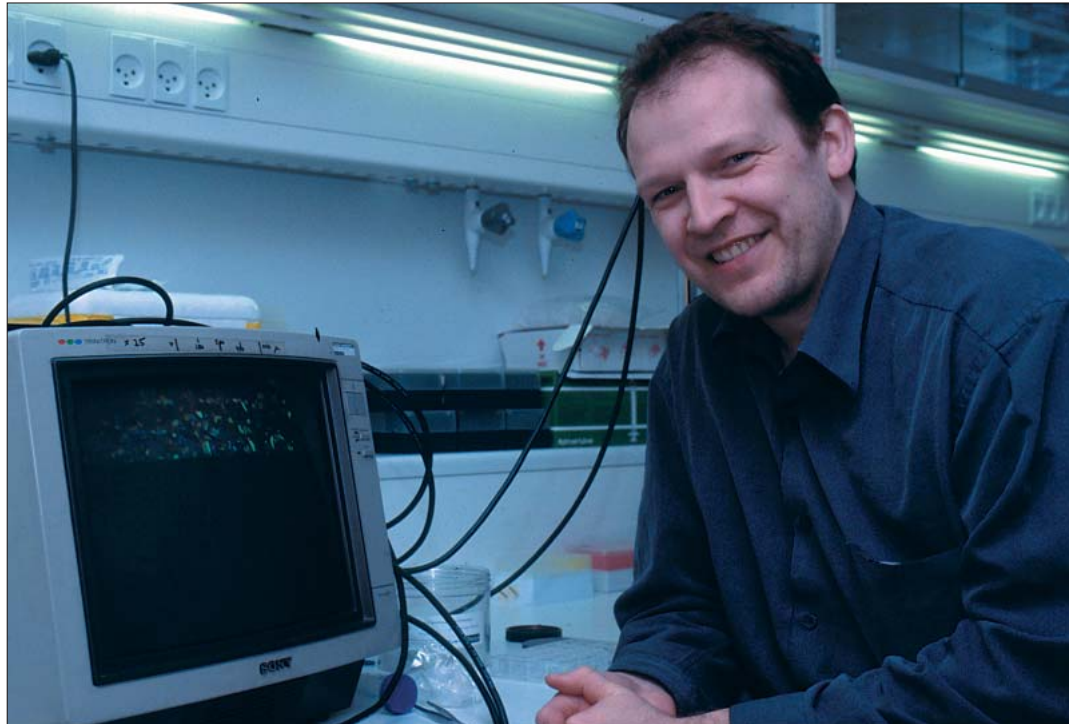


Proteinfabrikkens hemmeligheder

Et internationalt forskerhold har kortlagt hvert eneste atom i ribosomet, cellens proteinfabrik, som er en af livets mest centrale komponenter. Den danske molekylærbiolog Poul Nissen var med til bedriften, der er blevet fremhævet som et af de største videnskabelige gennembrud i år 2000.



Poul Nissen i laboratoriet.

Af Carsten R. Kjaer

■ Årets videnskabelige gennembrud i år 2000 blev af det videnskabelige tidsskrift *Science* kåret til at være kortlægningen af det humane genom. Hvad måske færre bemærkede var, at man på 2. pladsen fremhævede endnu en kraftpræstation – nemlig en fuldstændig løsning af den atomare struktur af cellens proteinfabrik – ribosomet. Det var et lille femmands team af forskere på Yale University under ledelse af de to professorer, Thomas A. Steitz og Peter B. Moore, som stod bag dette arbejde. Blandt de øvrige tre finder vi den danske molekylærbiolog Poul Nissen.

Den amerikanske organisation AAAS (American Associa-

tion for the Advancement of Science), som står bag udgivelsen af *Science*, har for nylig tildelt dette forskerhold den ærefulde Newcomb Cleveland Prize for deres banebrydende arbejde. Med prisen fulgte 5000\$ og en bronzemedalje.

Cellens proteinfabrik

Det er ikke noget nyt, at *Big Science* oftest foregår i det ufatteligt små. Nok er ribosomet opbygget af såkaldte makromolekyler, og består af mere end 300.000 atomer, men dette gør det dog ikke just til en størrelse, som er let at få øje på. Dog er ribosomer store nok til, at man vha. kraftige mikroskoper (elektronmikroskoper)

siden 1950'erne har kunnet studere dem i cellerne.

