



bmb+f - Förderschwerpunkt

Kondensierte Materie

Großgeräte der physikalischen
Grundlagenforschung

Schlussbericht vom 28.06.2004 zum Thema:

Untersuchung der Struktur- und Dynamik von Proteinen mit Verfahren zeitaufgelöster Kristallographie und diffuser Röntgenstreuung

Zuwendungsempfänger:	MPG-AG für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg
Projektleitung:	Dr. H.-D. Bartunik
Förderkennzeichen:	05KS1EAA/0
Förderzeitraum:	01.04.2001 – 31.03.2004
Zuwendung:	173.328,00 EUR
E-Mail:	bartunik@mpghdb.desy.de
Projektträger:	Projektträger DESY-HS

Genutzte Großgeräte:

DESY - DORIS

ESRF - ESRF

PSI - SLS

Angaben zum Projekt:

Veröffentlichungen:	13
Konferenzbeiträge:	4
Diplomarbeiten:	2
Dissertationen:	0
Habilitationen:	0
Patente:	0

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Schlussbericht-Kurzfassung

Zuwendungsempfänger: ***MPG-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie***

Projektleitung: ***Dr. Hans-Dieter Bartunik***

Untersuchung der Strukturodynamik von Proteinen mit Verfahren zeitaufgelöster Kristallographie und diffuser Röntgenstreuung

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und ihrer Veränderung im Verlauf biologischer Reaktionen ist eine wesentliche Voraussetzung für ein Verständnis ihrer Wirkungsweise auf molekularer Ebene. Das Forschungsvorhaben trug dazu in drei Arbeitsabschnitten bei. In einem ersten Teil wurden Zwischenzustände zweier unterschiedlicher Arten von Reaktionen mit einer Kombination von zeitaufgelöster Kristallstrukturanalyse und Kryoverfahren untersucht. Zum einen gelang es erstmals, die 3D-Strukturen produktiver Zwischenzustände der enzymatischen Reaktion einer Flavooxidase bei hoher Auflösung zu bestimmen. Die Änderungen in den Konformationen des Enzyms, der 6-Hydroxy-*L*-Nikotinoxidase, und der Metaboliten konnten über den gesamten Reaktionsweg verfolgt werden. Aufgrund der engen Homologie zu menschlichen Monoaminoxidasen sind diese Ergebnisse auch für die Entwicklung von Wirkstoffen von potentieller Bedeutung. Zum zweiten wurden zur weiteren Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen von Myoglobin bei der Bindung von CO Kristallstrukturen kurzlebiger Zwischenzustände bestimmt. Dabei wurde erstmals ultrahohe Auflösung erreicht. Die hohe Qualität der Elektronendichteverteilungen erlaubte die Lokalisierung des Liganden sowohl in Docking-Zuständen innerhalb der Hämtasche als auch beim Transfer von und zur Proteinoberfläche. In einem zweiten Teil wurden Verfahren und Rechenprogramme zur Auswertung diffuser Streuung von Proteinkristallen entwickelt und auf eine Reihe von Systemen angewandt. Im Mittelpunkt stand dabei die quantitative Auswertung der diffusen Streuverteilung von Hämoglobinkristallen. Diese Experimente ergaben erstmals eine vollständige Karte der Streuverteilung bei hoher Auflösung im reziproken Raum und damit eine Grundlage für eine Interpretation langreichweitiger Korrelationen im Kristall unter Bezug auf die molekulare Struktur. Die Ergebnisse zeigen die potentielle Bedeutung einer gemeinsamen Behandlung von kohärenter und inkohärenter Streuinformation bei der Verfeinerung von Kristallstrukturen. In einem weiteren Teil wurden schließlich die Kristallstrukturen einer Reihe wichtiger Proteine in Kollaboration mit externen Gruppen aufgeklärt.

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: **MPG-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie**

Projektleitung: **Dr. Hans-Dieter Bartunik**

Untersuchung der Strukturodynamik von Proteinen mit Verfahren zeitaufgelöster Kristallographie und diffuser Röntgenstreuung

Die Arbeit umfaßte im wesentlichen die Entwicklung von Verfahren und Rechenprogrammen zur Auswertung der diffusen Streuung von Proteinkristallen und ihre Anwendung, sowie die Kristallstrukturanalyse kurzlebiger Zwischenzustände von Proteinreaktionen. Darüber hinaus wurde eine Reihe wichtiger Proteinstrukturen in kollaborativen Arbeiten aufgeklärt.

