

# Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie EMBL –Außenstation Hamburg–

**Leitung:** M. Wilmanns, V. Lamzin

**Forschungsgruppenleiter:** C. Hermes, M. Koch, W. Meyer-Klaucke, J. Müller-Dieckmann, D. Svergun, P. Tucker, M. Weiss

Das Jahr 2003 stand im Zeichen der Vorbereitung für die Planung des Aufbaus von Messstationen mit biologischen Applikationen am PETRA III Ring, und EMBL ist mit einem eigenen Beitrag am TDR für PETRA III beteiligt. Die Umbauten am Fächer K wurden weitgehend abgeschlossen, und wir hoffen, noch dieses Jahr die neue MAD-Messstation X12 endgültig in Betrieb nehmen zu können. Unserem Mitarbeiter Dr. Dmitri Svergun wurde inzwischen eine volle Gruppenleiterstelle im Bereich der Kleinwinkelstreuung von biologischem Material angeboten, die er auch angenommen hat. Insbesondere bedingt durch eigene Entwicklungsarbeiten, ist das Interesse für Experimente an der von ihm betreuten Messstation enorm gestiegen. Sie soll in naher Zukunft von Grund auf renoviert werden. Seit Beginn des Jahres 2003 wird ein neues Integriertes Projekt (IP) der Europäischen Union, „BIOXHIT“ von EMBL-Hamburg unter der Leitung von Dr. Victor Lamzin koordiniert. Damit hat unser Institut eine leitende Rolle für die Weiterentwicklung von Technologien im Zusammenhang von Synchrotron-Messstationen mit Anwendungen in den Lebenswissenschaften übernommen. Ein weiteres Projekt, das vom BMBF gefördert wird, wird ebenfalls von EMBL-Hamburg koordiniert. Es hat zum Ziel, mit Hilfe von Proteinstrukturen neue Leitverbindungen gegen Tuberkulose zu finden. Außerdem wird im Rahmen dieses Projektes eine Hochdurchsatz-Kristallisationseinheit von EMBL aufgebaut.

Wir danken DESY und HASYLAB für die Bereitstellung der Infrastruktur und Synchrotronstrahlung im Jahre 2003. Im weiteren Teil des Berichtes sind die wissenschaftlichen Aktivitäten der Forschungsgruppen aus den Bereichen Instrumentierung (Christoph Hermes), Biokristallographie (Victor Lamzin, Paul Tucker, Manfred Weiss, Matthias Wilmanns, Paul Tucker) und Kleinwinkelstreuung (Dmitri Svergun) zusammengefasst.

## Instrumentelle Entwicklungen

Die Hauptaktivitäten der Instrumentierungsgruppe waren im letzten Jahr auf die Fertigstellung der Strahlführungen am Fächer K konzentriert. Die beiden neu aufgebauten Stationen X11 und X13, die bei konstanter Wellenlänge von etwa 0.8 Å für Experimente in der Proteinkristallographie genutzt werden, arbeiteten das ganze Jahr über sehr zufriedenstellend. Im Folgenden soll kurz der Fortgang der Arbeiten an der Strahlführung X12 beschrieben werden, die den zentralen Teil des Fächers K darstellt und an der Experimente mit variabler Wellenlänge geplant sind (MAD).

