

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie EMBL –Außenstation Hamburg–

Leitung: M. Wilmanns, V. Lamzin

Gruppenleiter: C. Hermes, M. Koch, W. Meyer-Klaucke, D. Svergun, P. Tucker

Im Januar 2001 begann das neue 5-Jahresprogramm des Europäischen Molekularbiologielabors (EMBL). Mit zusätzlichen Mitteln aus diesem Programm ist es nun möglich, eine dringend notwendige Gebäudeerweiterung der EMBL-Hamburg Außenstation im Jahr 2002 durchzuführen, und die Ausrüstung der Mess-Stationen am Fächer K zu verbessern. Mit dem Umbau der Mess-Station X12 für MAD-Experimente im Bereich der Biokristallographie wurde begonnen.

Verbunden mit dem neuen Forschungsprogramm hat EMBL entschieden, sich zukünftig auf die neuartigen Möglichkeiten zu konzentrieren, die sich aufgrund der gewonnenen Genomikdaten und der dadurch entstandenen Technologien im Bereich der Genomik und Proteomik ergeben haben.

Mit zwei erfolgreichen institutionellen Drittmittelprojekten aus dem Jahr 2001 wird von EMBL Hamburg angestrebt, eine führende Rolle in Deutschland als Koordinator des Hamburger TB-Strukturgenomikprojektes und in Europa als Partner im EU-geförderten SPINE-Projekt einzunehmen. Als zentrales Element ist der Aufbau einer automatisierten Kristallisationseinheit im Hochdurchsatz geplant. Nachdem im Oktober 2001 von DESY entschieden wurde, den PETRA-Ring für zukünftige State-of-the-Art Synchrotron-Mess-Stationen zur Verfügung zu stellen, haben bei EMBL Planungen für eigene Mess-Stationen begonnen. Diese Planungen werden auch im kommenden Jahr im Mittelpunkt der Aktivitäten stehen.

Wir danken DESY und HASYLAB für die Bereitstellung der Infrastruktur und Synchrotronstrahlung im Jahre 2001.

Im weiteren Teil des Berichtes sind die wissenschaftlichen Aktivitäten der Forschungsgruppen aus den Bereichen Instrumentierung, Kleinwinkelstreuung, Rönt-

gensabsorptionsspektroskopie und Biokristallographie, zusammengefasst.

Weitere Projekte in Zusammenarbeit mit auswärtigen Gruppen und Einzelheiten sind im EMBL Jahresbericht dargestellt:

(www.embl-hamburg.de/annual_report_2001.html).

Instrumentierung der Synchrotron-Mess-Stationen

Wie im Bericht des Vorjahres erwähnt, sollten die drei Strahlführungen der Proteinkristallographie am Fächer K von DORIS komplett neu gestaltet werden. Im neuen Aufbau sind die Strahlführungen X11 und X13, die bei konstanter Wellenlänge von etwa 0.8 Å arbeiten, vollständig symmetrisch zur zentralen Strahlführung X12 angeordnet. Die Strahlführung X12 soll zur Durchführung von MAD-Experimenten komplett neu aufgebaut werden und Messungen in einem weiten Wellenlängenbereich ermöglichen. Der Umbau des Fächers wurde Ende 2000 begonnen und in mehreren Stufen im Jahr 2001 weitergeführt.

Die veränderte Geometrie der Strahlführungen erforderte weitreichende Umbaumaßnahmen von Optik- und Experimentierhütten, Strahlenschutzeinrichtungen sowie der gesamten Versorgungsinfrastruktur. Im Frühjahr 2001 konnte mit dem Wieder- bzw. Neuaufbau der Strahlführungen begonnen werden, nachdem vorher der gesamte Bereich des Fächers K geräumt, Komponenten abgebaut und zur Wiederverwendung eingelagert worden waren.

Wegen der veränderten Geometrie mussten die Vakuumgefäße der drei Strahlführungen modifiziert oder neu konstruiert und angefertigt werden, während die optischen Komponenten in diesen Behältern, wie Monochromatoren, Röntgenspiegel, Blendensysteme sowie