1. Untersuchung intermediärer Reaktionszustände in Proteinen

1.1. Kristallstrukturen katalytischer Intermediate von 6HLNO

Es war bisher nur in wenigen Fällen möglich, die einzelnen Schritte einer enzymatischen Reaktion in 3D-Strukturen zu verfolgen. Für das Flavoenzym 6-Hydroxy-*L*-Nikotinoxidase (6HLNO) von *Arthrobacter nicotinovorans* gelang es uns, den Abbau von 6-Hydroxy-*L*-Nikotin (6HLN) in einer Reihe von Kristallstrukturen bei hoher Auflösung zu untersuchen. Wir bestimmten zunächst die Röntgenkristallstruktur von 6HLNO (Abb. 1a) mit Hilfe von MAD-Phasierung bei hoher Auflösung (1.95 Å). Im Anschluß daran setzten wir zeitaufgelöste Kristallographie in Verbindung mit Kryotechniken zur Analyse des Reaktionswegs im Kristall ein. Das Substrat 6HLN wurde unter anaeroben Bedingungen eindiffundiert. Durch den Einsatz sehr kleiner Kristalle mit Abmessungen von 10-50 µm konnten kurze Diffusionszeiten erreicht werden. Die Reaktion wurde jeweils durch Schockfrieren gestoppt; im unmittelbaren Anschluß daran wurden Beugungsdaten an der Mikrofokusbeamline (ID13) des ESRF in Zusammenarbeit mit C. Riekkel und M. Burghammer gemessen. Die resultierenden Kristallstrukturen, die bei hoher Auflösung verfeinert wurden, zeigen erstmals die 3D-Strukturen produktiver Zwischenschritte der katalytischen Reaktion einer Flavooxidase (Abb. 1b). Diese Strukturen entsprechen der Ausbildung eines Michaelis-Menten-Komplexes nach dem Andocken des Substrats an den Isoalloxazinring des FAD, einem intermediären Produktzustand (6-Hydroxy-*N*-Methylmyosmin), sowie einem zweiten Produktzustand nach Ringöffnung (6-Hydroxy-Pseudooxynikotin). Die einzelnen Reaktionsschritte erfolgen in räumlich getrennten Bereichen der Enzymstruktur. Die Reaktion beginnt im Inneren des Proteins und schreitet in Richtung der Proteinoberfläche fort. Sie wird von lokalen und globalen Änderungen der Proteinkonformation begleitet.

Zur vollständigen Analyse der enzymatischen Reaktion wurden zudem die Kristallstrukturen von Komplexen des Enzyms mit einem natürlichen Inhibitor (6HLD) bzw. mit dem Pseudooxynikotin-Produkt bestimmt; diese Arbeiten basierten auf weiteren Messungen am BW6/DORIS sowie am SLS in Villigen. 6HLNO weist hohe Homologie und enge strukturelle Verwandtschaft zu menschlichen Monoaminoxidasen auf. Die Ergebnisse der Strukturaufklärung von 6HLNO und der katalytischen Zwischenzustände sind damit von potentieller Bedeutung für eine gezielte Suche nach Wirkstoffen.

In weiteren Experimenten wurde der Versuch unternommen, die Bildung katalytischer Intermediate von 6HLNO auch mit Hilfe zeitaufgelöster Laue-Beugung zu verfolgen. Die kubische Kristallsymmetrie (P432) der Enzymkristalle schuf im Prinzip eine gute Voraussetzung für eine vollständige Kristallstrukturanalyse auf der Grundlage einer einzigen Breitband-Laue-Aufnahme und ihrer Auswertung mit dem von uns entwickelten Bayes-Verfahren¹. Alternativ dazu wurden Laue-Experimente mit begrenzter Bandbreite ($\Delta\lambda/\lambda \sim 1\%$) und multiplen Kristallorientierungen durchgeführt. In beiden Fällen zeigte sich jedoch, daß schnell einsetzende Strahlenschädigung hinreichend hohe Auflösung und Vollständigkeit der Daten verhinderte.

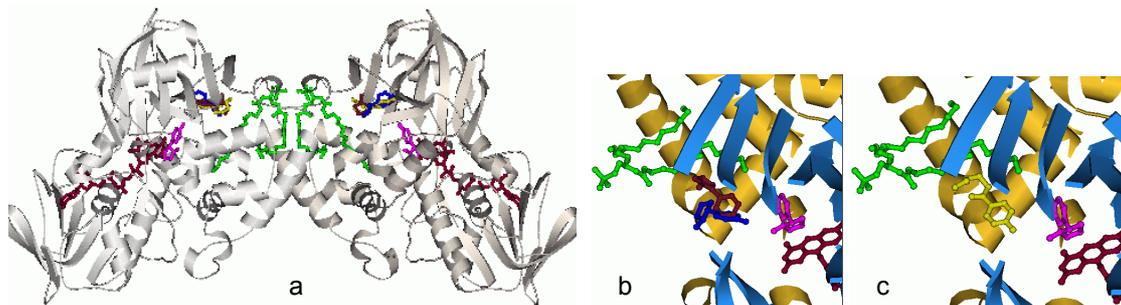


Abb. 1

a) Kristallstruktur des 6HLNO-Dimers. Jede monomere Untereinheit enthält ein FAD und ein Phospholipid (grün). b,c) Bindungsstellen des Substrats (magenta), des Myosmins (braun) bzw. des Pseudooxynikotins nach Ringöffnung (gelb).

