Sitzungsberichte der Leibniz-Sozietät der Wissenschaften zu Berlin *108(2010), 57–65*

Sabine Müller

Einfachheit biochemischer Komplexität – ein Widerspruch?

In der Literatur, in verschiedenen Lexika und online-Nachschlagewerken finden sich eine Reihe von Definitionen für „Einfachheit", die sich aber alle darüber einig sind, dass Einfachheit ein Zustand ist, der sich dadurch auszeichnet, dass nur wenige Faktoren zu seinem Ent- oder Bestehen beitragen. Das Zusammenspiel dieser Faktoren lässt sich durch nur wenige Regeln beschreiben. Das lässt den Schluss zu, dass Einfachheit das Gegenteil von Komplexität ist. Die Biochemie ist die Lehre von den komplexen chemischen Vorgängen in der Zelle. Im weitesten Sinn beschäftigt sie sich mit Untersuchungen zum Aufbau von Biomolekülen und deren Funktion im zellulären Geschehen, mit dem zellulären Stoffwechsel und dessen Regulation, sowie mit der Speicherung und Weitergabe von Information. Die in einer Zelle ablaufenden Prozesse sowie die Vernetzung von Informations-, Stoff- und Energieflüssen sind auf den ersten Blick sehr komplex, so dass sich dem Betrachter der Gedanke an Einfachheit in diesem Wissensgebiet nicht gerade aufdrängt. Und doch lassen sich charakteristische Merkmale der Einfachheit auch im komplexen biochemischen Geschehen erkennen. Nehmen wir beispielsweise die allgemein gebräuchlichen Tabellen, Übersichten und Atlanten zum biochemischen Stoffwechsel.[1] Beim ersten flüchtigen Blick ist man erschlagen von der Vielfalt der Strukturen, Pfeile und Rektionswege. Beim näheren Hinsehen erkennt man jedoch ganz einfache Prinzipien, Schritte und Mechanismen. Im folgenden soll an drei Beispielen aufgezeigt werden, dass biochemische Komplexität die Gültigkeit einfacher Grundprinzipien nicht ausschließt, und dass Einfachheit als Wirk,- Gestaltungs- und Denkprinzip erkennbar ist.

Betrachtet man zunächst die Mechanismen zur Regulation der Genexpression in Bakterien, so geht das klassische Modell davon aus, dass das genetische Material in Aktivitätseinheiten (Operons) unterteilt ist, und dass der Zellmetabolismus vorrangig durch Proteine, die individuelle Gene erkennen und deren Aktivität einstellen, auf der Ebene der DNA reguliert wird. Das

von Jacob und Monod 1961 beschriebene *lac* Operon[2] reguliert beispielsweise die Synthese von Proteinen, die in den Lactosemetabolismus involviert sind. Dabei befinden sich vor den Strukturgenen *lacZ, lacY* und *lacA* der Promotor und der Operator, Genabschnitte, die Bindestellen für die RNA-Polymerase (Promotor) und für ein Repressorprotein (Operator) darstellen.

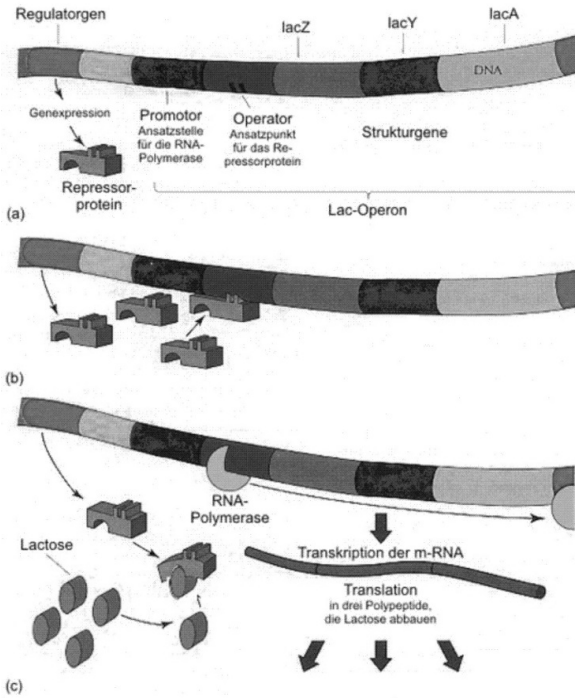

Abbildung 1: Funktionsweise des lac-Operons. Erläuterungen im Text.