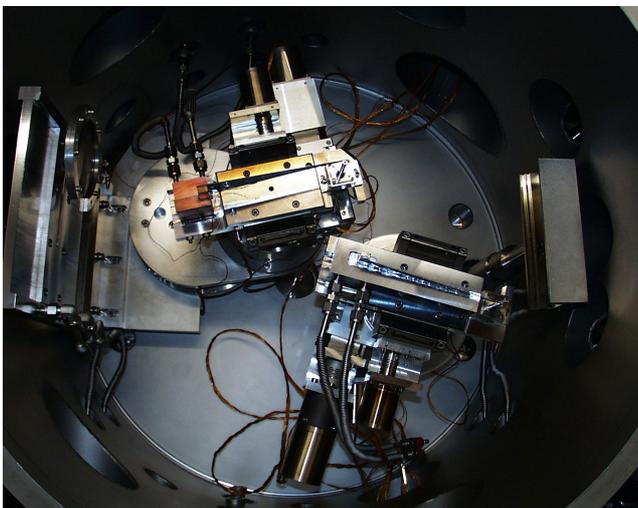


Abbildung 75: Blick von oben in das gemeinsame Vakuumgefäß der Monochromatoren von X13 (oben) und X11 (unten). Die von links kommende weiße Strahlung wird durch wassergekühlte Wolframblen- den eingegrenzt, bevor sie auf die dreieckigen Si-Monochromatoren trifft. Der zentrale Teil des Strahlungs-fächers für die zukünftige Strahlführung X12 wird zur Zeit durch einen beweglichen Wolframblock ausge- blendet.

deren gesamte Justiermechanik, vollständig neu entwickelt wurden. Dabei waren Vakuumkompatibilität, Strahlungsbeständigkeit sowie verbesserte Funktionalität und Zuverlässigkeit maßgebende Kriterien bei der Neukonstruktion. So konnte zum Beispiel durch eine weitaus effizientere Kühlung der fokussierenden Si-Monochromatoren sowohl die zeitliche Stabilität der Strahlung als auch deren Intensität an der Probe gesteigert werden. Mitentscheidend für diesen signifikanten Intensitätsgewinn um einen Faktor drei gegenüber der alten Anordnung war außerdem der Einsatz von kontinuierlichen, Rh-beschichteten Röntgenspiegeln, die eine verbesserte Fokussierung der Strahlung ermöglichen, anstelle der bisher verwendeten segmentierten Quarzspiegel. Abbildung 75 zeigt die Anordnung der Monochromator-Kristalle in ihrem gemeinsamen Vakuumgefäß, während Abbildung 76 das Kühlschema des X11 Monochromators verdeutlicht.

Mitte des Jahres 2001 standen die entscheidend verbesserten Messplätze X11 und X13 wieder für regulären Messbetrieb zur Verfügung. Die Konstruktion der

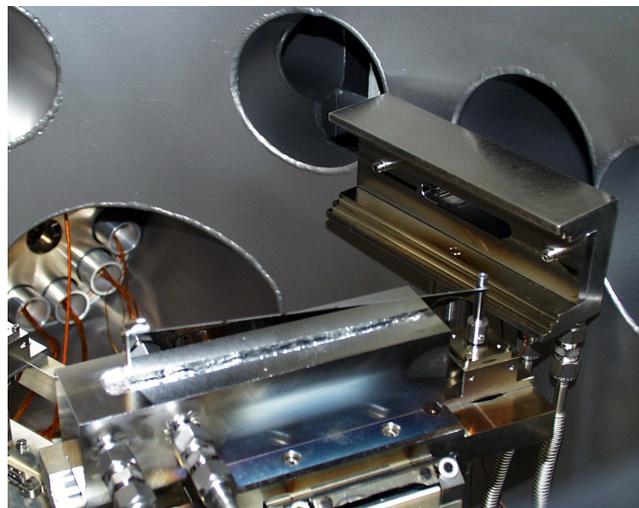


Abbildung 76: Der X11 Monochromator: Der dreieckige Si-Kristall taucht in die flüssige Metall-Legierung (Galinstan) in einem wassergekühlten Edelstahlgefäß. Der vertikale Stift an der Spitze des Dreiecks dient zur Fokussierung. Ganz rechts ist der bewegliche Strahlfänger sichtbar.

zukünftigen MAD Strahlführung X12 ist abgeschlossen und wesentliche Komponenten liegen zum Einbau bereit. Erste Tests des fokussierenden Doppelmonochromatorsystems sind für die zweite Hälfte 2002 geplant.

Nichtkristalline Systeme

Im Laufe des Jahres wurden etwa 25 Projekte, die Synchrotronstrahlung anwenden, in Zusammenarbeit mit auswärtigen Gruppen durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Aspekte der Struktur oder Strukturänderungen von biologischen Makromolekülen, Lipiden, synthetischen Polymeren oder kolloidalen Systemen, die zum Beispiel als Arzneimittelträger entwickelt werden, studiert.