1.2. Intermediäre Zustände der Bindung von CO an Mb bei atomarer Auflösung

Die Bindung des CO-Liganden an Myoglobin erfordert konziertierte lokale und globale Änderungen der Konformation in der Hämtasche und der Proteinmatrix. Die Amplituden dieser Strukturänderungen sind so klein, daß zu ihrer Analyse ultrahohe Auflösung und präzise Kontrolle des Ligandierungszustands im Kristall erforderlich sind². Diese Bedingungen können zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht in Laue-Beugungsmessungen realisiert werden. Die in derartigen Experimenten³ auf kurzen Zeitskalen erreichte Auflösung und Qualität der Daten erlaubte es bisher insbesondere nicht, koexistierende Strukturen, die unterschiedlichen aber energetisch vergleichbaren Ligandierungszuständen und Reaktionsschritten entsprechen, in Elektronendichtekarten eindeutig zu trennen. Dieses Problem tritt in verschärfter Form auf, wenn intermediäre Zustände nur

unvollständig angeregt werden, so daß die entsprechenden Komponenten der Elektronendichteverteilung sehr niedrigen Kontrast aufweisen.

Wir bestimmten erstmals die 3D-Strukturen einer Reihe von intermediären Schritten der Bindung von CO an Myoglobin bei ultrahoher Auflösung (0.95 – 1.2 Å). Die Population und Depopulation der Intermediate erfolgte unter unterschiedlichen Kryobedingungen. Die Röntgenbeugungsmessungen wurden mit monochromatischen Verfahren durchgeführt. Wie zu erwarten, zeigten die Elektronendichteverteilungen in den meisten Fällen eine Koexistenz verschiedener Zustände. Die einzelnen Zustände wurden in einer Reihe unterschiedlicher Mischungsverhältnisse analysiert und ihre Strukturen verfeinert. Ausgangspunkt dieser korrelierten Verfeinerungen waren hochpräzise Tieftemperatur-Strukturen von Deoxy-Myoglobin (Abb. 2a) und CO-Myoglobin, die bei extrem hoher Auflösung (0.85 Å bzw. 0.9 Å) verfeinert wurden. Abb. 2b zeigt als Beispiel zwei der verfeinerten Strukturmodelle intermediärer Zustände. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen⁴⁻⁶ von Intermediaten unter Kryobedingungen wurden in der gegenwärtigen Arbeit bei weitem höhere Auflösung und damit erstmals hohe Präzision der Strukturanalyse ohne Modellabhängigkeit erreicht. Insgesamt ergab diese Untersuchung ein detailliertes Bild der im Verlauf der Ligandierungsreaktion bevölkerten Strukturzustände, die Lokalisierungen des Liganden sowohl in Docking-Positionen in der Häm tasche als auch in einem zur Proteinoberfläche führenden Kanal entsprechen.

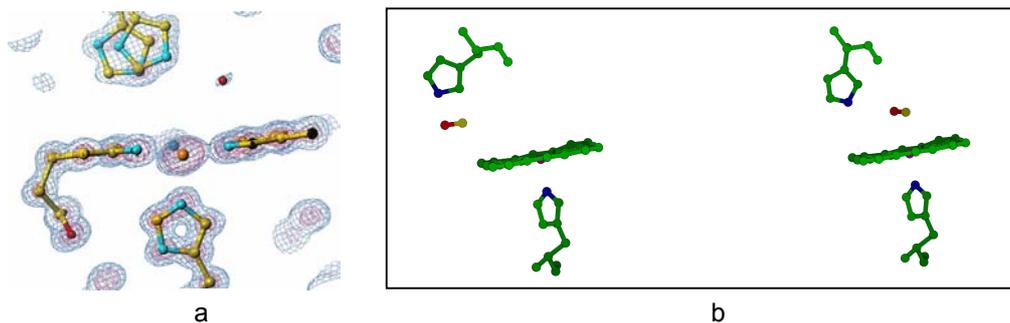


Abb. 2

- a) Kristallstruktur von Deoxy-Myoglobin bei 100 K und 0.85 Å Auflösung.
 b) Zwei der Intermediatzustände der Bindung von CO and Myoglobin.

Eine adäquate Behandlung koexistierender Kristallstrukturen ist darüber hinaus auch für andere Anwendungen zeitaufgelöster Kristallographie von großer Bedeutung; die Arbeit an der weiteren Entwicklung von Verfahren korrelierter Verfeinerung von Strukturen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wird fortgesetzt.