Schließlich gibt es noch einen Induktor, in diesem Fall Laktose, der durch Interaktion mit dem Repressorprotein dieses in seiner Funktion inhibiert. Gene müssen nicht permanent aktiv sein, sondern werden vielmehr entsprechend dem Bedarf der Zelle an- und ausgeschaltet. Dabei ist das Wechselspiel zwischen Induktor und Repressor ein Kernstück des Regulationsmechanismus. Das *lac*-Operon ist ein Beispiel für eine Feedbackregulation. *lacZ*, *lacY* und *lacA* sind Gene, die Laktose abbauende Enzyme codieren. Ist die zelluläre Laktosekonzentration gering, werden diese Enzyme nicht benötigt. Ein Repressorprotein, welches durch einen Genabschnitt, der unmittelbar vor dem

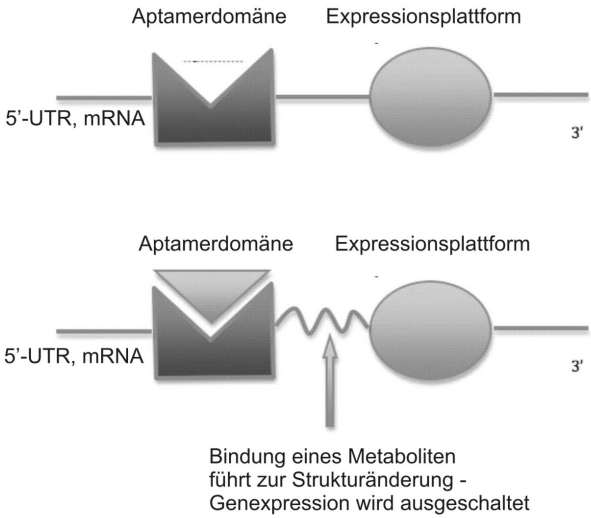

Abbildung 2: Modularer Aufbau eines Riboschalters

lac-Operon liegt, codiert wird, bindet an den Operator in direkter Nachbarschaft zum Promotor, und verhindert dadurch die gleichzeitige Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor. Die DNA kann nicht transkribiert, also nicht in RNA umgeschrieben werden, die Genexpression ist blockiert. Steigt die Laktosekonzentration in der Zelle bis zu einem Sättigungspunkt, sind viele Laktosemoleküle als Induktoren verfügbar. Laktose bindet an das Repressorprotein, und verhindert dadurch die Repressor-Operator-Bindung. Die RNA-Polymerase kann nun an den Promotor binden, und die nachfolgenden Strukturgene werden exprimiert. In diesem Geschehen ist ein bestechend einfaches Grundprinzip erkennbar: Die Konzentration eines Metaboliten bestimmt indirekt die Produktion von Proteinen, die in seinen Abbau involviert sind. Wenige Regeln und wenige Faktoren sind in diesen Prozess involviert. Und doch, es geht noch einfacher: Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die bakterielle Genexpression direkt auf der Ebene der *m*RNA ohne die Beteiligung von Proteinen reguliert werden kann.[3] Durch direkte Wechselwirkung eines Metaboliten mit der *m*RNA, die für Proteine codiert, die in den Transport, Auf- oder Abbau des Metaboliten involviert sind, wird deren Synthese kontrolliert. DNA oder Proteine sind für dieses Szenario nicht nötig. Verschiedene *m*RNAs, die die Information für den Aufbau metabolischer Proteine tragen, weisen in ihrer 5‘-untranslatierten Region Strukturelemente für

die Bindung eines spezifischen Metaboliten auf (Aptamer), gefolgt von den codierenden Regionen (Expressionsplattform) (Abbildung 2).Die Bindung des Metaboliten an das Aptamer führt zu einer Strukturänderung in der Aptamerdomäne, die in klassischer allosterischer Manier auf die Expressionsplattform übertragen wird. Als Resultat der Konformationsänderung in der Expressionsplattform wird (a) Transkription, also die Übertragung genetischer Information von DNA auf RNA vorzeitig terminiert, (b) die Initiation der Translation inhibiert oder (c) die *m*RNA zerstört[4](Abbildung 3).