Ribosomet består af godt 50 proteiner og 3 RNA-molekyler arrangeret i to underenheder: den store og den lille ribosomenhed. Der er tusinder af ribosomer i hver eneste celle, for på ribosomet sker oversættelsen af den genetiske information i DNA'et til proteiner, og denne proces er næsten konstant på højt blus. I praksis er ribosomer altså cellens proteinfabrik.

Denne fundamentale biokemiske proces er så vigtig for alle levende organismer, at ribosomet som evolutionær opfindelse er forblevet stort set uændret igennem livets knap fire milliarder år lange historie på

vor planet. Derfor er ribosomer grundlæggende identiske, hvad enten man kigger på en bakterie eller i menneskets celler. Af samme grund er netop ribosomet genstand for en betydelig interesse for forskere, da afsløringen af dets hemmeligheder vil kunne fortælle os om fundamentale biokemiske processer, og give os ny viden om udviklingen af det tidlige liv på jorden.

Bedriften

Den bedrift, som Poul Nissen har været med til at udføre, er i al sin enkelthed en fuldstændig løsning af strukturen af den store ribosomale subenhet – den enhed, hvorpå prote-

insyntesen i praksis foregår (se boks). Med en løsning af strukturen menes, at forskergruppen kan gøre rede for placeringen af hvert eneste af denne enheds ca. 200.000 atomer. Tilsvarende har en anden forskergruppe løst strukturen af den lille ribosom-enhed. Bedriften skal ses i lyset af, at ribosomet er næsten 10 gange større end noget molekyle, man hidtil har løst strukturen af.

Krystaller baner vejen til den atomare forståelse

Teknikken, som har gjort det muligt at kortlægge hvert enkelt atom i det komplicerede molekyle, kaldes røntgenkry-

stallografi (se boks). At bruge denne teknik på biologiske materialer kræver, at dette først skal omdannes til krystaller. En krystal er en meget velordnet struktur, hvor de enkelte molekyler, som opbygger krystallen, er arrangeret symmetrisk i forhold til hinanden. En perfekt krystal rummer således orden helt ned på det atomare niveau, og denne atomare opbygning kan afdækkes ved røntgenkrystallografiske metoder (se boks).

Man finder krystaller overalt i dagligdagen i form af eksempelvis salt og sukker, men det kræver megen ekspertise og

held at lave krystaller af biologiske makromolekyler, som kan bruges til røntgenkrystallografi. Kvaliteten af krystallerne er nemlig bestemmende for, hvor godt et resultat, der kommer ud af anstrengelserne.

Resultatet af undersøgelserne er et såkaldt elektrontætheds-kort, som forskerne kan bruge til at tolke den atomare struktur. Jo bedre krystal, man har til rådighed og jo kraftigere røntgenstråling, man bruger – desto højere opløsning kan man frembringe i elektrontæthedskortet. Med højere opløsning kan man mere nøjagtigt bestemme den atomare struktur.

Forskergruppen har bestemt strukturen af den store ribosom-enhed til, hvad man angiver som 2,4 Å opløsning (jo lavere tal, jo højere opløsning). Dette er i røntgenkrystallografisk sammenhæng en god opløsning på et biologisk makromolekyle, hvor det er muligt at se de enkelte atomers kontaktflader med rimelig præcision.

Den lille ribosom-enhed, som en anden forskergruppe sideløbende løste strukturen af, blev bestemt til 3,0 Å opløsning, hvilket også gør det muligt at frembringe en ganske tilfredsstillende atomstruktur til bioke-misk analyse.