2. Diffuse Streuung von Proteinkristallen

Die Entwicklung von Methoden zur Auswertung diffuser Streuung von Proteinkristallen und ihre Anwendung bildeten einen Schwerpunkt des Forschungsvorhabens. Wesentliches Ziel war dabei eine quantitative Analyse. Ein derartiger Ansatz wurde bisher im wesentlichen nur bei niedriger Auflösung mit einer daraus resultierenden Beschränkung auf kurzreichweitige Fehlordnung verfolgt⁷; die Interpretation basierte

dabei auf einem Modell isotroper Korrelation mit Korrelationsradien von 5-10 Å und blieb ohne Bezug auf die molekulare Struktur. Für eine Untersuchung langreichweitiger (statischer oder dynamischer) Fehlordnung waren die experimentell bestimmten 3D-Verteilungen der diffusen Streuung im Bereich hoher Auflösung zu unvollständig. Unsere theoretischen Entwicklungen und experimentelle Anwendungen gehen wesentlich über diese früheren Ansätze hinaus. Insbesondere in einer Untersuchung der diffusen Streuung von Hämoglobinkristallen führten wir erstmals eine quantitative Analyse langreichweitiger Fehlordnung in Proteinkristallen durch und stellten sie in Relation zur molekularen Packung und der Kristallstruktur.

2.1. Theoretische Arbeiten und Softwareentwicklung

Vollständige 3D-Darstellung der diffusen Streuverteilung im reziproken Raum

Wir entwickelten im Rahmen des Vorhabens neuartige Methoden, die eine dreidimensionale Darstellung der vollständigen diffusen Streuverteilung im gesamten reziproken Raum bei hoher Auflösung gestatten. Experimentelle Grundlage bilden jeweils Messungen im Drehkristallverfahren mit kleinem Drehbereich pro Streuaufnahme. Die Auswertung schließt eine Reihe rechnerischer Einzelschritte ein: Entfernen von Bragg-Reflexen, geometrische Korrekturen, Subtraktion der von der Probenumgebung herrührenden Untergrundstreuung, Entfernen der sphärisch symmetrischen Streukomponente, Skalieren, Symmetriemittelung, und schließlich Darstellung der Daten als Grauskala- oder Pseudofarbbildern in einer Abfolge von Ebenen. Die Verfahren wurden in einem Rechenprogramm implementiert, das hinsichtlich Raumgruppe, Beugungsgeometrie und Detektorformat nicht spezifisch ist. Programmteile, in denen eine Serie von Aufnahmen unabhängig voneinander bearbeitet werden, wurden parallelisiert. Wir setzten dieses Programm an einem LINUX-Cluster ein. Damit gelang es uns, die für Untersuchungen bei hoher Auflösung erforderlichen großen Mengen an experimentellen Daten mit kurzen Rechenzeiten auszuwerten. Dieses Rechenprogramm steht allen externen Gruppen für Anwendungen an der Beamline BW6 zur Verfügung.

Quantitative Interpretation der diffusen Streuverteilung

Zur Interpretation der aus kurzreichweitigen Korrelationen resultierenden diffusen Streuung wurde bereits in früheren Arbeiten⁷ ein Konvolutionsverfahren eingesetzt, das die diffuse Streuverteilung wie folgt beschreibt:

$$I_d(\mathbf{h}) \propto \sum_i e^{-(\mathbf{s}, \mathbf{h})^T \mathbf{U}(\mathbf{s}, \mathbf{h})} (\mathbf{s}_i \mathbf{h})^T \mathbf{U}(\mathbf{s}_i \mathbf{h}) \sum_{hkl} |F(\mathbf{h}_{hkl})|^2 \hat{\Gamma}(\mathbf{s}_i(\mathbf{h} - \mathbf{h}_{hkl})) \quad (1)$$

Dabei sind \mathbf{h} der Streuvektor, \mathbf{U} die mittlere quadratische Auslenkungsamplitude, $F(\mathbf{h})$ und $\hat{\Gamma}(\mathbf{h})$ die Fourier-Transformierten der Elektronendichte des Moleküls bzw. der

Korrelationsfunktion. Die Summation erfolgt über die Bragg-Positionen hkl und die Symmetrieeoperatoren s_i .