Die Ergebnisse dieser Projekte sind im HASYLAB Jahresbericht, im EMBL Forschungsbericht und in den 23 Publikationen der Gruppe, die im Jahre 2001 in internationalen Fachzeitschriften erschienen sind, beschrieben.

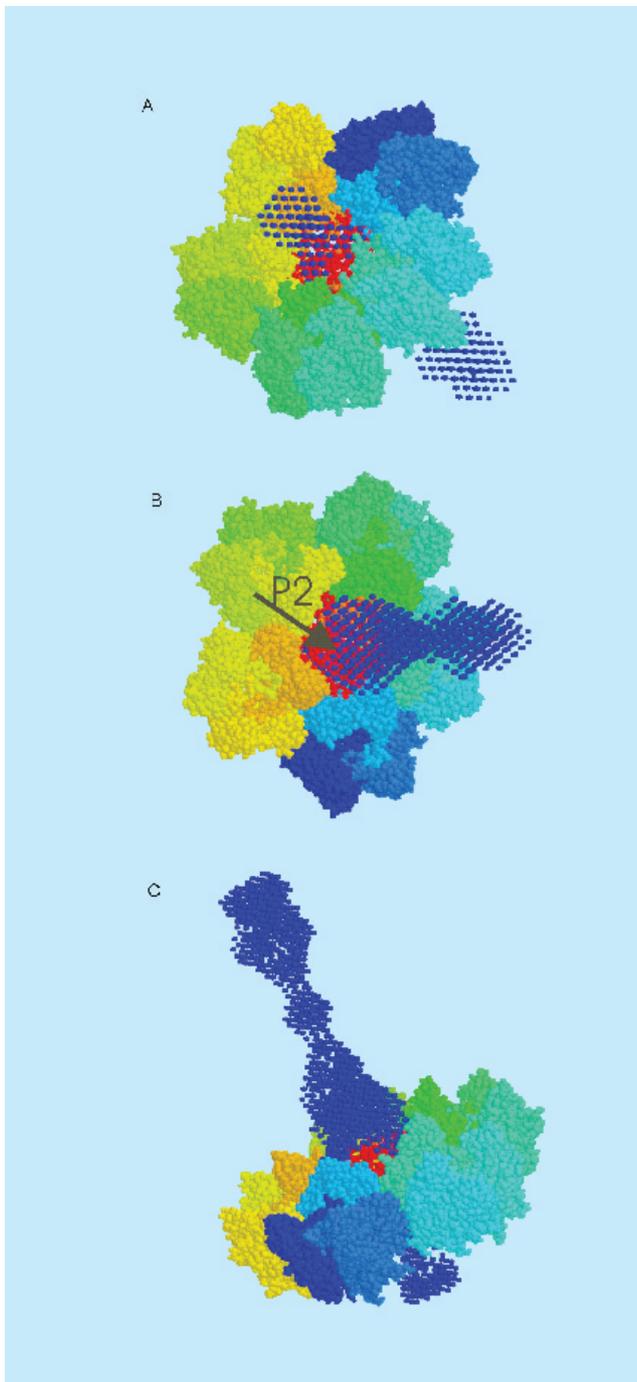


Abbildung 77: Struktur der Spitzen an der Oberfläche des PRD1 Bacteriophags: (A) Sicht aus dem Inneren des Virions, (B) Obenansicht: der Pfeil zeigt die mögliche Bindungsstelle des Proteins P2. In der Seitenansicht (C) sind die individuellen Untereinheiten einer Schicht P3-trimere in unmittelbarer Nähe der Spitze in verschiedenen Farben dargestellt.

In diesem Rahmen fanden Entwicklungen eines Datenerfassungssystems auf der Grundlage der Zeit-Raum-Zeit Umwandlung statt, das 2001 für eine Reihe von Projekten eingesetzt wurde. Der Erfolg eines solchen Instrumentierungsprojekts kann am besten daran gemessen werden, dass es von seinen Nutzern weitgehend unbemerkt bleibt.

Ein Schwerpunkt der Forschung war auch in diesem Jahr die Entwicklung von Daten-Interpretationsmethoden für Lösungsstreuung von biologischen Makromolekülen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Kristallographie in Moskau.

Das Modell der Spitzen an der Oberfläche des Bacteriophags PRD1 in Abbildung 77 zeigt, wie durch Anwendung dieser Methoden die Röntgenkleinwinkelstreuung an Lösungen für Biochemiker nützliche Information über die Wechselwirkung von Proteinen geben kann.

