

Abbildung 86: *Dreidimensionale Struktur der Isopropylmalatdehydrogenase aus M. tuberculosis. Eine Untereinheit des Homodimers ist in Farbe gezeichnet, die andere in grau. Zu erkennen sind die α -Helizes in rot und die β -Stränge in gelb. Das aktive Zentrum befindet sich in der sichtbaren Spalte zwischen den beiden Domänen jeder Untereinheit.*

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie EMBL –Außenstelle Hamburg–

Leitung: M. Wilmanns, V. Lamzin

Für ein paar Tage ging unser Blick zurück auf das 30-jährige Bestehen der Außenstelle Hamburg des Europäischen Laboratoriums für Molekularbiologie (EMBL). Gemeinsam mit unseren Kollegen von DESY und vielen auswärtigen Gästen feierten wir das Jubiläum mit einer internationalen Konferenz „Structural Biology at Crossroads“. Eine neue Vereinbarung zwischen DESY und EMBL über eine interinstitutionelle Partnerschaft wurde am 19.05.2004 von den Direktoren beider Institute, Prof. Albrecht Wagner und Prof. Fotis Kafatos, feierlich unterzeichnet.

Wichtiger als der Blick in die Vergangenheit sind aber die Zukunftsperspektiven für unser Institut, und damit auch für viele Wissenschaftler aus meist europäischen Ländern, die Synchrotronstrahlung für Anwendungen in den Lebenswissenschaften in Hamburg nützen. Der zukünftige Speicherring PETRA III bietet herausragende Möglichkeiten für EMBL, die von uns derzeit betriebenen Strahlrohre durch erstklassige, neue Einrichtungen zu ersetzen. Dafür haben wir einen Vorschlag mit dem Titel „Integrated Centre in Structural Biology at PETRA III“ eingereicht. Die konkreten Planungen haben bereits – in Abstimmung mit DESY – begonnen und wir hoffen, demnächst mit der Rekrutierung eines exzellentes Teams für den Bau der geplanten Einrichtungen beginnen zu können.

Im Folgenden sind die wissenschaftlichen Aktivitäten der Forschungsgruppen aus den Bereichen Instrumentierung (Christoph Hermes), Biokristallographie (Victor Lamzin, Jochen Müller-Dieckmann, Paul Tucker, Manfred S. Weiss, Matthias Wilmanns) und Kleinwinkelstreuung (Dmitri Svergun) zusammen gefasst.

Instrumentelle Entwicklungen an der EMBL Außenstelle Hamburg in 2004

Um der zunehmenden Bedeutung der Kleinwinkelstreuung für die Strukturbestimmung innerhalb der Lebenswissenschaften angemessen Rechnung zu tragen, wurde eine gründliche Überholung der EMBL-Strahlführung X33 beschlossen, die seit mehr als 15 Jahren erfolgreich für Messungen an nicht-kristallinen Proben verwendet wurde. Wichtige Teile der Röntgenoptik (Monochromator, Spiegel) und die rechnergesteuerte Kontrolle und Überwachung aller Komponenten der Strahlführung werden vollständig erneuert. Die Probenumgebung wird neu gestaltet und Detektor und Datenerfassungssystem werden erneuert. In einem ersten Schritt wurde in der Sommerpause 2004 der horizontal fokussierende Si(111) Monochromator durch eine verbesserte Variante ersetzt, dessen Prinzip sich bereits an den Strahlführungen für die Proteinkristallographie bewährt hatte. Der Monochromator, als erstes optisches Element der Strahlführung, muss die gesamte thermische Last der weißen Synchrotronstrahlung aufnehmen, ohne dass dies zu einer wesentlichen Verschlechterung der Strahlcharakteristik führt. Das neue Konzept wird im Folgenden kurz erläutert. Die weiße Synchrotronstrahlung trifft auf einen Si-Kristall in Form eines gleichschenkligen Dreiecks der an der Basis fixiert ist. Da die reflektierenden (111)-Netzebenen einen Winkel von 8.5° mit der Kristalloberfläche bilden (asymmetrische Reflexion), wird der horizontale Querschnitt des reflektierten Strahls der Wellenlänge 1.5 \AA um das 4-fache reduziert. Eine weitere Fokussierung erreicht man durch Biegen des Monochromators, indem die Spitze des Si-Dreiecks horizontal verschoben wird. Hierzu wurde ein hochgenaues Aktuatorsystem mit Picomotor entwickelt. Die Feinregulierung des Braggwinkels erfolgt mittels eines Piezoantriebs, so dass eine exakte horizontale Positionierung des Röntgenstrahls möglich ist. Die wichtigste Verbesserung ge-

