

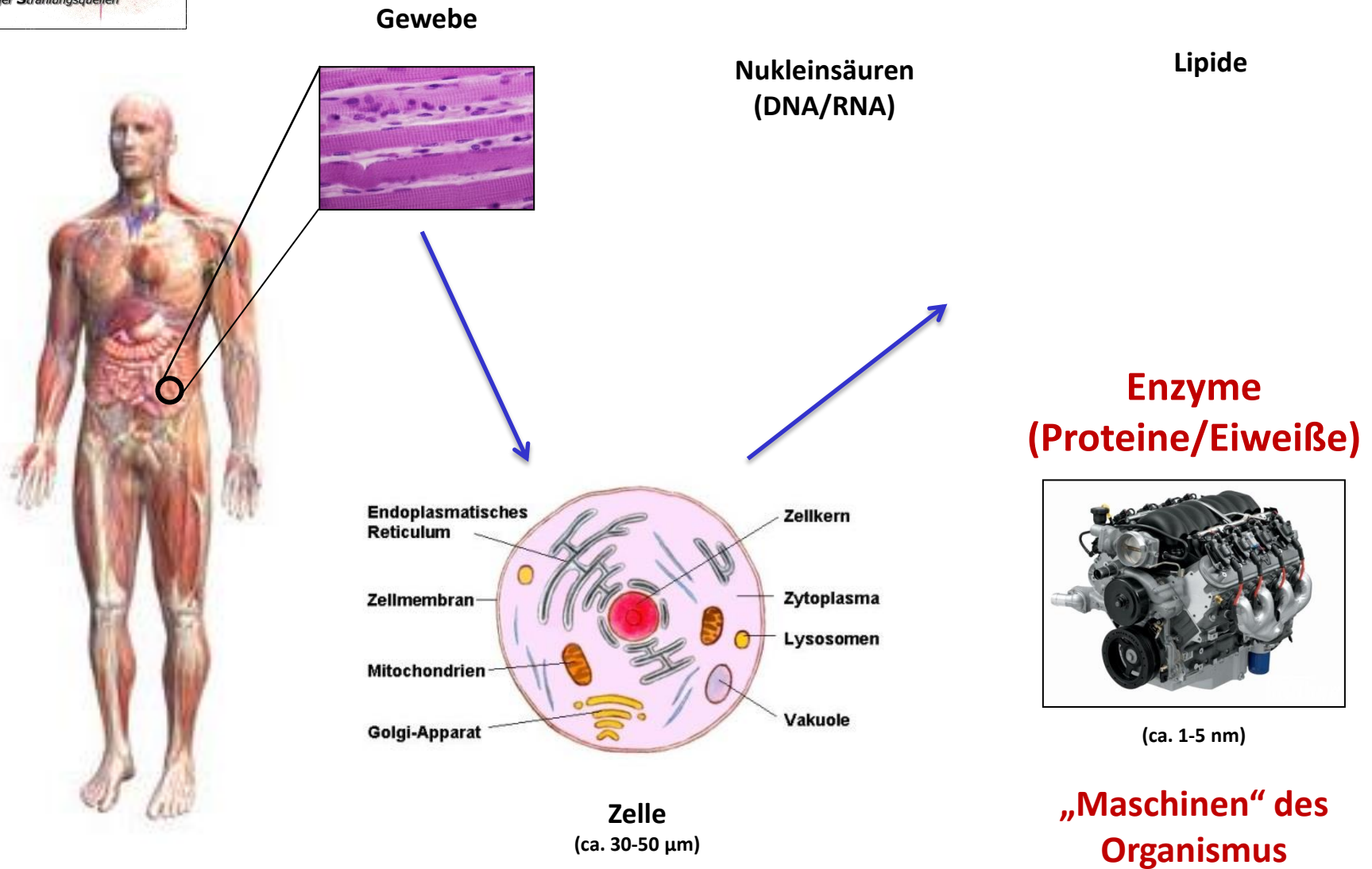
Strukturuntersuchung von biologischen Nanopartikeln mit Röntgenstrahlung

Lars Redecke

Strukturelle Infektionsbiologie unter Anwendung neuer Strahlungsquellen (SIAS)

Gemeinsames Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung der Universität Hamburg und der Universität zu Lübeck

Biologische Nanopartikel



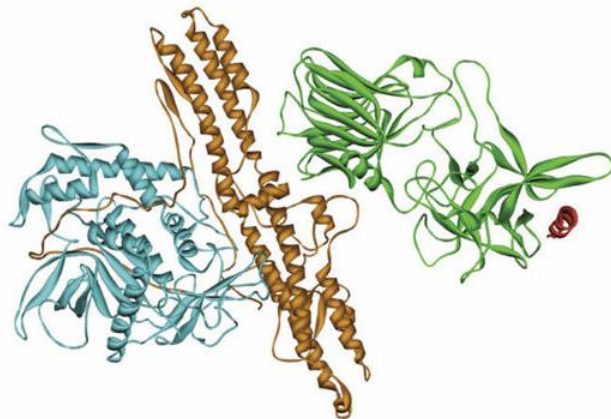
Proteinstrukturen

Trypsin-Inhibitor (58 aa)



36 Å, 8 kDa

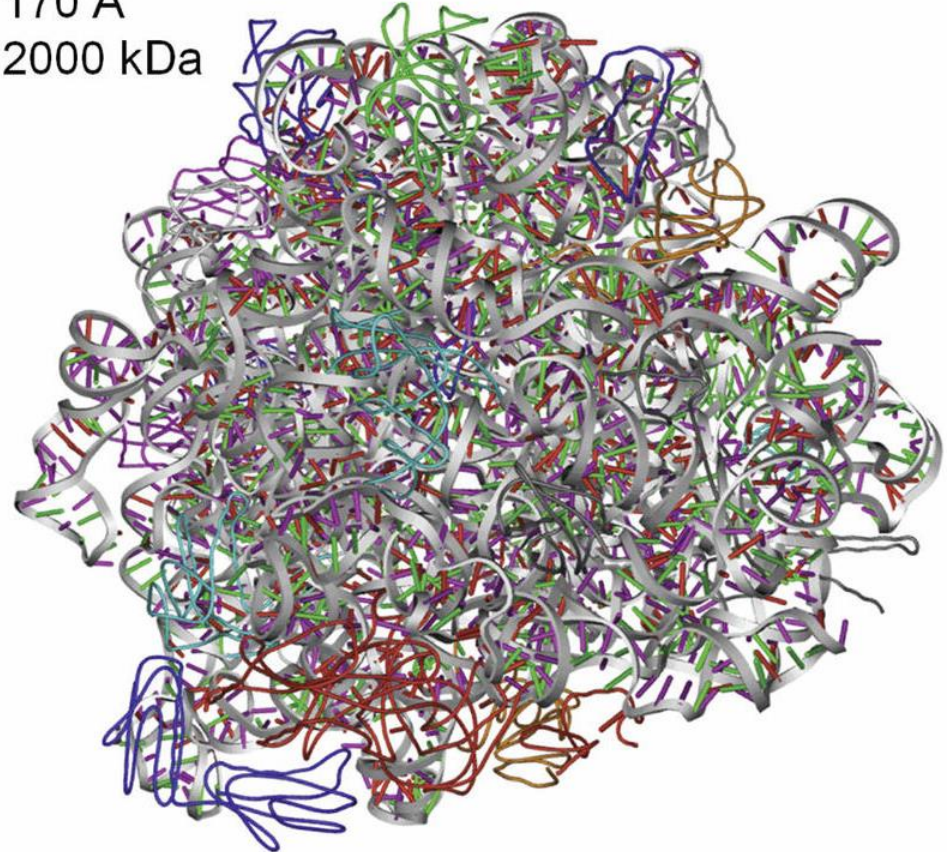
125 Å, 150 kDa



Botulinumtoxin (1,300 aa)

Ribosom, 50S Untereinheit

170 Å
 2000 kDa



PDBs: 1bpi, 3bta, 1ffk

Warum benötigen wir die Strukturbiologie?

Aufklärung der Struktur von Proteinen/Enzymen



**Verständnis der Funktion von Proteinen/Enzymen
(Struktur-Funktions-Beziehung!)**



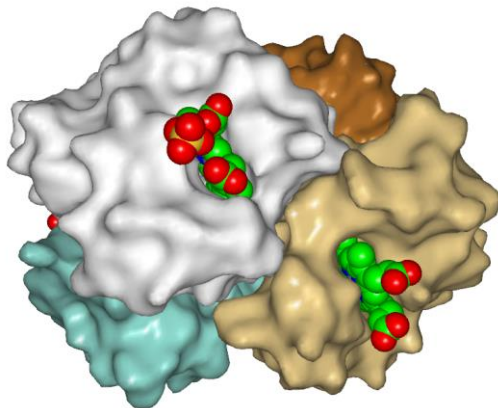
**Verständnis der Funktionsweise
des menschlichen Organismus**



**Entwicklung passgenauer
Wirkstoffe zur Behandlung von
Krankheiten / Infektionen**

Proteinstruktur

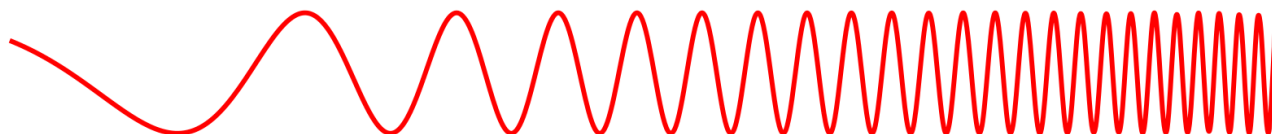
wenige nm (10^{-9} m)



Röntgenstrahlung!



„Röntgenmikroskop“ nicht möglich, keine geeigneten Linsen!