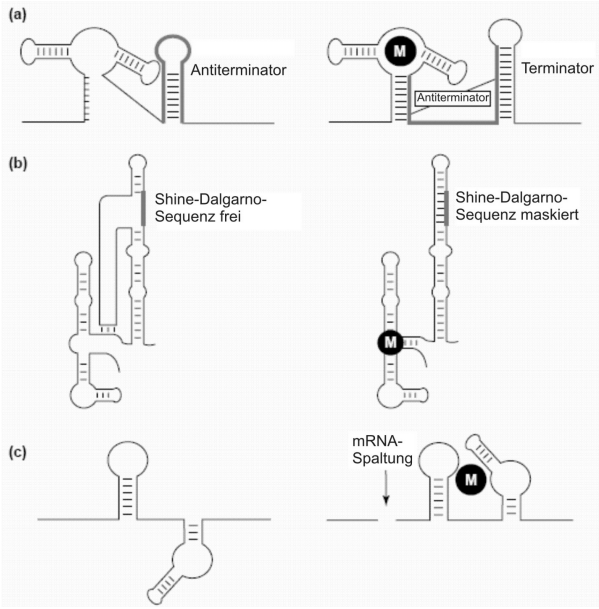

Abbildung 3: Modi der Regulation der Genexpression durch Riboschalter. a).Regulation der Transkriptionstermination. In Abwesenheit des Metaboliten (M) wird die RNA normal transkribiert. Bindung des Metaboliten führt zur Auflösung des Antiterminators und zur Ausbildung einer Terminatorstruktur, so dass die Transkription frühzeitig terminiert wird und kein vollständiges Transkript entsteht. b) Regulation der Translationsinitiation. In Abwesenheit des Metaboliten ist die Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) frei, nach Bindung des Metaboliten wird diese in eine doppelsträngige Struktur integriert, so dass das Ribosom nicht binden kann. Die Genexpression ist ausgeschaltet. c) Der Metabolit dient als Cofactor für eine Ribozymstruktur, die die mRNA-Spaltung bewirkt.

Ein Beispiel für einen Translationsschalter ist der Thiaminpyrophosphatriboschalter (Abbildung 4)[5]. Thiaminpyrophosphat (TPP) ist ein Coenzym verschiedener Enzyme wie zum Beispiel Transketolase oder Pyruvatdehydroge-

nase, die an Aldehydtransferreaktionen beteiligt sind.[6] Der TPP-Riboschalter tritt in der 5'-untranslatierten Region von Transkripten auf, die TPP aufbauende Enzyme kodieren. Bei kleinen zellulären TPP-Konzentrationen ist die Genexpression aktiv, das Transkript wird translatiert. Dabei bindet das Ribosom, der Proteinsyntheseapparat der Zelle, an eine spezifische Sequenz der *m*RNA, die Shine-Dalgarno-Sequenz, was die Translation einleitet. Steigt die TPP-Konzentration bis zu einem Sättigungspunkt, bindet TPP an die Aptamerrdomäne des Riboschalters. Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung führt zu einer Restrukturierung der Shine-Dalgarno-Sequnz, mit der Konsequenz, dass das Ribosom nicht mehr binden kann. Dadurch ist die Translationsinitiation inhibiert, und die am TPP-Aufbau beteiligten Proteine werden nicht synthetisiert. Dieses bestechend einfache Prinzip der durch die TPP-Bindung induzierten Verfügbarkeit/Nichtverfügbarkeit der Ribosombindestelle ist eine effiziente Strategie zur Regulation der Genexpression in vielen Bakterien. Inzwischen sind eine Reihe weiterer Metaboliten bekannt, die wie in Abbildung 3 gezeigt, allosterisch die Expression von metabolischen Proteinen regulieren, und so ihren eigenen Auf- und Abbau oder Transport steuern.[3]