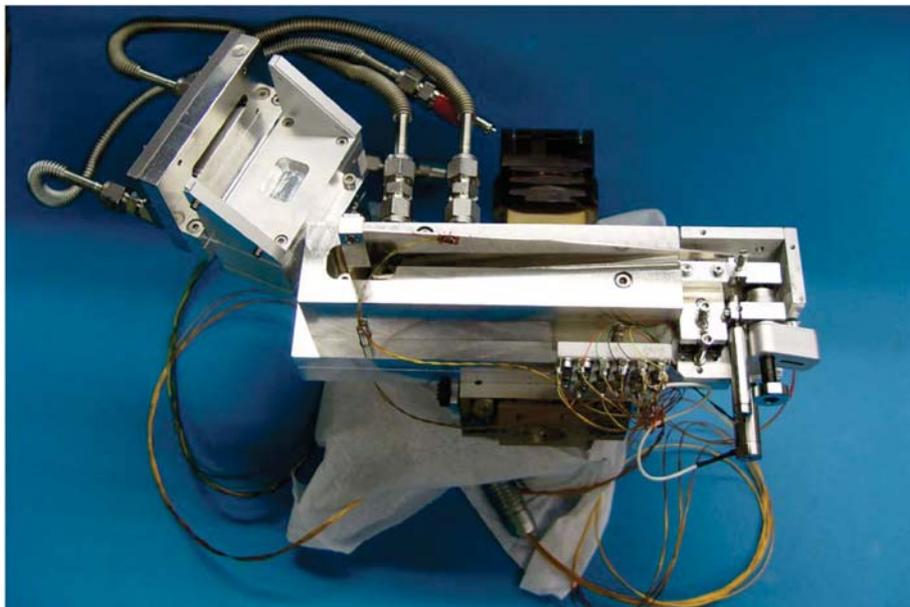


Abbildung 87: *Monochromatoraufbau der EMBL-Strahlführung X33. Die weiße Synchrotronstrahlung fällt von links durch einen wassergekühlten Spalt mit integriertem Intensitätsmonitor auf den dreieckigen Si-Kristall. Der Kristall ist in einem wassergekühlten Edelstahlbehälter montiert, der mit flüssigem Metall-Eutektikum gefüllt wird (Galinstan). Rechts im Bild sind die Feineinstellungen für die Biegung und den Braggwinkel zu sehen.*

genüber der Vorgängerversion liegt in der entscheidend verbesserten Kühlung des Monochromators mittels eines flüssigen Eutektikums (Galinstan), in das die untere Hälfte des Si-Kristalls taucht. Das Eutektikum befindet sich in einem Behälter aus Edelstahl, der von Kühlwasser durchflossen wird. Dadurch ließen sich Stahlbewegungen, die das Arbeiten früher sehr erschwerten, vollständig eliminieren. Abb. 87 zeigt den verbesserten Monochromatoraufbau. Es zeigte sich, dass durch die oben geschilderten Verbesserungen ein deutlich erhöhter Photonenfluss für Kleinwinkel Streuexperimente zur Verfügung steht, bei gleichzeitig signifikant verbesserter Langzeitstabilität. Für die Sommerpause 2005 ist der Einbau eines neuen Röntgenspiegels geplant.