Zur Modellierung der aus langreichweitig korrelierten Auslenkungen resultierenden diffusen Streuung entwickelten wir einen neuartigen analytischen Ansatz. Die Korrelation ist nun eine Funktion intermolekularer Vektoren. Unter den Annahmen, daß die Proteinmoleküle als feste Körper harmonische Auslenkungen erfahren, daß eine Kopplung nur zwischen Molekülen besteht, die durch eine kristallographische Translation aufeinander bezogen sind, und daß die Korrelation der Auslenkungen eine anisotrope Funktion des intermolekularen Vektors mit exponentiellem Abfall darstellt, ergab sich der folgende Ansatz für eine Beschreibung der diffusen Streuintensität:

$$I_d(\mathbf{h}) \propto |F(\mathbf{h})|^2 \sum_i e^{-(\mathbf{s}_i \mathbf{h})^T \mathbf{U}(\mathbf{s}_i \mathbf{h})} (\mathbf{s}_i \mathbf{h})^T \mathbf{U}(\mathbf{s}_i \mathbf{h}) \sum_{hkl} \hat{\Gamma}(\mathbf{s}_i (\mathbf{h} - \mathbf{h}_{hkl})) \quad (2)$$

Der zweite Term der Beziehung ist eine Fourier-Transformierte des fehlgeordneten Kristallgitters. Die Symmetrie des Beugungsbildes bleibt auch dann erhalten, wenn die Hauptrichtungen von \mathbf{U} und $\hat{\Gamma}(\mathbf{h})$ von den Symmetrieachsen abweichen.

2.2. Experimentelle Anwendungen

Die diffuse Streuung von Proteinkristallen wurde in Anwendungen auf unterschiedliche Systeme untersucht. Diese umfaßten Hämproteine, Hefe-Hexokinase, sowie das Photosystem II⁸ in einer Zusammenarbeit mit W. Saenger. In allen Fällen wurde die experimentelle Bestimmung der vollständigen diffusen Streuverteilung bei hoher Auflösung durch den Einfluß von Strahlenschäden kompliziert. Dieses Problem tritt aufgrund der im Vergleich zur Bragg-Beugung geringen Intensität der diffusen Streuung generell auf. Im folgenden werden die Ergebnisse von Experimenten an Hämoglobinkristallen dargestellt, die beispielhaft zeigen, daß eine quantitative Interpretation der diffusen Streuverteilung bei hoher Auflösung erreicht werden kann. Diese Anwendung stellt gleichzeitig einen signifikanten Schritt zur vollständigen Auswertung der kohärenten und inkohärenten Röntgenstreuung von Proteinkristallen dar, die im Prinzip auch Verfeinerungen der Kristallstruktur zugrunde liegen sollte.

Untersuchung der diffusen Streuung von Hämoglobinkristallen

Röntgenaufnahmen von Kristallen der C2-Kristallform von Pferdehämoglobin (Hb) zeigten sowohl bei Zimmertemperatur als auch unter Kryobedingungen (100 K) ausgeprägte diffuse Streumuster (Abb. 3e). Messungen wurden unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Eine erste Meßreihe erbrachte eine vollständige Karte der diffusen Streuverteilung bei einer Proben temperatur von 100 K; der reziproke Raum wurde mit einer Auflösung von 2.1 Å auf einem feinen Gitter (>300 Å) überdeckt. Eine zweite Meßreihe bei Zimmertemperatur führte zu einer aufgrund von Strahlenschäden nur partiellen Karte. Eine dritte Meßreihe bei 100 K und langen

Belichtungszeiten (mit einer vergleichbaren Gesamtdosis wie für die Bestimmung der vollständigen 3D-Verteilung) führte schließlich zu einer Karte, welche die $hk0$ -Ebene bei hoher Auflösung (1.9 \AA) auf einem feinen Gitter ($>500 \text{ \AA}$) überdeckt; sie bildete die Grundlage für die quantitative Analyse der diffusen Streuung.

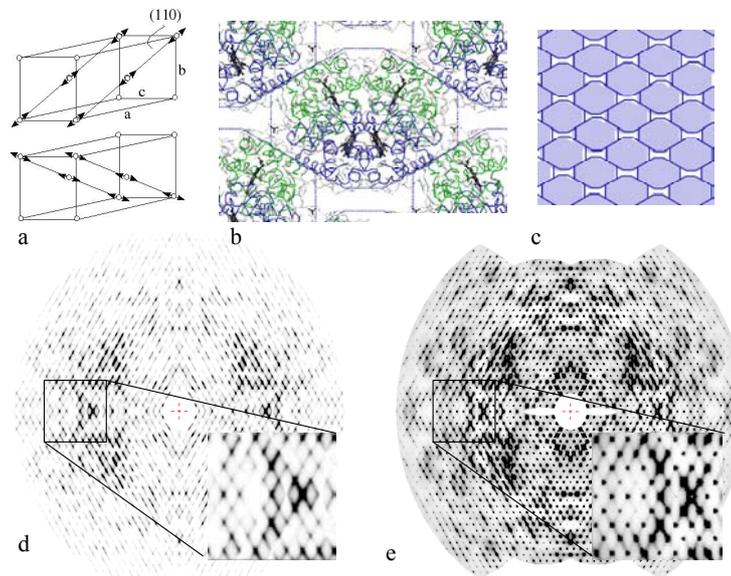


Abb. 3

- a) Richtungen der Auslenkungen in Hämoglobinkristallen. b) Molekülpackung in der (001)-Ebene. c) Schematische Darstellung der Auslenkung der Tetramere im Gitter. d) Theoretisch berechnete diffuse Streuverteilung in der $hk0$ -Ebene. e) Entsprechender Ausschnitt der experimentellen diffusen Streuverteilung.

