

Abbildung 69: *Ligandkomplex-Strukturen der Pex13p-SH3 Domäne mit Hilfe von NMR-Spektroskopie (links) und Röntgenstrukturanalyse (rechts). Links: Oberflächendarstellung der Pex13p-SH3-Domäne mit den Bindungsstellen für Pex5p (oben) und Pex14p (unten). Rechts: Ribbondarstellungen der apo-Pex13p SH3-Domäne (oben) und der Komplexstruktur in Gegenwart eines Pex14p-Peptides in Polyprolin-TypII Konformation (unten).*

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie EMBL –Außenstation Hamburg–

Leitung: M. Wilmanns, V. Lamzin

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

Äußerlich stand das Jahr 2002 im Zeichen des Umbaus und der Erweiterung des EMBL-Gebäudes (25A). Es ist nun weitgehend fertig gestellt und macht auch nach außen die Präsenz des EMBL auf dem Gelände von DESY mit dem bekannten grünen Hexagon deutlich. Die Einweihung fand im Rahmen der Wintersitzung des Rates von EMBL im November 2002 in Hamburg statt.

Wichtigstes und größtes Projekt bei EMBL ist nach wie vor der Umbau und Ausbau von Fächer K am DORIS-Ring. Die beiden abgewinkelten Messstationen X11 und X13 mit fixierter Wellenlänge erfreuen sich inzwischen einer sehr guten Reputation.

Die MAD-Messstation X12 mit veränderbaren Wellenlängen soll noch im Jahr 2003 in den Probebetrieb gehen. Seit Oktober 2002 ist EMBL offiziell ein so genannter Node-Partner des ersten Europäischen Strukturproteomik-Projektes SPINE.

Von großer Bedeutung für EMBL sind die DESY-Pläne, den Speicherring PETRA in eine dedizierte Synchrotronstrahlungsquelle umzuwandeln. Ein Workshop im September 2002 machte deutlich, wie groß das Potential für biologische Anwendungen an zukünftigen Messstationen am Speicherring PETRA sein wird.

Wir danken DESY und HASYLAB für die Bereitstellung der Infrastruktur und Synchrotronstrahlung im Jahre 2002.

Im weiteren Teil des Berichtes sind die wissenschaftlichen Aktivitäten der Forschungsgruppen aus den Bereichen Instrumentierung, Biokristallographie, Kleinwinkelstreuung und Röntgenabsorptionsspektroskopie zusammengefasst.

Instrumentierung der Synchrotron-Messstationen

Die Arbeiten an den Strahlführungen X11 und X13, die im Vorjahr begonnen wurden, konnten in diesem Jahr erfolgreich abgeschlossen werden. Durch die Verbesserung der optischen Komponenten und einen optimierten mechanischen Aufbau erhöhte sich die am Probenort verfügbare Intensität um einen Faktor 3. Damit stehen zwei Strahlführungen für die Proteinkristallographie zur Verfügung, die Messungen mit hoher Intensität bei konstanter Wellenlänge (ungefähr 0.85 Å) an nicht zu kleinen Kristallen erlauben. Die Verbesserungen wurden von der Nutzerschaft durchweg sehr positiv bewertet.

Die Hauptaktivität im Verlauf des Jahres war der Aufbau der Vakuumkomponenten sowie der verschiedenen optischen Systeme wie Blenden, Monochromatoren und Röntgenspiegel der Strahlführung X12. Da diese Strahlführung hauptsächlich zur Messung anomaler Streueffekte (MAD) in der Proteinkristallographie verwendet werden wird, musste sie mit einem Monochromatorsystem ausgestattet werden, das eine schnelle, problemlose Änderung der Wellenlänge ermöglicht. Dies wurde mit einem Doppelmonochromator erreicht, dessen zwei Kristalle wie folgt auf einen hochpräzisen Rotationstisch montiert sind: der erste Kristall ist wassergekühlt und kann sowohl vertikal als auch horizontal bezüglich des stationären zweiten Kristalls bewegt werden. Dadurch ist gewährleistet, dass bei einer Wellenlängenänderung die Position des Strahls unverändert bleibt. Abbildung 70 zeigt den Einbau des mechanischen Systems in die entsprechende Vakuumkammer. Einzelheiten sind im HASYLAB Jahresbericht nachzulesen.