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) am EMBL Hamburg

Die Hauptaktivitäten der Kleinwinkelstreuerguppe um Dmitri Svergun konzentrierten sich im Jahr 2004 auf die

Bereitstellung von Strahlzeit für SAXS an biologischen Materialien und die Betreuung von internationalen Nutzergruppen. Dazu wurden neue Methoden für die Datenauswertung und Interpretation entwickelt, sowie die Experimentieranlage X33 am Strahl D1 von DORIS III weiter ausgebaut. Die Anzahl der Nutzergruppen steigt seit fünf Jahren kontinuierlich um 20% per Jahr an. Um diese vornehmlich biologisch orientierten Fragestellungen zu bearbeiten, werden fast alle Projekte in enger Zusammenarbeit mit den Nutzergruppen ausgeführt. Dies beinhaltet in vielen Fällen die Probenvorbereitung in den EMBL Biochemielabors, die gemeinsame Datenaufnahme am Experiment sowie die Erarbeitung fertiger Strukturmodelle und deren Interpretation. Um mit der weiteren Verfeinerung der computergestützten Modellierungssoftware Schritt zu halten, wurden im Laufe des Jahres 2004 weitreichende Umbauten an der Strahlanlage durchgeführt. So wurde z. B. um eine stabilere Strahlage zu erreichen ein neuer Monochromator mit verbesserter Kühlung eingebaut. Desweiteren dient nun ein zweidimensionaler Flächendetektor (MAR345 Imageplate) als Standard SAXS Detektor.