Die diffuse Streuverteilung im reziproken Raum weist Streaks in den Ebenen $l=const$ auf, die sich entlang der Knotenlinien $h+k=2n$ und $-h+k=2n$ erstrecken. In der Nachbarschaft der Knotenlinien $h=0$ und $k=0$ weisen beide Streakscharen gleiche Intensitäten auf und bilden kreuzförmige Halos um Bragg-Positionen. Diese Beobachtungen und andere Aspekte der Intensitätsverteilung konnten zunächst qualitativ erklärt werden. Das Auftreten von Streaks entlang der Knotenlinien entspricht einem Bruch der Translationssymmetrie zwischen den entsprechenden Kristallebenen, während die Translationen innerhalb der Ebenen erhalten bleiben. Die Streaks entlang $h+k=2n$ resultieren aus Auslenkungen von (110)-Ebenen (Abb. 3a), die symmetriebezogenen Streaks denen von $(1\bar{1}0)$ -Ebenen. Die Richtung der Auslenkungen ist parallel zu $1\bar{1}0$ bzw. 110 . Diese beiden Komponenten der Fehlordnung sind statistisch unabhängig. Sie treten nicht gleichzeitig in ein und derselben Einheitszelle auf. Das Muster der Gitterfehlordnung bedingt eine Anharmonizität der gemittelten Elektronendichteverteilung; wenn der Kristall als polysynthetischer Zwilling betrachtet wird, ist jedoch eine harmonische Näherung gerechtfertigt. Das C2-Gitter wird durch Translationen des $(\alpha\beta)_2$ -Tetramers gebildet. Die Moleküle sind entlang der $\{110\}$ -Kristallebenen dicht gepackt. Der Kristall besteht aus einer losen Packung dieser Ebenen. Wasserkanäle erstrecken sich entlang 001. Die detaillierte Struktur der intermolekularen Kontaktbereiche ist konsistent mit einem mechanistischen Modell von Auslenkungen, die

mit Gleitbewegungen entlang der Kontaktflächen verbunden sind. Deformationen treten im wesentlichen nicht im Proteinmolekül auf, sondern beeinflussen den Solventbereich.

Zum quantitativen Vergleich zwischen dem theoretischen Modell und den experimentellen Daten wurde der analytische Ansatz (2) verfolgt. Die Modellparameter \mathbf{U} und $\hat{\Gamma}(\mathbf{h})$ wurden so abgeschätzt, daß sich maximale lineare Korrelationskoeffizienten zwischen den experimentellen diffusen Streukarten und einer theoretischen Streuverteilung ergaben, die auf der Basis eines bei 1.5 Å Auflösung verfeinerten Modells der Kristallstruktur von Hb berechnet wurden. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Analyse. Der lineare Korrelationskoeffizient zwischen dem Modell und den experimentellen Daten beträgt 0.76; im Vergleich dazu ergab ein Konvolutionsansatz (1) weit niedrigere Korrelation. Die Hauptrichtungen von \mathbf{U} und $\hat{\Gamma}(\mathbf{h})$ werden präzise durch die Daten definiert. Die Korrelationslänge in der Richtung schwacher Kopplung entspricht 1 - 2 kristallographischen Translationen. Die Korrelationslänge innerhalb der {110}-Ebenen beträgt ≥ 6 Translationen.

Die Amplitude der Auslenkung wird durch den Bragg-Term $I_b(\mathbf{h} = hkl) \propto |F(\mathbf{h})|^2 \sum_i e^{-(s_i, \mathbf{h})^T \mathbf{U}(s_i, \mathbf{h})}$ bestimmt. Es wäre von Interesse, die Kristallstruktur im Rahmen eines derartigen Modells zu verfeinern; insbesondere sollte dies zu physikalisch relevanteren Temperaturfaktoren führen. Dafür ist eine Weiterentwicklung der bereits verfügbaren Verfeinerungsverfahren erforderlich. Die Tatsache, daß der Produktansatz (2) die diffusen Streudaten erheblich besser beschreibt als eine Konvolutionsmethode deutet darauf hin, daß die diffuse Streuung Information über die kontinuierliche Molekültransformierte enthält, die bisher nicht genutzt wurde.

