

## Kristallkunst

Protein-Kristalle sind winzig und erscheinen wie filigrane Kunstwerke. Forscher nutzen sie, um im Detail zu verstehen, wie Proteine aufgebaut sind und wie sie funktionieren. Eine hohe Kunst ist es auch, Proteine überhaupt erst dazu zu bringen, Kristalle zu bilden. Davon haben wir uns in der Kristallisations-Facility des MPI-BPC überzeugt.



(Kristallisations-Facility MPI-BPC)

Für manche ist Protein-Kristallografie mehr Kunst als Wissenschaft“, sagt Sarah Sainsbury, Leiterin der Kristallisations-Facility, schmunzelnd. Um dies zu verstehen, reicht ein Blick durch das Mikroskop: Proteine bilden wunderschöne und vielfältige Kristalle.

Die ersten dieser kunstvollen „Meisterwerke“ wurden in den späten 1950er Jahren erschaffen: Damals kristallisierten John Kendrew und Max Perutz die Proteine Myoglobin und Hämoglobin und beschossen sie mit Röntgenstrahlen. Auf Grundlage der so gewonnenen Informationen erstellten sie dreidimensionale Modelle der beiden Proteine. Diese wurden natürlich nie in einer Kunstgalerie ausgestellt – sie brachten den beiden Forschern jedoch wissenschaftlich die höchste Anerkennung ein: den Nobelpreis für Chemie im Jahr 1962. Seither hat sich am Prinzip der Protein-Kristallisation nichts geändert. Die Kristalle streuen die Röntgenstrahlen und erzeugen ein Muster. Daraus leiten die Forscher die Proteinstruktur ab. Dies ist heute die am häufigsten genutzte

Methode, um die dreidimensionale Struktur von Proteinen zu bestimmen.

Doch warum ist es überhaupt wichtig, die Gestalt eines Proteins genau zu kennen? Die Antwort auf diese Frage findet sich in einem Credo der Strukturbioologen: Struktur ist Funktion. Mit anderen Worten: Um zu verstehen, wie ein Protein funktioniert, muss man dessen dreidimensionale Struktur so detailliert wie möglich kennen. Diese Struktur zu bestimmen, kann oft knifflig sein. Die Protein-Kristallisation ist eine der wenigen hierfür geeigneten Methoden und dabei so erfolgreich, dass sich mit ihr heute sogar die Struktur riesiger molekularer Komplexe wie Ribosomen oder Polymerasen analysieren lässt.

Die Sache hat nur einen Haken: Trotz jahrzehntelanger Erfahrung mit der Methode ist es immer noch fast unmöglich vorherzusagen, unter welchen Bedingungen ein bestimmtes Protein Kristalle bildet. „Es gibt lediglich Tendenzen: Proteine mit verwandten Eigenschaften neigen dazu, unter ähnlichen Bedingungen zu kristallisieren“, er-

klärt Sarah Sainsbury, „dafür gibt es aber keine Garantie.“ Diese Komplexität und die damit verbundene Unsicherheit sind ein wesentlicher Grund, warum Wissenschaftler auf Einrichtungen wie die Kristallisations-Facility unter dem Dach von Turm 4 des MPI-BPC angewiesen sind: Hier werden die richtigen chemischen Verhältnisse unter tausenden Möglichkeiten ermittelt.

Mit einem Künstler-Atelier haben die Räume der Facility natürlich sehr wenig zu tun – stattdessen trifft man hier auf modernste Technik. Mehrere Roboter pipettieren automatisch winzige Mengen Flüssigkeit in Vertiefungen von Plastikplatten, Lösungen fließen durch Schläuche aus Flaschen zu verschiedenen Geräten und ein großer Schrank bietet genau kontrollierte Bedingungen für das Kristallwachstum. Mittendrin sind zwei Männer in Laborkitteln damit beschäftigt, die Abläufe zu überwachen. Jürgen Wawrzinek und Thomas Schulz sind die Technischen Assistenten, die die Facility am Laufen halten und die Forscher beim Züchten der Kristalle unterstützen.

»Für manche ist Protein-Kristallografie  
mehr Kunst als Wissenschaft«

Sarah Sainsbury



Sarah Sainsbury sucht nach Proteinkristallen.

Sarah Sainsbury is fishing for protein crystals.