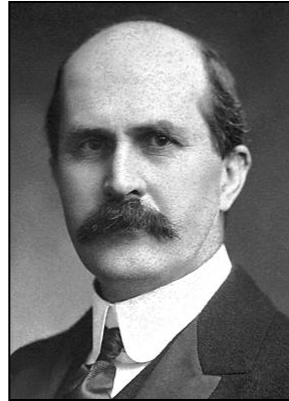
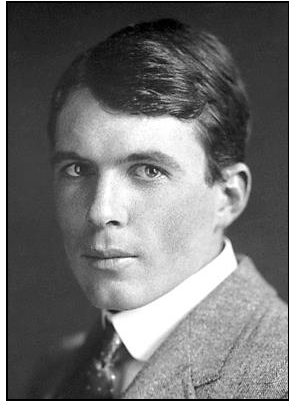


Radiowellen	Mikrowellen	Infrarot	Licht	Ultraviolett-	Röntgen-	Gammastrahlung
10^3	10^{-2}	10^{-5}	0.5×10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Gebäude	Menschen	Schmetterling	Nadelspitze	Einzeller	Moleküle	Atome
						Atomkerne

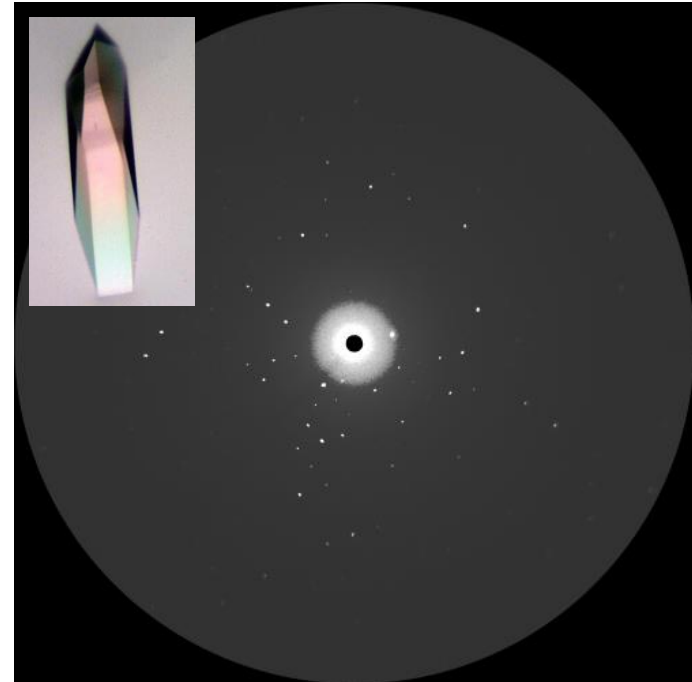


Wilhelm Conrad Röntgen
 (1845-1923)

Röntgenkristallographie



- **William Lawrence Bragg** (1890-1971)
William Henry Bragg (1862-1942)
- Röntgenstrahlung streut an Kristallen (1913)
- **1915 Nobelpreis für Physik**

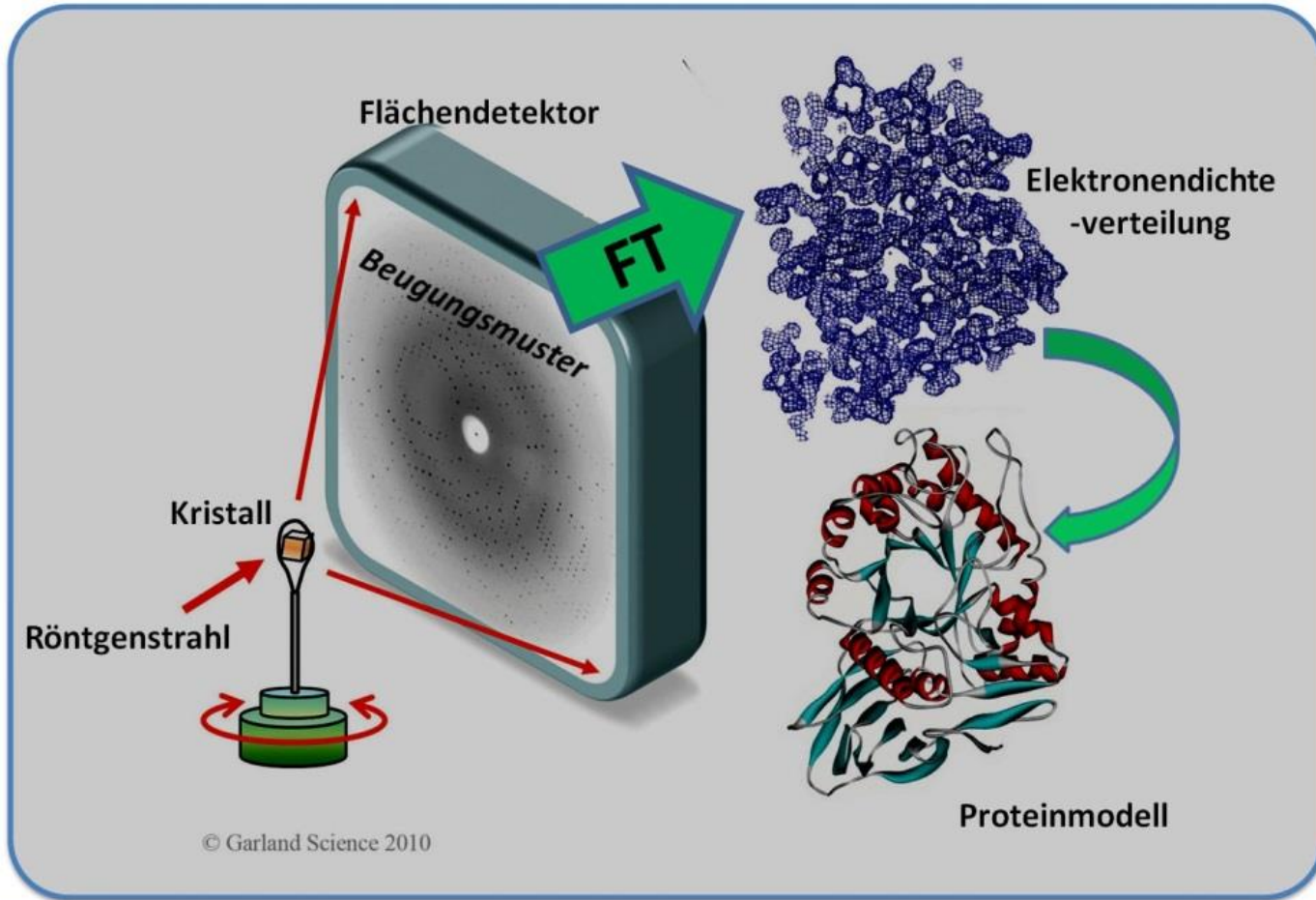


**Grundlagen der modernen
 Strukturbiologie**

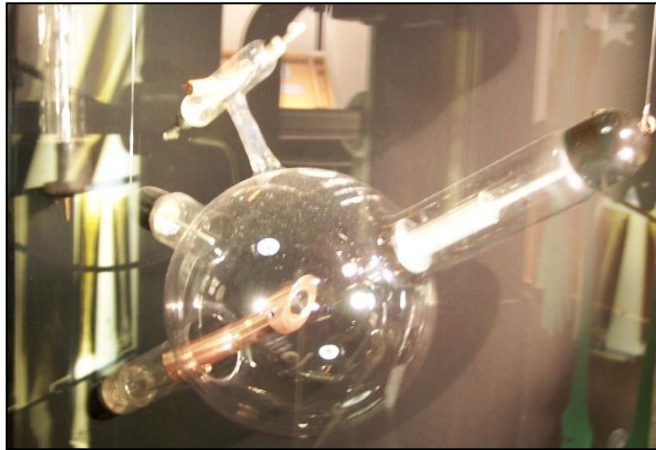
IYCr2014.de



Röntgenkristallographie

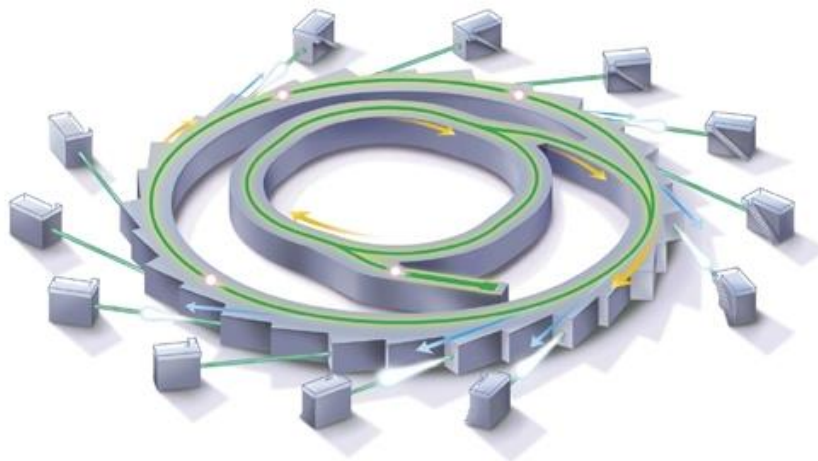
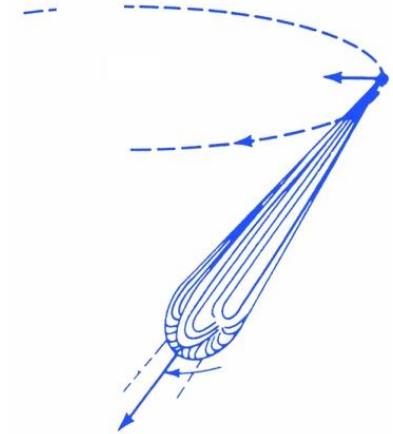


Synchrotronstrahlung



Klassische Röntgenröhre

Werden geladene Teilchen beschleunigt oder abgebremst, senden sie Strahlung aus



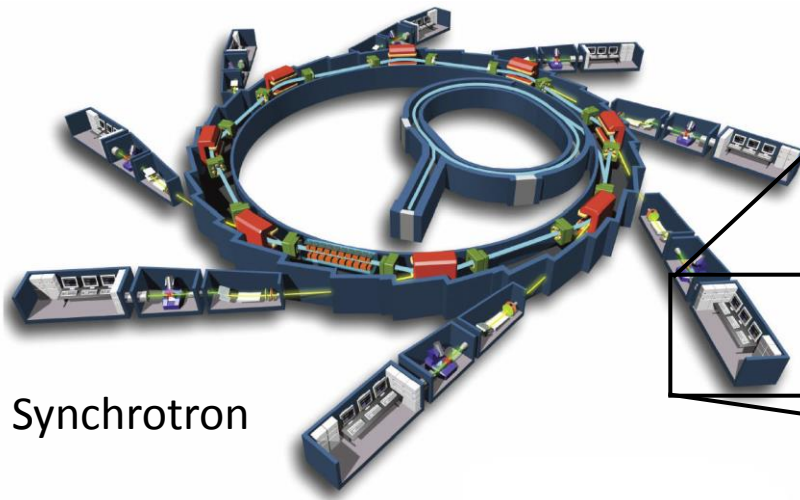
Synchrotronstrahlung:

- **Elektronen / Positronen** werden im **Hochvakuum** auf annähernd **Lichtgeschwindigkeit** beschleunigt und mit **Magneten** auf eine Kreisbahn gezwungen
- Abgegebene **Strahlung** wird fokussiert auf Experimente