Im März 2003 konnte an X12 erstmals die Intensität eines monochromatischen Röntgenstrahls gemessen werden. Die Messung erfolgte mittels einer Ionisationskammer, die an der Stelle aufgestellt war, an der sich später der Proteinkristall befinden wird. Für diese ersten Tests wurde anstelle des sehr komplexen horizontal fokussierenden Monochromators ein einfacher Doppelkristallmonochromator (DCM) mit zwei flachen Si (111) Kristallen verwendet. Damit konnten sowohl die gesamten mechanischen Komponenten des Monochromatoraufbaus als auch die entsprechende Kontrollsoftware charakterisiert werden. Bis auf geringfügige Korrekturen an der Software arbeiteten alle Motorsysteme, Intensitätsmonitore und fernbedienbaren Sichtschirme zuverlässig und den Spezifikationen entsprechend. Die Charakterisierung des vertikal fokussierenden Röntgenspiegels von X12 wurde ebenfalls mit Hilfe dieses vereinfachten Monochromatoraufbaus mit sehr zufriedenstellenden Ergebnissen durchgeführt. Identische Spiegel werden bereits erfolgreich an den Strahlführungen X11 & X13 eingesetzt. Ein weiterer wichtiger Schritt im Hinblick auf die Fertigstellung von X12 war der Austausch der zwei flachen Monochromator Kristalle durch die endgültige Konfiguration, die aus einem wassergekühlten, flachen ersten und einem horizontal fokussierenden zweiten Si-Kristall besteht. Die

