

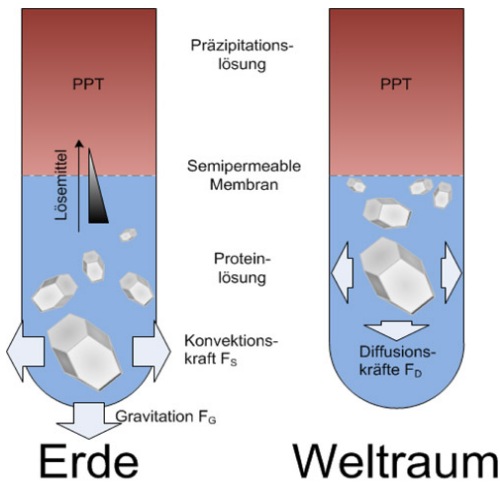
## „ISS – Biochemistry goes Space: Proteinkristallisation in der Schwerelosigkeit“

### Adrian Eilingsfeld

Sie haben bestimmt schon vom wahrscheinlich schnellsten biochemischen Labor der Welt gehört. Mit einer Geschwindigkeit von 28.000 km/h gleitet es in einer Höhe von 400 km mehrmals täglich über unsere Köpfe hinweg. Bei einer solchen Geschwindigkeit braucht man für die Entfernung von der Eingangstür der GDCh in Frankfurt bis zum östlichsten Punkt Russlands etwa eine halbe Stunde. Die Rede ist natürlich von der ISS, der Internationalen Raumstation. Eines der dort bearbeiteten Forschungsgebiete ist die Kristallographie. Sie umfasst die Erforschung von Kristallstruktur, -entstehung und -eigenschaften. Sowohl Kristalle als auch der zu ihrer Bildung führende Prozess – die Kristallisation – sind allgegenwärtig, sei es in Form von Salz oder Zucker in der Küche oder in Form von Schneeflocken und Eisblumen im Winter. Der auf den ersten Blick noch so einfache Prozess der Kristallisation unterliegt komplexen Gesetzmäßigkeiten und hat eine enorme wissenschaftliche Bedeutung.

### Die Bedeutung der Kristallographie

Die Herstellung von Kristallen aus makromolekularen Verbindungen spielt eine zunehmend wichtige Rolle in der Biochemie und Molekularbiologie. Dies ist vor allem auf die aus Kristallen durch Röntgenbeugung gewonnenen Erkenntnisse über Struktur und Funktion von Proteinen zurückzuführen. [1] Wird ein Proteinkristall mit Röntgenstrahlung bestrahlt, kommt es aufgrund der Beugung der Röntgenstrahlung im Kristall zu spezifischen Beugungsmustern, den sogenannten Diffraktionsmustern (siehe auch Abb. 2). Aus der Lage der Maxima im Beugungsmuster lässt sich die Geometrie der Elementarzelle des Kristallgitters ermitteln. Dies lässt sich mittels mathematischer Beziehungen, wie etwa der Bragg-Gleichung, bewerkstelligen: Dabei ist  $n$  der Grad des untersuchten Maximums,  $\lambda$  die Wellenlänge des Röntgenlichts,  $d$  der Abstand der Netzebenen (die Ebene der durch Beugung erzeugten Punkte) des Kristallgitters und  $\theta$  der Eintrittswinkel der Strahlung. Durch weitere Operationen wie die Fourier-Transformation oder Regressionsanalysen lassen sich Elektronendichtekarten erstellen, welche die Grundlage zur Ermittlung der relativen Atom-Positionen des untersuchten Proteins bilden. Die verwendeten Formeln werden je nach Zusammensetzung und Struktur des Kristalls, wie etwa kubisch oder rhombisch, entsprechend erweitert. Aufgrund der hohen Komplexität der so erhaltenen Formeln als auch der Zahl an Datenpunkten ist eine Berechnung ohne Computer kaum denkbar. Röntgenstrahlung wird aufgrund ihrer geringen Wellenlänge von  $10^{-8}$  bis  $10^{-11}$  m verwendet. Je geringer die Wellenlänge, desto feiner die bestimmbareren Beugungsmuster und desto detaillierter die zu errechnende Struktur. [2] Diese Strukturen bilden die Basis für mathematischer Modelle, aus denen Informationen über die Funktion des Proteins oder über die Bindung von Liganden abgeleitet werden können. Dies ist vor allem in der medizinischen Forschung bei der Entwicklung wirksamer und spezifischer Medikamente von enormer Bedeutung.