In verschiedenen Projekten wurden Strukturänderungen oder Phasenübergänge, die zum Beispiel bei thermischen Behandlungen stattfinden, als Gleichgewichtsstrukturen studiert. Hierbei wurde meistens versucht, diese Änderungen in zeitaufgelösten Messungen zu verfolgen und die Ergebnisse mit denen von anderen Methoden, wie Infrarotspektroskopie, Kalorimetrie oder Kleinwinkellichtstreuung, zu korrelieren. Diese Methoden sind besonders bei der Entwicklung von Nahrungsmitteln wie Stärke, synthetischen Polymeren und ihren Legierungen oder Arzneimittelträgern wichtig.

Die Grundsätze des EMBL sehen neben der Forschung auch Ausbildung- und Lehrtätigkeiten auf höherer Ebene vor. In diesem Rahmen wurde im September zusammen mit der GKSS (Geesthacht) ein erfolgreiches EMBO Praktikum über Lösungsstreuung an biologischen Makromolekülen organisiert. Neben einführenden Vorlesungen über Röntgen- und Neutronenstreuung, mathematische Methoden, Instrumentierung, Datenerfassung und Modellierung hatten die 40 Teilnehmer auch die Möglichkeit, ihre eigenen Proben zu messen und die Daten auszuwerten.

Röntgenabsorptionsspektroskopie

In vielen Biokatalysatoren (Enzymen) sind Metalle essentieller Bestandteil des aktiven Zentrums. Metalle wie

Zink, Eisen, Kupfer oder Mangan sind dort an der chemischen Umsetzung der jeweiligen Substrate beteiligt. Die Röntgenabsorptionsspektroskopie erlaubt es, diese Metallatome als Sonden zu nutzen. Einzelne Zustände können dabei strukturell charakterisiert werden. Aus dem Wissen über diese Einzelaufnahmen kann dann ein Modell für den Reaktionsmechanismus entwickelt werden.

Des Weiteren kann auch die Bindung von reaktionshemmenden Molekülen (Inhibitoren) analysiert werden. Die Methode erlaubt die strukturelle Analyse dieser Zentren unabhängig vom Probenzustand, das heißt im Gegensatz zur Proteinkristallographie können diese Messungen auch an Lösungen erfolgen.

Die EMBL Außenstation Hamburg betreibt einen Messplatz für Röntgenabsorptionsspektroskopie an Biomolekülen und stellt ihn der internationalen Nutzergemeinde zur Verfügung. Im Jahre 2001 wurde eine Vielzahl von Projekten in Kooperation mit Labors aus Europa und den USA durchgeführt. Im Folgenden wird eines der internen Projekte kurz skizziert, um einen Einblick in die typischen Fragestellungen und Arbeitsweisen zu geben.

Beta-Laktamasen sind eine der Ursachen für bakterielle Resistenzen gegen Antibiotika. Bereits seit mehreren Jahren sind wir an der Entschlüsselung des Reaktionsmechanismus der Metallo-Beta-Laktamasen beteiligt. Zu dieser Proteinfamilie zählen noch weitere Enzyme die über ein ähnliches aktives Zentrum verfügen, zum Beispiel Glyoxalase II, welche auch im Menschen für die Zellentgiftung wichtig ist.

Neben diesen Enzymen wurde ein neues Enzym untersucht, welches im Zusammenhang zu einigen Krebsarten zu stehen scheint. Im EMBL Molekularbiologielabor konnte dieses Enzym weltweit zum ersten Mal isoliert und in den für weitere Untersuchungen notwendigen Mengen hergestellt werden. Hierbei konnte bestätigt werden, dass Zink essentiell für seine Funktion ist. Das Metallbindungsmotiv ähnelt den Beta-Laktamasen. Diese erste strukturelle Einordnung hilft bei der weiteren funktionellen Untersuchung. In Kombination von molekularbiologischer und spektroskopischer Arbeit wird beleuchtet werden, welche Voraussetzungen Inhibitoren erfüllen müssen, um die Reaktivität der bakteriellen Metallo-Beta-Laktamasen zu verringern, ohne die Reaktivität anderer essentieller Enzyme

zu beeinflussen. Auf diesem Weg soll ein Beitrag zum Verständnis dieser Enzymklasse geleistet werden, so dass spezifische Inhibitoren für die medizinische Anwendung entwickelt werden können.