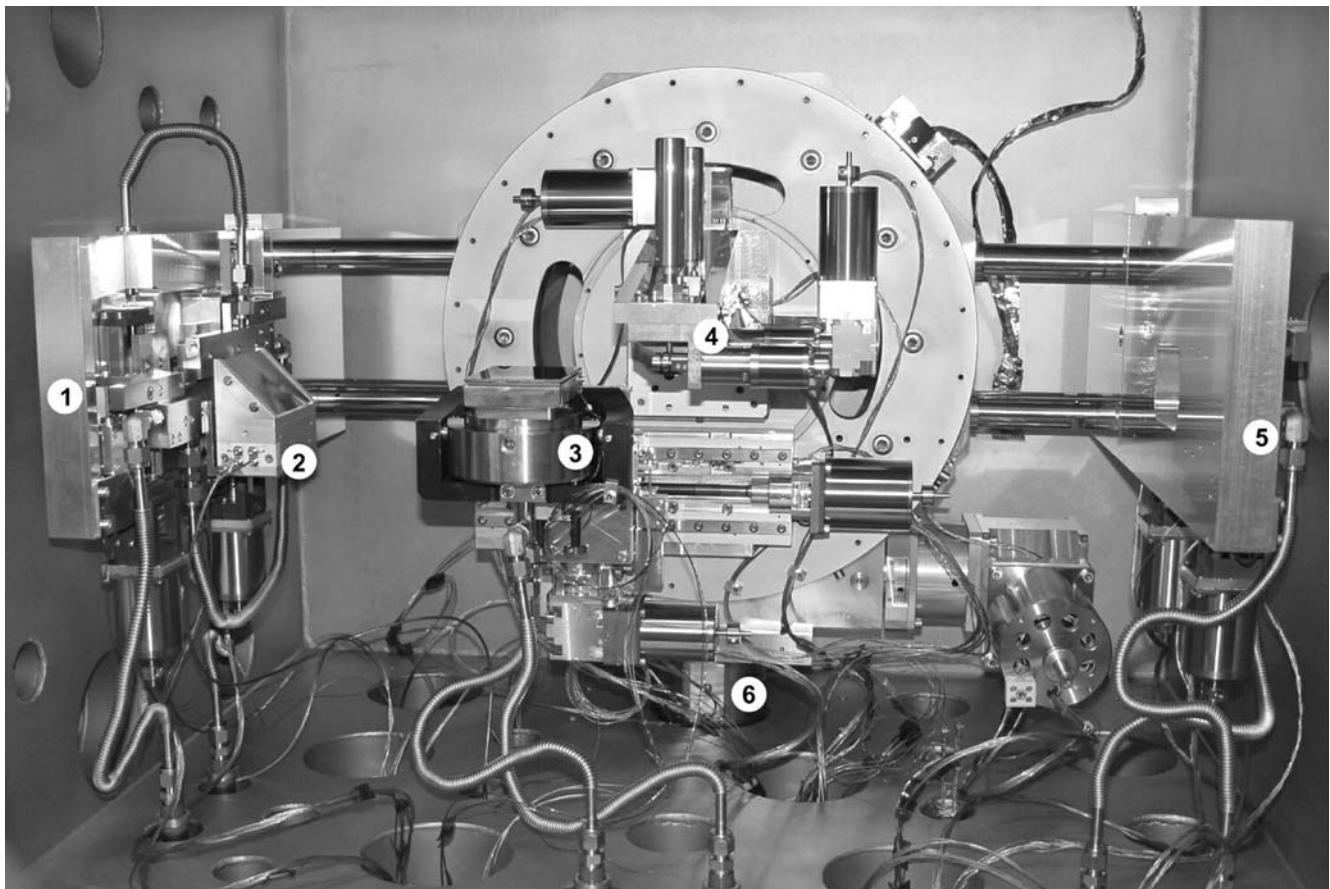


Abbildung 66: Doppelmonochromator im Vakuumtank. 1) Eingangsblende (wassergekühlt), 2) Intensitätsmonitor (PIN-Diode), 3) wassergekühlter, erster Si(111) Kristall montiert auf kardanischer Feinjustiervorrichtung, 4) zweiter, fokussierender Monochromatorkristall mit Biegemotoren, 5) Ausgangsblende, 6) Hubsäule zur vertikalen Translation des gesamten Aufbaus.

exakte gegenseitige Positionierung der beiden Kristalle zueinander erfolgt durch eine Kombination von hochpräzisen Picomotoren und einem dynamisch regelbaren Piezokristall. In guter Übereinstimmung mit den Strahlparametern von DORIS konnte weiße Synchrotronstrahlung von 50 mm Breite zu einem monochromatischen Strahl von etwa 1.5 mm (fwhm) Breite fokussiert werden. Ein Problem ergab sich, wenn die Energie des Röntgenstrahls über einen sehr großen Bereich variiert wurde: Dann konnte zwar die vertikale Position des Strahls durch das Verfahren des zweiten Kristalls konstant gehalten werden (constant exit), in horizontaler Richtung ergaben sich aber inakzeptable Strahlver-

schiebungen. Dies soll zukünftig durch eine bessere, verspannungsfreie Fixierung der Kristalle und durch eine noch genauere relative Positionierung zueinander vermieden werden.

## Strukturen aus dem Proteom des Tuberkulosebakteriums

Vor einigen Jahren ergaben Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO, dass ca. ein Drittel

der Weltbevölkerung mit „Mycobacterium tuberculosis“, dem Erreger der Tuberkulose, infiziert ist. Jedes Jahr kommen mehr als 8 Millionen neue Fälle hinzu, und mehr als 2 Millionen Menschen sterben jährlich an der Krankheit. Koinfektion mit HIV, eine Zunahme an resistenten „Mycobacterium tuberculosis“-Stämmen und die zunehmende Mobilität auf globaler Ebene bewirken, dass Tuberkulose zu einem zunehmenden globalen Problem wird, was wiederum zu einem revitalisierten Interesse an der über Jahrzehnte vernachlässigten Tuberkuloseforschung führt.

Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Strukturgenomik-Projektes ([www.xmtb.org](http://www.xmtb.org)) arbeiten verschiedene Arbeitsgruppen der EMBL Außenstelle in Hamburg (Wilmanns, Tucker, Weiss, Groves, Song) sowie der strukturbioologisch orientierten Hamburger Max-Planck-Gruppen (Bartunik) an der Strukturaufklärung von etwa 150 Proteinen aus „Mycobacterium tuberculosis“. Die Selektion der Zielproteine umfasst Proteine der Leu- und Lys-Biosynthese (Weiss), der His-Biosynthese (Wilmanns), allgemeiner Aminosäurebiosynthesewege (Bartunik), Zweikomponentensysteme (Tucker), sowie eine Reihe von Proteinen, die in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Arbeitsgruppe für Infektionsbiologie (Kaufmann) in Berlin auf der Basis von Protein- und RNA-Expressionsprofilen ausgewählt wurden. Speziell die letzteren haben eine große Chance, sich als neue Zielproteine für neue Anti-Tuberkulosemedikamente herauszukristallisieren, da sie in unterschiedlichen Lebenszyklen von „Mycobacterium Tuberculosis“ von dem Bazillus in unterschiedlichem Ausmaß produziert werden.