In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Produktionstechnik und Automation (IPA) in Stuttgart wurde ein automatischer Probenwechsler für die Proteinkristallographie entwickelt und an der Strahlfüh-

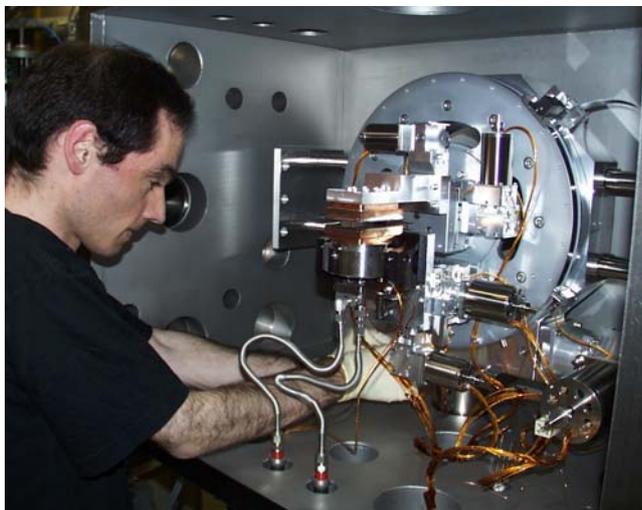


Abbildung 70: Das Doppelmonochromatorsystem wird in den Vakuumbehälter eingebaut.

rung BW7B aufgebaut. Das Problem hierbei bestand darin, den Transfer der Proben aus ihrem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerbehälter zum Goniometerkopf schnell und sicher zu gewährleisten und sie anschließend automatisch im Synchrotronstrahl zu zen-



Abbildung 71: Der automatische Probenwechsler an BW7B. Zu sehen sind der Roboter, der Proben-Dewar mit angeschlossenem Nachfüllschlauch sowie der modifizierte kristallographische Messaufbau. Der zweidimensionale Detektor ist am oberen rechten Bildrand sichtbar.

trieren. Der erste Teil der Aufgabe wird von einem 6-Achsen Industrieroboter übernommen, während die automatische Zentrierung mittels eines bei EMBL entwickelten Systems erfolgt. Hierbei werden die erforderlichen Bewegungen durch eine Kombination von hochpräzisen Translationen und magnetischer Kopplung der Komponenten erreicht. Das System wurde im Sommer 2002 erstmals an der Strahlführung aufgebaut, und das Prinzip konnte erfolgreich getestet werden, wenngleich Mängel am Proben-Dewar sowie eine erst teilweise vorhandene leicht bedienbare Software noch keinen Nutzerbetrieb zuließen. Eine zweite Testphase mit modifizierten Komponenten und benutzerfreundlicher Software ist für 2003 vorgesehen. Abbildung 71 zeigt den automatischen Probenwechsler beim Testaufbau an BW7B. Auch hierzu finden sich Einzelheiten im HASYLAB Jahresbericht.

Kleinwinkelstreuung an nicht-kristallinen Systemen

Im Laufe des Jahres wurde eine Reihe von Projekten abgeschlossen, um eine Neuordnung der Aktivitäten und Neuverteilung der Verantwortlichkeiten im Rahmen der zukünftigen Forschungsrichtungen an der Außenstelle zu erleichtern. In Zukunft wird sich die Gruppe auf eine kleine Zahl von Projekten und Kollaborationen beschränken. Wie in der Vergangenheit wurde in diesem Jahr viel Zeit investiert, um sicherzustellen, dass die Nutzergruppen ihre Messungen unter bestmöglichen Bedingungen durchführen konnten. Eine Reihe von Änderungen wurde an der Kamera vorgenommen, um Routinemessungen an Proteinlösungen zu vereinfachen. Eine neue, von F. Golding (Lancaster) produzierte Windows-Version des Datenerfassungsprogramms wurde installiert. Diese Entwicklung dient auch anderen externen Gruppen, inklusive HASYLAB, die dieses System für Kleinwinkelstreuungsmessungen verwenden. Weiter wurde ein Multiplexermodul (MX1001 von Smart Silicon Systems, Lausanne) installiert, um die Daten von zwei unabhängigen Detektoren alternierend aufzunehmen. Für statische Messungen bietet diese Lösung eine höhere Auflösung.