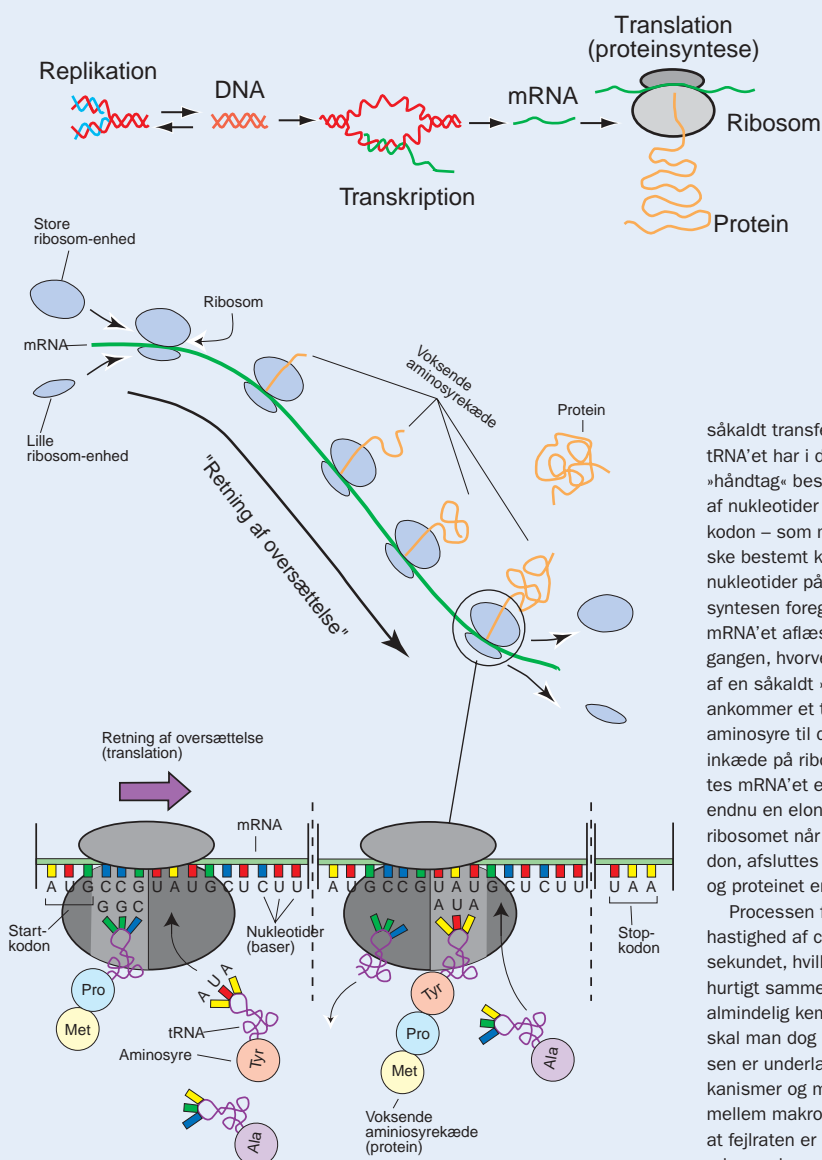
Proteindannelse

Det var i 1950'erne, at man blev klar over, at der var en sammenhæng mellem generne på DNA'et og proteinerne, som dannes i cellerne. Dette skyldtes i særdeleshed Watson & Crick samt Franklin & Wilkin's banebrydende studier af DNA strukturen. Det lykkedes derpå at løse den »genetiske kode« i 1960'erne. Med den genetiske kode menes, at bestemte kombinationer af DNA'ets fire byggesten, nukleotiderne A, C, T og G (i RNA er nukleotidet T udskiftet med nukleotidet U), koder for bestemte aminosyrer.

En kombination af tre nukleotider – f.eks. ACA – kaldes en kodon, og svarer til en ganske bestemt aminosyre (i dette tilfælde Threonin). Der indgår 20 forskellige aminosyrer i den levende organisme, og da fire nukleotider kan kombineres i triplerter på 64 måder, er der altså flere forskellige kombinationer af nukleotider, der koder for den samme aminosyre.

Udover de triplerter, der koder for aminosyrer, findes der også et såkaldt startkodon (Kombinationen AUG) og stopkodons (kombinationerne UGA, UAA og UAG). Disse angiver hhv. begyndelsen og enden på genet.

Et protein laves ved, at der først dannes en såkaldt messenger-RNA (mRNA) kopi af det stykke DNA, hvor dets kodende gen findes (et gen består typisk af 500 – 3000 nukleotider). Denne mRNA-kopi transporteres ud af cellerkernen til ribosomet. Hertil transporteres også aminosyrer, som er fasthæftet til



såkaldt transfer-RNA (tRNA). tRNA'et har i den anden ende et »håndtag« bestående af en triplet af nukleotider – et såkaldt anti-kodon – som modsvarer en ganske bestemt kombination af tre nukleotider på mRNA'et. Proteinsyntesen foregår således ved, at mRNA'et aflæses et kodon ad gangen, hvorved der ved hjælp af en såkaldt »elongeringsfaktor« ankommer et tRNA molekyle med aminosyre til den voksende proteinkæde på ribosomet. Herpå flyttes mRNA'et en tak ved hjælp af endnu en elongeringsfaktor. Når ribosomet når en såkaldt stopkodon, afsluttes aminosyre-kæden, og proteinet er dannet.