Von den insgesamt 147 ausgewählten Proteinen, konnten bisher 106 erfolgreich exprimiert werden, 53 davon konnten in gereinigter Form dargestellt werden, von 13 konnten Kristalle gezüchtet werden, und von neun der kristallisierten Proteine wurden die drei-dimensionalen Strukturen bestimmt. Dabei handelt es sich um ein Protein aus der Leu-Biosynthese (Rv2995c), drei Proteine aus der Lys-Biosynthese (Rv1293, Rv2753c and Rv2773c), einer Receiverdomäne eines Zweikomponentensystems (Rv1626), einer ATPase-Domäne eines Zweikomponentensystems (Rv0902c), sowie ein Protein aus der Lipidbiosynthese (Rv2217). Nach erfolgter Strukturaufklärung gehen die Bestrebungen nun da-

hin, Inhibitoren aufzufinden, die möglicherweise als neue Leitverbindungen für die Entwicklung neuer Anti-Tuberkulose-Medikamente dienen können.

## Kleinwinkelstreuung an Nicht-kristallinen Systemen

Die Kleinwinkelstreuanlage X33 an DORIS III ist – einzigartig in Europa – spezialisiert auf die Untersuchung von biologischen Makromolekülen in Lösung. Die Kleinwinkelstreuung liefert dabei komplementäre Daten zur hochaufgelösten Proteinkristallographie. Von besonderem Interesse sind strukturelle Umfaltungsprozesse, deren Konformationen meist nicht kristallographisch untersucht werden können. Die Systeme variieren dabei von kleineren einzelnen Proteinen (z. B. native Prionen) und deren Konformationsänderungen bis zu Untersuchungen von Protein-Protein, Protein-DNS(RNS) Wechselwirkungen und Komplexbildung. Messungen an biologisch aktiven Peptid-Lipidmembran Systemen, Polymeren sowie Mikroemulsionen erweiterten das Profil der Kleinwinkelstreuanlage. Um den Nutzern optimale Bedingungen zu garantieren stehen speziellen Probenumgebungen zur Verfügung die es erlauben präzise Streudiagramme zu messen. Die bestehenden Datenaufnahmeprogramme wurden erweitert, um zukünftigen Anforderungen von neuen elektronischen Komponenten gerecht zu werden. Zur Zeit ist der Upgrade von optischen und mechanischen Komponenten der Kleinwinkelstreuanlage projektiert.

Der Zahl die Kleinwinkelstreuprojekte ist in letzten fünf Jahren kontinuierlich (um 20 Prozent pro Jahr) gestiegen. Verschiedene Projekte konnten 2003 in Kooperation mit Nutzern erfolgreich zu Ende gebracht werden. Von besonderem Interesse war dabei die Untersuchung von der Proteinquartärstruktur und Komplexbildung. Der Vorteil der Kleinwinkelstreuung ist hierbei, dass vorhandene, hochaufgelöste makromolekulare Strukturen der einzelnen Komponenten zur Verwendung kommen um den gesamten Komplex zu Rekonstruieren. Dazu wird zunächst die Form der Komplexe mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung genau bestimmt und dann die resultierenden Daten mit den einzelnen Proteinkomponenten verglichen.