Der Prototyp eines Zeit-Digital Umwandlers (TDC) auf der Grundlage eines Moduls, das von der Gruppe

von K. Koningsmann aus Freiburg für das COMPASS-Experiment beim CERN entwickelt wurde, wurde im Rahmen einer Doktorarbeit benutzt, um den Effekt der Bunchstruktur im Speicherring und von simultanen Ereignissen auf Gasdetektoren zu untersuchen. Dieser Ansatz zur Zeit-Digital Umwandlung bietet die Möglichkeit, sekundäre Ereignisse, die nur zum Untergrund beitragen, zu eliminieren. Weiter wurde ein Ausleseprogramm für das bei der ESRF entwickelte N110 TDC erstellt.

Die Hauptthemen bei den Anwendungen der Synchrotronstrahlung, die in Zusammenarbeit mit Nutzergruppen durchgeführt wurden, waren neben den Messungen an Proteinlösungen (siehe unten) auch Studien an kolloidalen Lipidnanopartikelsuspensionen, die neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Medikamententrägern bieten. Weiterhin wurde auch der Strukturpolymorphismus bei Lipopolysacchariden oder Endotoxinen von Gram-negativen Bakterien und die Kopplung zwischen Phasenübergängen sowie die Kristallisation von synthetischen Polymeren untersucht. Details dieser Projekte sind in den Beiträgen der Nutzergruppen im HASYLAB Jahresbericht beschrieben.

Automatische Interpretation von Kleinwinkelbeugungsdaten

Das Programmpaket ATSAS wurde entwickelt und an der Messstation X33 installiert. Es steht ebenfalls über das Internet (<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/>) zur Verfügung. Es enthält Programme zur Datenverarbeitung und das Programmsystem PRIMUS für Datenmanipulationen (Detektorkorrektur, Normalisierung, Mittelung, Hintergrundsubtraktion usw.). Die Datenanalyse-Programme SASPLOT (für graphische Darstellung), GNOM (für Berechnung charakteristischer Funktionen) und PEAK (für die Analyse von Strukturfaktoren) können über Menüs aufgerufen werden. Das Paket beinhaltet außerdem verbesserte Versionen der Programme DAMMIN und GASBOR für ab initio Oberflächen- und Domänen-Strukturanalyse, sowie SUPCOMB, CRY SOL und MASSHA für „Rigid-Body“-Modellierungen, CREDO für die Hinzufügung von Schleifen oder Domänen zu makromolekularen Modellen und OLIGOMER für die Analyse von Mischungen.

Die Grenzen der ultrahoch aufgelösten Proteinkristallographie

Ultrahoch aufgelöste Proteinkristallographie öffnet eine neue Dimension in der makromolekularen Strukturforschung mit einer Auflösung von 0.8 Å oder höher. Diese Proteinstrukturen liefern Erkenntnisse, die wichtig für das Verständnis der Funktion der Proteine sind, wie zum Beispiel mechanistische Untersuchungen der Katalyse auf elektronischer Ebene. Dieses Wissen kann in der Pharmazie oder Biotechnologie angewandt werden.