**Abbildung 1:** Bei der Kristallisation vorherrschende Kräfte auf der Erde und im Weltraum

## Von kritischen Lösungen und keimenden Kristallen

Da in der Natur Proteine nicht in kristalliner Form vorkommen, müssen Proteinkristalle unter Ausnutzung physikalischer Gesetzmäßigkeiten gewonnen werden. Hierbei haben sich zwei Verfahren besonders bewährt. Zu einem die Dampfdiffusion, zum anderen Flüssig-Flüssig-Diffusion. In beiden Fällen macht man sich das Ausdampfen oder das Absorbieren des Lösemittels zu Nutze, welches das Protein enthält. So wird bei der flüssig-flüssig Diffusion das Lösemittel aus der Proteinlösung durch eine semipermeable Membran in eine Präzipitationslösung (PPT, engl.: **precipitate**) absorbiert (Abb.1), während die konzentrierte Proteinlösung zurückbleibt. Der Stofftransport ist hierbei auf die durch das Konzentrationsgefälle des Lösungsmittels bedingte Osmose zurückzuführen.

Durch die Abnahme der Lösemittelkonzentration kommt es zu kritischen Lösungen. Das Löslichkeitsprodukt des Proteins wird unterschritten, und es beginnt auszufallen. Es bilden sich winzige Kristalle, sogenannte Kristallisationskeime, an denen sich durch molekulare Wechselwirkungen wie die van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen neue Proteinmoleküle anlagern. Der Kristall wächst. Die Art der Anlagerung und damit die resultierende Kristallstruktur hängen von der molekularen Struktur des Proteins und von den die Kristallisation beeinflussenden Kräften ab. Auf der Erde ist vor allem die Gravitation ausschlaggebend, die sowohl durch Dichteunterschiede im Fluid Konvektion also auch die Sedimentation der Kristalle bewirkt (Abb. 1, links). Sowohl das Absinken der Kristalle als auch die durch die Konvektionsströmung schneller ablaufende Kristallisation wirken sich negativ auf die Qualität der Kristalle aus. Durch die hohe Flussrate zum Kristall kommt es zur Adsorption von Verunreinigungen. Anders sieht es im Weltraum aus: Durch die dort vorherrschende Mikrogravitation von nur  $10^{-5}g$  ( $1g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ) sind nunmehr die Diffusion und die molekularen Wechselwirkungen die treibenden Kräfte der Kristallbildung (Abb. 1, rechts). Durch das Fehlen der Konvektionsströmung kommt es bei fortschreitender Kristallisation in unmittelbarer Nähe des Kristalls nur zu einer langsamen Zufuhr neuer Proteinmoleküle. Es ergibt sich in der Folge ein langsames und gleichmäßigeres Kristallwachstum als im Schwerfeld der Erde. [3]

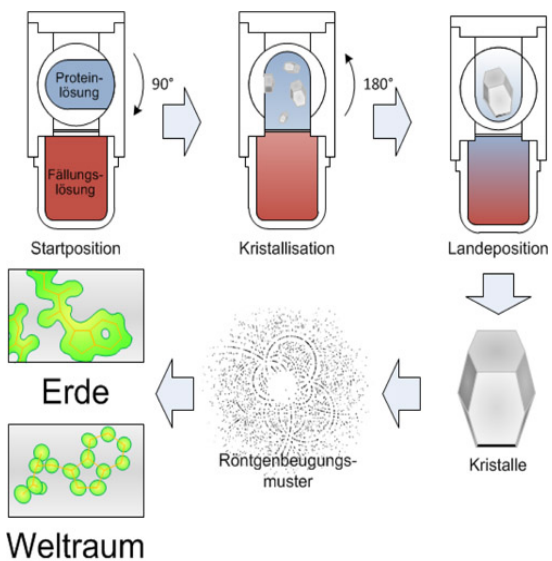
Aufgrund dieser Faktoren, die zur Verbesserung der Kristallqualität und zum Verständnis der Kristallbildung beitragen, hat die ESA an Bord der ISS die *Advanced Protein Crystallisation Facility* (APCF) zur Erforschung der Kristallisation unter Mikrogravitation eingerichtet.