Processen forløber med en hastighed af ca. 20 aminosyrer i sekundet, hvilket ikke er specielt hurtigt sammenlignet med en almindelig kemisk reaktion. Her skal man dog huske på, at processen er underlagt nøje kontrolmekanismer og mange del-reaktioner mellem makromolekyler, der sikrer at fejlraten er så lav som i størrelsesordenen 1:10.000.

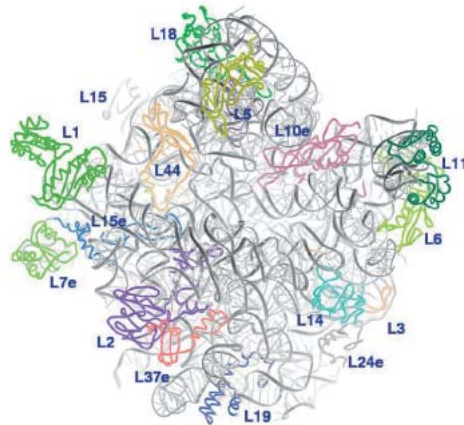
Ny biokemisk indsigt

Løsningen af ribosomets struktur har kastet nyt lys på de biokemiske processer, der foregår under proteinsyntesen på ribosomet. Biokemiske processer foregår i et tredimensionelt miljø, hvor det er meget afgørende, på hvilken måde de kemiske forbindelser bliver bragt sammen. Derfor er det så centralt at bestemme de tredimensionelle, atomare strukturer af biologiske makromolekyler, der styrer disse processer. Strukturbestemmelser giver også ny indsigt i de regler og finesser, som benyttes i biologien til at opbygge disse store, tredimensionelle makromolekyler, der kan varetage vigtige biologiske processer.

Proteinsyntesen sker ved, at aminosyrer tilføjes en efter en til en voksende kæde, som det dikteres af den genetiske information. Denne proces er katalyseret af ribosomet. Forskergruppen har kunnet påvise, at det katalytiske område på ribosomet alene udgøres af ribosomets RNA. Dermed kan det slås fast, at RNA i tidernes morgen udviklede sig til at lave protein, hvorefter den fortsatte evolution mod biologisk liv, som vi kender det i dag, har kunnet tage rigtig fart. Dette afgør i realiteten den »hønen-eller-ægget«-diskussion om, hvorvidt RNA kom før proteinerne eller omvendt ved livets begyndelse.

Selvom den herskende opfattelse de senere år har været, at RNA kom før proteinerne, så er det først med forskergruppens opdagelse, at denne diskussion kan betragtes som endegyldigt afgjort. På denne måde er det tydeligt, at sådanne detaljerede studier af atomare strukturer er med til at bidrage til vores forståelse for, hvordan livets tidligste udvikling forløb på vor planet.

Tillige har forskerholdet observeret, at ribosomet ser ud til at anvende såkaldt syre/base-katalyse. Dette er en ganske sofistikeret katalytisk mekanisme, som altså også kan varetages af et RNA-baseret enzym.



Ribosomets struktur: To repræsentationer af den atomare struktur af den store ribosomale subenhed. Billedet til venstre viser en schematisk fremstilling af ribosom-enhedens forskellige komponenter (RNA er angivet med gråt og proteiner (kaldet L1, L2 etc.) med farver). Billedet til højre viser den komplette atomare struktur af det ribosomale RNA (farver) kombineret med en schematisk fremstilling af de ribosomale proteiner (lys grå).

Perspektiver i milliondollar-klassen

Som nævnt er løsningen på en så kompliceret struktur som ribosomet dels i sig selv en akademisk tilfredsstillende for de deltagende forskere, og dels vigtig for vor forståelse af centrale biokemiske processer. Men ervedover er der bestemt også økonomiske perspektiver. Det perspektiv, der umiddelbart har vist

sig, drejer sig om udviklingen af antibiotika.

Man ved, at en lang række antibiotika virker ved at blokere proteinsyntesen i bakterierne. Dette gør de ved at binde sig til ribosomets katalytiske område. På baggrund af den nye detaljerede viden om, hvor og hvordan de biokemiske processer udspringer sig i ribosomet, og ved at bestemme atomare strukturer af

ribosomer med antibiotika bundet til sig, kan man få en langt bedre forståelse af, hvordan disse antibiotika virker, og hvordan bakterierne udvikler resistens. Det vil derfor være muligt på en »intelligent måde« at designe nye antibiotika i stedet for, som det hidtil har været tilfældet, at prøve sig frem ved mere tilfældige metoder.