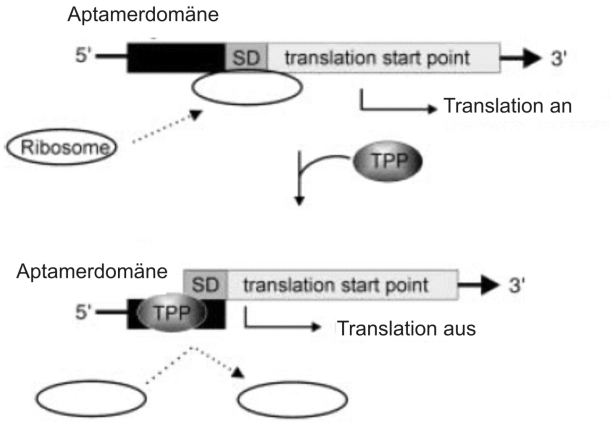

Abbildung 4: Regulation der Translationsinitiation im TPP-Riboschalter. Erläuterung im Text.

Beide Mechanismen, die Feedbackregulierung auf DNA-Ebene (Abbil-dung 1) und die Genexpression durch Riboschalter, verdeutlichen, dass komplexen zellulären Prozessen einfache Prinzipien zu Grunde liegen: in Abhängigkeit von der Konzentration eines Metaboliten wird eine Entscheidung über die Synthese

von metabolischen Proteinen getroffen. Besonders im Fall der Riboschalter sind wenige Faktoren involviert und wenige Regeln bestimmen das Geschehen. Somit findet hier Einfachheit durchaus Anwendung als Wirkprinzip.

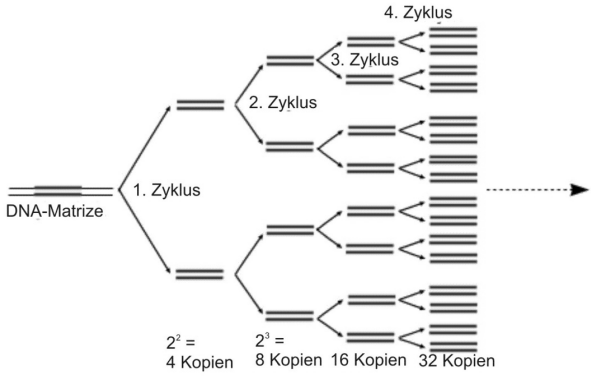

Abbildung 5: Prinzip der Polymerasekettenreaktion. Iterative Zyklen von Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese führen zur exponentiellen DNA-Anreicherung.

Auch in der biochemischen Methodik findet man Einfachheit als Gestaltungsprinzip. Die Polymerasekettenreaktion (*P*olymerase *C*hain *R*eaction, PCR)[7] hat die Biochemie revolutioniert. Kleinste Mengen von DNA lassen sich mit dieser Methode schnell und zuverlässig anreichern, was eine Grundvoraussetzung beispielsweise für die Kriminal- und Medizinische Diagnostik, sowie für die molekularbiologische Forschung ist. Das Prinzip der PCR ist überaus einfach (Abbildung 5): ein doppelsträngiges Stück DNA wird durch Wärmezufuhr denaturiert (in die Einzelstränge aufgetrennt), an jeden Einzelstrang werden kurze terminale Primer angelagert, die dann durch eine DNA-Polymerase entsprechend der Matrize zum vollständigen DNA-Strang aufgefüllt werden. Dann beginnt der Prozess von vorn, durch iterative Zyklen von Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese wird eine exponentielle Vermehrung der ursprünglichen DNA-Menge erreicht. Das einfache Funktionsprinzip ist mit einem einfachen Arbeitsprotokoll verbunden: alle Komponenten werden in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben, und die einzelnen Schritte von Denaturierung, Primeranlagerung und DNA-Synthese werden allein durch das Temperaturregime bestimmt. Wieder sind es wenige Regeln (Temperaturregime) und wenige Faktoren (Template, Primer, Nucleosidtriphosphate und DNA-Polymerase), die das Geschehen bestimmen. Die PCR ist eine einfache, fast simple Methode, nach der die Biochemie und Moleku-

larbiologie schon viel früher verlangt hätte. Trotz ihrer Einfachheit wurde sie erst 1988 entwickelt. K. Mullis ist 1993 für seine Entdeckung mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet worden. Ein einfaches von der Natur vorgegebenes Prinzip ist durch einfache Gestaltungsweise zur hocheffizienten Technologie geworden.