In einer Veröffentlichung wurde über die Evaluierung von Daten des kleinen 46-Aminosäuren-Proteins Crambin bis zu 0.54 Å Auflösung berichtet. Dieses Protein kommt in den Samen der Pflanze *Crambe abyssinica* vor und ist homolog zu Membran-aktiven Pflanzentoxinen. Die physiologische Funktion des Proteins ist noch immer unbekannt. Gereinigtes Protein besitzt erstaunliche Eigenschaften: es ist extrem hydrophob und weist, obwohl die Kristalle kaum Defekte aufweisen, einen hohen Grad von molekularer Fehlordnung auf. Es existiert sogar als Mischung von zwei Isoformen. Nur die Mischung der beiden Isoformen liefert Kristalle von sehr hoher Qualität. Die Auflösung der Daten war, obwohl sie die höchste jemals in der Proteinkristallographie erreichte war, nicht durch die Streuung des Kristalls, sondern durch die Geometrie der BW7A-Messstation limitiert. Die Verfeinerung der Struktur gegen die 0.54 Å Daten zeigte Details in der Elektronendichte, die noch nie zuvor für ein Biomolekül erreicht werden konnten (Abb. 72). Es war das erste Mal, dass die so genannte Multipol-Verfeinerung auf ein Protein angewandt wurde, bei der die einzelnen Atome nicht lediglich als Kugeln behandelt werden. Bei ultrahoher Auflösung spielen die nicht-sphärischen Komponenten der Atomformen eine wesentliche Rolle, und so konnten nicht-bindende Elektronen und die Valenzelektronenverteilung in den Peptidebenen direkt visualisiert werden. Dies liefert ein realistisches Bild von der elektronischen Situation im Protein und wertvolle Informationen über die Oberflächeneigenschaften. Es ermöglicht, die Charakteristiken des Proteins zu einem extrem hohen Grad an Genauigkeit darzustellen.

Um die Grenzen noch weiter zu erforschen, wurde die Gelegenheit genutzt, eine Undulator-Messstation am