Die Kristallisations-Facility wurde erstmals von der Abteilung *Zelluläre Biochemie* von Reinhard Lührmann unter der Leitung von Vlad Pena eingerichtet. Ulrich Steuerwald lieferte die Expertise für die Robotertechnik. Die Facility erhielt neue Geräte, als Patrick Cramer 2014 an das Institut kam, und gehört seither zu dessen Abteilung *Molekularbiologie*. „Bei uns züchten aber Wissenschaftler aus vielen verschiedenen Laboren des Instituts Kristalle“, berichtet Jürgen Wawrzinek. Etwa 30 Forscherinnen und Forscher nutzen im Moment die Facility. „Tatsächlich aber nehmen sehr viel mehr Kollegen unseren Service in Anspruch. Zuvor müssen sie viel Zeit in die Vorbereitung ihrer Proteine investieren.“ In der Tat ist das eigentliche Erzeugen der Kristalle nur ein Teil der Arbeit, wenn es um Strukturbestimmung geht. Erst müssen die Wissenschaftler das Protein oder den Proteinkomplex, dessen Struktur sie untersuchen wollen, herstellen und aufreinigen. Das kann Monate dauern. „Um einen guten Kristall zu bekommen, ist es absolut essenziell, das Protein so gut wie

möglich aufzureinigen“, bestätigt Sarah Sainsbury. Nur eine sehr reine Proteinprobe liefert gute Kristalle. Es ist wie bei Eischnee: Man muss sicherstellen, dass keine Spur Eigelb im Eiweiß ist, sonst wird man es nicht steif schlagen können. Das liegt an den Emulgatoren im Eigelb – sie hindern die Proteine im Eiweiß daran, ein Netz zu bilden. Genauso können Kontaminationen in der Proteinprobe das Protein daran hindern zu kristallisieren. „Außerdem ist die Wahl von Co-Faktoren wie zum Beispiel Metallionen wichtig. Sie können ein Protein stabilisieren und so dazu beitragen, es zu kristallisieren.“

#### **Kristalle können nach Stunden oder Wochen entstehen**

„Sobald das Protein aufgereinigt ist, übernehmen wir das Screening, um die passenden Kristallisationsbedingungen zu ermitteln“, sagt Thomas Schulz. An dieser Stelle wird deutlich, warum die Kristallisations-Facility eine so große Hilfe für die Forscher ist. Bis zu 2000 Bedingungen lassen sich hier prüfen,

unter denen ein Protein potentiell Kristalle bilden kann. „Mit etwas Erfahrung kann man immerhin eine Vermutung anstellen und die Zahl der Bedingungen eingrenzen, die man überprüfen muss, um die passende zu finden“, sagt Sarah Sainsbury.

Die Proben für das Screening bereitet ein Roboter vor. Einmal programmiert, mischt er winzige Mengen des aufgereinigten Proteins mit verschiedenen Chemikalien und erzeugt so immer wieder individuelle Bedingungen für die Kristallisation. Diese Bedingungen unterscheiden sich in Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke, der Gegenwart von Salzen und Liganden. Für jede Bedingung werden lediglich 100 Nanoliter der Proteinprobe benötigt – das ist ein zehntausendstel Milliliter. Diese Sparsamkeit ist wichtig, da sich viele Proteine nur in sehr geringen Mengen herstellen und reinigen lassen.

Doch wie bildet ein Protein überhaupt Kristalle aus? Sarah Sainsbury erklärt: „Man muss seine Löslichkeit reduzieren, und das sehr langsam.“ Um



Thomas Schulz, Sarah Sainsbury und Jürgen Wawrzinek (von links) im Labor der Kristallisations-Facility.

Thomas Schulz, Sarah Sainsbury, and Jürgen Wawrzinek (from left) in the lab of the Crystallization Facility.

das zu erreichen, befindet sich in jeder Plattenvertiefung neben dem Tropfen mit dem Protein ein weiterer Tropfen, der einen sogenannten Präzipitanten enthält – eine Verbindung, die die Löslichkeit des Proteins stark herabsetzt. „Im Laufe der Zeit ändert sich das Volumen des Proteintropfens und damit die Löslichkeit des Proteins. Wenn die Bedingungen günstig sind, ordnen sich die Proteinmoleküle irgendwann – anstatt einfach auszufallen – in einem Kristallgitter an.“

Die ersten Kristalle können schon nach wenigen Stunden entstehen, aber auch mehrere Wochen auf sich warten lassen. „Manchmal schaut ein Forscher seine alten Platten nach Monaten durch und findet auf einmal Kristalle, die vorher noch nicht da waren“, erzählt Jürgen Wawrzinek.