Schließlich kann man hinterfragen, inwieweit sich Forscher beim Entwurf von Strategien und Modellen zur Untersuchung zellulärer Prozesse vom Prinzip der Einfachheit leiten lassen. Nehmen wir beispielsweise die Untersuchung der DNA-Methylierung. Spezifische Cytidine in genomischer DNA werden an der Nucleobase durch Enzyme (Methyltransferasen) methyliert. Während dieser Prozess in Bakterien und Archaen zum Schutz vor Fremd-DNA und zur Fehlerkorrektur bei der DNA-Replikation dient, ist die Cytidinmethylierung in höheren Lebewesen mit der Markierung von aktiven und inaktiven Bereichen der DNA und damit mit Genregulation und Imprinting verknüpft.[8] Um den Mechanismus der Methylierung zu verstehen, bieten sich geeignete Modelle an, die sich im Labor einfach untersuchen lassen. Basierend auf der Kenntnis der organischen Chemie, der involvierten Aminosäuren des Enzyms, sowie der Reaktionsedukte und -produkte muss zunächst eine Hypothese zum Reaktionsmechanismus entworfen werden (Abbildung 6).

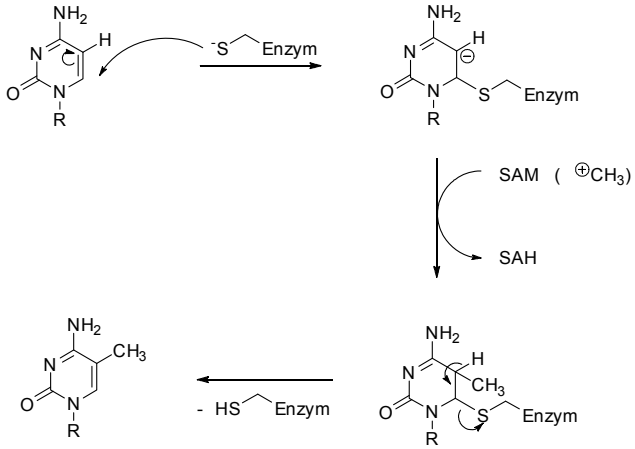

Abbildung 6: Mechanismus der enzymatischen Methylierung von Cytidin in DNA. SAM: S-Adenosylmethionin

Das Enzym erkennt ein Cytidin innerhalb einer spezifischen Sequenz auf der DNA. Die SH-Gruppe eines Cysteinrestes des Proteins greift als Nucleophil

in einer Michaeladdition am C6-Atom der heterocyclischen Base des Nukleosids an und generiert dadurch eine negative Ladung am C5-Atom, die im Molekül resonanzstabilisiert ist. Vom Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM) wird anschließend eine positiv geladene Methylgruppe auf das negativierte C-Atom (C5) übertragen. Der finale Schritt ist eine β-Eliminierung des Enzyms unter Abspaltung eines Protons von C5, die Methylierungsreaktion ist abgeschlossen.[9] Wie ist diese Hypothese zu prüfen? Man kann versuchen, die chemische Transformation entlang des Reaktionsweges zu beobachten, etwa durch zeitaufgelöste Röntgenkristallographie bei tiefen Temperaturen mit stark verlangsamter Reaktionskinetik. Das ist kompliziert. Alternativ kann man versuchen, die Reaktion auf einer vorher definierten Stufe „einzufrieren", und das Zwischenprodukt zu isolieren. Beachten muss man dabei einfache Grundprinzipien der Organischen Chemie. Im genannten Beispiel der Cytidinmethylierung ist es gelungen, durch Ersatz des zu methylierenden Cytidins durch ein Analogon (5-Fluorcytidin), die Reaktion auf der Stufe der Methylübertragung abzufangen und dadurch den Reaktionsmechanismus zu untermauern (Abbildung 7).[10] Fluor ist in seiner Größe Wasserstoff sehr ähnlich, übt aber einen entgegengesetzten elektronischen Effekt auf das Nucleosid aus. Während Wasserstoff einfach als Proton in einer β-Eliminierung abgespalten werden kann, ist das für Fluor aufgrund seiner starken Elektronegativität nicht möglich, so dass der finale Schritt im Reaktionsmechanismus, die Abspaltung des Enzyms, nicht möglich ist, und dadurch das methylierte DNA-Enzymaddukt erhalten bleibt. Die Isolierung des Addukts und der Nachweis seiner strukturellen Identität ist ein Beweis für den postulierten Mechanismus und wurde als solcher von der Fachwelt anerkannt.[11] Einfachheit tritt hier als Erkenntnis- und Gestaltungsprinzip in Erscheinung. Keine komplizierten Methoden wurden verwendet, sondern simple Grundprinzipien der Organischen Chemie sind mit einfacher experimenteller Arbeitsweise verknüpft worden.