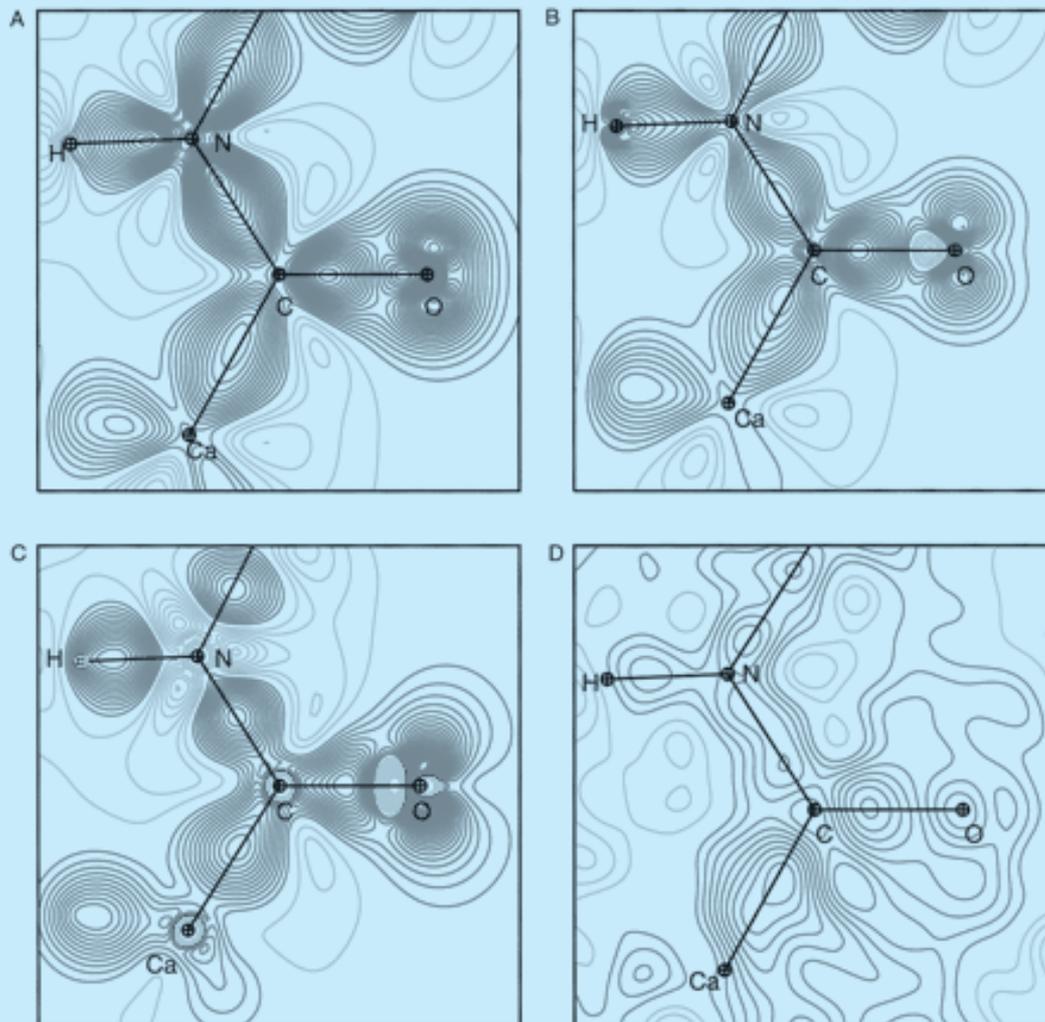


Abbildung 72: Elektronendichte nach Multipol-Verfeinerung gegen die 0.54 Å Daten.

PETRA Ring auszuprobieren, die wegen ihrer Strahlcharakteristik noch nicht für Proteinkristallographie verwendet wird. Die Messstation ermöglichte die Anwendung kurzer Wellenlängen bei hoher Intensität und war mit einem Mar-CCD Detektor und einem 6-Kreis-Diffraktometer ausgerüstet (Abb. 73). Der Detektor war so montiert, dass man ihn sowohl senkrecht als auch um 45 Grad geneigt einsetzen konnte. Daten wurden bei einer Wellenlänge von 0.55 Å gesammelt, mit einer Belichtungszeit von 60 sec pro 0.15°. Reflexe konnten bis zu einer Auflösung von 0.43 Å beobachtet werden.

Wegen der Geometrie der Detektoranordnung war es nötig, zwei oder mehr Datensätze von einem Kristall in verschiedenen Orientierungen zu sammeln, da die Symmetrie niedrig war (Raumgruppe P21). Die prozessierten Daten waren bis zu einer Auflösung von 0.48 Å zu 90% komplett. Der niedrigere Auflösungsbereich wurde von dem zuvor gemessenen 0.54 Å Datensatz hinzugefügt. Der gesamte Datensatz beinhaltet ungefähr 40% mehr Reflexe. Die Verfeinerung der Struktur wird zur Zeit begonnen mit dem Ziel, mehr über feine elektronische Details in der Struktur zu lernen.

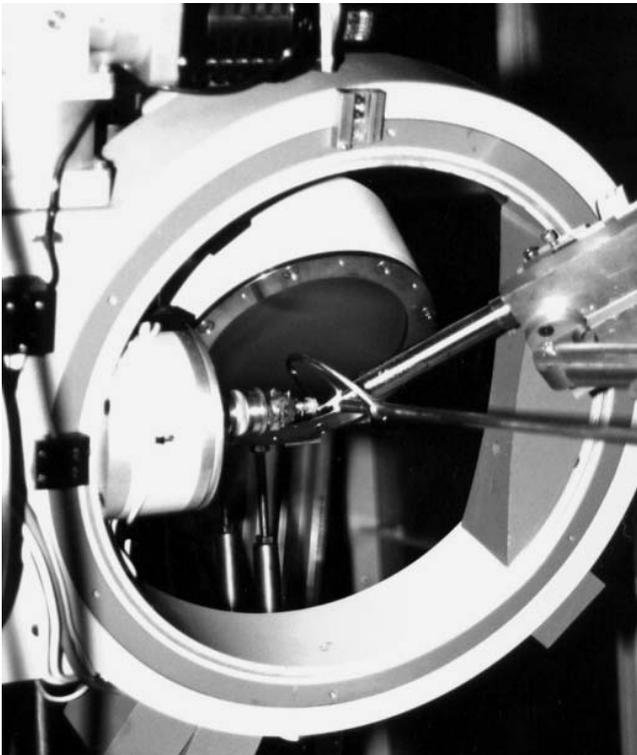


Abbildung 73: Aufbau der PETRA-Messstation für die Crambin-Datensammlung.