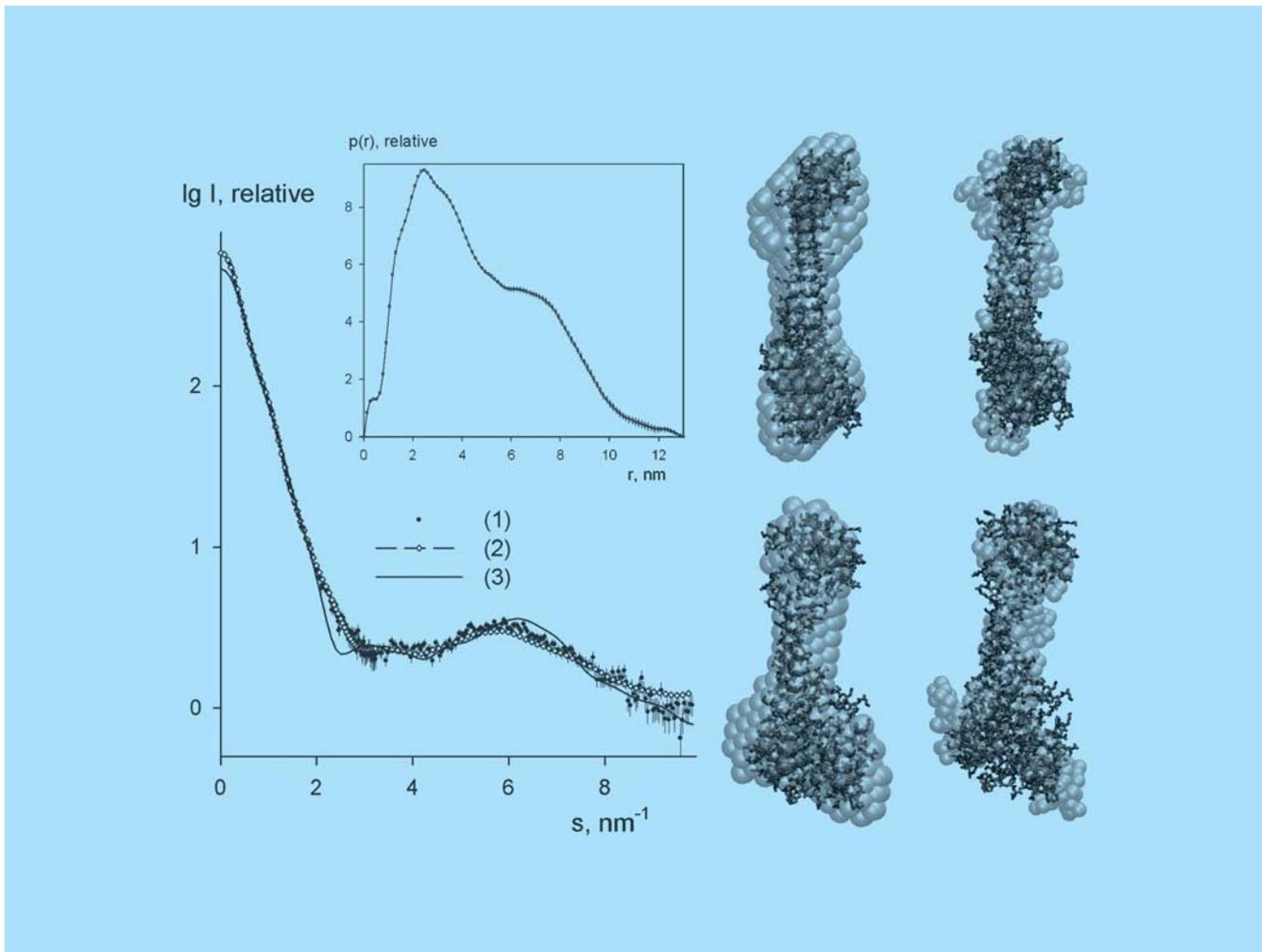


Abbildung 88: Experimentelle SAXS Daten der Vma5p Untereinheit aus Hefe und die daraus abgeleiteten *ab initio* Modelle. A) DAMMIN Dummy Atom Model und B) GASBOR Dummy Residue Model in Vergleich mit später veröffentlichte Kristallstruktur.

Untersuchung der Struktur und Funktion einer Untereinheit der Vma5p ATPase aus Hefe

Die Aufgabe der Proteine aus der Familie der membran-gebundenen V-ATPasen, die in allen eukaryotischen Zelle zu finden sind, ist es, Ionen durch die Zellmembran zu pumpen. Die Struktur und Funktion einer Untereinheit der Vma5p ATPase aus Hefe wurde in Zusammenarbeit mit G. Grüber (Universität des Saarlandes)

untersucht. Die stiehlförmige Vma5p Untereinheit des Hefeproteins V1 wurde in seiner wasserlöslichen Form in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Funktionalität der Vma5p Untereinheit wurde durch biochemische Voruntersuchungen, wie Fluoreszenzspektroskopie und Zirkulardichromismus belegt. Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung war es möglich, die Struktur *ab initio* (also ohne vorab Informationen der Struktur zu verwenden) bei niedriger Auflösung zu berechnen (Armbrüster et al., FEBS Lett. **570** (2004) 119–125.) Die aus den Streudaten abgeleiteten Strukturen der

Vma5p Untereinheit zeigen eine stiefel-ähnliche Form, die sich aber deutlich in zwei unterschiedliche Domänen einteilen lässt. Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere unabhängige *ab initio* Modellierung bestätigt. Im Abb. 88 sind die beiden durch unterschiedliche Methoden gewonnenen SAXS Modelle dargestellt. Für beide Fälle wurden diese Modelle mit einer Proteinstruktur mit atomarer Auflösung verglichen, die nach der Veröffentlichung der SAXS Modelle im Laufe des Jahres 2004 von einer anderen Gruppe vorgestellt wurde (Drory et al., EMBO Rep. **5** (2004) 1148-1152). Dieser Vergleich zeigt, dass die aus den SAXS Daten gewonnenen Strukturen eine sehr gute Vorhersage der räumlichen Anordnung und der Form des Proteins zulassen.

ARP/wARP beschleunigt die Proteinkristallographie für ihren Einsatz in Hochleistungsanwendungen

Nachdem das röntgenkristallographische Experiment durchgeführt und das Phasenproblem gelöst worden ist, muss als nächstes ein aus chemischer Sicht plausibles Modell des Makromoleküls erstellt werden. Für Projekte aus der Strukturgenomik und anderer Hochleistungsanwendungen aus dem Bereich der Strukturbestimmung muss der normalerweise zeit- und arbeitsaufwendige Schritt des Modellbauens schnell, zuverlässig und hoch automatisiert sein. Die ARP/wARP Software, die in Zusammenarbeit mit einer Forschergruppe des NKI in Amsterdam entwickelt wird (Perrakis et al., Nature Struct. Biol. **6** (1999) 458-463), geht dieses Problem erfolgreich an und ist in der Lage, automatisch ein im Wesentlichen vollständiges Modell zu produzieren. Im Juli 2004 wurde die Version 6.1 der Software, die einige Neuerungen beinhaltet, der wissenschaftlichen Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt. Selbst bei einer Auflösung von nur 2.6 Å können nun bereits genaue Proteinmodelle erzeugt werden. Bei noch niedrigerer Auflösung können α -helikale Fragmente des Proteins modelliert werden. Sehr rechenaufwendige Aufgaben können nun im Fernbetrieb auf einer im EMBL-Hamburg speziell dafür aufgebauten Multiprozessoreinheit ausgeführt werden. Doch nicht nur der Proteinanteil einer Kristallstruktur, sondern auch gebundene Ligandenmoleküle können mit der neuen Version von ARP/wARP automatisch modelliert wer-

