

Proteinstrukturanalyse mit Synchrotronstrahlung

G. Buth, D. A. Moss, ISS

Einleitung

Ziel der Proteinstrukturanalyse ist es, die Funktion von Proteinen zu verstehen und erklären zu können. Proteine sind molekulare Nanomaschinen mit beweglichen Teilen, Bindestellen zur Erkennung und zum Greifen von anderen Molekülen, usw. (Abb. 1) Die Frage, wie ein bestimmtes Protein seine Aktivität umsetzt und seine Rolle in den Lebewesen erfüllt ist letztendlich nur durch ein Verständnis seiner Struktur und strukturellen Dynamik zu erreichen.

In diesem Beitrag schildern wir, wie an der Synchrotronlichtquelle ANKA mit Hilfe der komplementären Messmethoden Röntgendiffraktion und Infrarotspektroskopie auf dieses Ziel hin gearbeitet wird.

Proteinkristallografie

Mittels der Proteinkristallografie ist es möglich, die molekulare Struktur komplexer Eiweißmoleküle (Proteine) im Detail aufzuklären, insoweit sie in einen ein-kristallinen Zustand überführbar sind. Ziel einer Proteinstrukturanalyse ist die Bestimmung der Koordinaten jedes der einige 100 bis 1000 Atome in der Einheitszelle eines Proteinkristalls. Die Kenntnis der räumlichen Struktur eines Proteinmoleküls erlaubt die Entwicklung von Modellvorstellungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen, etwa von Enzymen. Diese Erkenntnisse sind beispielsweise in der Pharmaforschung von vitalem Interesse, so auch für die gezielte Synthese von Wirkstoffen („Drug design“). Unter den vielen weiteren Anwendungen sei nur die Optimierung von Fettspaltern (Lipasen) in Waschmitteln erwähnt.

Proteinkristallografie in Kurzform

Wird ein Protein-Einkristall mit Röntgenlicht bestrahlt, wirken die Netzebenen des Kristalls analog zu einem optischen Beugungsgitter, allerdings in 3 Dimensionen. Die Röntgenstrahlung wird abgelenkt in Richtungen, die durch die Geometrie (Gitterparameter, Symmetrie) der Einheitszelle bestimmt werden. Für die Intensitäten der Reflexe ist die Anordnung der Atome innerhalb der Einheitszelle maßgebend.

Zur Analyse der 3D-Struktur wird der Kristall im Röntgenstrahl wiederholt um einen kleinen Winkel rotiert und dabei die gebeugte Röntgenstrahlung mit einem Flächendetektor registriert (Abb. 2).

Aus den gemessenen Intensitätsdaten ist auf die Anordnung der Atome in der Elementarzelle zurück zu schließen. Eine als das „Phasenproblem der Kristallogra-