Moduläre Domänen in der Signaltransduktion

Praktisch alle biologischen Prozesse werden durch Protein-Protein Wechselwirkungen gesteuert, die von modulären Proteindomänen ausgehen. Die Klasse der so genannten Src Homology 3 (SH3) Domäne gehört zu einer der am besten untersuchten Signaltransduktionsdomänen. Trotz ihrer weiten Verbreitung in zellulären Systemen scheint deren Funktion auf die stöchiometrische, singuläre Protein-Protein Wechselwirkung beschränkt zu sein. Gemeinsam ist diesen SH3-Domänen ein Oberflächensegment zwischen zwei charakteristischen Schlaufen, das ein konserviertes (Pro-X-X-Pro)-Sequenzmotiv in Polyprolin-TypII Konformation von Proteinliganden bindet.

Ein neues Forschungsprojekt an einer SH3-Domäne aus Hefe resultierte aus einem Europäischen Forschungsverbund, der sich zum Ziel gemacht hat, die verschiedenen biologischen Funktionen von SH3-Domänen in diesem Organismus mit verschiedenen Proteomik-orientierten Methoden zu untersuchen. Eine der Aufgaben dieses Verbundes ist die Erstellung einer strukturellen Datenbasis von SH3-Domänenstrukturen und ihren Liganden mit Hilfe von führenden Strukturbiologiemethoden, der NMR-Spektrometrie und Kristallographie mit Hilfe von Synchrotronstrahlung. Dies soll mit standardisierten Methoden für alle notwendigen Schritte, von der Klonierung bis zur verfeinerten Struktur, erfolgen. Von den 29 bekannten SH3-Domänen aus Hefe wurden bis jetzt zwei Strukturen gelöst (Abp1, Pex13p). Zwei weitere Strukturen sind derzeit in Bearbeitung, Myo5 (Univ. La Sapienza, Rom) und Myo3 (Mill Hill, London), und eine Reihe von weiteren SH3 Domänen wird derzeit in Hamburg isoliert.

Von besonderem Interesse war die Struktur der Pex13p-SH3-Domäne, weil sie, im Gegensatz zu anderen SH3-Domänen, zwei Liganden (Pex5p, Pex14p) an unterschiedlichen Oberflächenbereichen bindet (Abb. 69). Die Proteine Pex5p, Pex13p und Pex14p bilden einen Kernkomplex, der als Rezeptor für Proteine dient, die in so genannte Peroxisomen eingeschleust werden. Peroxisomen sind Zellorganellen, in denen biochemische Prozesse, wie zum Beispiel der Abbau von Fettsäuren, stattfinden, die eine räumliche Trennung von anderen Prozessen erfordern. Durch kombinierte Anwendung von NMR-Spektroskopie (EMBL Heidelberg) und Kristallographie (EMBL Hamburg) wurde die genaue Topographie der beiden Bindungsstellen für Pex5p und Pex14p auf der Oberfläche der Pex13p SH3-Domäne bestimmt. Während Pex14p in die bekannte Bindungstasche für Liganden in Polyprolin-TypII-Konformation bindet, bindet Pex5p in α -helikaler Konformation an einen Oberflächenbereich, der gegenüberliegend zur Pex14p-Bindungsstelle ist. Ein zukünftiges Forschungsziel wird es sein, die Strukturen der vollständigen binären und ternären Protein-Proteinkomplexe, bestehend aus Pex5p, Pex13p und Pex14p, zu bestimmen und somit die molekularen Grundlagen von Proteinimport in Peroxisomen zu verstehen.