Synchrotronstrahlungsquellen



Strukturanalyse mit Synchrotron-Strahlung

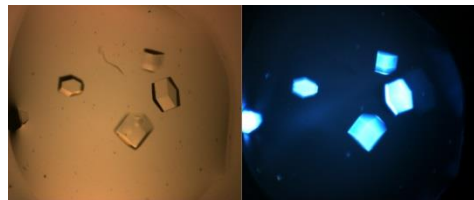


Synchrotron

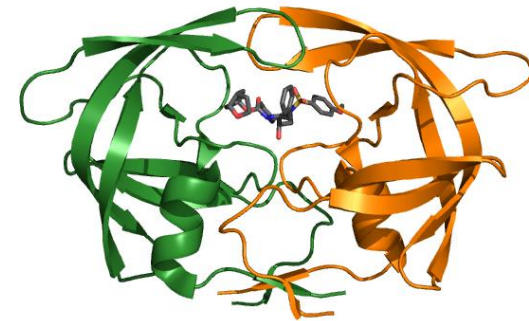


Beamline X13 @ DORIS storage ring
 (DESY/Hamburg)

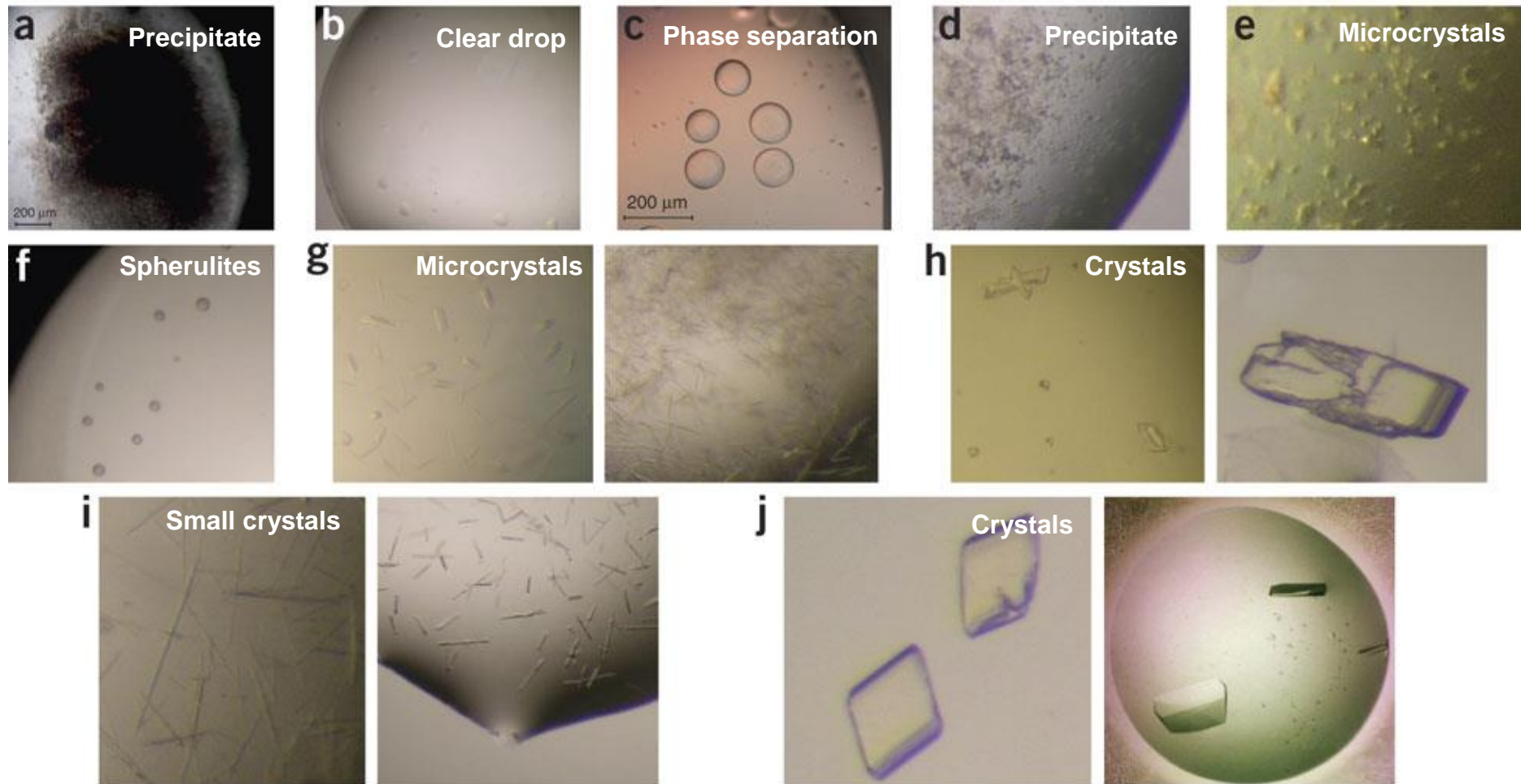
Beugungsbild



< 50 μm (approx. 10 μm)

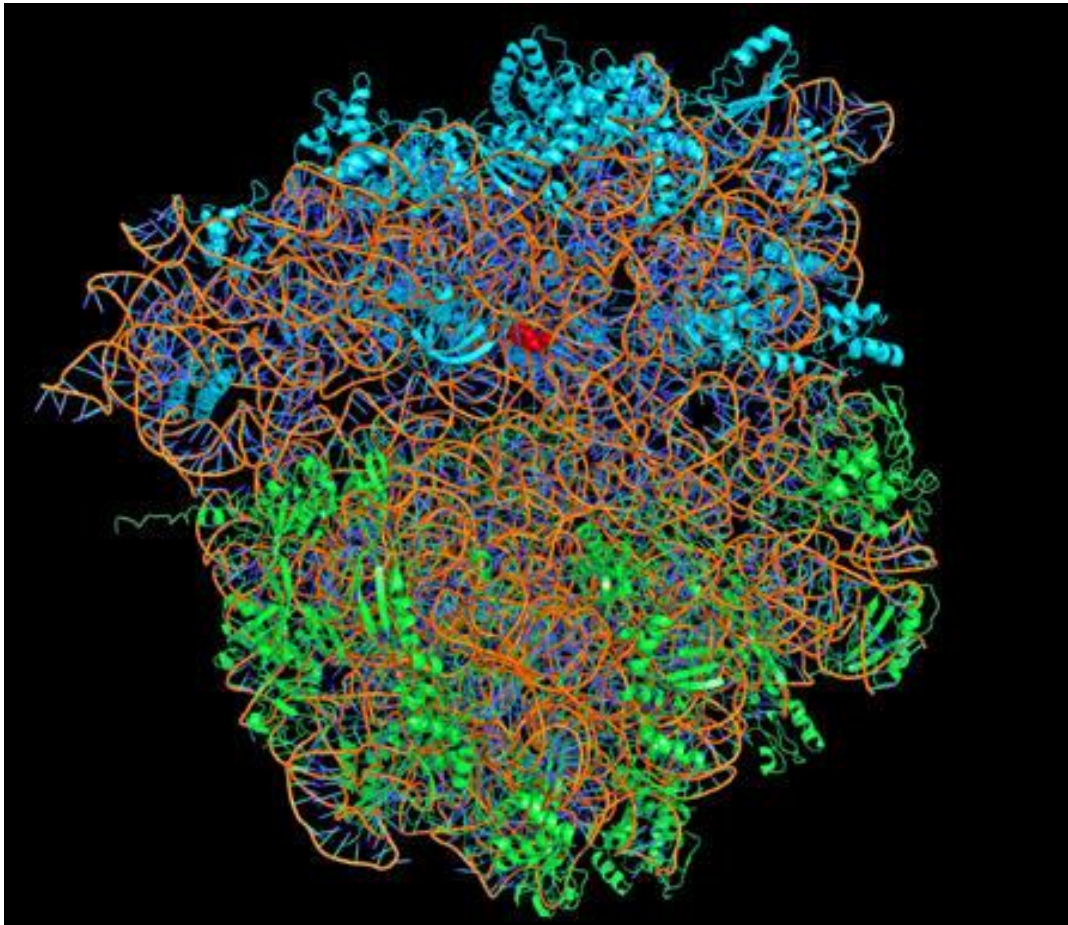


Proteinkristallisation



Benvenuti & Mangani, *Nature Protocols* **2**, 1633 - 1651 (2007)

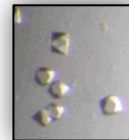
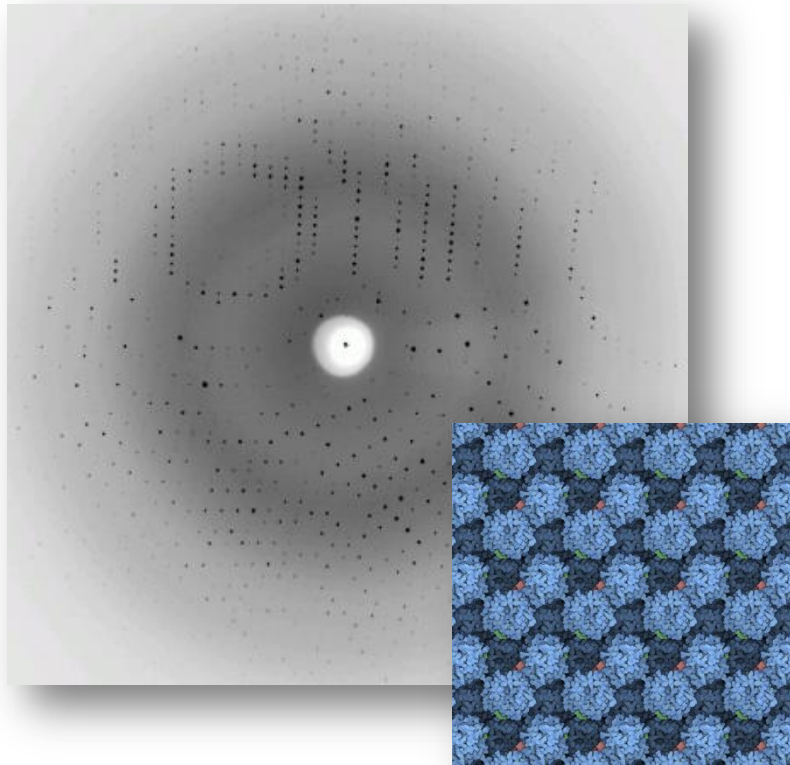
3D-Struktur eines bakteriellen Ribosoms



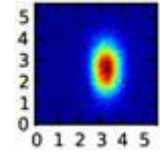
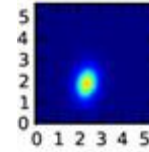
Nobelpreis Chemie 2009