den (Zwart et al., Acta Cryst. **D60** (2004) 2230-2239). Das Problem der Modellierung von Liganden ist von besonderem Interesse sowohl von einem theoretischen wie auch praktischen Standpunkt. Das praktische Interesse leitet sich größtenteils vom Bestreben ab, die Automatisierung in der Medikamentenentwicklung voranzutreiben, und auch dazu, die Kristallographie hier als selektiv richtungsweisend bei der optimierten Informationsgewinnung in der Forschung einzusetzen. Die Handhabung der chemischen Information eines Liganden stellt eine besondere Herausforderung bei der Interpretation von Elektronendichten dar, die weniger als atomare Auflösung und obendrein Phasenfehler besitzen. Mit ARP/wARP können Liganden von mittlerer Größe in etwa 10 Minuten modelliert werden (Abb. 89), während die Modellierung eines 44-atomigen NAD Moleküls ca. eine Stunde dauert. Zukünftige Implementierungen der Algorithmen werden auf noch mehr Effizienz getrimmt sein. Ein wichtiger Teil der weiteren Entwicklung ist die Modellierung teilweise ungeordneter Liganden.

Strukturelle Studien an Enzymen aus der Leuzin- und Lysin-Biosynthese von *Mycobacterium tuberculosis*

Sowohl Lysin wie auch Leuzin zählen zu den essentiellen Aminosäuren in Säugern. Da Bakterien diese Aminosäuren synthetisieren müssen, stellen die Enzyme der entsprechenden Biosynthesewege interessante Targets für neue Antibiotika dar. In Säugern gibt es diese Enzyme nicht, daher sollte die Inhibition der bakteriellen Enzyme weitestgehend ohne Nebenwirkungen ablaufen. In unseren Forschungen haben wir uns auf insgesamt 13 Enzyme aus *Mycobacterium tuberculosis* konzentriert, 4 davon stammen aus der Leuzinbiosynthese, und die anderen 9 aus der Lysinbiosynthese. Im letzten Jahr gelang es uns, die Strukturen von insgesamt 4 Enzymen aufzuklären, die der Isopropylmalatdehydrogenase (IPMDH) aus der Leuzinbiosynthese (Singh et al., J. Mol. Biol. **346** (2005) 1-11), und die Strukturen von Dihydrodipicolinatsynthase (DHDPS), Dihydrodipicolinatreduktase (DHDPR) und die von Diaminopimelatdecarboxylase (DAPDC) aus der Lysinbiosynthese. Insbesondere die Struktur der IPMDH (Abb. 86) stellt dabei einen wichtigen Meilenstein dar, weil es uns in diesem Fall gelang, in Zusammenar-

