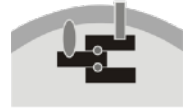


Laborversuch: Lysozym-Kristallisation



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Forschung: Kristallisation von Proteinen

Liebe Schülerinnen und Schüler,
mein Name ist Oliver Daumke und ich leite hier am Max Delbrück Zentrum
eine Arbeitsgruppe für Strukturbiologie.

Hallo ich bin Tobi und ich bin bei Oli in der Forschungsgruppe seit 5 Jahren ...
... und ich bin Katja und - wie Tobi - Postdoc in Olis Gruppe.

Um zu verstehen, wie unser menschliches Nervensystem seine unterschiedlichen Aufgaben erfüllt,
untersuchen wir Strukturbiolog:innen die Proteine, der Nervenzellen.
Und dabei schauen wir ganz genau hin, bis auf die atomare Ebene.

Die Strukturaufklärung von komplexen Proteinen kann Monate, wenn nicht gar Jahre dauern.
Wir beschäftigen uns daher heute mit der Strukturaufklärung eines Modellproteins der
Strukturbiologie:
mit der des Lysozyms.

Lysozym ist ein Protein, was bei uns in der Augenflüssigkeit vorkommt, es schützt unsere Augen
vor bakteriellen Infektionen.

Und nun zeigen euch Katja und ich die verschiedenen Arbeitsweisen,
die Strukturbiolog:innen beherrschen sollten.

Fragestellung / Recherche

Als allererstes überlegen wir, welche Fragestellung wir eigentlich klären wollen.

Da wir Strukturbiolog:innen sind, sind wir natürlich an der 3dimensionalen Struktur von Proteinen
interessiert!

Es ist aber auch wichtig, wo kleine Kraftstoffmoleküle an unser Protein binden.

Wie verändert sich die räumliche Struktur unseres Proteins, wenn es arbeitet?

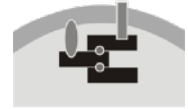
Zu jeder dieser Fragestellungen können wir eine Struktur machen.

Aber erstmal recherchieren wir, was andere Forscher*innen dazu schon herausgefunden haben.

Dazu suchen wir in wissenschaftlichen Datenbanken, oder wir fragen Kolleg*innen, die bereits an
dem Protein geforscht haben.

Und wenn wir wissen, welches Protein wir uns genauer anschauen wollen, geht es ins Labor.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Forschung: Kristallisation von Proteinen

Protein-Herstellung

Denn wir können unser Protein leider nicht kaufen, sondern müssen es uns selbst herstellen.

Durch unsere Recherche kennen wir zum Glück die DNA Sequenz, welche den Bauplan unseres Zielproteins enthält und bringen diese dann in Bakterien ein.

Die sind nämlich recht einfach in der Handhabung, die brauchen nur 37 Grad, ein Nährmedium aus Aminosäuren und dann noch ein bisschen schütteln.

Und das ist das, was sie hier in diesem Inkubator machen, hier schütteln die Bakterien bei gemütlichen 37 Grad vor sich hin. Nach einer Nacht können wir sie dann ernten.

Dazu muss die Nährlösung von den Bakterien getrennt werden, damit wir an unser Protein kommen. Dazu haben wir eine Zentrifuge die sich sehr schnell dreht, 4500 Umdrehungen pro Minute für 20 min. Das ist schneller als eine Waschmaschine im Schleudergang. Die schweren Bakterien setzen sich am Boden ab und die Nährlösung kann dann einfach abgegossen werden.

Reinigung

Die Bakterien enthalten aber jetzt ihre eigenen Proteine und zusätzlich unser Zielprotein, dessen DNA wir ja dort eingeschleust hatten. Um an die Proteine heranzukommen, müssen wir die Bakterien zunächst aufbrechen und die Membranen zerstören. Blöderweise haben wir dann eine Mischung aus bakterieneigenen Proteinen und unserem Zielprotein.

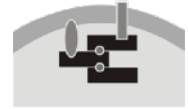
Das ist aber kein Problem, denn wir können die Proteine voneinander trennen.

Das machen wir über eine Chromatographieanlage. Wir spritzen den Proteincocktail hinein und dann wird er über sogenannte Säulen gepumpt, die wie winzige Siebe arbeiten.