Die Platten werden in dem großen Schrank im hinteren Bereich des Labors gelagert. Er bietet Platz für 1000 Platten, die insgesamt 96 000 Proben enthalten. Um nachzusehen, ob ihre Kristallisationsversuche erfolgreich sind, müssen die Wissenschaftler nicht einmal in die Facility kommen. Der Schrank ist mit einem automatisierten Kamerasystem ausgestattet, das regelmäßig Bilder von jeder Platte macht und auf einem zentralen Server abspeichert. So können die Forscher die Fotos von ihrem eigenen Computer aus nach Kristallen durchsuchen.

### Gute Kristalle, schlechte Kristalle

Mit den ersten Kristallen ist die Arbeit aber noch nicht getan: „Kristalle zu erzeugen ist nur der erste Schritt. Als nächstes muss man sie zum Wachsen bringen“, sagt Sarah Sainsbury. Denn zu kleine Kristalle liefern im Röntgenstrahl nicht genügend Informationen. Um sie wachsen zu lassen, ist es zumeist nötig, die Bedingungen zu verbessern, unter denen die ersten Kristalle entstanden sind. „Das bedeutet eine weitere Runde Screening. Aber dieses Mal weiß man ungefähr, welche chemische Umgebung günstig ist.“

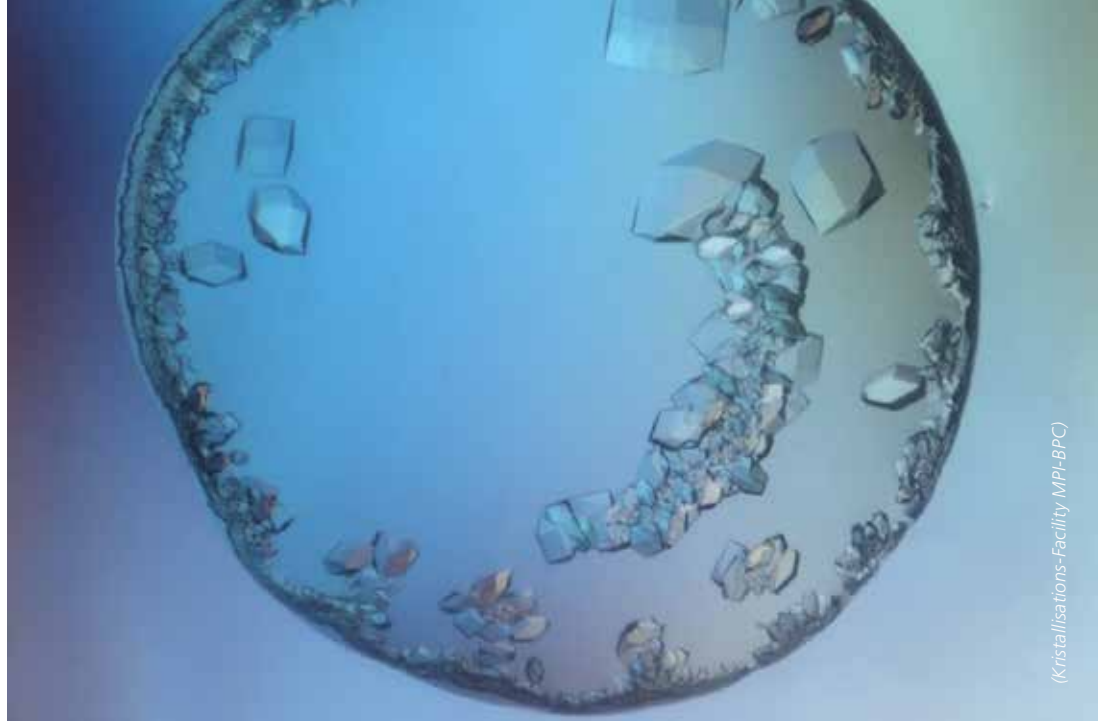
Wenn die Kristalle schließlich groß genug sind – also normalerweise etwas über 0,1 Millimeter im Durchmesser –, ist es Zeit zu überprüfen, woraus sie bestehen. Dafür nutzt die Facility den PX Scanner – ein unscheinbares, aber leistungsstarkes Gerät, das vielversprechende Kristalle mit Röntgenstrahlen beschießt. Das resultierende Muster lässt darauf schließen, ob die Kristalle etwas taugen. An diesem Punkt kann es zu Enttäuschungen kommen, etwa dann, wenn sich die kleinen Kunstwerke gar nicht als Proteingebilde, sondern als Salz erweisen. „In dem Fall muss man mit dem Screening noch einmal ganz von vorne anfangen.“ Und die Arbeit von Wochen oder Monaten war vergeblich. Immerhin weiß der Forscher nun, nach welchen Kristallen er nicht sucht – ein schwacher Trost.