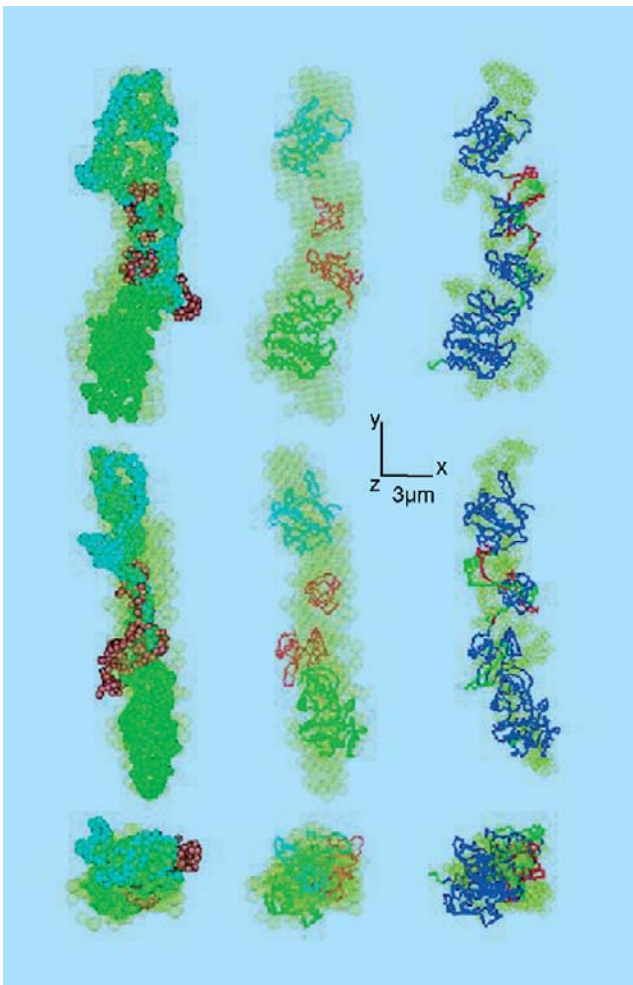


Abbildung 67: Der Vergleich der durch Kleinwinkelstreuung erhaltenen Modelle mit niedriger Auflösung (helle Kugelstruktur) mit ebenfalls durch Lösungstreuung erhaltenen Strukturen der einzelnen Proteinkomponenten (links). Die verfeinerte Struktur auf Basis der Proteinkristallstrukturdaten der Thyrosinkinase ist in das Lösungsmodell eingebettet dargestellt (Mitte). Die fehlenden Verbindungstücke zwischen den einzelnen Proteindomänen sind mit Hilfe des Programms CREDO hinzugefügt worden (rechts).

Diese Interpretation der Kleinwinkelstreuendaten erfolgt mit speziellen Softwarepakete, die am EMBL in Hamburg entwickelt und gepflegt wird. Schnelle Algorithmen erlauben es dabei die Hülle eines Proteins „ab initio“ zu berechnen. Die Programme GASBOR und DAMMIN wurden dazu erweitert und neue Funktio-

nen hinzugefügt. So kann nun die Symmetrie der Moleküle in der Modellverfeinerung berücksichtigt, sowie Modelle symmetrischer Proteinuntereinheiten interaktiv durch das Programm MASSHA berechnet werden. Einen neuen Ansatz in der Modellierung von Kleinwinkelstreuendaten benutzt das Programm GLOBSYMM. Hierbei werden speziellen Eigenschaften der Quartärstruktur des Proteins verwendet um durch einen Suchalgorithmus Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu ermitteln. Das komplette Programmpaket ATSAS zur Analyse und Interpretation von Kleinwinkelstreuendaten steht akademischen Anwendern als Freeware für alle gängigen Betriebssysteme zur Verfügung (<http://www.embl-hamburg.de/software.html>). Zur weiteren Vereinfachung der Dateninterpretation von Lösungsstreuexperimenten ist der Prototyp einer Datenbank, die eine schnelle Klassifikation der untersuchten Proteine erlaubt im Aufbau. Hintergrund dabei ist, dass strukturelle Übereinstimmung von Proteinen ein Hinweis auf gemeinsame Funktionalität sein kann. Ein Vergleich von experimentellen Daten mit theoretisch bestimmten Proteindaten (z. Z. ca. 15 000 Datensätzen) vermittelt somit eine schnelle Zuordnung des untersuchten Proteins zu einer bestimmten Proteinfamilie.