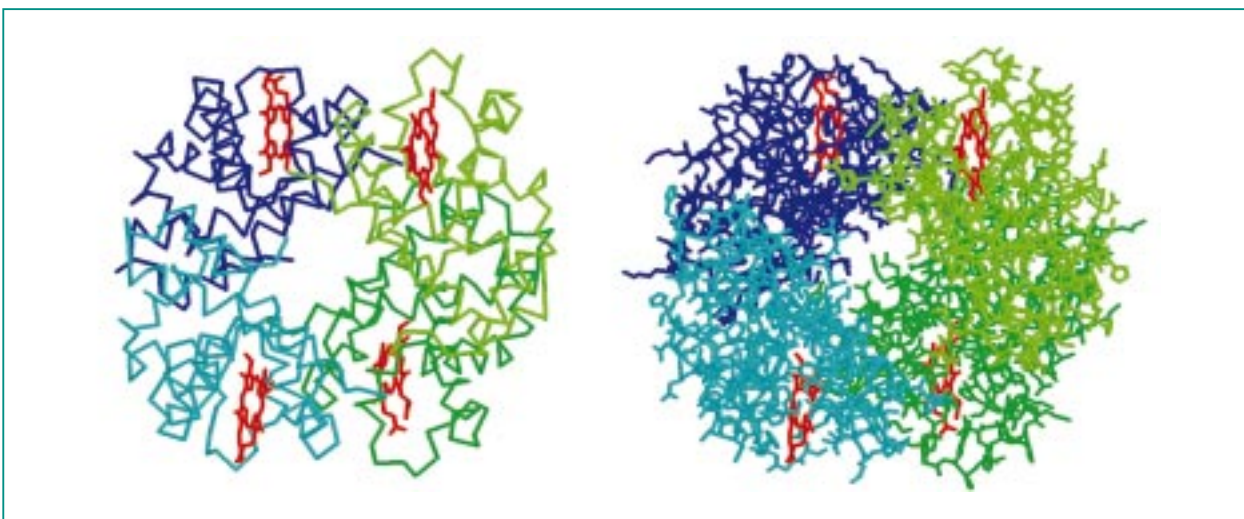


Abb. 1: Struktur des Hämoglobins. Diese erste Proteinstrukturbestimmung wurde in Cambridge von Perutz und Kendrew mittels Röntgendiffraktion durchgeführt, wofür sie 1962 den Nobelpreis erhielten. Links ist nur das sog. Rückgrat dargestellt, um das verschlungene Faltmuster der vier Polymerketten sichtbar zu machen. Rechts sind alle 4656 Atome (ohne H) dieses eher unterdurchschnittlich großen Proteins dargestellt.

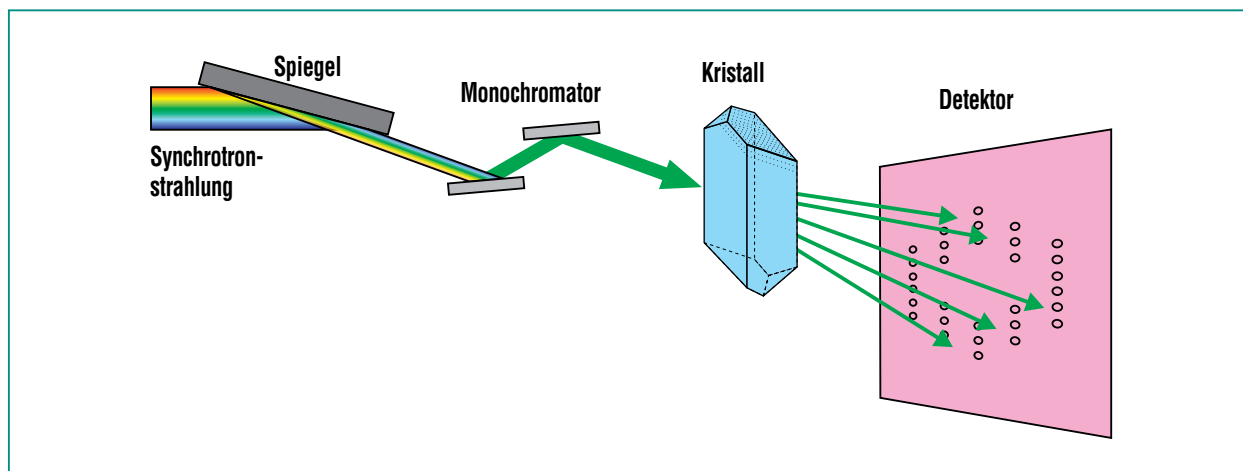


Abb. 2: Schema des Aufbaus für Proteinkristallographie bei ANKA.

phie“ bekannte Schwierigkeit dabei ist, dass Röntgendetektoren nur die Intensität, das Quadrat der Wellenamplitude der Reflexe messen. Das vom Kristall abgebeugte Wellenfeld enthält die Information über die Kristallstruktur aber in Form von Amplitude und Phase. Die Streuphasen müssen auf geeignete Weise rekonstruiert werden.

Eine recht bekannte und verbreitete Methode hierzu ist der „Multiple isomorphe Ersatz“ (MIR, „Multiple Isomorphous Replacement“). Der Kristall wird gezielt mit Schweratomen (z. B. Hg, Pt) verunreinigt, die sich an bestimmten Gitterplätzen einlagern. Dadurch ändert sich die Elektronendichte auf charakteristische Weise. Durch Vergleich der Streuintensitäten verschieden präparierter Kristalle kann die Phase der Reflexe bestimmt und die Struktur gelöst werden. Damit dies gelingt, darf sich die Gitterstruktur der Kristalle durch den Einbau der Fremdatome nicht verändern (Isomorphie). Damit die Phasenlösung eindeutig wird, sind mindestens zwei Derivate zu

finden, bei denen die Schwermetallatome an unterschiedlichen Stellen an das Proteinmolekül binden. Mithin ist oft eine aufwändige Präparation geeigneter Kristalle, Suche nach geeigneten Schwerelementen und viel Ausprobieren erforderlich.