Biokristallographie

Alternative Strategien zur Phasenbestimmung unter der Verwendung von Xenon

Die in der Proteinkristallographie üblichen Methoden zur experimentellen Phasenbestimmung beruhen auf Diffraktionsexperimenten bei einer (SAD) oder mehreren Wellenlängen (MAD) und nutzen das anomale Signal von Selenatomen, die als Selenomethionin mit Hilfe von heterologen Expressionssystemen in Proteine eingebaut wurden. Das Interesse gilt der Erweiterung dieser Möglichkeiten, die Phasen zu bestimmen. Wie bereits vorher gezeigt werden konnte, kann das Edelgas Xenon zur Derivatisierung und damit zur Phasierung herangezogen werden. Dazu wird es entweder als isomorphes Schweratomderivat betrachtet (SIR, MIR), oder man nutzt seine anomale Streuung als Quelle zur Phasenbestimmung aus (SIRAS, MIRAS). Eine ganze Reihe von Geräten wurde entwickelt, um einen Proteinkristall unter hohem Druck einer Xenon-Atmosphäre auszusetzen, danach den Druck wieder abzusenken und den Kristall schnell einzufrieren, um das gebundene Xenon nicht wieder entweichen zu lassen.

Einige dieser Geräte stehen den Nutzern der EMBL Hamburg Mess-Stationen zur Verfügung. Die Derivatisierung mit Xenon wurde bisher ausschließlich unter der Zuhilfenahme von hydrophilen Additiven (beispielsweise Glycerin, Sucrose, Ethylenglykol) durchgeführt, um die Keimbildung von hexagonalem oder kubischem Eis zu verhindern, wenn der Kristall schnell auf -180°C abgekühlt wird. Allerdings werden die Schwierigkeiten, ein geeignetes Gefrierschutzmittel zu finden, in dem der Kristall über einige Minuten stabil bleibt, oftmals nicht publiziert.

Es ist daher wichtig, eine möglichst breite Palette an Möglichkeiten für die Xenon- (oder Krypton-) Derivatisierung zu haben. Zum einen ist Xenon in hydro-

phoben Lösungsmitteln besser löslich als in Wasser, und zum anderen kann die an dem Kristall haftende Mutterlauge auch durch ein Ziehen des Kristalls durch Paraffinöl entfernt werden (eine alte Technik, die in letzter Zeit für die Proteinkristallographie wiederentdeckt wurde). Kombiniert man diese beiden Befunde, so lässt sich die Xenon-Derivatisierung mit der gleichen, wenn nicht einer besseren Ausbeute durchführen. Dazu wurden Kristalle von Elastase aus dem Schweinepankreas (PPE, Molekulargewicht etwa 22 000 Da) mittels trockenem Paraffinöl bzw. Panjelly™ kryogeschützt, und dann vor dem schnellen Abkühlen einer Xenon-Atmosphäre ausgesetzt.

Strukturelle Grundlagen in der Regulation von Transkriptionsfaktoren

Das menschliche Genom enthält hunderte von Transkriptionsfaktoren, die das Ausmaß der Bereitstellung praktisch aller Akteure von biologischen Prozessen, den so genannten Proteinen, regulieren. Sie üben diese Regulation aus, indem sie die Transkription der jeweiligen DNA-Gene in ihre Produkte, die Proteine, durch Bindung an spezifische Regionen der Targetgene steuern. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren aber nicht nur diesen Übersetzungsprozess, sondern sind selbst auf mehrfachen Ebenen Steuerungen unterworfen, die zum Beispiel durch die Bindung von zusätzlichen Aktivator, Repressoren und anderen spezifischen Rezeptoren erfolgen. Damit wird deutlich, wie wichtig die exakt portionierte Bereitstellung von Proteinen zu bestimmten Zeiten und in bestimmten Zellen ist, um zum Beispiel Zellwachstum und -differenzierung zu steuern. Sobald, in vielen Fällen nur geringfügig, diese Steuerungsmechanismen nicht mehr exakt ausbalanciert sind, geraten diese biologischen Prozesse schnell außer Kontrolle und können dann zum Beispiel zu vielfältigen Tumoren führen.