Durch die Verbesserungen der experimentellen Aufbauten und der Datenanalysesoftware war es möglich, ein Modell für die Tyrosinkinase Btk („Burtons tyrosine kinase“) zu entwickeln (Abbildung 67). Dieses spezielle Enzym ist eine nicht Rezeptor gebundene Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Lymphozyten des Immunsystems bei Menschen und Mäusen innehat. Dabei zeigt die Burtons Tyrosinkinase einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie andere Proteine dieser Familie, besitzt aber im Gegensatz zwei weitere Proteindomänen. Diese Proteindomänen wurden mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung bestimmt. Überraschenderweise zeigte der Proteinkomplex eine lineare Anordnung der Domänen, die keine oder nur geringe Wechselwirkungen mit den anderen Proteindomänen haben. Allerdings zeigen biochemische Daten, dass die ein einfaches Abschneiden der Domänen keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat. Die Daten der Röntgenkleinwinkelstreuung weisen damit darauf hin, dass – im Unterschied zu anderen Vertretern aus der Familie der Tyrosinkinase – die Regulation der enzymatischen Aktivität keinen vollständig assemblierten Komplex benötigt.

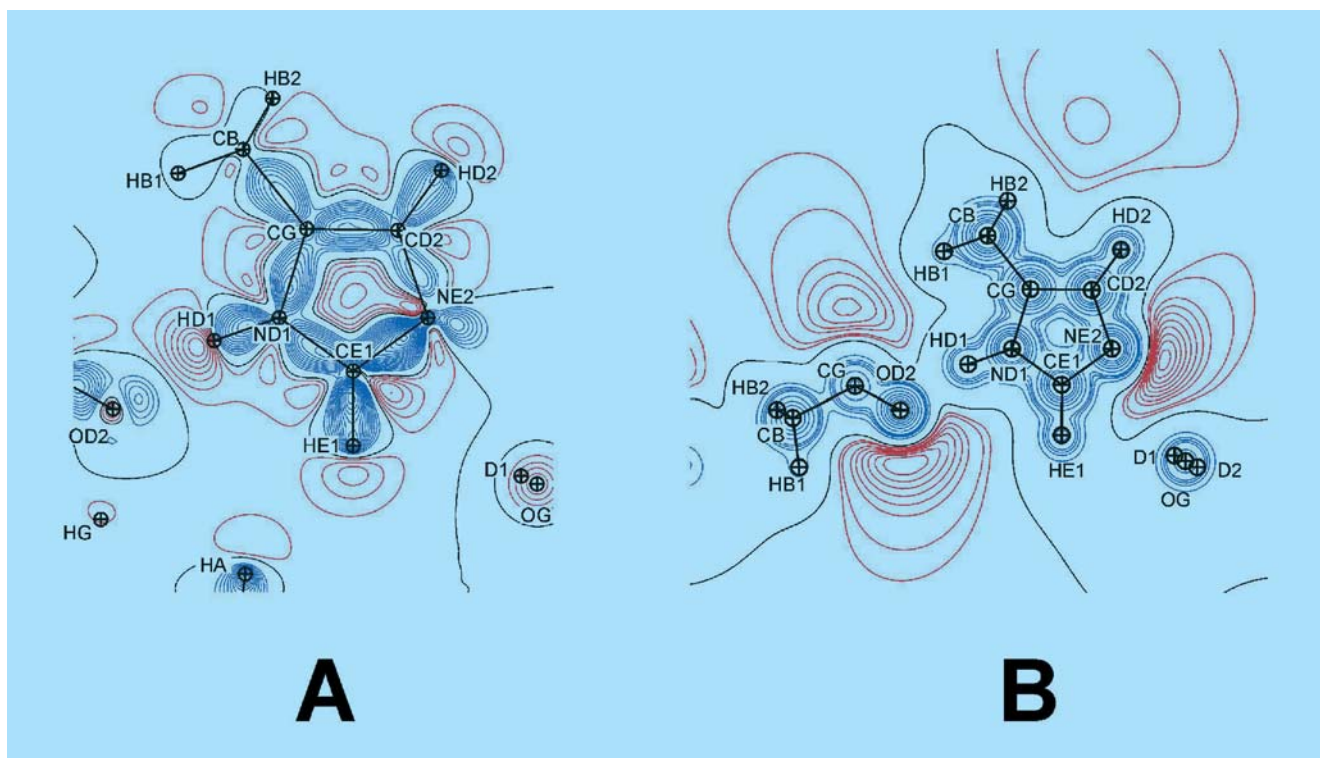


Abbildung 68: Deformationselektronendichte (A), die die nicht-Kugelförmigkeit der Atome zeigt, und die Ladungsverteilung (B) um das katalytisch aktive Histidin 56, die wichtige Oberflächeneigenschaften zeigt.

## Kristallographie zu atomarer Auflösung deckt Geheimnisse der Katalyse auf

Eine Reihe von Kristallstrukturen von Trypsin, die entweder ein Peptidfragment oder einen kovalent gebundenen Inhibitor enthalten, wurden zu atomarer und ultra-hoher Auflösung bestimmt und „ab initio“ quantenchemischen Rechnungen und Multipol-Verfeinerungen unterzogen. Trypsin spaltet Peptide am C-terminalen Ende nach Arginin oder Lysin. In den Strukturen von Trypsin aus „*Fusarium oxysporum*“ kann immer ein Peptidfragment im aktiven Zentrum beobachtet werden (Rypniewski, Ostergaard et al. 2001). Dies und die Tatsache, dass die Kristalle zu sehr hoher Auflösung streuen, machen Trypsin besonders interessant für Studien des Mechanismus und sind ein