Insgesamt verdeutlichen die drei Beispiele (*i*) zellulärer Stoffwechsel, (*ii*) biochemische Methodik und (*iii*) biochemische Modellierung, dass Einfachheit als Wirk- Gestaltungs- und Erkenntnisprinzip sehr wohl Anwendung in der Biochemie findet. Bleibt abschließend die Frage zu beantworten, ob biochemische Komplexität tatsächlich einfach ist. Ja, in ihren Grundzügen. Einfache Prinzipien liegen dem komplexen Geschehen zugrunde, einfache Gestaltungsprinzipien können Grundlage von Schlüsseltechnologien sein, und einfache Herangehensweise erlaubt die Aufklärung von biochemischen Mechanismen. Leben ist vielfältig, und die molekularen Grundlagen des Lebens sind in einem Netzwerk ineinandergreifender Prozesse organisiert. Jeder

einzelne Schritt für sich lässt Einfachheit erkennen. Der Ursprung des Lebens muss durch einfache Mechanismen geprägt sein. Die Natur hatte vier Milliarden Jahre Zeit, Komplexität zu entwickeln. Die einfachen Elemente als Grundpfeiler der Komplexität sind jedoch nicht verschwunden.

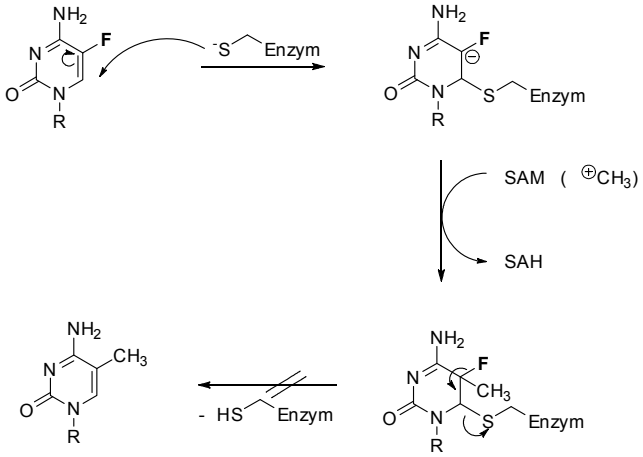

Abbildung 7: Einfrieren der Cytidinmethylierung auf der Stufe des methylierten DNA-Enzym-Addukts durch 5-Fluorcytidin. Erläuterungen im Text.

Quellen

[1] Biochemical Pathways, G. Michal (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin, 1999
[2] F. Jacob, J. Monod, J. Mol. Biol. 1961, 3, 318-356
[3] A. Roth, R. R. Breaker, Annu. Rev. Biochem. 2009, 78, 305-334.
[4] S. Blouin, J. Muhlbacher, J. C. Penedo, D. A. Lafontaine, ChemBioChem, 2009, 10, 400-416.
[5] S. Müller, ChemBioChem, 2003, 4, 817-819.
[6] R. Zhao, F. Gao, Y. Yang, G. A. Diaz, B. D. Gelb, I. D. Goldman, J. Biol. Chem., 2001, 276, 1114-1118.
[7] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Science 1988, 239, 487–491
[8] T. Y. Zhang, M. J. Meaney, Annu. Rev. Psychol., 2010, 61, 439-466.
[9] D. V. Santi, C. E. Garrett, P. J. Barr, Cell, 1983, 33, 9-10.
[10]T. Hanck, S. Schmidt, H.-J. Fritz, Nucleic Acids Res. 1993, 21, 303-309.
[11]O. V. Kirsanova, N. A. Cherepanova, E. S. Gromova, Biochemistry, 2009, 74, 1175-1186.