Wenn jedoch alles gut gelaufen ist und das Beugungsmuster brauchbar aussieht, folgt der letzte Schritt: Der Kristall kann zu einem der großen Synchrotrons, dem DESY in Hamburg oder dem SLS im schweizerischen Villigen, gebracht werden. Nur mit den mächtigen Röntgenstrahlen dieser Quellen lässt sich ein Beugungsmuster erzeugen, das detailliert genug ist, um daraus die Struktur des Proteinkomplexes zu berechnen.

So weit zu kommen, ist bisweilen ziemlich schwierig. Doch Erfahrung hilft, und manche Wissenschaftler haben ganz eigene Ideen, wie sie ihre Chancen verbessern können: „Manche Leute sind recht abergläubisch bei der Frage, was ihrem Protein beim Kristallisieren hilft“, erzählt Jürgen Wawrzinek lachend. „Ich habe von jemandem gehört, der in jede einzelne Screening-Probe ein Katzenhaar getaucht hat.“ Es scheint darauf hinauszulaufen: Protein-Kristallisation ist tatsächlich eine hohe Kunst und manchmal eine geheimnisvolle. (fk)

*Die Kristallisations-Facility möchte dem IT & Elektronik Service (insbesondere Julian Janssen, Felix Kassner, Petra Hummel und Petra Küster) sowie der Feinmechanik-Werkstatt unseres Instituts unter der Leitung von Rainer Schürkötter für ihre Unterstützung danken. Ohne sie könnte die Facility nicht so reibungslos funktionieren.*





(Kristallisations-Facility MPI-BPC)

## Fünf Fragen

### 5 questions to Sarah Sainsbury

**Was ist für Sie das Spannendste an Ihrem Beruf?**

Nach all den Jahren fasziniert es mich immer noch, dass ein Protein Kristalle bilden kann.

**What fascinates you most about your job?**

After many years the fact that a protein can form crystals still fascinates me.

**Welche andere Tätigkeit könnten Sie sich vorstellen?**

Vielleicht wäre ich Ärztin oder würde etwas völlig anderes tun, zum Beispiel im Wildtierschutz arbeiten.

**If you had to choose a different profession, what would you do?**

Maybe I would work as a medical doctor or do something completely different like working in animal conservation.

**Wie tanken Sie nach einem harten Arbeitstag Energie?**

Ich treibe gerne Sport.

**How do you recharge your batteries after a tough day?**

I like to do some sport.

**Welche Begabung hätten Sie gerne?**

Ich würde wirklich gerne ein Musikinstrument spielen können.

**Which talent would you like to have?**

I would really like to be able to play a musical instrument.

**Was würden Sie tun, wenn Sie mehr Zeit hätten?**

Ich würde zeichnen oder malen, um mich zu entspannen.

**What would you do if you had more time?**

I would like to draw and paint to relax.



# Crystal art

Protein crystals are tiny, look pretty, and researchers rely on them to understand in detail how proteins are built and how they function. However, making a protein form crystals can seem almost impossible – were it not for the Crystallization Facility at the MPI-BPC.



Some consider protein crystallization more an art than a science,” Sarah Sainsbury, head of the Crystallization Facility, says smiling. There certainly is some truth in this view – to appreciate it one just needs to look through a microscope at the beautiful and diverse crystals formed by proteins. With this in mind, the first masterpieces in the discipline of protein crystallization were created in the late 1950s: Back then, John Kendrew and Max Perutz crystallized the proteins myoglobin and hemoglobin, shot X-rays at them and, based on the information they hereby received, produced three-dimensional models of the two proteins. These were, of course, never exhibited in an art gallery – but they earned the two scientists a renowned scientific award in 1962: the Nobel Prize in Chemistry. Since then, the principles of protein crystallization have not changed. The pattern created by X-rays when diffracted by the protein crystal yields the crucial information. From this pattern researchers deduce the protein’s structure. Protein crystallization has gone a long way in science and today it is the method most often used to determine the three-dimensional structure of proteins.