## Kristallisation im Weltraum

Zur genauen Aufklärung von Proteinstrukturen ist es notwendig, in einen Auflösungsbereich von bis unter  $1 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ) vorzudringen. Kleinste Fehler oder Deformationen im Kristall stören die Röntgenbeugung und führen dadurch zu fehlerhaften oder ungenauen Strukturbestimmungen. Entsprechend wichtig ist es, qualitativ hochwertige Kristalle zu erhalten. Neben der Anordnung der Proteinmoleküle können bei besonders hochwertigen Kristallen über Röntgenbeugung auch Informationen

über die Wechselwirkung mit Lösemitteln und intermolekulare Bindungen gewonnen werden. [4]

Mit dem Standortwechsel ins Weltall nimmt die Komplexität des Experimentaufbaus enorm zu. Es muss unter anderem darauf geachtet werden, dass der Aufbau dicht, in Mikrogravitation funktional sowie möglichst einfach zu bedienen ist. Wegen der hohen Transportkosten in den Weltraum muss die Apparatur zudem eine möglichst geringe Masse haben. Hinzu kommt, dass es kaum möglich ist, den Aufbau unter vergleichbaren Bedingungen im Vorfeld zu testen; so ist sowohl die Entwicklung als auch der spätere Betrieb mit einigen Risiken verbunden. Zu einer möglichen Fehlfunktion unter Mikrogravitation kommt hinzu, dass die im Weltraum gewonnenen Kristalle beim Rücktransport zur Erdoberfläche durch die beim Wiedereintritt auftretenden hohen g-Kräfte beschädigt werden können. Aufgrund dieser Randbedingungen mussten eigens neue Verfahren und Apparaturen entwickelt werden. [5]



Die nachfolgende Abbildung (Abb. 2) skizziert den Ablauf eines solchen Experiments und die Funktion des Aufbaus. [6]

Bis zum Eintreffen des Experiments an Bord der ISS befinden sich die PPT-Kammer und das Proteinreservoir in voneinander getrennten Positionen. Zum Starten der Kristallisation wird die Kammer mit dem Proteingemisch um 90° gedreht, bis sie über einer semipermeablen Membran mit der das Lösemittel absorbierenden PPT-Lösung in Kontakt steht. Hierzu wird unter anderem PEG-8000, ein Gemisch langkettiger Polyethylenglycole (die Zahl gibt dabei die mittlere relative Molekülmasse an) verwendet. Dieses eignet sich aufgrund der durch die Molekülgrößen bedingten geringen Permeabilität bei zugleich hoher Löslichkeit als Fällungsmittel. Für die Dauer des Experiments, das je nach Protein bis zu 30 Tage laufen kann, bleiben die Kammern miteinander in Kontakt. Vor dem Wiedereintritt in die Atmosphäre werden die Kammern durch Drehen um 180° voneinander

getrennt. Nach der Landung werden die Kristalle isoliert und dann mit hochenergetischer Synchrotronstrahlung analysiert. Diese bietet entgegen der aus Röntgenröhren gewonnenen Strahlung ein sehr breites ( $10^{-4} - 10^{-11}$  m), kontinuierliches Wellenlängenspektrum mit hoher Brillanz, aus welchem die für die Analyse verwendete monochromatische Strahlung gezielt ausgewählt werden kann. Mit diesem Verfahren sind noch bessere Auflösungen der Röntgenbeugungsmuster und der daraus gewonnenen Elektronendichtekarten möglich.