exzellentes Mittel für die Untersuchung der katalytischen Aktivität auf Elektronenniveau (Meijers, Morris et al. 2000; Schmidt and Lamzin 2002).

Die Katalyse findet in einer Spalte, von der eine Bindungstasche (specificity pocket) ins Innere des Enzyms ragt. Eine katalytische Triade (Ser 195 – His 56 – Asp 99) formt den Kern des aktiven Zentrums. Ein sogenanntes „oxyanion-hole“ stabilisiert die Ladungen, die sich an den Zwischenprodukten während der Reaktion bilden. Die Bindungstasche bevorzugt lange, basische Aminosäureseitenketten. Der Unterschied in den Substratspezifitäten zwischen verschiedenen Trypsinen ist durch die Form und Größe der Bindungstasche gegeben (Lu, Apostol et al. 1997; Brandsdal, Aqvist et al. 2001).

Das Substrat ist nur teilweise gebunden, und seine Besetzung scheint mit der Besetzungsverteilung der ver-

schiedenen Konformationen in der Proteinstruktur zu korrelieren. Dem Arginin in der Bindungstasche fehlt das zweite Carboxyl-Sauerstoffatom, und die C=O Bindungslänge ist mit 1.48 Å extrem lang. Das Molekül liegt in mindestens zwei Konformationen vor, in der Struktur bei pH 4 überlappt es sogar mit einem Lysin. Zwei Wassermoleküle (W1 und W2) befinden sich in unmittelbarer Nähe. W2 befindet sich nahe am Carboxyl-Sauerstoffatom im Arginin. Das Carboxyl-Kohlenstoffatom hat Kontakt zu W1 (1.87 Å) und dem Ser 195 Og. (2.05 Å). Die Koordination um den Kohlenstoff ist tetraedrisch.

Eine gute Übereinstimmung zwischen der Kristallstruktur und dem theoretischen Modell aus den *ab initio* quantenchemischen Rechnungen konnte nur unter der Annahme erreicht werden, dass das katalytisch aktive Serin de-protoniert ist und das angreifende Wassermolekül (W1) ein Wassermolekül und kein Hydroxylion ist, was den Schluss nahelegt, dass die Kristallstruktur einen Zustand nahe am tetraedrischen Übergangszustand darstellt. So konnte bewiesen werden, dass die Trypsin-Deacylierung tatsächlich einem S<sub>N</sub>2 Mechanismus folgt. W1 ist für die Hydrolyse verantwortlich, während W2 als Aktivator funktioniert.