Proteinkristallographie mit Synchrotronstrahlung

Synchrotronstrahlung hat eine Reihe herausragender Eigenschaften: Neben hoher Brillanz ein sehr breites Strahlungsspektrum vom fernen Infrarot bis in den harten Röntgenbereich. Ein entscheidender Vorteil für die Strukturanalyse ist, dass aus diesem Spektrum Strahlung mit einer über einen weiten Bereich durchstimmbaren Photonenenergie selektiert werden kann. Damit ist es möglich, solche Elemente im Proteinkristall gezielt anzuregen, die in der Lage sind, bei einer bestimmten Energie in Resonanz mit dem einlaufenden Röntgenwellenfeld zu gelangen. Dadurch ändert sich ihr atomares Streuvermögen beim Durchgang durch eine Resonanz (Abb. 3).

Gewissermaßen übernimmt jetzt eine einzelne Atomsorte, bei unterschiedlicher Energie angeregt, die Rolle der verschiedenen Elemente in den Schwermetallderivaten des MIR-Verfahrens.

Die zu Grunde liegende Funktionsweise dieses „MAD“ für „Multiple Anomale Dispersion“ genannten Verfahrens [1] lässt sich mit einem einfachen optischen Analogon veranschaulichen: Stellen wir uns vor, der Kristall bestünde aus lauter grauen Atomen, in das einige grüne Atome eingebettet sind. Strahlt man den Kristall mit rotem Licht an, heben sich die grünen Atome nicht deutlich von den grauen Atomen ab. Ändert man nun die Farbe des einfallenden Lichts von rot nach grün, scheinen mit einmal die grünen Atome hell aufzuleuchten und heben sich vom grauen Hintergrund deutlich ab, und man ist in der Lage ihre Positionen eindeutig zu bestimmen. Das MAD-Verfahren hat den Vorzug, dass im Prinzip eine komplette Strukturlösung mit nur einem einzigen Einkristall möglich ist, vorausgesetzt, er besitzt ein Element mit