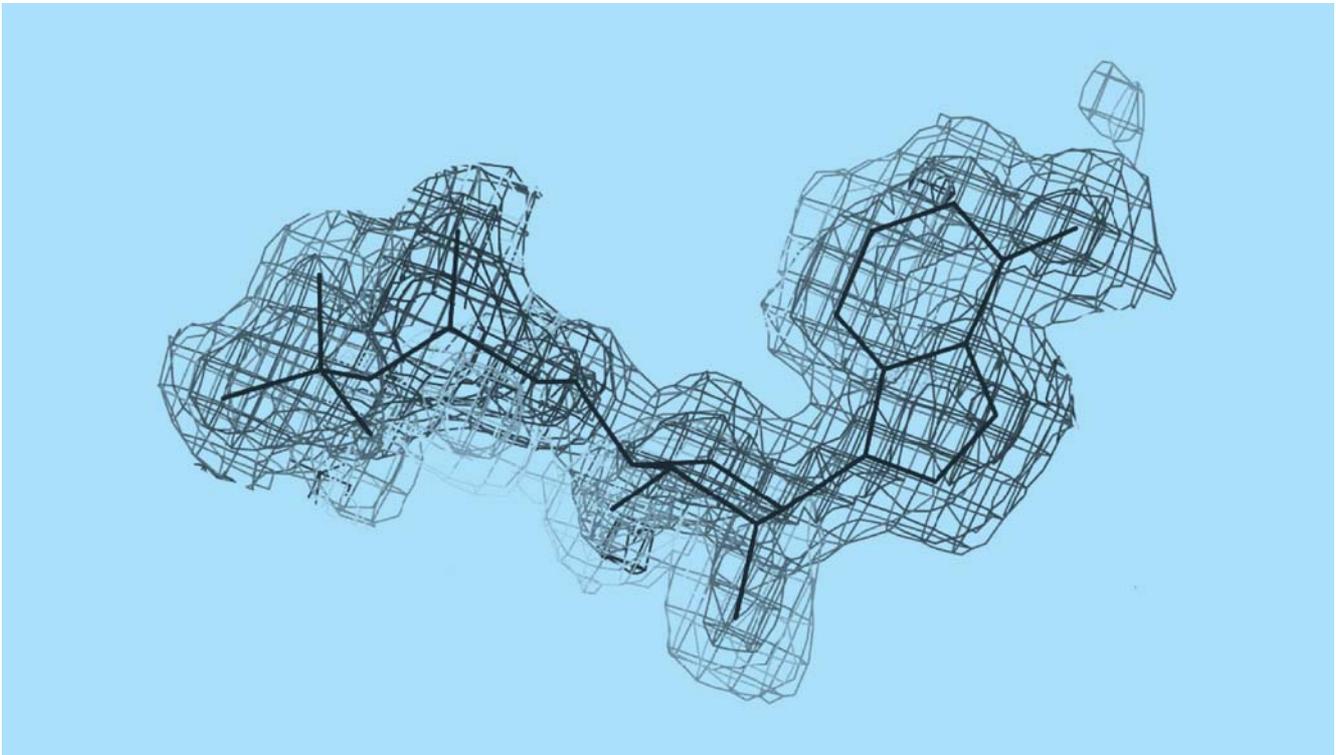


Abbildung 89: *Automatisch von ARP/wARP modelliertes ADP.*

beit mit Dr. Jens-Peter von Kries vom FMP Berlin in einem Screening-Experiment vielversprechende Substanzen zu identifizieren, die möglicherweise dazu geeignet sind, als Leitverbindungen für neue antimykobakteriellen Medikamente weiterentwickelt zu werden.

Aufbau einer Hochdurchsatz-Kristallisations-Anlage

Grundvoraussetzung jedes erfolgreichen Biokristallographieprojekts ist die Überführung hochreiner Lösungen von Biomakromolekülen in den kristallinen Zustand. Aufgrund ihrer hohen chemischen und strukturellen Variabilität ist es bisher nicht möglich, die exakten Bedingungen dafür vorherzusagen. In einem „trial-and-error“ Verfahren werden deshalb die wichtigsten Kristallisationsparameter, wie Temperatur, pH-

Wert und chemische Komposition der Kristallisationslösung in bis zu 1000 unterschiedlichen Experimenten durchgetestet. Zur strukturellen Stabilisierung des oft sehr flexiblen Biomakromoleküls werden gleichzeitig verschiedene Liganden eingesetzt, wodurch sich die Anzahl möglicher Experimente weiter erhöht. Um Materialverbrauch (die Herstellung hochreiner Biomakromoleküllösungen ist teuer und arbeitsintensiv) und Zeitaufwand zu minimieren, wurden im Lauf der letzten Jahre Verfahren zur Miniaturisierung und zur Automatisierung dieses Prozesses entwickelt. Das EMBL hat eine solche Anlage in dafür vom DESY neu angemieteten und umgebauten Laborräumen in Gebäude 3 aufgebaut. Die Anlage besteht aus 2 hochautomatisierten Einheiten. Mit Hilfe dieser Anlage können sämtliche Kristallisationslösungen, ausgehend von wenigen Stammlösungen hergestellt werden. Anschließend werden diese in speziellen Mikrotiterplatten mit Proteinlösung zum eigentlichen Kristallisationsexperiment versetzt. Dabei kann das Volumen pro Experiment auf

wenige hundert Nanoliter begrenzt werden. Die zahlreichen Experimente werden dann von computerkontrollierten und hochauflösenden Kameras in regelmäßigen Abständen dokumentiert und den Wissenschaftlern, zusammen mit anderen wichtigen Daten, per Internet zur Verfügung gestellt.