### Bisherige Erkenntnisse aus den Experimenten in Mikrogravitation

Im Rahmen der Optimierung von Kristallisationsexperimenten im Weltall wurden einige neue Erkenntnisse erzielt, die auch für Anwendungen auf der Erde genutzt werden können. So lassen sich die Kristalle durch Zugabe von niedrigen Konzentrationen an Agarose (einem Gelbildner auf Polysaccharidbasis) vor den bei der Landung auftretenden Scherkräften schützen. Zudem wirkt das Agarosegel wie ein Sieb, welches Verunreinigungen vom Kristall abhält, und führt, auch bei Experimenten auf der Erde, zu einer durch die Reduktion der Flussrate und Verunreinigungen bedingte erhöhte Kristallqualität. [7] Der fehlende Einfluss der Gravitation macht sich ebenso bei speziellen Kristallisationsmethoden wie der künstlichen Graphoepitaxie durch hochwertigere Kristalle

**Abbildung 2:** Experimenteller Ablauf von der Kristallisation unter Mikrogravitation bis zur Erzeugung von Elektronendichteverteilungen (grün) über Röntgenbeugungsmuster

bemerkbar. Bei der Epitaxie handelt es sich um das Aufwachsen von Kristallen auf kristallinen Substraten. Im Fall der Graphoepitaxie wird, durch ein auf das Substrat aufgebrachtes Relief, welches der Struktur des erwarteten Kristalls angepasst ist, eine gleichmäßige Kristallbildung forciert. Dies ist insbesondere für Biokristalle für mikroelektronische oder materialwissenschaftliche Anwendungen von Bedeutung, wie etwa die Verwendung von Lysozym als Sonde bei Rasterkraftmikroskopen, für welche große Mengen an identischen Kristallen benötigt werden. [5, 8]

### **Doch wie sieht es mit den konkreten Ergebnissen aus?**

Im Schnitt zeigten 24 % der zwischen 1993 und 2003 unter Mikrogravitation gewachsenen Kristalle dreidimensionale Strukturen von höherer Auflösung und größeren Dimensionen als alle vergleichbaren auf der Erde gewachsenen Kristalle. Die Verbesserung der Auflösung korreliert dabei mit der Größe des Proteins. Bei kleinen Proteinen zeigten 67 % der Kristalle, bei mittelgroßen 50 % und bei großen 30 % bessere Ergebnisse. Dies wird vor allem durch eine auf die gleichmäßigere Struktur zurückzuführende Verbesserung der Signalintensität im Verhältnis zur Beugung deutlich, was einer Reduktion des Signal-Rausch-Verhältnisses gleichkommt. Im Fall einiger Proteine wurde eine Verbesserung der Auflösung um mehrere Å erreicht und dadurch neue molekulare Brücken im Proteingefüge identifiziert und Interaktionen mit dem Lösemittel festgestellt. Zudem nahm die Erfolgsquote der Experimente die zwischen 1993 und 2003 bereits bei 52 % lag mit der Zeit stetig zu. Dies hat sowohl mit zunehmender Erfahrung mit der Kristallisation in Mikrogravitation als auch mit dem technischen Fortschritt zu tun. [4] Im Extremfall des kubischen Kristalls des Satelliten-Tabakmosaikvirus (STMV) wurde Kristalle erhalten, die mit >1,5 mm 30-mal größer waren und dabei geringere Makel aufwiesen als alle je auf der Erde gewachsenen Kristalle dieses Proteins. [1]

Allerdings ist die Kristallisation in der Mikrogravitation keine Patentlösung für alle Herausforderungen. In einigen Fällen kommen die im Weltraum gewachsenen Kristalle nicht an die Qualität der auf der Erde gewonnenen heran. Aufgrund technischer Grenzen der Messaufbauten ist selten eine Verbesserung von bereits bestehenden hochauflösenden Strukturen unterhalb des Bereichs von 1 Å möglich. Zudem stellt sich die Frage, in welchen Fällen der erheblich höhere materielle und finanzielle Aufwand für die entsprechende Anpassung der Experimente an die Mikrogravitation und der Transport in den Orbit gerechtfertigt sind.