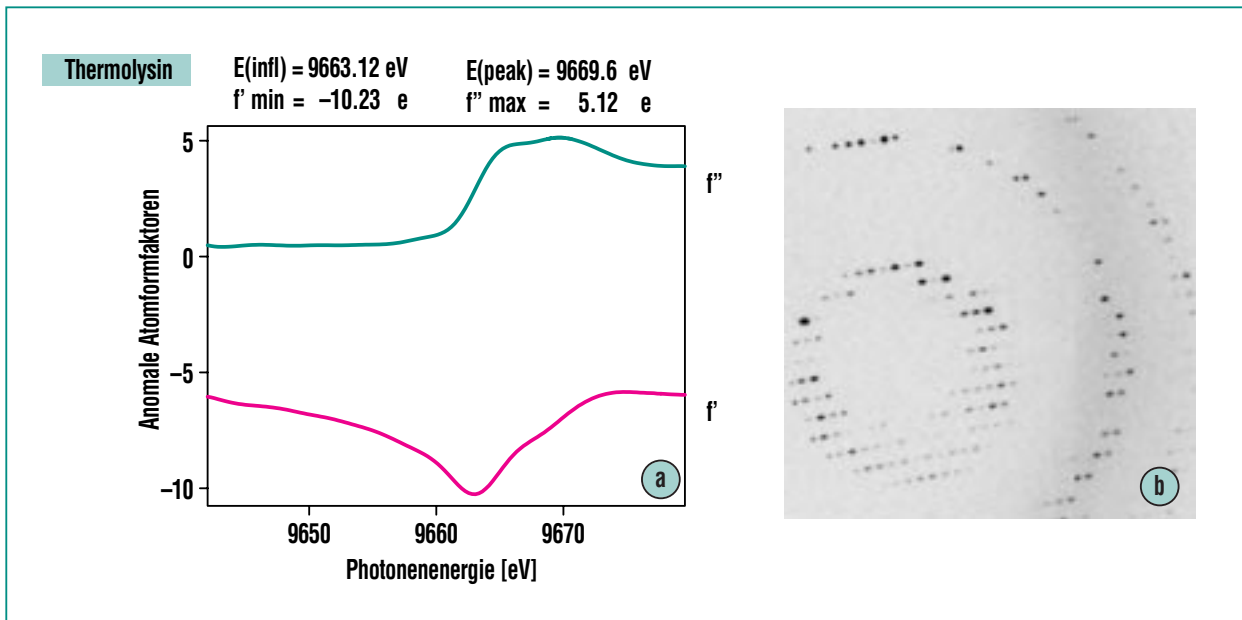


Abb. 3: a) Streuvermögen der Zn-Atome in Thermolysin als Funktion der Photonenergie (dispersive Korrekturen) [3, 4]. b) Beugungsbild eines Thermolysin-Einkristalls: ein Bild von ca. 1200 eines MAD-Datensatzes [3].

einer Resonanz im der Messung zugänglichen Bereich. Hier hat sich Selen durchgesetzt wegen der Möglichkeit, bereits bei der Genexpression eines Proteins die schwefelhaltige Aminosäure Methionin durch Selenomethionin zu substituieren.

Proteinkristallographie bei ANKA

Am Speicherring ANKA [2] wird ein Strahlrohr für makromolekulare Kristallographie betrieben. Es ist für Strukturbestimmungen mit MAD bei Energien zwischen 5 keV und 20 keV ausgelegt. Eine mit einem Röntgenspiegel vertikal und mit einem gebogenem Monochromatorkristall horizontal fokussierende Optik lenkt den Strahl auf einem typisch 0,1 mm³ bis 0,5 mm³ kleinen Probenkristall (Abb. 2). Zur Vermeidung von Strahlenschäden wird der Kristall

in einem kalten Stickstoffgasstrom bei Temperaturen um 100 K eingefroren. Als Detektionssysteme stehen wahlweise eine langsame aber großflächige Bildplatte und ein kleiner aber schneller CCD-Detektor zur Verfügung.

Infrarotspektroskopie

Mit der Infrarotspektroskopie werden die Frequenzen von Streck- und Biegeschwingungen interatomarer Bindungen direkt gemessen. Solche Molekülschwingungen lassen sich gut anhand der wohlbekannten Kugel- und Stabmodelle von Molekülen vorstellen, wenn man gedanklich die Stäbe etwas realitätsnäher durch Federn ersetzt. Das ganze Molekül ist ständig in Bewegung und alles vibriert. Die Frequenzen dieser Schwingungen hängen von den Massen der

beteiligten Atome (d.h. deren chemischer Identität), der Stärke der Bindung sowie den Bindungslängen und -winkeln ab, also von allen Parametern, die die Molekülstruktur ausmachen.

Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie liefert die Infrarotspektroskopie keine genauen dreidimensionalen Atomkoordinaten. Allerdings wirkt das Infrarotspektrum von Proteinen wie eine Art Fingerabdruck der Proteinstruktur, in dem sich selbst winzigste Strukturveränderungen ausdrücken [5]. Dabei ist eine Kristallisation nicht erforderlich; das Infrarotspektrum kann mit dem Protein in dessen nativem Zustand in Lösung oder in situ in einer Biomembran aufgezeichnet werden. Selbst Messungen an Zellen und Geweben in vivo sind möglich, und dieses Anwendungsgebiet wächst ständig.

Die Infrarotspektroskopie kann auch zeitlich aufgelöste Daten bis hinunter zu Zeitskalen von Nanosekunden liefern. Aus diesen Gründen sind Infrarotspektroskopie und Röntgenkristallographie Verfahren, die einander hervorragend ergänzen: Die Infrarotspektroskopie liefert dynamische Angaben als Ergänzung zu den im Wesentlichen statischen Strukturangaben der Proteinkristallographie. Damit kommen wir dem Ziel der Strukturbiologie näher, die Funktion biologischer Makromoleküle anhand ihrer Molekülstruktur zu erklären.