**Ada E. Yonath
Thomas A. Steitz
Venkatraman Ramakrishnan**

Kristallgröße und Diffraktion



Kristallgröße



X-ray Intensität



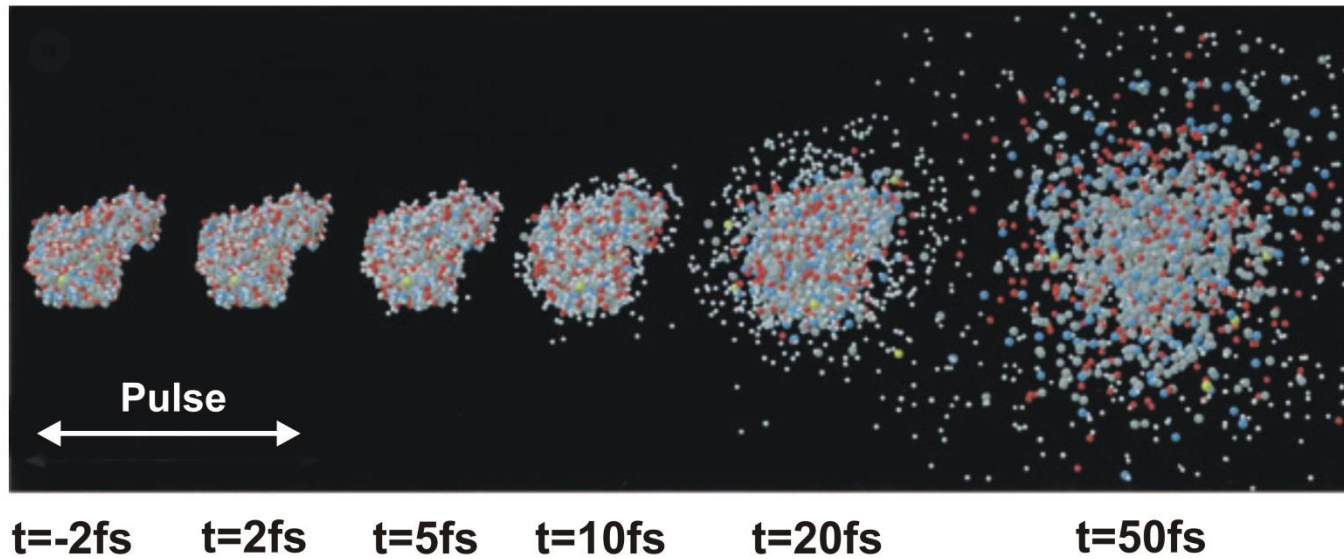
Strahlenschädigung

Beugung eines einzelnen Moleküls ist sehr schwach, für intensive Signale ist Verstärkung durch Kristall notwendig

Kristall der Neuraminidase der Vogelgrippe, nach Bestrahlung am ERSF bei 100k (www.bioch.ox.ac.uk/garmangroup)

Limitationen der Röntgenkristallographie

- Je **kleiner der Proteinkristall**, umso **höhere Energie** benötigt
- Extreme Energie der Strahlung **schädigt die Proteine** während der Messung

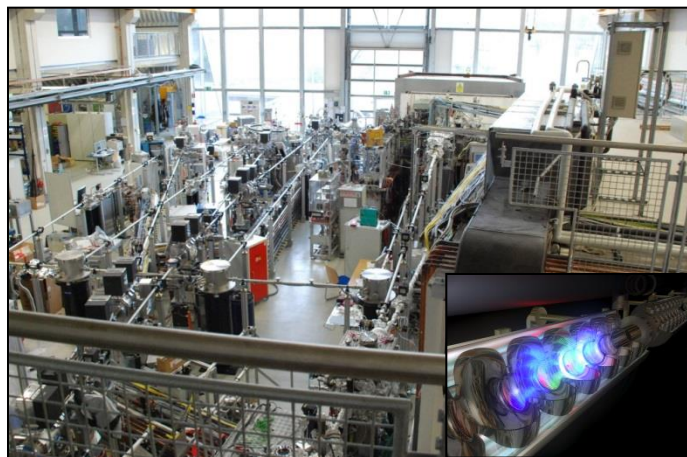


Theorie:

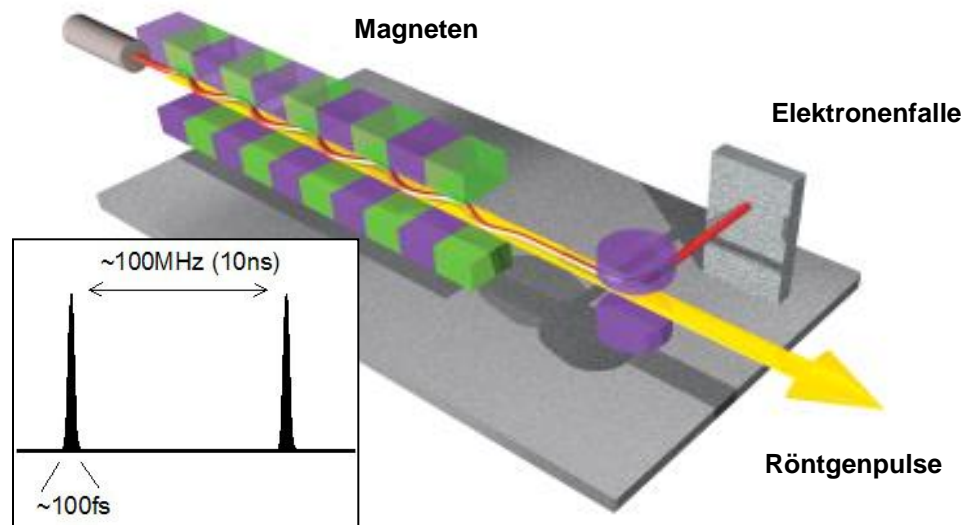
Ein Beugungsbild eines Proteins müsste mit Hilfe eines **ultrakurzen** und **extrem energiereichen Röntgenpulses** aufgenommen werden bevor die Probe explodiert.

Neutze, R. *et al.*, *Nature* 406, 752-757 (2000)

FLASH – Der weltweit erste Röntgenlaser



Elektronenquelle und Beschleuniger



Prinzip eines „Freie-Elektronen-Lasers“
(XFEL)

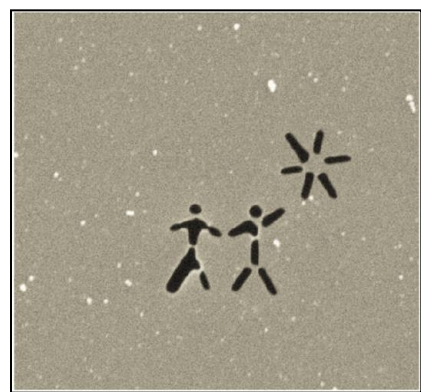
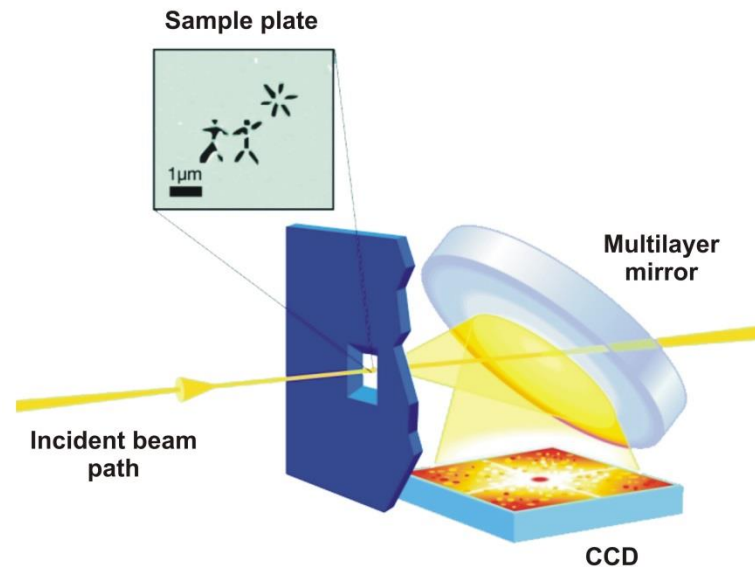
- 260 m Länge
- Röntgenpulse von **Femtosekunden-Länge** (10^{-15} s)
- Hohe Energie und “Brillanz”

FLASH – Der weltweit erste Röntgenlaser

Erstes Experiment am DESY in Hamburg

- Silikon-Membrane
- 25 fs X-rays mit $4 \times 10^{13} \text{ W cm}^{-2}$
- 10^{12} Photonen mit 32 nm Wellenlänge
- 60 Å max. Auflösung

→ **Beweis der “Beugung vor Zerstörung”**



FLASH-Puls

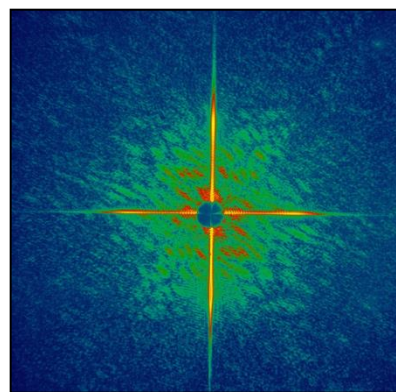
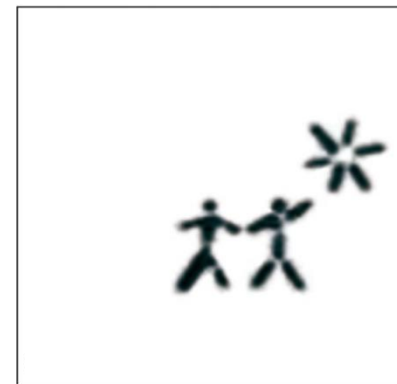
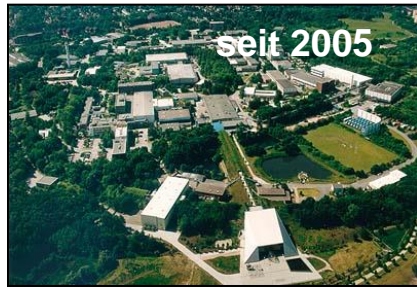


Bild-
Berechnung



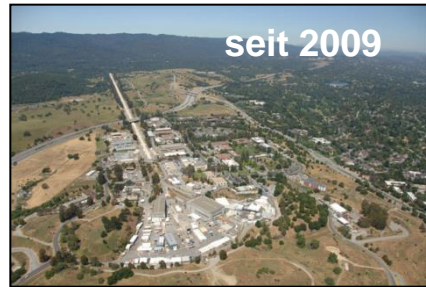
Chapman, H. et al., *Nature* 2, 839-843 (2006)

Freie-Elektronen-Laser (XFELs)



seit 2005

FLASH (DESY/GER)



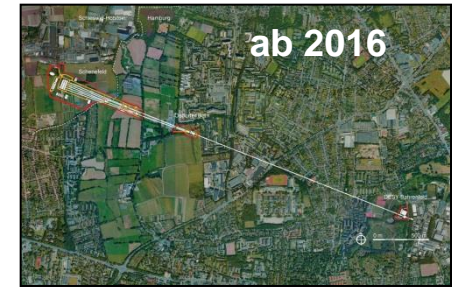
seit 2009

LCLS (SLAC/USA)