But why is it important to know the shape of a protein in the first place? The answer to this question can be found in a credo of structural biologists: Structure is function. In other words, to properly understand how a protein works is only possible when you know its three-dimensional structure in as much detail as possible. However, to obtain this structure can be tricky. Protein crystallization is one of only very few methods available to this end – but a very powerful one: Today, with its help scientists can analyze the structure even of huge molecular complexes such as ribosomes or polymerases.

Nevertheless, there is one flaw: In spite of more than 50 years of experience with the method, it remains almost impossible to predict the conditions under which a certain protein will form

crystals. “There are just trends: Proteins that share certain properties tend to crystallize under similar conditions,” Sarah Sainsbury explains, “but there is no guarantee.” This uncertainty is a major reason why researchers depend on facilities like the one under the roof of tower four at the MPI-BPC: To find the right setting among thousands of options.

Far from looking like an artist’s studio, the two rooms of the facility are filled with modern technology: Several robots automatically pipet tiny amounts of liquid into the wells of plastic plates, solutions are pumped through hoses connecting bottles with various pieces of equipment. A huge cabinet provides space and perfectly controlled conditions for the protein crystals to grow. And in the middle of it all, two men in lab-coats are busy supervising the process. Jürgen Wawrzinek and Thomas Schulz are the technicians who run the facility and provide support for the scientists who want to grow protein crystals.

The Crystallization Facility has been founded by the Department of *Cellular Biochemistry* (led by Reinhard Lührmann) under supervision of Vlad Pena and with Ulrich Steuerwald as an expert for robotics. When Patrick Cramer joined the institute in 2014, the facility was equipped with new machines and belongs to his Department since. “But the scientists who grow crystals here come from various labs of the institute,” says Jürgen Wawrzinek. About 30 researchers are currently using the facility. “However, this is only a fraction of all the people who need our service at some point – they spend a lot of time preparing the protein they want to crystallize before coming to us.”

Indeed, obtaining a protein crystal is only part of the job when it comes to structure determination. Before that, scientists need to produce and purify the protein or the protein complex whose structure they want to study. This can take months. “To get a good crystal, it is absolutely essential to purify

the protein as well as possible,” Sarah Sainsbury points out. Only a highly purified protein sample will yield good crystals. It is like with beaten egg white: You must make sure not to have any yolk in it, otherwise you will have a tough time beating it until stiff. This is because of the emulgators contained in the yolk – they keep the proteins in the egg white from forming a mesh just as contaminations in the protein sample keep the protein from crystallizing. “Also, the choice of co-factors is important. They can stabilize a protein and thus help crystallize it.”

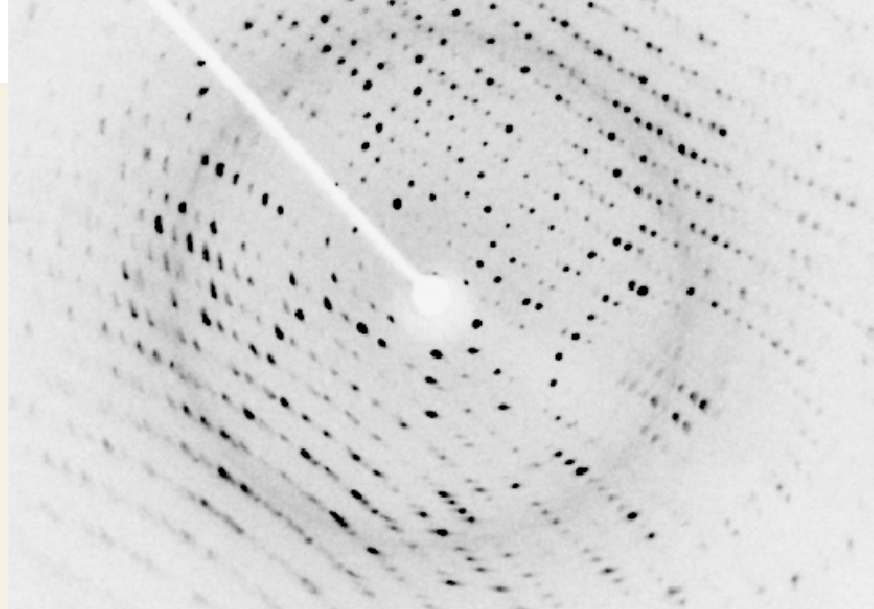
### Crystals may appear after hours or weeks