Am Ende kommen die Proteine hinter der Säule wieder raus, diesmal allerdings nach ihrer Größe sortiert und in einem automatischen Probensammler aufgefangen. In jedem Röhrchen sind also nur Proteine einer Größe, wobei im letzten Röhrchen die kleinsten Proteine zu finden sind.

Der Computer zeigt uns anhand der Aufnahme von UV-Licht, in welchem Röhrchen sich unser Zielprotein befindet.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Forschung: Kristallisation von Proteinen

Kristallisation

Jetzt endlich haben wir es: unser Zielprotein in Reinform.

Um seine Struktur zu bestimmen, müssen wir es vermessen.

Jedoch wäre das Signal eines einzelnen Proteins viel zu gering zum Messen.

Um das Signal zu verstärken, benutzen wir einen Trick: Wir lassen es kristallisieren, weil wir wissen, dass sich in einem Kristall ganz viele Moleküle unseres Proteins in einem geordneten Gitter zusammenfinden.

Leider ist es oft nicht klar, unter welchen Bedingungen ein Kristall gebildet wird. Deshalb setzen wir einfach möglichst viele Bedingungen an, und testen, wann es klappt.

Das Ansetzen der vielen unterschiedlichen Lösungen wird vollautomatisch mit dem Kristallisationsroboter gemacht. Dafür brauchen wir diese Platten hier, mit 96 Löchern. Pro Protein setzen wir ca. 10 - 15 Platten an und können so in ungefähr 3 Stunden über 1000 verschiedene Bedingungen herstellen.

Bis aber wirklich ein Kristall wächst, kann es eine ganze Zeit dauern.

Das kann in seltenen Fällen in wenigen Stunden passieren, normalerweise aber dauert das Tage bis Wochen, selten sogar Jahre.

Weil man diese vielen Ansätze von Hand am Mikroskop so schlecht überwachen kann, haben wir sogenannte Kristallisationshotels.

Hier werden die Ansätze bei 4 oder 20°C eingelagert und vollautomatisch in bestimmten Abständen aus ihrem "Zimmer" geholt und von einer Kamera fotografiert.

Und ja, manchmal liegen die hier dann eben jahrelang drin, und wir verfolgen am PC, ob da etwas passiert oder nicht.

Klingt spannend, ist es auch.

Und es ist leider so, dass nur ganz wenige dieser vielen Ansätze zu Kristallen führen.

Viele Platten enthalten auch nach langer Zeit keine Kristalle.

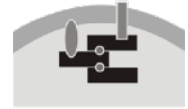
In dieser Übersicht sehen wir die 96 Fotos von einer Platte zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Wir können uns aber auch die Fotos von einem bestimmten Ansatz über eine bestimmte Zeit ansehen:

nach einem Tag, nach 2 Tagen nach 1 Woche, nach 2 Wochen

und dann ist es ein schönes Gefühl und ein echtes Erfolgserlebnis, wenn wir wirklich Kristalle entdecken und ihnen quasi beim Wachsen zugucken können.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Forschung: Kristallisation von Proteinen

Und jetzt seid ihr gefragt:

Findet heraus, unter welchen Bedingungen euer Modellprotein Lysozym die größten Kristalle bildet. Das Schöne daran ist Lysozym kristallisiert innerhalb von wenigen Minuten.

Das heisst, ihr könnt live dabei sein und live zugucken.

Viel Spaß dabei!

Teil 2:

Nachdem unser Zielprotein von Bakterien hergestellt wurde, haben wir es mit der Chromatografieanlage gereinigt. Anschließend haben wir versucht das Zielprotein zu kristallisieren, indem wir es in viele verschiedene Lösungen gegeben haben.

Und nach Wochen bzw. Monaten haben wir es geschafft, dass sich Kristalle bilden.

Und die wollen wir haben, weil in Kristallen die Proteine alle in einem geordneten Gitter vorliegen und quasi als Signalverstärker wirken.

Röntgenstrukturanalyse

Unsere Proteinkristalle sind klein, ähnlich wie der Durchmesser eines menschlichen Haars. Trotzdem schaffen wir es, sie unter dem Mikroskop mit einer winzigen Nylonschleife aus der Lösung herauszufischen, quasi zu angeln.

