the first time. The discovery has important implications for the development of drugs. "The beta5 subunit is different in the two proteasome variants and this could pave the way for the development of highly selective inhibitors that can target just one of the two variants," explains Groll. Applied drugs cannot do this yet. "Selective inhibitors that target the immunoproteasome, for example, could lead to drugs with reduced side effects for diseases such as type 1 diabetes, multiple sclerosis and rheumatoid arthritis," adds Eva Huber.

Natural inhibitors

Armed with these new findings, Groll has now decided to develop – or more accurately discover – active components himself. In fact, over the course of time, he has more or less returned to the chemistry of natural products. And today, proteasomes are his target. However, he does not believe

that effective ingredients can be created "virtually" by using computers only, even if all structural data are available. This computer-aided process is known as rational drug design. It enables researchers to vary substances virtually on screen until they have a product that matches the core of a beta5 subunit, for example. Once it has the right properties, the virtual candidate is then synthesized in a lab. "Regardless of how much time you spend getting the perfect fit, you still don't know if the substance you have developed will be able to penetrate cells in the body."

Groll believes that nature's huge palette of substances can provide selective, highly effective inhibitors for proteasomes and proteasome variants. This is because proteasomes are extremely important complexes for organisms. As such, they have always been the target of different poisons from a huge range of parasites throughout the course of evolution. "These inhibitors are already primed to penetrate through to the body's proteasomes. First of all we have to identify these substances. Then, and only then, we can start to optimize them on screen," adds Groll. ▶



Die Doktorandin Eva Huber am Röntgendiffraktometer, einem Gerät für die Strukturanalyse von Kristallen. Für viele Analysen nutzt Grolls Arbeitsgruppe auch den Teilchenbeschleuniger am Paul Scherrer Institut in der Schweiz / The PhD student Eva Huber adjusts the x-ray-diffractometer, a device which allows analyzing the structure of crystals. Groll's team also uses the synchrotron facilities at the Swiss Paul Scherrer Institute for crystal structure analysis

vornehmen.“ An die 16.000 Extrakte aus Pilzen, Bakterien, Schwämmen, Pflanzen – jeweils voll mit Tausenden von Naturstoffen – sollen jetzt am Lehrstuhl im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Chimiothèque Nationale in Paris untersucht werden. Beim Screenen aber hilft das Proteasom. Martin Stein hat es mit neuer Technik in Dienst genommen. Man nehme dafür eine klar definierte Menge an Proteasom, des Weiteren ein mit dem Kohlenstoff ^{13}C markiertes Eiweiß, das normalerweise vom Proteasom abgebaut wird. In einer sogenannten Kernspinmessung lässt sich aufgrund der Markierung über die Änderungen der Signale exakt verfolgen, wie die geschredderten Einzelfragmente entstehen. Beim eigentlichen Test gibt nun ein Roboter unbekannte Mischungen von Naturstoffen hinzu. Verändert sich das Kernspinsignal dann aber unverhofft einmal nicht, was als Beweis dafür gilt, dass das markierte Eiweiß intakt geblieben ist, so schwimmt ein Hemmstoff für das Proteasom in der Lösung. Der Rest ist Fleißarbeit, den Inhibitor aus den Extrakten zu isolieren und zu analysieren. Keine Frage, die Münchener haben ihr Objekt gut im Griff, das Proteasom ist bereits Haustier der Forschung. *Autor: Bernhard Epping*

He and his team are collaborating with the Chimiothèque Nationale in Paris to investigate around 16,000 extracts of fungi, bacteria, sponges and plants – each one packed with thousands of natural products. The proteasomes help with screening, however, and Martin Stein has started working with the new technology.

The process begins with a clearly defined amount of proteasomes and a protein labeled with the C^{13} carbon – the label used to mark protein for degradation. The scientists then use a nuclear magnetic resonance spectroscopy to track exactly how the individual shredded fragments are created. They do this by tracing the label and any changes in signals. For the actual test, a robot then adds unknown mixtures of natural products. If the nuclear spin signal doesn't change, the labeled protein is intact and the solution eventually contains a proteasome inhibitor. Then the real work starts as researchers have to isolate the inhibitor from the extracts and analyze it.

Without any doubt, the Munich team certainly know their stuff inside out, since not many research groups have their own pet proteasomes. *Autor: Bernhard Epping*