Die Fähigkeit der Infrarotspektroskopie, die Dynamik von Proteinstrukturen zu erfassen, kann am besten anhand eines Beispiels illustriert werden. Die Spektren in Abb. 4 zeigen die In-vitro-Fehlfaltung eines rekombinierten Prionenproteins aus der nativen Form in die pathologische Form, die

BSE hervorrufen soll [6]. Die negative (d.h. verschwindende) α -Helixbande und die positive (d.h. entstehende) β -Faltblattbande deuten in Übereinstimmung mit den bisherigen Erkenntnissen darauf hin, dass es sich hierbei um die Umwandlung einer Helixstruktur in eine Faltblattstruktur handelt. Das kleine Maximum bei 1690 cm^{-1} bedeutet übrigens, dass das β -Faltblatt antiparallel verläuft. Diese Fehlfaltung erfolgt bei niedrigerem pH-Wert viel schneller, doch zeigen die spektralen Signaturen, dass sich bei beiden pH-Werten die gleiche Umfaltung ergibt.

Infrarotspektroskopie mit Synchrotronlicht

Synchrotronlicht bietet dem Infrarotspektroskopiker eine Reihe erheblicher Vorteile gegenüber den üblichen Infrarotlichtquellen im Labor. [7] Wichtigster Vorteil ist

die tausendfach größere Brillanz (das bedeutet in etwa Lichtfluss pro Einheitsfläche), die sich in einer gewaltigen Verbesserung der Datenqualität ausdrückt, wenn man mit Proben von Mikrogröße arbeitet. Mit Synchrotronlicht lassen sich gute Daten im mittleren Infrarotbereich bei einer Ortsauflösung bis zu der Beugungsgrenze von $5 - 10\text{ }\mu\text{m}$ erzielen.

Die Vorteile dieser hohen Ortsauflösung bei der Untersuchung von biologischen Materialien liegen auf der Hand – siehe hierzu Abb. 5 [8]. Aber auch bei Messungen an reinen Proteinen in Lösung kann die hohe Ortsauflösung des Synchrotronlichts für die Durchführbarkeit eines Experiments entscheidend sein. Der einschränkende Faktor bei Messungen an biologischen Proben ist oft die geringe verfügbare Probenmenge. Mit dem kleinen Messfleck des Synchrotronlichts,

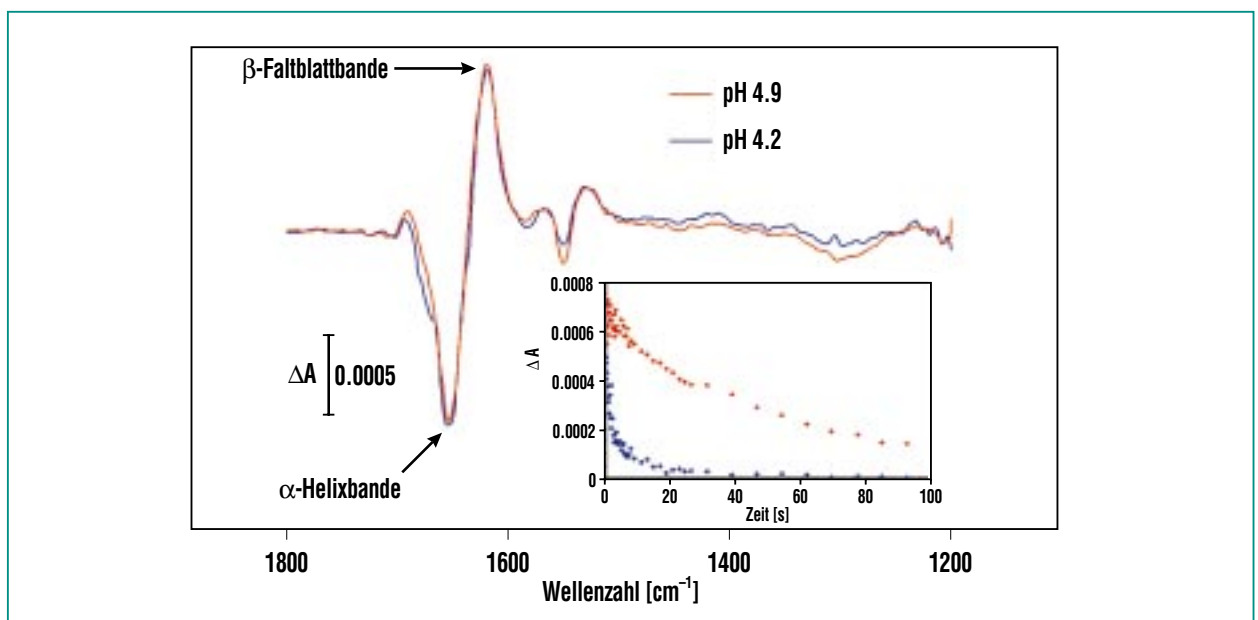


Abb. 4: Fehlfaltung eines Prionenproteins (in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, Berlin). Die Infrarotdaten liefern eine Art Fingerabdruck des Umfaltungsmusters, hier in Abhängigkeit des pH-Wertes.