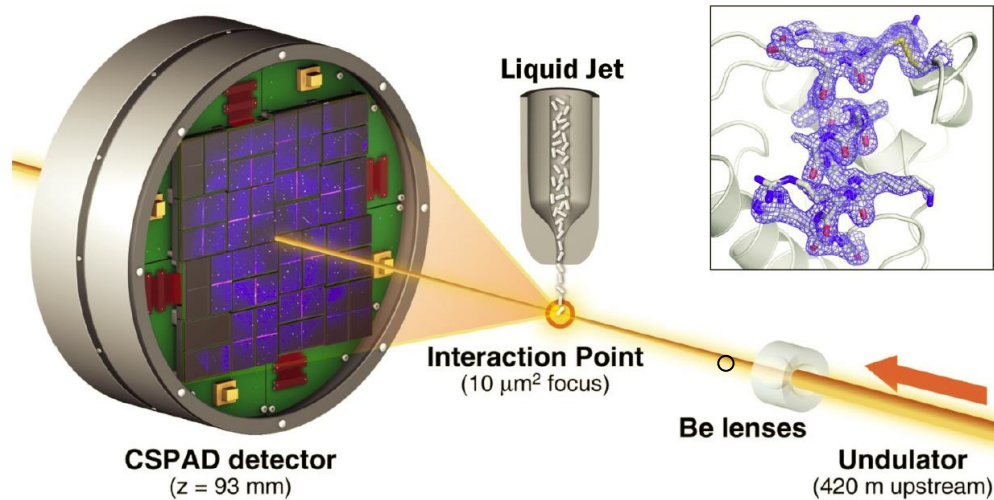
seit 2011

SACLA (RIKEN8/JAP)



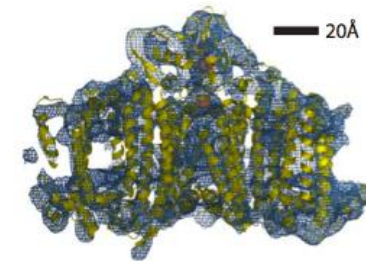
ab 2016

EU XFEL (DESY/GER)



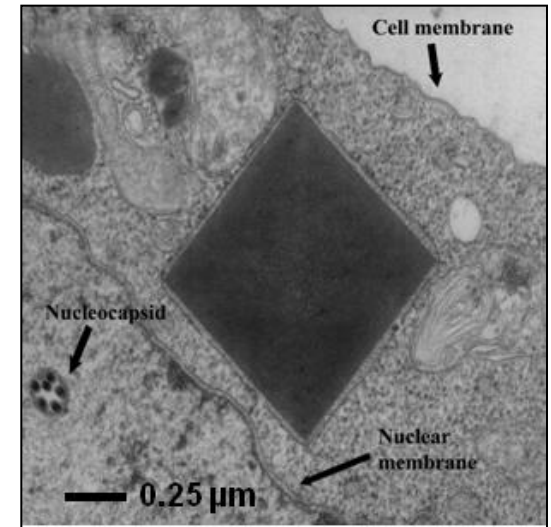
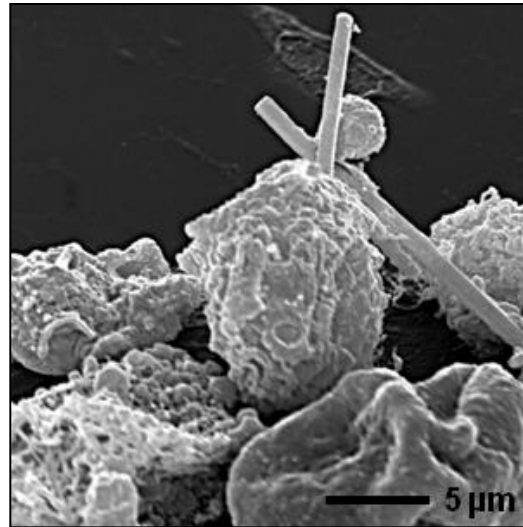
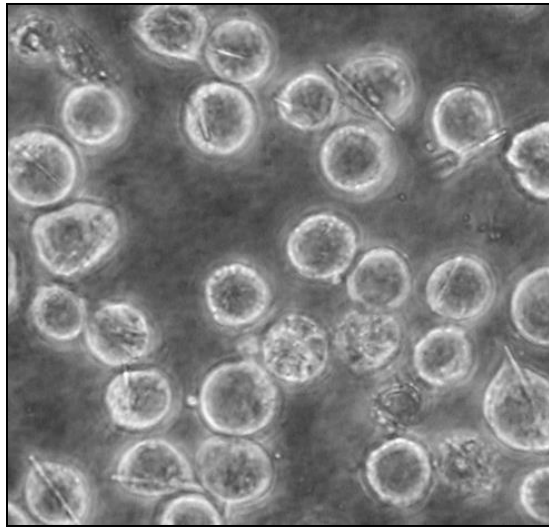
Serielle Femtosekunden Kristallographie (SFX)

100 – 500 nm Kristalle des
 Membranproteins Photosystem I

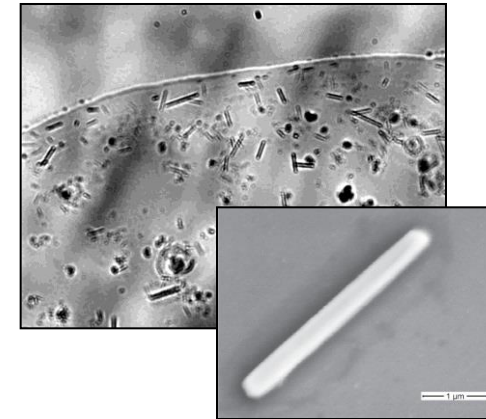


Chapman, H. et al., *Nature* 470, 73-78 (2011)
 Boutet, S. et al. ... Redecke, L. et al., *Science* 337, 362-364(2012)

In vivo-Kristallisation von Proteinen



- **Protease Cathepsin B** des Parasiten *Trypanosoma brucei* (TbCatB)
- Rekombinante Genexpression in Baculovirus-infizierten **Sf9-Insektenzellen**
- Kristalle von Membran mit Ribosomen umgeben – **Ursprung der Kristallisation im ER?**



Koopmann*, Kupelli*, Redecke* *et al.*, *Nat. Methods* 9, 259-262 (2012)

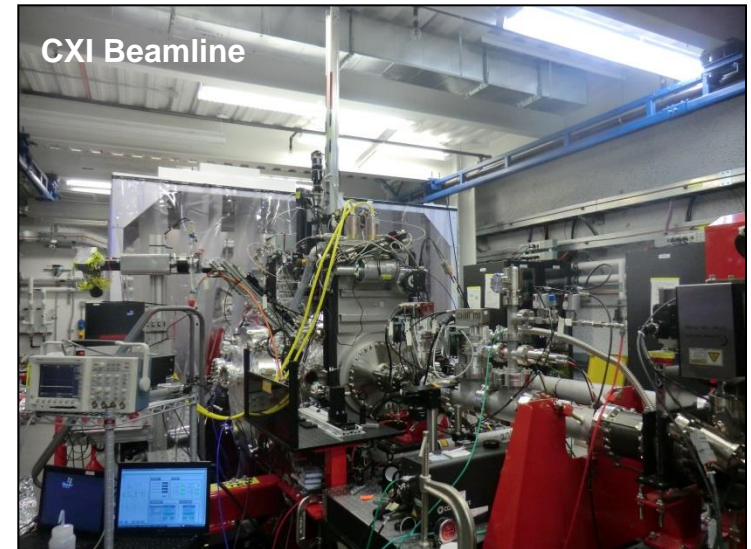
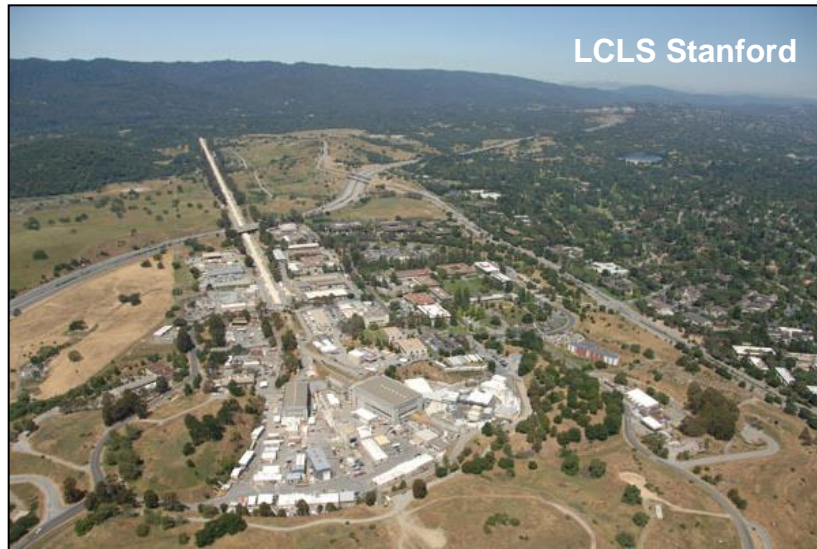
In vivo-Kristallisation von Cathepsin B



In vivo-Kristallisation von Cathepsin B



Serielle Femtosekunden Kristallographie (SFX)



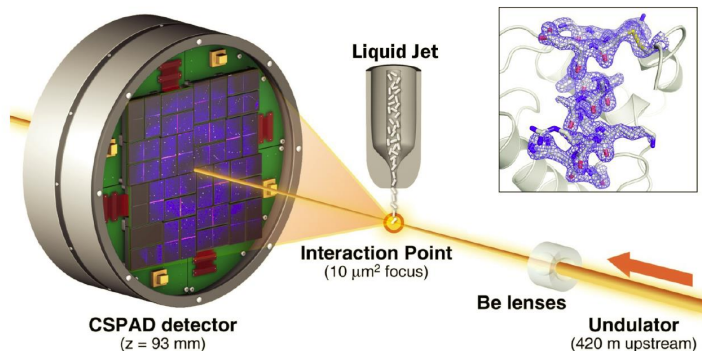
- Upgrade des LCLS-Lasers 2011
- Höchste Strahlungsenergie der Welt (bisher)
- 9.4 keV (1.32 Å Wellenlänge)
- 7200 Detektorbilder pro Sekunde
- 5-40 fs X-ray Pulse