Anschließend frieren wir unsere Kristalle in flüssigem Stickstoff ein, bei 100 Kelvin, das sind – 197°C. Und das machen wir, weil wir nun den Kristall mit dem Röntgengenerator untersuchen wollen und die energiereiche Röntgenstrahlung dabei unseren Kristall nicht zerstören soll.

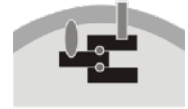
Die Röntgenstrahlung trifft gebündelt auf unseren Kristall und wird dabei abgelenkt. Jedes einzelne Atom des Kristalls lenkt den Strahl etwas anders ab und so kommt es zu diesen wunderschönen Difraktionsbildern.

Damit wir ein volles dreidimensionales Bild bekommen, müssen wir den Kristall im Röntgenstrahl drehen und viele viele dieser Bilder aufnehmen. Diese Messung kann zwischen 5 Minuten und 2 Stunden dauern.

Und aus diesem Muster kann man eben dann mit Hilfe verschiedener Computerprogramme im Nachgang eine sogenannte Elektronendichtewolke berechnen.

Die ist wie eine Hülle, die unser Protein umgibt.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Forschung: Kristallisation von Proteinen

Es ist eher selten, dass man mit dem ersten Kristall den einen Datensatz messen kann, um die Struktur zu bestimmen.

Normalerweise testen wir hunderte von Kristallen und vermessen diese, bevor es zu einem Datensatz kommt, mit dem wir die Struktur lösen können.

Modellierung

Es kommt etwas darauf an, wie gut unser Kristall und unsere Messung war und wie gut letztendendes diese Elektronendichtewolke definiert ist, um gut sehen zu können, wo welche Aminosäuren reinpassen.

Wenn das deutlich ist, können Computer uns bei der Modellierung helfen.

Wenn das aber nicht so eindeutig ist, dann kommen die Programme schnell an ihre Grenzen und wir müssen am Rechner sitzen und Aminosäure für Aminosäure in die Wolke einbauen und uns durch das Protein durchhangeln.

Hier kommen wir jetzt wieder zurück zum Anfang des Projektes, dort haben wir die DNA eingesetzt, welche den Bauplan für unser Protein enthält.

Und diesen Bauplan, die Abfolge der Aminosäuren, sehen wir jetzt wieder hier in der Struktur und in der Elektronendichte.

Und diese Information können wir uns zunutze machen für den Modellbau, weil wir genau wissen, in welcher Abfolge die Aminosäuren hintereinander auftreten.

So können wir durch die Sequenz durchgehen und in der Elektronendichtewolke charakteristische Stellen heraussuchen, an denen wir genau erkennen, welche Aminosäuren eingebaut werden müssen.

Anhand der Aminosäuresequenz können wir von dieser Stelle beginnend das Modell fertig bauen.

Und genau das werdet ihr jetzt auch tun:

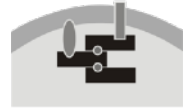
Uns sind in der Lysozymstruktur einzelne Seitenketten abhandengekommen.

Und ihr werdet mit Hilfe der Sequenz herausfinden, welche das sind, diese wieder neu einbauen und gucken, wie sie zur Elektronendichtewolke passen.

Textliste zum Video:

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation

SFB 958



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Forschung: Kristallisation von Proteinen

Ihr habt heute erste Einblicke in die Arbeit von Strukturbiolog:innen bekommen und konntet selbst erste Arbeitsschritte zur Strukturbestimmung unternehmen.

Wir benutzen diese molekularen Strukturen um die Funktionsweise von molekularen Maschinen zu verstehen.

Wir benutzen sie auch um die Ursache von genetischen Erkrankungen zu verstehen und möglicherweise Medikamente zu entwickeln.

Wir hoffen, dass wir Euch heute von unserer Arbeit begeistern konnten und freuen uns Euch eines Tages hier am MDC zu sehen.

Alles gute, tschüss.

Webseite zum Projekt: bcp.fu-berlin.de/nos

© Freie Universität Berlin, 2023