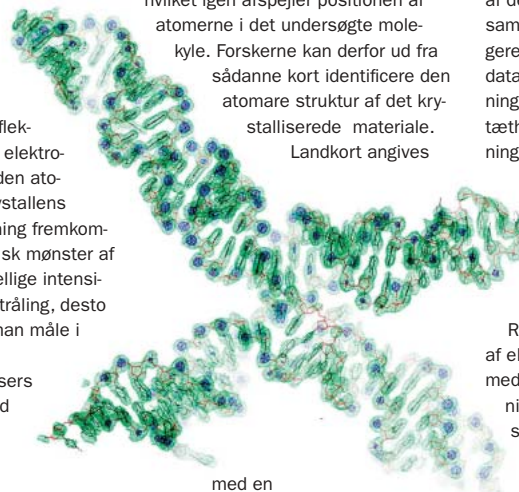
Disse åbenlyse perspektiver har

Røntgenkrystallografi og elektrontæthedskort

Princippet i røntgenkrystallografi er, at man belyser en velformet krystal med en kraftig røntgenstråle med en veldefineret bølgelængde, eksempelvis 1 Å (1 Ångstrøm = 10^{-10} meter eller en ti-millionedel meter). Røntgenstrålerne reflekteres fra atomernes elektroner, og på grund af den atomare struktur og krystalens symmetriske opbygning fremkommer der et symmetrisk mønster af reflekser med forskellige intensiteter. Jo kraftigere stråling, desto flere reflekser kan man måle i praksis.

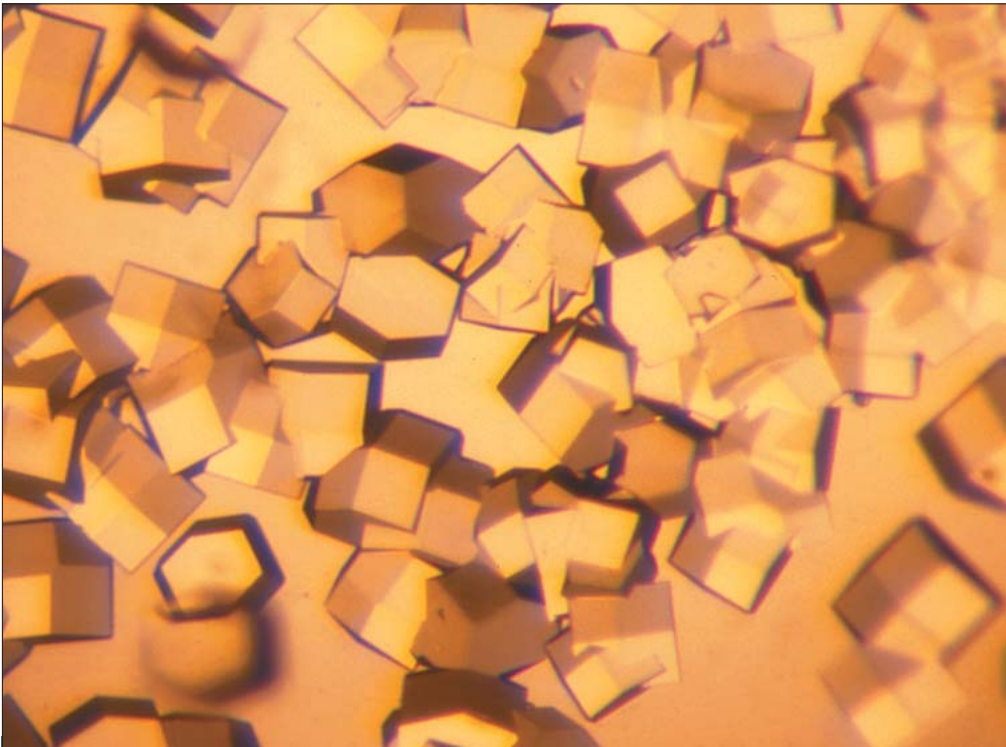
De enkelte refleksers intensitet måles med en detektor, og en liste over samtlige observerede refleksers intensitet kaldes et datasæt. Ud fra sådanne datasæt kan man beregne et elektrontæthedskort i

lighed med et topografisk landkort med højdekorturer. Korturerne i elektrontæthedskortet angiver således områder med stor elektrontæthed, hvilket igen afspejler positionen af atomerne i det undersøgte molekyle. Forskerne kan derfor ud fra sådanne kort identificere den atomare struktur af det krystalliserede materiale. Landkort angives