Launch of Fourth LCLS Instrument Reveals Crisp, Fine Molecular Detail

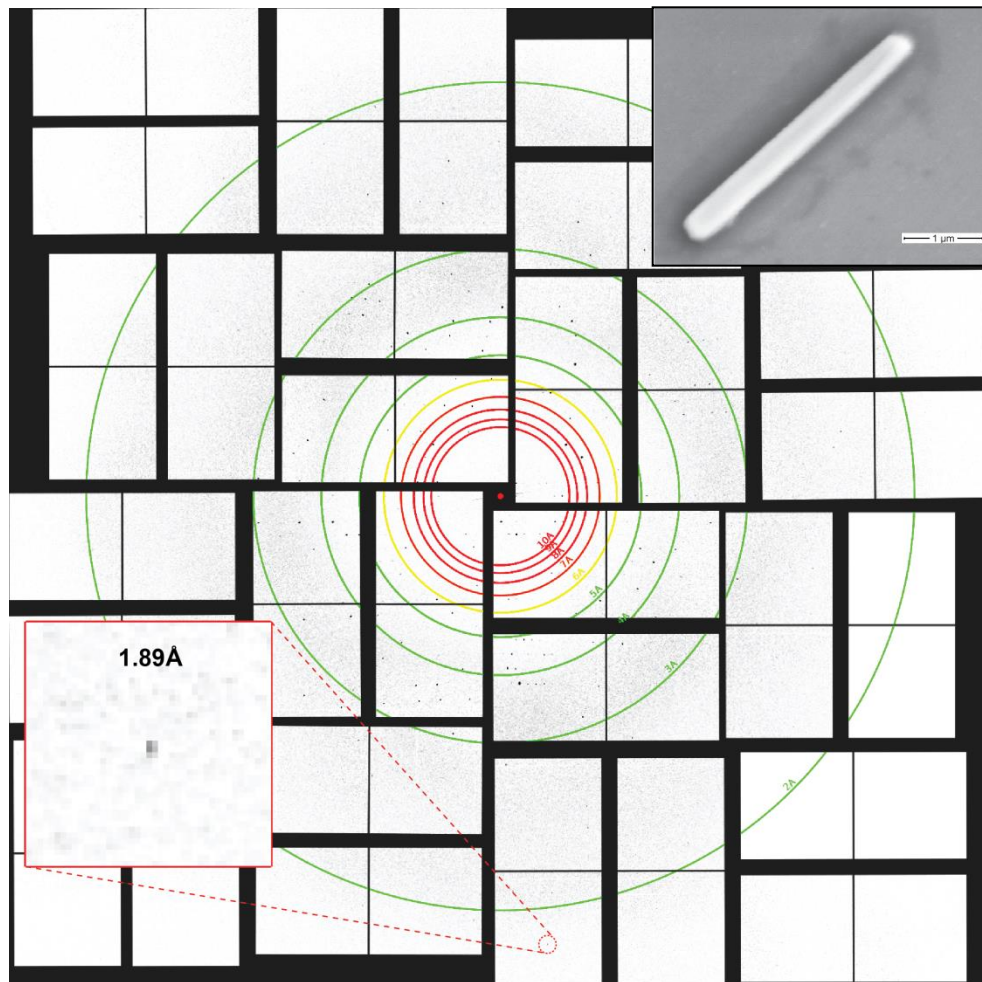
SFX-Untersuchung von CatB *in vivo*-Kristallen

CXI-Beamline des LCLS (Stanford, USA):



- 8 h Datensammlung
- 3,953,201 aufgenommene Detektorbilder
- 357,555 Bilder mit Bragg-Spots (9%)
- 156,565 Bilder erfolgreich prozessiert

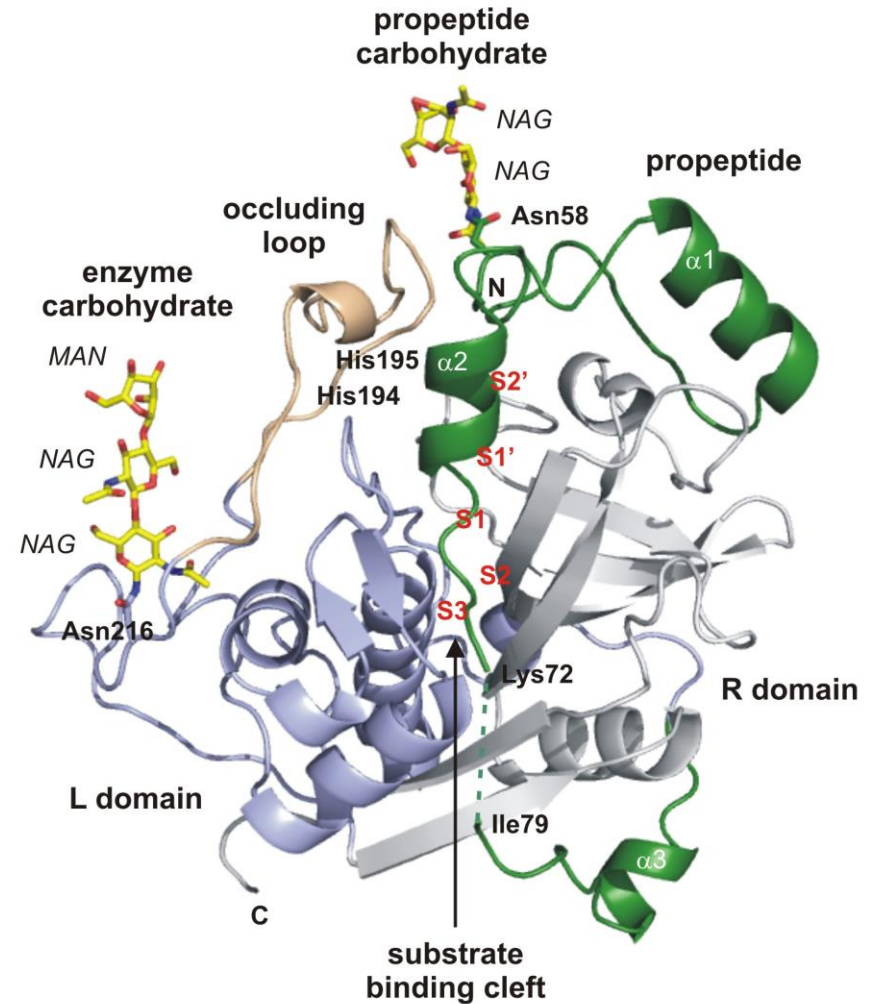
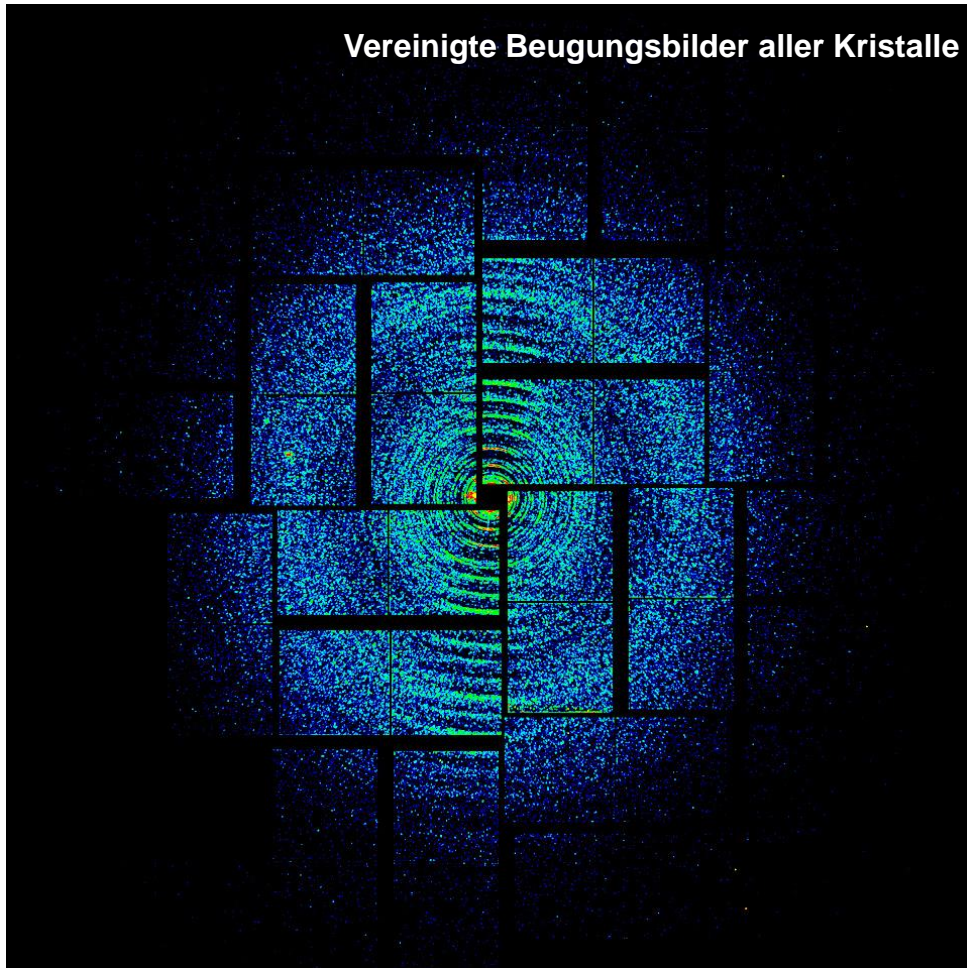
**Vollständige Strukturinformation
 bis 2.1 Å Auflösung!**