zusammen mit entsprechender Mikrofluidik [9, 10], lässt sich der benötigte Probenbedarf drastisch reduzieren. Ein Messfleck-Durchmesser von 10 μm bedeutet ein Messvolumen von 1 Picoliter (10^{-12} Liter)!

Als weitere Vorteile des Synchrotronlichts können die natürliche Polarisierung sowie die gepulste Zeitstruktur in biologischen Untersuchungen nutzbar gemacht werden. Schließlich bietet Synchrotronlicht im gesamten fernen Infrarotbereich bis hinauf zu mm-Wellenlängen eine nutzbare Intensität und ermöglicht damit die Untersuchung verhältnismäßig wenig erforschter Bereiche der Absorptionsspektren biologischer Makromoleküle.

Zusammenfassung

Bei der Proteinstrukturanalyse verfolgt man das Ziel, die Funktionsweise von Proteinen auf molekularer Ebene zu verstehen. Mit Hilfe der komplementären Messmethoden Röntgendiffraktion und Infrarotspektroskopie wird an der Synchrotronlichtquelle ANKA auf dieses Ziel hingearbeitet. Durch Röntgendiffraktion wird ein vollständiges Strukturmodell des Proteins im Sinne der X,Y,Z-Koordinaten sämtlicher Atome erzeugt. Die Infrarotspektroskopie liefert dynamische Angaben als Ergänzung zu den im Wesentlichen statischen Strukturangaben der Proteinkristallographie. Bei beiden Messmethoden werden die Vorteile des Synchrotronlichts – seine hohe Intensität, niedrige Divergenz und extrem breite Durchstimbarkeit – im vollen Umfang ausgenutzt.