### **Ausblick**


Der Ausblick aus dem schnellsten und teuersten Labor der Welt dürfte wohl kaum zu überbieten sein, und auch um die Zukunft der Kristallisation im All ist es nicht schlecht bestellt. Bisherige Arbeiten auf dem Gebiet der Kristallisation unter Schwerelosigkeit sprechen für sich: Bei gleichen Ausgangslösungen werden durch Mikrogravitation letztlich besser aufgelöste Strukturen ermöglicht. Mitunter konnten Aussagen über zuvor unbekannte Strukturen, Interaktionspartner und aktive Zentren getroffen werden. Neben den nationalen Raumfahrtbehörden wie ESA, NASA, JAXA und Roskosmos sowie deren Universitätskooperationen haben sich inzwischen auch erste kommerzielle Unternehmen in der ISS eingegliedert. Es wird also auch in Zukunft Proteinkristalle aus dem All geben.

#### **Take-Home-Messages:**

- Aus Proteinkristallen lassen sich mittels Röntgenbeugung, basierend auf physikalischen Gesetzmäßigkeiten, Rückschlüsse auf die Proteinstruktur ziehen.
- Die Kristallisation von Proteinen kann auf verschiedenen Wegen, wie etwa der Dampfdiffusion oder Flüssig-Flüssig Diffusion, eingeleitet werden.
- Unter Mikrogravitation kommt es durch die Abwesenheit von Konvektion und

Sedimentation zu einem gleichmäßigen Ablauf der Kristallisation, was in vielen Fällen zu qualitativ hochwertigeren und größeren Kristallen führt.

- Der zusätzliche Aufwand für die Durchführung im Weltall ist enorm und bleibt im Einzelfall abzuwägen.
- Kristallisation in Mikrogravitation eignet sich für schwer zu kristallisierende Proteine, deren Struktur unter terrestrischen Versuchsbedingungen bisher nicht aufgeklärt werden konnte.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. <a href="#">Woche 2</a>).</p> <p>Der Autor, Adrian Eilingsfeld, ist Studierender im Masterstudiengang Biomolecular Engineering an der TU Darmstadt</p> <p>(E-Mail: <a href="mailto:a.eilingsfeld@stud.tu-darmstadt.de">a.eilingsfeld@stud.tu-darmstadt.de</a>).</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Katja Schmitz (E-Mail: <a href="mailto:schmitz@biochemie-tud.de">schmitz@biochemie-tud.de</a>).</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Durch welchen Zusatz im Medium lassen sich Kristalle vor Scherkräften bei der Landung schützen?</p>
Literatur:	
<p>[1] Koszelak, S., et al., <i>Protein and virus crystal growth on international microgravity laboratory-2</i>. Biophys J, 1995. 69(1): p. 13-9.</p>	
<p>[2] Meschede, D., <i>Gerthesen Physik</i>. 2006, Springer: Heidelberg. p. 857.</p>	
<p>[3] Pusey, M.L., R.S. Snyder, and R. Naumann, <i>Protein crystal growth. Growth kinetics for tetragonal lysozyme crystals</i>. J Biol Chem, 1986. 261(14): p. 6524-9.</p>	
<p>[4] Vergara, A., et al., <i>Lessons from crystals grown in the Advanced Protein Crystallisation Facility for conventional crystallisation applied to structural biology</i>. Biophysical Chemistry, 2005. 118(2-3): p. 102-112.</p>	
<p>[5] Givargizov, E., et al., <i>Growth of biocrystalline films of PVC catalase in space using artificial epitaxy (graphoepitaxy)</i>. Journal of Crystal Growth, 2008. 310(4): p. 847-852.</p>	
<p>[6] DeLucas, L.J. <i>Commercial Protein Crystal Growth - High density protein crystal growth Modified (CPCG-HM)</i>. 2013 [cited 2013/05/14]; Available from: <a href="http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1035.html">http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1035.html</a>.</p>	
<p>[7] Lorber, B., et al., <i>Crystallization within agarose gel in microgravity improves the quality of thaumatin crystals</i>. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. 55(Pt 9): p. 1491-4.</p>	
<p>[8] Wickremasinghe, N.S. and J.H. Hafner, <i>Protein Crystals as Scanned Probes for Recognition Atomic Force Microscopy</i>. Nano Letters, 2005. 5(12): p. 2418-2421.</p>	