L. Redecke*, K. Nass* *et al.* *Science* 339, 227-230 (2013)

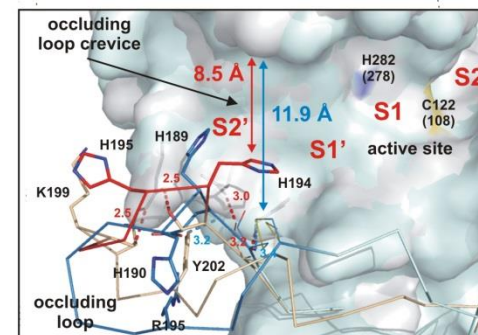
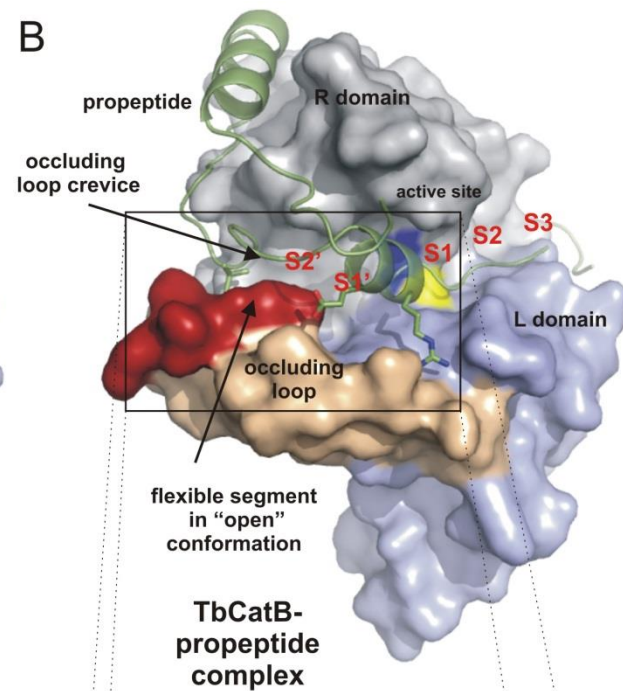
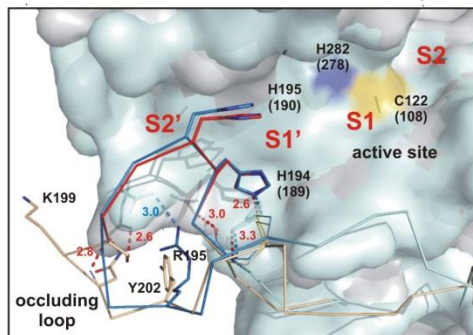
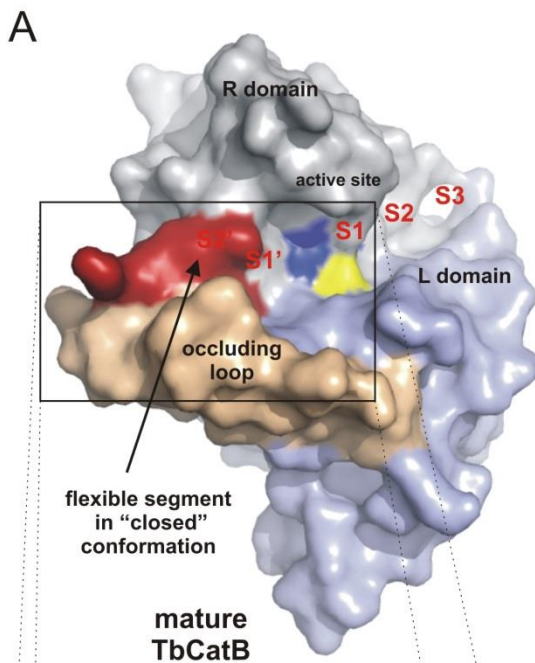
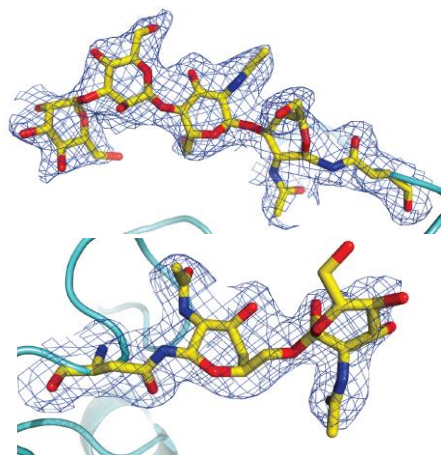
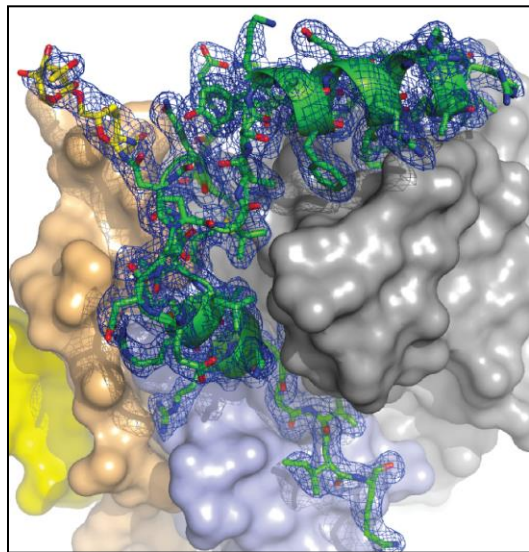
SFX-Untersuchung von CatB *in vivo*-Kristallen

Vereinigte Beugungsbilder aller Kristalle



L. Redecke*, K. Nass* *et al.* *Science* 339, 227-230 (2013)

SFX-Untersuchung von CatB *in vivo*-Kristallen



L. Redecke*, K. Nass* *et al. Science* 339, 227-230 (2013)

Erste neue Strukturinformation mittels XFEL

Natively Inhibited *Trypanosoma brucei* Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser

Lars Redecke,^{1,2†} Karol Nass,^{3,4†} Daniel P. DePonte,³ Thomas A. White,³ Dirk Rehders,¹ Anton Barty,³ Francesco Stellato,³ Mengning Liang,³ Thomas R.M. Barends,^{5,6} Sébastien Boutet,⁷ Garth J. Williams,⁷ Marc Messerschmidt,⁷ M. Marvin Seibert,⁷ Andrew Aquila,³ David Arnlund,⁸ Sasa Bajt,⁹ Torsten Barth,¹⁰ Michael J. Bogan,¹¹ Carl Caleman,³ Tzu-Chiao Chao,¹² R. Bruce Doak,¹³ Holger Fleckenstein,³ Matthias Frank,¹⁴ Raimund Fromme,¹² Lorenzo Galli,^{3,4} Ingo Grotjohann,¹² Mark S. Hunter,^{12*} Linda C. Johansson,⁸ Stephan Kassemeyer,^{5,6} Gergely Katona,⁸ Richard A. Kirian,^{3,13} Rudolf Koopmann,¹⁰ Chris Kupitz,¹² Lukas Lomb,^{5,6} Andrew V. Martin,³ Stefan Mogk,¹⁰ Richard Neutze,⁸ Robert L. Shoeman,^{5,6} Jan Steinbrener,^{5,6} Nicusor Timneanu,¹⁵ Dingjie Wang,¹³ Uwe Weierstall,¹³ Nadia A. Zatsepin,¹³ John C. H. Spence,¹³ Petra Fromme,¹² Ilme Schlichting,^{5,6} Michael Duszynski,¹⁰ Christian Betzel,^{16‡} Henry N. Chapman^{3,4‡}

www.sciencemag.org **SCIENCE** VOL 339 11 JANUARY 2013

STRUCTURAL BIOLOGY

News Flash: X-ray Laser Produces First Protein Structure

30 NOVEMBER 2012 VOL 338 **SCIENCE** www.sciencemag.org

BIOCHEMISTRY

How to Solve Protein Structures with an X-ray Laser

John R. Helliwell 11 JANUARY 2013 VOL 339 **SCIENCE** www.sciencemag.org

Small is beautiful

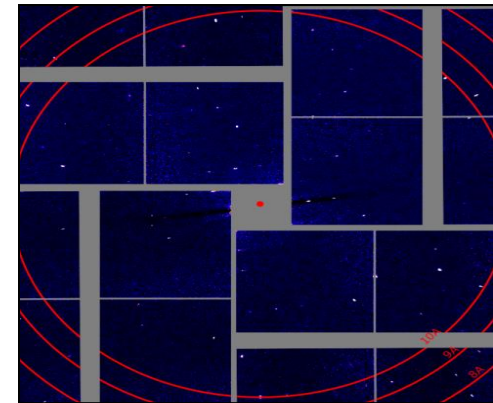
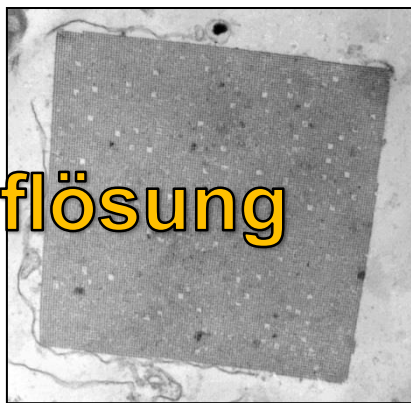
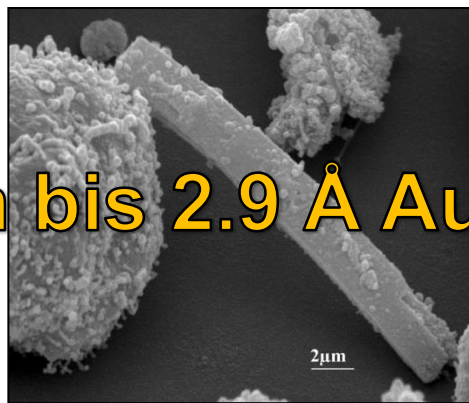
Keith Moffat *Nat. Methods* 9, 242-243 (2012)

"The advance demonstrates the potential of X-ray lasers to decipher proteins that conventional X-ray sources cannot"

(Science 338, 21 December 2012)

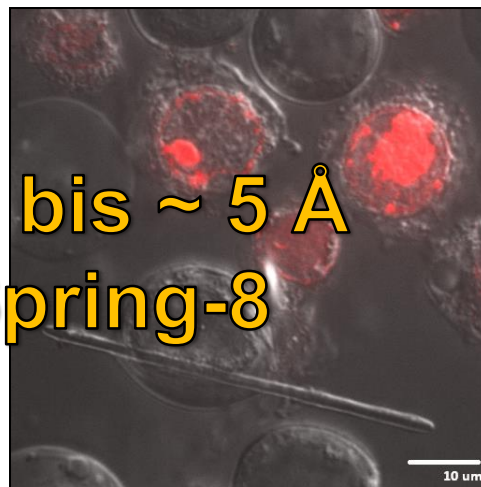


In vivo-Kristallisation weiterer Proteine



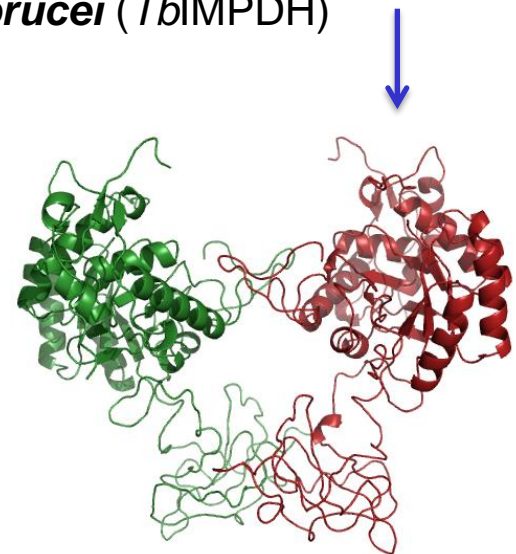
SFX-Daten bis 2.9 Å Auflösung

Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase des Parasiten *Trypanosoma brucei* (TbIMPDH)