Unsere Gruppe beschäftigt sich mit strukturbiologischen Fragestellungen von zwei prototypischen Mitgliedern, Oct-1 und Oct-2, einer dieser Transkriptionsfaktorfamilien, der so genannten POU-Familie. Diese Faktoren regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie zum Beispiel im Bereich des so genannten House-Keeping (Oct-1), der Programmierung von em-

bryonalen Stammzellen (Oct-4) bis hin zur Entwicklung und Adaption von Immunantworten (Oct-1, Oct-2). Die geringe Zahl von Transkriptionsfaktoren aus dieser Familie (15 im menschlichen Genom) erfordert daher komplizierte und divergente Kontrollmechanismen wie zum Beispiel post-translationale Modifikationen, Interaktionen mit heterologen Transkriptionsfaktoren und flexible DNA-Bindung. Diese für die Mitglieder der POU-Transkriptionsfaktorfamilie einzigartige Flexibilität beruht auf einer flexiblen Verbindung der beiden kanonischen DNA-Bindungsdomänen, die als POU-Homeodomäne und POU-spezifische Domäne bezeichnet werden. Je nach Mitglied aus dieser Transkriptionsfaktorfamilie variiert die Sequenz und die Länge dieser Verbindungen zwischen 15 und mehr als 50 Aminosäureresten. Da beide DNA-Bindungsdomänen strukturell autonom sind, sind unterschiedliche Anordnungen dieser Domänen in Gegenwart von spezifischen DNA-Motiven möglich.

In B-Zellen, die in der Immunologie eine wichtige Rolle spielen, wird die Aktivität von Oct-1 durch einen Lymphenspezifischen Koaktivator OBF-1 reguliert, in dem er sich zwischen die beiden DNA-bindenden Domänen von Oct-1 einklammert. Auf molekularer Ebene wurde, in Zusammenarbeit mit der Universität Pennsylvania, gezeigt, dass dieser Koaktivator zum Beispiel die Expression des Osteopontin-Gens durch Oct-4 regelt, nicht aber die so genannten VH-Promoter. Diese Ergebnisse erlaubten die Etablierung des Paradigmas für differenzielle Transkriptionsregulation durch unterschiedliche POU-Dimerkonformationen.

Um die strukturelle Basis dieses Phänomens zu bestimmen, wurden zwei Kristallstrukturen der DNA-bindenden Bereiche des Transkriptionsfaktors Oct-1 gelöst, in Gegenwart von zwei unterschiedlichen DNA-Motiven, die PORE und MORE genannt wurden und die die Szenarien von Osteopontin-Expression und VH-Expression vertreten. Die kristallographischen Daten wurden an Mess-Stationen am DORIS-Speicherring aufgenommen. Der direkte Vergleich dieser beiden Strukturen zeigt, dass die gleiche Polypeptidkette von Oct-1 in der Lage ist, zwei völlig unterschiedliche Dimer-Arrangements zu bilden mit jeweils zwei austauschbaren Oberflächenbereichen, die Kontaktflächen im jeweiligen Dimer bilden können (Abb. 78).

Mit Hilfe dieser Daten wurde das Konzept der DNA-abhängigen Transkriptionsfaktor-Dimerisierung einge-