med en målestok, eksempelvis 1:100.000 eller 1:20.000. Jo lavere målestoksforhold – jo højere opløs-

ning, og jo mere detalje kan man udlede af landkortet. På samme måde angiver man elektrontæthedskortets opløsning, og den er givet af det datasæt, man har kunnet indsamle. Jo bedre krystal og jo kraftigere røntgenstråling – desto større datasæt og dermed højere opløsning kan man frembringe i elektrontæthedskortet. Med højere opløsning kan man mere nøjagtigt bestemme den atomare struktur. Figuren er et udsnit af elektrontæthedskortet af den store ribosomale subenhed. Dette udsnit viser et område af det ribosomale RNA. Der er angivet to niveauer af elektrontæthed, hvor grøn er medium, og blå er høj. Mediumniveau viser typisk alle atomer i strukturen, som her er vist med rødbrun stregtegning. Det blå niveau viser kun de allerkræftigste korturer, som i RNA udgøres af fosfatgrupper, der kan ses at ligge som perler på en snor.



Biologiske krystaller

Biologiske makromolekyler undersøges altid i vandige opløsninger, hvor de har deres korrekte struktur og biologiske funktion. Man kan derfor ikke opnå krystallisation blot ved udtørring, som man eksempelvis kender det fra saltkrystaller. I stedet opnår man krystallisation ved at tilsætte forbindelser, der nedsætter makromolekylernes opløselighed i den vandige opløsning.

Når opløseligheden sænkes, vil man opnå, at makromolekylerne klasker sammen, og danner et bundfald (kaldet precipitat). Hvis man er heldig, vil

denne proces ske kontrolleret, således at makromolekylerne vil danne nogle ganske bestemte kontakter til hinanden frem for tilfældige klumper af precipitat. Herved kan der nemlig dannes krystaller, hvor makromolekylerne lægger sig i et velordnet mønster i forhold til hinanden. Denne krystallisationsproces er en ganske vanskelig kunst, og man kan ikke forudsige, hvilke betingelser der vil lade et bestemt makromolekyle danne krystaller. Det er derfor en klassisk, empirisk disciplin, hvor man lader sig lede af eksperimenter og observationer.

fået de to amerikanske professorer fra Yale, der ledede projektet, til at grundlægge et firma, som forsøger at udnytte de kommercielle muligheder i denne nye tilgang til antibiotikaudvikling. Til formålet er det lykkedes dem at rejse en «first round venture capital» på ikke mindre end 22 mio. dollars – et rekordstort beløb i selv amerikansk målestok.

Yderligere fart på dansk ribosom-forskning

Poul Nissen selv er nu tilbage i Danmark på et såkaldt Ole Rømer stipendium, finansieret af Statens Naturvidenskabelige Forskningsråd. Her skal han på

Laboratoriet for Makromolekylær Krystallografi under ledelse af lektor Jens Nyborg sætte gang i den danske ribosom-forskning. Han vil bl.a. sætte fokus på ribosomer fra andre organismer, såsom mennesker og gær, og studere ribosomets vekselvirkning med andre komponenter i cellen, der indgår i proteinsyntesen. Til dette arbejde har Poul Nissen sammen med sin kollega lektor Gregers Andersen netop modtaget en stor bevilling fra det internationale Human Frontier Science Program, så de i samarbejde med to amerikanske laboratorier kan inddrage flere forskellige metoder og strategier

i denne forskning.

Desuden har Poul Nissen startet et nyt felt i krystallografiske studier af en klasse proteiner, som kaldes membranproteiner. Disse proteiner er særdeles interessante for den medicinske forskning, da de fleste lægemidler virker på netop denne klasse af proteiner.

Poul Nissens aktiviteter indgår i øvrigt i det nyligt oprettede forskningscenter INANO ved Aarhus Universitet, som fokuserer på den tværvidevidenskabelige nanovidenskab og nanoteknologi.

Tiden vil vise, om Poul Nissens arbejde vil kaste flere priser og bronzemedaljer af sig. ☺

*Om forfatteren
Carsten R. Kjaer
er redaktør,
Aktuel Naturvidenskab
e-post: crk@aktuelnat.au.dk*

*Om Poul Nissen
Han er forskningslektor ved
Laboratoriet for Makromolekylær Krystallografi
Institut for Molekylær og
Strukturel Biologi
Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10C
8000 Århus C
Tlf.: 8942 5027
E-post: nissen@imsb.au.dk*