3. Kristallstrukturanalyse von Proteinen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde eine Reihe wichtiger Proteinstrukturen in Kollaborationen mit verschiedenen externen Gruppen gelöst. Diese Arbeiten, deren Ergebnisse in der Liste der Publikationen enthalten sind, werden hier nicht näher beschrieben. In vielen Fällen wurde anomale Streuung zur Phasierung eingesetzt. Alle Messungen wurden an der Beamline BW6 an DORIS durchgeführt.

Referenzen

- ¹Bourenkov, G.P., Popov, A.N., Bartunik, H.D. (1996), *Acta Cryst* **A52**, 797-811.
- ²Kachalova, G.S., Popov, A.N., Bartunik, H.D. (1999). *Science* **284**, 473-6.
- ³Schotte et al. (2003), *Science* **300**, 1944-7.
- ⁴Teng et al. (1994), *Nat. Struct. Biol.* **1**, 701-5.
- ⁵Schlichting and Berendzen (1994), *Nature* **371**, 808-12.
- ⁶Hartmann et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7013-6.
- ⁷Wall et al. (1997), *Structure* **5**, 1599-612.
- ⁸Zouni et al. (2001), *Nature* **409**, 739-43.

Schlussbericht - Veröffentlichungen

Zuwendungsempfänger: **MPG-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie**

Projektleitung: **Dr. Hans-Dieter Bartunik**

Untersuchung der Strukturodynamik von Proteinen mit Verfahren zeitaufgelöster Kristallographie und diffuser Röntgenstreuung

a) Publikationen in referierten Fachzeitschriften

Santos-Silva, T., Dias, J. M., Bourenkov, G., Bartunik, H., Moura, I., Romao, M.J. (2004). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the 16-haem cytochrome of *Desulfovibrio gigas*. *Acta Crystallogr. D* **60**, 968-70.

Jauch, R., Bourenkov, G.P., Chung, H.R., Urlaub, H., Reidt, U., Jackle, H., Wahl, M.C. (2003). The zinc finger-associated domain of the *Drosophila* transcription factor grauzone is a novel zinc-coordinating protein-protein interaction module. *Structure* **11**, 1393-402.

Ksiazek, D., Brandstetter, H., Israel, L., Bourenkov, G.P., Katchalova, G., Janssen, K.P., Bartunik, H.D., Noegel, A.A., Schleicher, M., Holak, T.A. (2003). Structure of the N-terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. *Structure* **11**, 1171-8.

Groll, M., Brandstetter, H., Bartunik, H.D., Bourenkov, G., Huber, R. (2003) Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes. *J. Mol. Biol.* **327**, 75-83.

Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., Than, M.E. (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 520-6.

Hagemeyer, C.H., Shima, S., Thauer, R.K., Bourenkov, G., Bartunik, H.D., Ermler, U. (2002). Coenzyme F420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **332**, 1047-57.

Than, M.E., Henrich, S., Huber, R., Ries, A., Mann, K., Kuhn, K., Timpl, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Bode, W. (2002). The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6607-12.

Garrido-Franco, M., Ehlert, S., Messerschmidt, A., Marinkovic, S., Huber, R., Laber, B., Bourenkov, G.P., Clausen, T. (2002). Structure and function of threonine synthase from yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 12396-405.

Jozic, D., Bourenkov, G., Bartunik, H., Scholze, H., Dive, V., Henrich, B., Huber, R., Bode, W., Maskos, K. (2002). Crystal structure of the dinuclear zinc aminopeptidase PepV from *Lactobacillus delbrueckii* unravels its preference for dipeptides. *Structure* **10**, 1097-106.

Fritz, G., Roth, A., Schiffer, A., Buchert, T., Bourenkov, G., Bartunik, H.D., Huber, H., Stetter, K.O., Kroneck, P.M., Ermler, U. (2002). Structure of adenylylsulfate reductase from the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* at 1.6 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1836-41.

Bosch, J., Tamura, T., Bourenkov, G., Baumeister, W., Essen, L.O. (2001). Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of the Tricorn protease hexamer from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Struct. Biol.* **134**, 83-7.

Worbs, M., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., Wahl, M.C. (2001). An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol. Cell* **7**, 1177-89.

Muller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., Heinemann, U. (2001). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 2786-9.

b) Konferenzbeiträge

Bourenkov, G., Bartunik, H.D. Diffuse scattering from Hemoglobin Crystals. Gemeinsame Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kristallographie und Deutsche Gesellschaft für Kristallwachstum und Kristallzüchtung, Jena, 2004.

Bourenkov, G., Karain, W., Viehmann, H., Blume, H., Bartunik, H.D. A computer program to extract and evaluate diffuse scattering data from protein diffraction images. 10. Jahrestagung DGK, Kiel, 2002.

Kachalova, G. S., Bourenkov G. P., Bartunik, H. D., Dimitrov, M. I., Donchev, A. A., Shosheva, A. Ch. (2002). Crystal structure of poplar plastocyanin b. *Acta Cryst. A58* (Supplement).