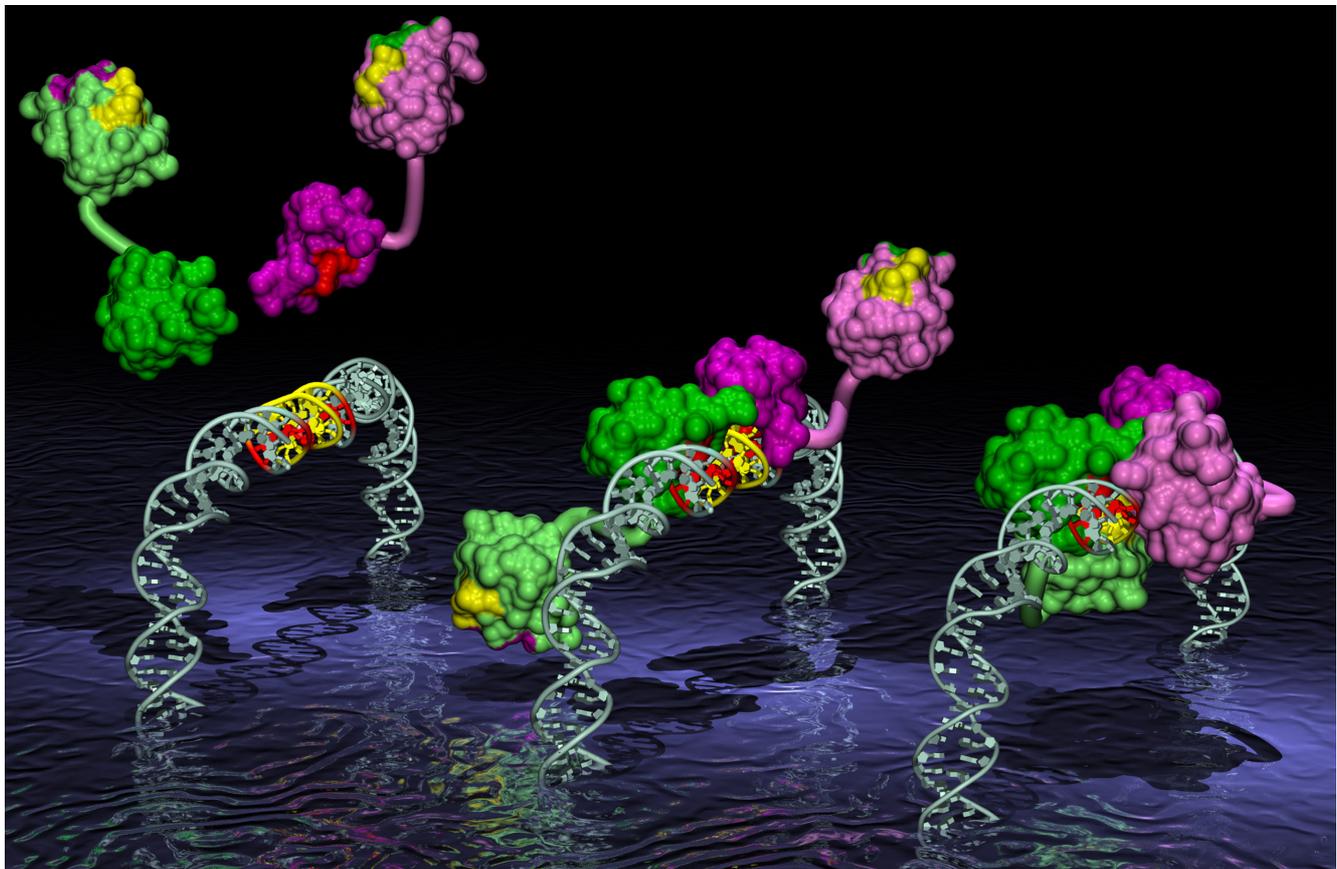


Abbildung 78: Dieses Bild zeigt, basierend auf den Kristallstrukturen von Oct-1/MORE und Oct-1/PORE, wie sich der gleiche Transkriptionsfaktor unterschiedlich mit spezifischen DNA-Motiven assoziieren kann. (Ansgar Phillipsen, Univ. Basel)

führt, die sowohl von der Sequenz der jeweiligen DNA als auch von den Abständen der beiden Bindungsmotive abhängt.

Die ARP/wARP Software Suite zur Automatisierung der Kristallstrukturbestimmung

Seit Beginn der Proteinkristallographie war ein Schwerpunkt in diesem Forschungsgebiet die Verbesserung und Automatisierung der einzelnen Schritte der Strukturlösung. In den meisten Bereichen der modernen Molekularbiologie wächst das Wissen sprunghaft an. Wissenschaftler suchen Antworten auf eine immer größer werdende Anzahl von interessanten und komplexen

biologischen Fragen und bestimmen daher auch eine große Anzahl von Proteinstrukturen. Vor dem Hintergrund der Strukturgenomik-Ära wird es immer wichtiger, schnelle, sichere, objektive und automatische Methoden zur Lösung makromolekularer Strukturen zur Verfügung zu haben.

Wenn das Phasenproblem einmal gelöst ist, sieht sich die Kristallographie einem neuen Problem gegenüber: der Interpretation der Elektronendichte, die sich nicht von selbst erklärt. Die Reduktion einer in 3-D kontinuierlichen Elektronendichteverteilung zu Atomen mit verschiedenen Typen und Bindungen, aus denen das Modell besteht, ist eine sehr umfangreiche Aufgabe. Viel Zeit und großer Aufwand sind oft nötig, um ein erstes Modell aus einer interpretierbaren Elektronendichte zu erstellen und es dann zu verfeinern, bis es bestmög-