“Once the protein is purified, we take over the job of screening for the proper crystallization conditions,” says Thomas Schulz. At this point, it becomes clear why the facility is of great help for our researchers. Up to 2,000 conditions can be checked to find out in which environment a protein forms crystals. “However, with some experience you can have a guess and reduce the number of conditions you need to check before finding the right one,” Sarah Sainsbury adds.

The samples for the screening are prepared by a robot. Once programmed, it mixes tiny amounts of purified protein with different chemicals and thus creates individual environments for crystallization. These environments differ in many factors such as pH, ionic strength, the presence of various salts and ligands. For each condition, as little as 100 nanoliters of the protein sample are required, that is a tenth of a thousandth of a milliliter. This thriftiness is important as many proteins can only be produced and purified in small amounts.

But why should a protein form crystals? Sarah Sainsbury explains: “You have to reduce its solubility, but very slowly.” To achieve this, in each plate well the drop containing the protein is accompanied by a second drop that contains a so-called precipitant – this is a compound that strongly reduces the protein’s solubility. “Over time, the volume of the drop changes which affects the protein solubility. At some point, if the conditions are favorable, instead of just precipitating the protein molecules will arrange in a crystal lattice.”

For the first crystals to appear it may take as little as a few hours or as much as several weeks. “Sometimes, a



(Del 45, Wikimedia Commons, public domain)

X-ray diffraction pattern of a lysozyme crystal. / Röntgenbeugungsmuster eines Lysozym-Kristalls.

researcher goes through his or her old plates months later and suddenly finds crystals that have not been there before,” says Jürgen Wawrzinek.

The plates are stored in the big cabinet in the back of the lab. It provides space for 1,000 plates containing 96,000 samples. In order to check if their crystallization attempts are successful, the scientists do not even need to come upstairs into the facility. The imager is equipped with an automated camera system that regularly takes pictures of every plate. The images are transferred onto a central server and the researchers can look through them from their own computer to see if they can spot any crystals.

### Good crystals, bad crystals

With the first crystals, however, the job is not yet done: “Getting the crystals is only the first part. Next, you need to make them grow,” says Sarah Sainsbury. For crystals that are too tiny will not yield enough information when shot at with X-rays. And to make them grow it is usually necessary to further optimize the conditions under which the first crystals appeared. “This means another round of screening. But this time, you already know roughly what chemical environment is favorable.”

Finally, when the crystals are big enough – that is, something usually above 0.1 millimeters in diameter – it is time to check what they are made of. To this end, the facility harbors an inconspicuous but powerful machine, the PX Scanner. It shoots X-rays at promising crystals. The resulting pattern indicates if the crystals are any good. Here, dis-

appointment is threatening: At times it turns out that the miniature works of art are not built of protein after all – but of salt. “In that case, one has to start all over again with the screening.” And the work of weeks or months was all in vain. At least now the researcher knows what crystals he or she is not looking for – a thought of only little consolation.

But if all has gone well and the diffraction pattern looks promising, it is time for the last step: The scientists can take the crystal to one of the large synchrotrons DESY in Hamburg or SLS in Villigen, Switzerland. Only with the powerful X-rays generated by these sources they can obtain a diffraction pattern detailed enough to calculate the structure of the protein complex.

To get this far is tough at times. But experience helps, and some scientists come up with their very own ideas of how they can increase the odds: “Some people are kind of superstitious in what they believe helps their protein to crystallize properly,” Jürgen Wawrzinek tells laughing. “We had a guy who dipped a cat hair into each of his screening samples.” It seems to come down to this: Protein crystallization is some sort of art, indeed, and sometimes an obscure one. (fk)

*The crystal facility would like to acknowledge the support from the IT & Electronics Service (in particular Julian Janssen, Felix Kassner, Petra Hummel, and Petra Küster) and the Precision Mechanics Workshop of our institute headed by Rainer Schürkötter for their contributions in order to keep the facility running smoothly.*