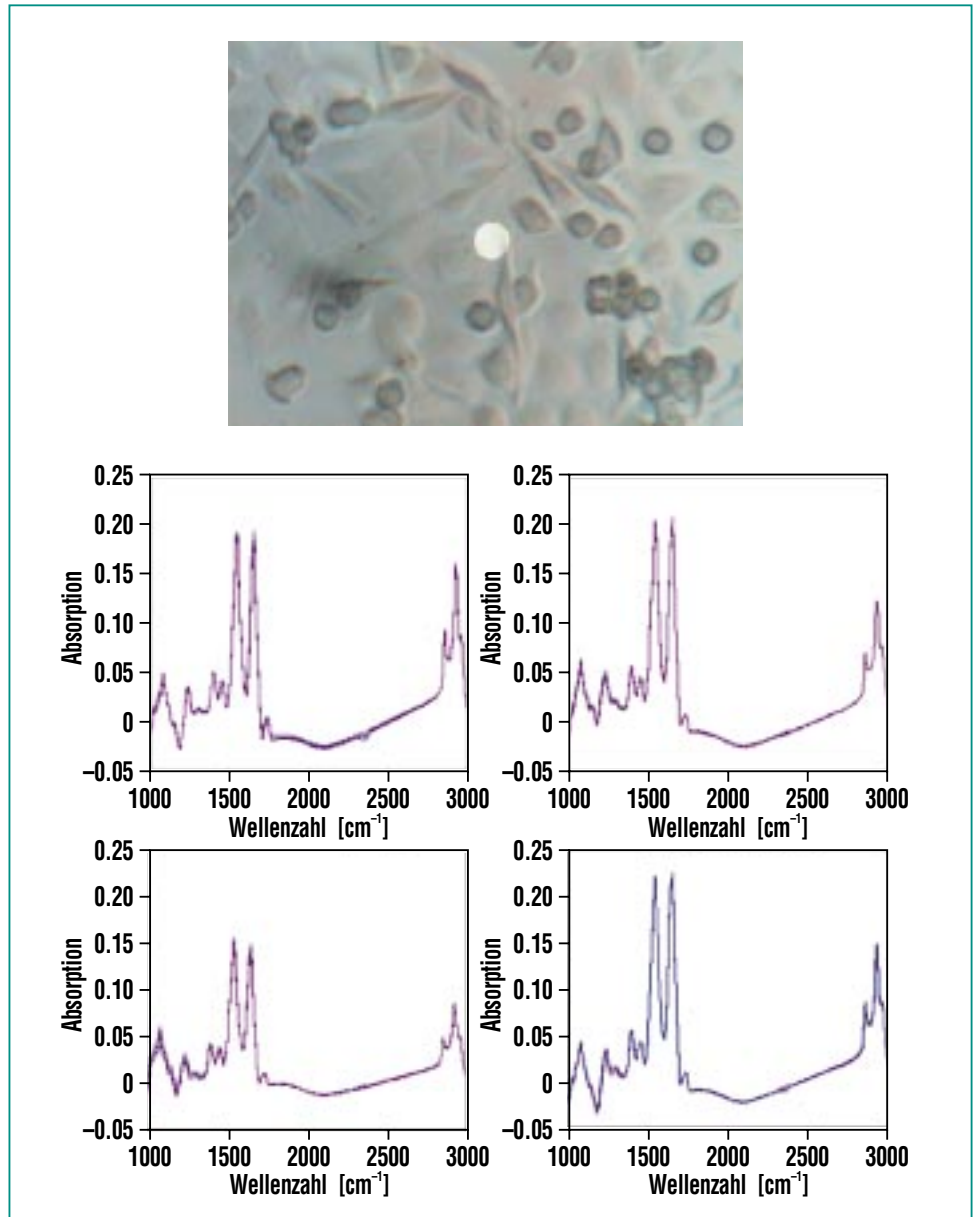


Abb. 5: Lebende menschliche Krebszellen unter dem Infrarotmikroskop bei ANKA (in Zusammenarbeit mit dem European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg). Der helle Kreis mitten im Bild zeigt den eigentlich erfassten Messbereich, hier 20 μm im Durchmesser. Die Spektren von vier Einzelzellen sind zwar sehr ähnlich, jedoch nicht identisch. Ohne die hohe Ortsauflösung des Synchrotronlichts würde man nur ein Durchschnittsspektrum über viele Zellen erhalten, die intraindividuellen Unterschiede würden untergehen.

Strahlzeit an ANKA wird der nationalen und internationalen wissenschaftlichen Gemeinde zur Verfügung gestellt. Antragsfor-

mulare sind auf der ANKA Webseite <http://www.fzk.de/anka/> verfügbar.

Literatur

- [1] W.A. Hendrickson,
Science 254 (1991) 51-58
- [2] H.O. Moser,
Journal of Alloys and Compounds
328 (2001) 42-49
- [3] J. Debreczeni, G. Bunkóczi,
private Mitteilung (Messung am
ANKA-PX Strahlrohr, 2003)
- [4] G. Evans, R.F. Pettifer,
J. Appl. Cryst. 34 (2001) 82-86
- [5] D.A. Moss, K. Fuchsle, R. Masuch,
A. Wolf,
Biomedical Spectroscopy
(A. Mahadevan-Jansen,
G. J. Puppels, Eds.),
SPIE Proc. 3918 (2000) 97-105
- [6] F. Sokolowski, A. J. Modler,
R. Masuch, D. Zirwer, M. Baier,
G. Lutsch, D. A. Moss, K. Gast,
D. Naumann,
J. Biol. Chem. 278 (2003)
40481-40492
- [7] Y.-L. Mathis, B. Gasharova,
D.A. Moss,
WIRMS 2003, Lake Tahoe, Ca.,
8.-11. Juli 2003
- [8] M. Keese, R. Pepperkok, D. A. Moss,
1st Workshop on Biological
Applications of Synchrotron Infrared
in Europe, Karlsruhe,
9.-10. September 2003
- [9] R. Masuch, D. A. Moss,
Appl. Spectrosc. 57 (2003)
1407-1418
- [10] S. Kulka, N. Kaun, J. R. Baena,
J. Frank, P. Svasek, D. A. Moss,
M. J. Vellekoop, B. Lendl,
Anal. Bioanal. Chem.
(eingereicht)