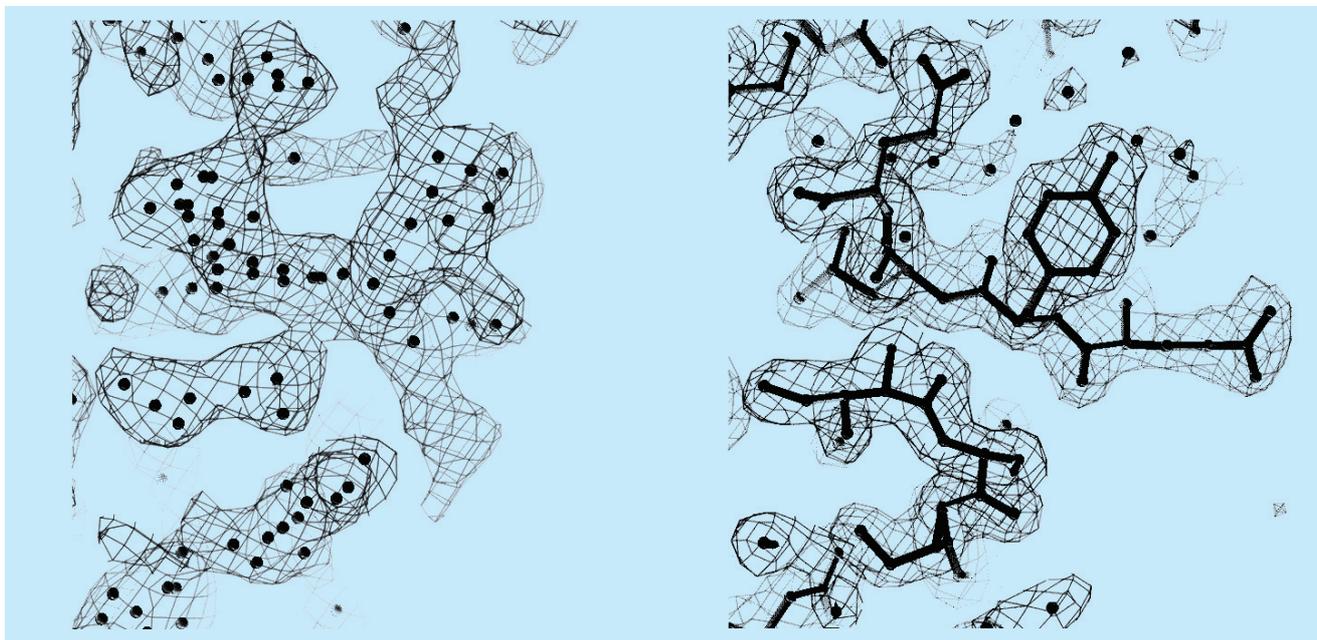


Abbildung 79: Automatische Verfeinerung und Bau der Struktur von Leishmanolysin bei 2.0 Å Auflösung, wobei während weniger CPU-Stunden ein praktisch vollständiges Modell entstand. Links: Region in der Start-Elektronendichte mit freien Atomen. Rechts: Dieselbe Region mit der Elektronendichte nach ARP/wARP und dem automatisch gebauten Modell.

liche Übereinstimmung mit den kristallographischen Daten erreicht.

Trotz jüngster Fortschritte in der Dichteinterpretation und Strukturerkennung in der Proteinkristallographie ist der momentane Stand der Automatisierung eher bescheiden, und es existiert große Abhängigkeit von einem Benutzer, um die wichtigen und relevanten Entscheidungen zu treffen. Die ARP/wARP Software, die beim EMBL Hamburg gemeinschaftlich mit dem NKI Amsterdam entwickelt wurde, bietet Möglichkeiten, die nahe an volle Automation herankommen und es erlauben, ein makromolekulares, atomares Modell praktisch vollständig zu bauen.

Die Methode setzt Daten mit einer Auflösung von 2.3 Å oder besser und geeignete Startphasen voraus. ARP/wARP revolutioniert konventionelle kristallogra-

phische Verfeinerung von Makromolekülen durch die Real-Space Manipulation des Modells, indem es die Eingriffe des Benutzers in silica nachspielt. Die erste Elektronendichte wird zunächst als freie, unverbundene Atome parametrisiert, die praktisch jedes Detail der Map beschreiben. Diese Atome werden dann durch Hinzunahme/Wegnahme einer wiederholten Neugruppierung unterworfen, einer Strukturerkennung von proteinähnlichen Fragmenten und komplettem Wiederaufbau der Proteinkette.

Zum Abschluss werden Seitenketten in optimaler Konformation eingebaut. Diese Prozedur ist an eine Optimierung der Modellparameter gegen die kristallographischen Daten gebunden und konvergiert schließlich zu einem Set von Polypeptidketten mit den übrigen freien Atomen als Lösungsmittelmoleküle. Ein Beispiel ist in Abbildung 79 gezeigt.