Multipoleverfeinerung zeigte die Ladungsverteilung im aktiven Zentrum und die Richtigkeit der „*ab initio*“ Berechnungen. Die Strukturen stellen Schnappschüsse entlang des Reaktionweges dar. Die Kombination dieser Methoden ist ein gutes Mittel, um biologische Prozesse zu verstehen.

## Wie kleine strukturelle Unterschiede die Funktion von Enzymen bestimmen können

Metallo-beta lactamasen sind Enzyme, die die Resistenz von Bakterien gegen Antibiotika verursachen. Nur in wenigen Fällen gibt es geeignete Medikamente, die diese Enzyme inhibieren, so dass sie nicht die Antibiotika in der Wirksamkeit behindern. Leider ist zu beobachten, dass durch kleine Veränderungen der Enzyme ständig neue Resistenzen entstehen. Es gibt nun mehrere Ansätze, wie man sich mit diesem Themen-

komplex auseinandersetzen kann. Zum einen können alle neu gefundenen Lactamasen sofort charakterisiert werden, zum anderen kann man versuchen, die Flexibilität innerhalb dieser Enzymfamilie zu verstehen. Den zweiten Weg haben wir gewählt. Zu diesem Zweck wurden auf Basis der Aminosäuresequenz, die in Datenbanken gespeichert sind, Enzyme identifiziert, die eine ähnliche Struktur besitzen könnten, aber aufgrund ihres Vorkommens im Menschen oder in Pflanzen vermutlich eine andere Funktion ausüben: Glyoxalase II und Zinc Phosphodiesterase (ZiPD). Während Glyoxalase II für die Entgiftung von Zellen sehr wichtig ist, scheint ZiPD an der Bearbeitung von tRNA beteiligt zu sein. Obwohl alle Enzyme eine sehr ähnliche Struktur bzw. Faltung haben, zeichnen sie unterschiedliche Metallspezifitäten aus. Metallo-beta lactamase sind abhängig von der Gegenwart von mindestens einem Zinkion im aktiven Zentrum, während ZiPD derer zwei benötigt. Glyoxalase II ist im Gegensatz dazu nicht nur mit Zinkionen, sondern auch mit Mischungen aus Mangan- und Eisenionen aktiv. Um die Ursachen hierfür festzustellen, wird die Koordination der Metallionen in Lösung bestimmt. Die ideale Methode hierzu ist die Röntgenabsorptionsspektroskopie. Mit Hilfe dieser Technik, für die EMBL Hamburg einen Messplatz an DORIS III betreibt, kann die Metallumgebung und die elektronische Konfiguration des Metallions unabhängig vom Probenzustand bestimmt werden. Für die Enzyme dieser Superfamilie wurden so die Metallbindungsmotive bestimmt und es sind kleine, vermutlich entscheidende Unterschiede festzustellen. So sind nicht immer alle Metallbindungspartner oder Liganden identisch. Dies verändert die elektronische Konfiguration der Metallionen. Die Molekularbiologie erlaubt den Austausch dieser Aminosäuren (Mutation). Stellt man so wieder das Standardmotiv her, bietet sich die Chance den Einfluss der einzelnen Liganden zu verstehen. Um die Metallspezifität zu beleuchten, wurden die Metallbindungskonstanten für die Enzyme und Mutanten bestimmt und mit Röntgenabsorptionsspektroskopie die Bindung an das aktive Zentrum verifiziert. Die marginalen Unterschiede hierbei zeigen klar auf, dass es neben den strukturellen Eigenschaften noch andere, vermutlich globale, Faktoren gibt, die diese Metallspezifität beeinflussen. Für die beta-lactam spaltenden Enzyme heißt dies, dass wir eine neue Sichtweise gewonnen haben und in Zukunft diese Enzyme auch andere Metalle nutzen könnten, was vermutlich andere Arten der Inhibition (Medikamente) notwendig macht.