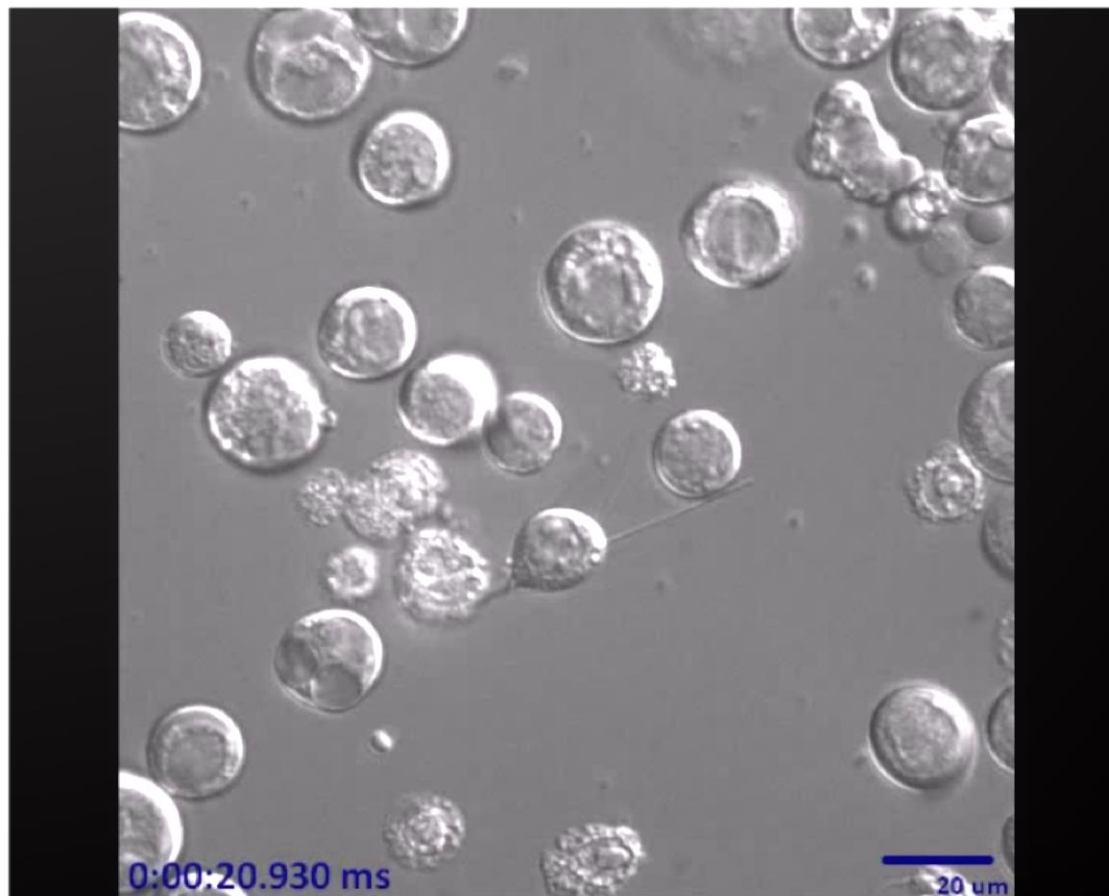
**Beugungsdaten bis ~ 5 Å
 Auflösung am Spring-8**

Luciferase aus dem Leuchtkäfer

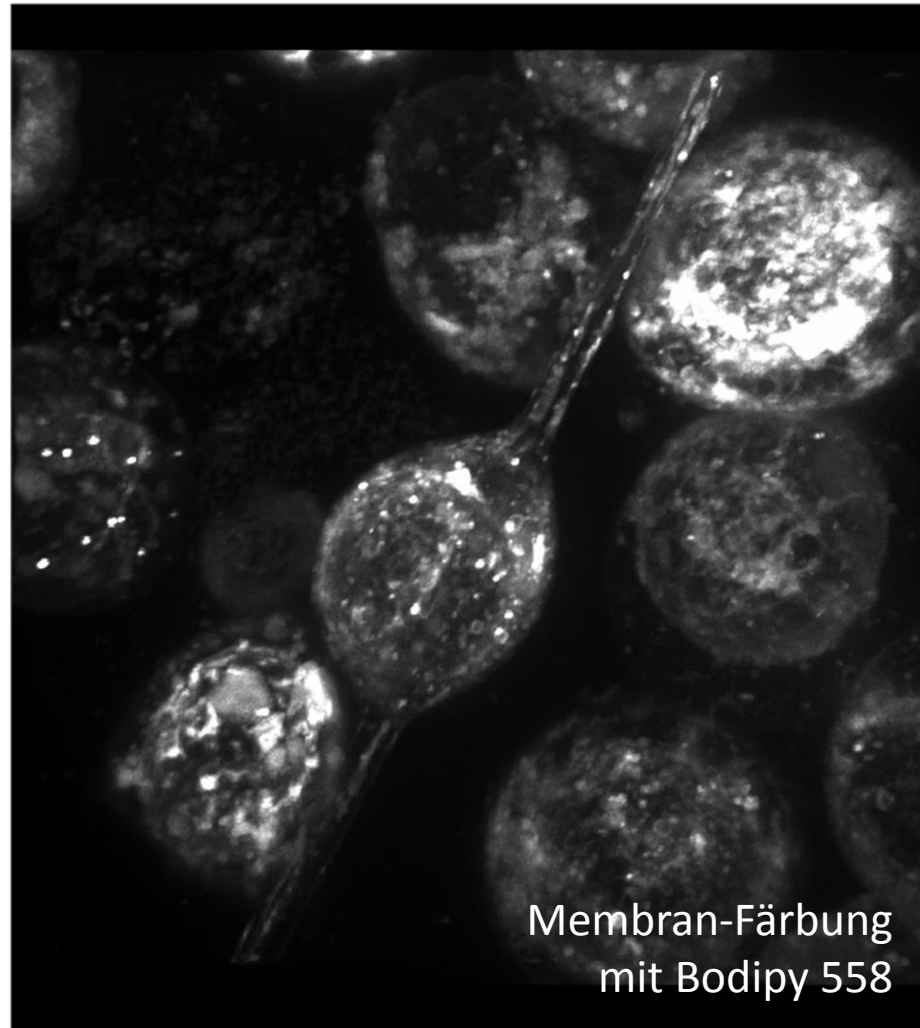


L. Redecke*, K. Nass* *et al.* (2014), to be submitted
 R. Schönherr*, M. Klinge*, ... , and L. Redecke (2014), to be submitted

In vivo Protein-Kristallisation der Luciferase

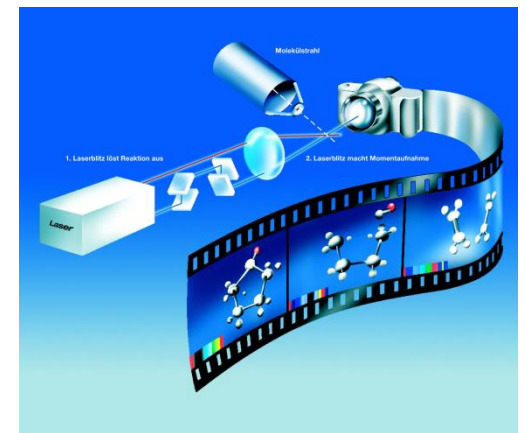


In vivo Protein-Kristallisation der Luciferase



- **Freie-Elektronen-Laser (XFELs)** bieten **neue Möglichkeiten** für die Strukturbiologie:
 - Analyse extrem **kleiner Kristalle**
 - **Keine Strahlenschädigung**
- **Kristallisation** kann auch **in lebenden Zellen (*in vivo*)** erfolgen
- ***In vivo*-Kristalle** eignen sich perfekt für die neue **Serielle Femtosekunden-Kristallographie (SFX)** an XFELs
- ***In vivo*-Kristallisation** scheint **nicht selten** zu sein
- Kombination der ***in vivo*-Kristallisation** und der **SFX-Technik** liefert **neue Möglichkeiten für die Strukturbiologie**, (vor allem wenn die zellulären Mechanismen der *in vivo*-Kristallisation verstanden sind)

Die Zukunft – der Europäische XFEL





Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Deutsches Zentrum
für Luft- und Raumfahrt e.V.
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Kooperationen

University of Havana (Cuba):

Maya de los Angeles Chavez
Rossana Garcia-Fernandez

DKFZ Heidelberg:

Jean Rommelaire

University of Leiden (NED):

Claude Backedorf

CFEL @ DESY, Hamburg:

Henry Chapman
Karol Nass, Daniel DePonte,
Thomas A. White, Francesco
Stellato, Mengning Liang, Anton
Barty, Dominik Oberthür

SLAC, Stanford (USA):

Michael J. Bogan
Sebastien Boutet
Garth J. Williams

NTU Singapore

University of Lübeck:

Rolf Hilgenfeld
Norbert Tautz
Olaf Isken

Rainer Duden
Robert Schönherr
Enno Hartmann

Arizona State University (USA):

John C.H. Spence
Petra Fromme
Mark S. Hunter
Uwe Weierstall

MPI Heidelberg:

Ilme Schlichting
Robert L. Shoeman
Lukas Lomb

HPI Hamburg:

Thomas Dobner

University of Hamburg:

Christian Betzel
Michael Rübhausen
Stephan Binder

University of Tübingen:

Michael Duszenko
Rudolf Koopmann
Thilo Stehle

University Santiago de Compostela (Spain):

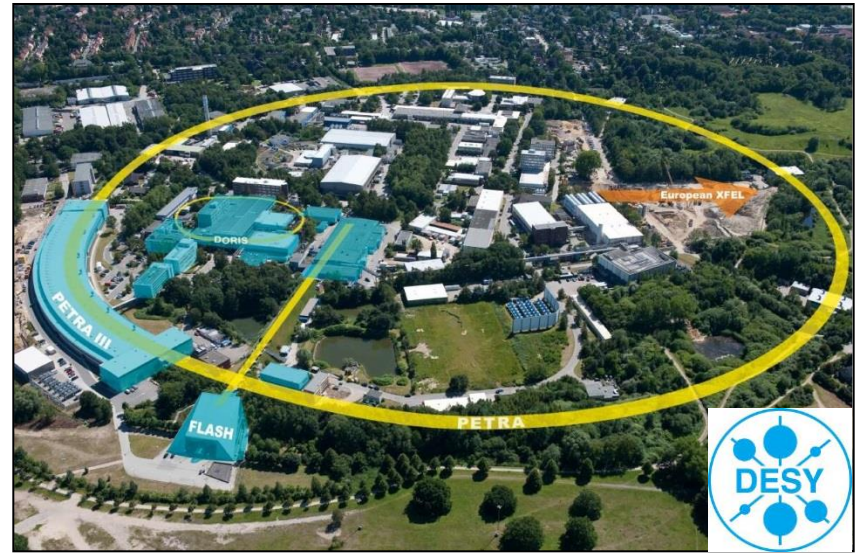
Jose Martinez-Costas

University of Gothenburg (Sweden):

Richard Neutze

University of Uppsala (Sweden):

Janos Haidu
Marvin M. Seibert



www.juniorgroup-sias.de