Etablierung des Zusammenhangs zwischen Phosphorylierungskaskade in bakteriellen Zweikomponentensystemen und der Antitermination bei der Transkription.

Ein typisches Zweikomponentensystem besteht aus einer Histidinkinase (HK) und einem Responsregulator (RR). Die HK wird üblicherweise durch ein externes Signal aktiviert. Dies führt zur Autophosphorylierung eines Histidinrestes durch ein γ -Phosphat von ATP. Der zugehörige RR katalysiert dann den Transfer des Phosphats auf ein konserviertes Aspartat in seiner sogenannten Receiver-Domäne. Die darauf folgende Konformationsänderung führt zu einer Verstärkung der Bindung von RR an DNS. RR kann dabei als Aktivator oder auch als Repressor für die Transkription wirken. In Rahmen unserer strukturellen Arbeiten an Rv1626 (Morth et al., *Structure* **12** (2004) 1595-605), einem offenen Leseraster im Genom von *Mycobacterium tuberculosis*, konnten wir zeigen, dass der Phosphoryltransfer auch die Termination der Transkription regulieren kann. Um diese Hypothese zu untermauern, identifizierten wir die zu Rv1626 gehörige HK und zeigten, dass der Phosphoryltransfer in der Tat spezifisch statt findet. Dieses Proteinpaar gehört damit zu den 5 Zweikomponentensystemen, die in allen mykobakteriellen Spezies konserviert sind. Obwohl die Funktion dieses Paares bis jetzt noch nicht bekannt ist, ist es aufgrund der Konservierung sehr wahrscheinlich, dass es für Mykobakterien eine wichtige, regulative Rolle spielt.

Die Verankerung des größten menschlichen Proteins Titin in der Muskelzelle

Die Z-Scheibe in menschlichen Muskelzellen verbindet benachbarte Zelleinheiten, die sogenannten Sarkomere. Sie bietet eine Basis, die größten bekannten Filamentsysteme aus Muskelzellen durch ein weitreichendes Netzwerk von Interaktionen verschiedener Proteine zu verankern. Letztes Jahr haben wir herausgefunden, wie das größte dieser Filamentsysteme, Titin mit ca. 38000 Aminosäuren, durch einen Komplex mit dem Z-Scheibenprotein Telethonin assembliert und in der Z-Scheibe verankert ist. Entgegen früheren Erwartungen bildet es einen antiparallelen (2:1) Sandwich-Komplex. Die überraschende pseudo-symmetrische Struktur von Telethonin ermöglicht ein palindromisches, d. h. symmetrisches, Arrangement von zwei Titinmolekülen in diesem Komplex. Eine derartige Architektur ist noch niemals zuvor in einem Protein-Protein-Komplex gefunden wurden. Um sicher zu stellen, dass die gefundene Struktur im Kristall einen Komplex unter physiologischen Bedingungen darstellt, haben wir unsere Ergebnisse mit komplementären Imagingtechniken bestätigt. Sowohl ein *in vivo* Fluoreszenz-Komplementierungsassay als auch eine sogenannte FRET (Förster Resonanz Energie Transfer)-Analyse bestätigten unsere kristallographischen Ergebnisse. Damit ist uns nach der Strukturbestimmung der Proteinkinase von Titin (Mayans et al., *Nature* **395** (1998) 863–869) ein weiterer wichtiger Schritt in die Gesamtstrukturbestimmung dieses riesigen Proteins gelungen. Die kristallographischen Daten wurden an Synchrotron-Messstationen unserer Kollegen der Max-Planck-Gesellschaft und von EMBL aufgenommen. Eine niedrig aufgelöste Analyse dieses Komplexes mit Hilfe von Kleinwinkelstreuung wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. M. Koch bereits publiziert (Zou et al., *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 2636–2644).