Kachalova, G. S., Bourenkov G. P., Fried, B., Krauss, N., Maun, H., Decker, K., Bartunik, H. D. Crystal Structure of 6-Hydroxy-L-nicotin oxydase from *Arthrobacter Nicotinovorans*. 9. Jahrestagung DGK, Bayreuth, 2001.

c) Diplomarbeiten

Anneke Brümmer, Kristallstrukturanalyse der Konformationsänderung von Hexokinase bei der Bindung von Glucose, Diplomarbeit, Univ. Hamburg, Mai 2003.

Markus Röhrken, Röntgenkristallstrukturanalyse von Leghämoglobin bei atomarer Auflösung, Diplomarbeit, Univ. Hamburg, Mai 2003.

d) Interne Berichte

Jauch, R., Bourenkov, G.P., Chung, H.-R., Urlaub, H., Reidt, U., Jackle, H., Wahl, M.C. (2003) Structure and Function of the Zinc Finger-Associated Domain of the Drosophila Transcription Factor Grauzone. HASYLAB Annual report.

Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., Than, M.E. (2003). Crystal Structure of the Proprotein Convertase Furin. HASYLAB Annual report.

Polyakov, K.M., Boiko, K.M., Tikhonova, T.V., Stekhanova, T.N., Antipov, A.N., Bourenkov, G.P., Popov, A.N., Lamzin, V.S., Popov, V.O (2003). Crystal structure of oxoanion polyreductase from Thioalkalivibrio nitratireducens . HASYLAB Annual report.

Bourenkov, G.P., Viehmann, H., Bartunik, H.D. (2002). Diffuse Scattering from Yeast Hexokinase Crystals. HASYLAB Annual report.

Bruemmer, A., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. (2002). Analysis of the conformational motions in hexokinase. HASYLAB Annual report.

Morozov, V., Zenchenko, T., Kachalova, G., Bourenkov, G.P., Blume, J., Kruger, W., Bartunik, H.D. (2002). X-ray Diffraction from a Protein Crystal Subjected to Uniaxial Load. HASYLAB Annual report.

Santos- Silva, T., Dias, J.M., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Moura, I., Romao, M. J. (2002). Structure Determination of a sixteen hemes cytochrome from *Desulfovibrio gigas*. HASYLAB Annual report.

Maskos, K., Bourenkov, G.P., Nagase, H., Lim, N.H., Braun, M., Bartunik, H.D., Huber, R., Bode, W. (2002). Crystal structure analysis of the latent form of matrix metalloprotease-1 (proMMP-1). HASYLAB Annual report.

Ksiazek, D., Brandstetter, H., Israel, L., Bourenkov, G.P., Kachalova, G., Rehm, T., Janssen, K.P., Bartunik, H.D., Noegel, A.A., Huber, R., Schleicher, M., Holak, T.A. (2002). Structure of the N-Terminal Domain of the Adenylyl Cyclase-Associated Protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. HASYLAB Annual report.

Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., Than, M.E (2002). Structure determination of a new serine endoprotease. HASYLAB Annual report.

Henrich, S., Mann, K., Bourenkov, G.P., Ries, A., Kühn, K., Bartunik, H.D., Huber, R., Timpl, R., Bode, W., Than, M.E. (2002). Crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV. HASYLAB Annual report.

Artyukh, R., Akulenko, N., Ksenzenko, V., Bourenkov, G.P., Kachalova, G., Bartunik, H.D. (2002). Identification of ZN in Phage T5 site-specific endonuclease F-TfII. HASYLAB Annual report.

Dimitrov, M., Donchev, A., Schosheva, A., Kachalova, G., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. (2002). Crystal structures of the reduced and Oxidized States of Poplar Plastocyanin b and a. HASYLAB Annual report.

Worbs, M., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., Wahl, M.C. (2001). Crystal structure of Transcription Factor NusA. HASYLAB Annual report.

Kaiser, J.T., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., Wahl, M.C. (2001). Crystal structure of MJ0158. HASYLAB Annual report.

Groll, M., Huber, R., Finley, D., Bartunik, H.D., Bourenkov, G.P. (2001). Proof for a gating mechanism in the eucaryotic 20S proteasome axial channel. HASYLAB Annual report.

Groll, M., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Kohno, J., Huber, R. (2001). The eucaryotic 20S proteasome: a potential target in drug design. HASYLAB Annual report.

Rebelo, J., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Bacher, A., Huber, R. (2001). Mutant studies on GTP - Cyclohydrolase I from E.Coli. HASYLAB Annual report.

Krapp, S., Bourenkov, G.P., Jacob, U., Munster, A. (2001). Murine CMP-Sialic Acid Synthetase. HASYLAB Annual report.