

DURCH DEN DRSCHUNGEL

DER

MOLLEKÜLE

DURCH DEN DSCHUNDEL DER MOLEKÜLE

ROUTENPLANER FÜR ZIELE IM GENOM

JÖRG LANGOWSKI

Bestimmte Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, haben die Aufgabe, im Zellkern Gene an- oder abzuschalten. Damit sie ihre Arbeit tun können, müssen sie sich durch einen Dschungel von Zellsaft-Molekülen kämpfen, zu ihrer Wirkstätte vordringen, das Erbmolekül entwirren und an vorbestimmter Stelle binden. Die Wege, die Transkriptionsfaktoren dafür einschlagen, und die Kooperationen, die sie hierzu eingehen müssen, sind noch wenig bekannt. Neue Mikroskopiertechniken bringen Licht in das Dunkel.

D

Die Erbinformation in jeder Zelle des menschlichen Körpers ist in der DNA enthalten, einem sehr langen und sehr dünnen Molekülfaden. Insgesamt zwei Meter des Fadens sind in 46 Abschnitten, den Chromosomen, im circa 20 Mikrometer kleinen Zellkern verpackt. Auf diesem Faden ist wie in einem Text aus vier „Buchstaben“ – den Basenpaaren – die genetische Information abgelegt. Beim Menschen umfasst der Text – das Genom – sechs Milliarden Zeichen. Das entspricht einer Bibliothek aus etwa 10.000 Bänden in jeder einzelnen Zelle. Moderne Sequenzieretechniken können heutzutage diese gesamte Information innerhalb weniger Tage „lesen“ und werden beispielsweise in der Krebsdiagnostik schon routinemäßig eingesetzt. Die Reihenfolge der Basen, die „DNA-Sequenz“, alleine reicht aber nicht aus, um die Funktion einer Zelle im Organismus zu verstehen. Je nach Zelltyp sind nämlich unterschiedliche Gene aktiv – und welche Gene jeweils angeschaltet werden, hängt wesentlich von der räumlichen Struktur des Genoms ab.

Damit die genetische Information spezifisch abgelesen werden kann, muss ein Protein, ein sogenannter Transkriptionsfaktor, eine definierte Stelle finden und an sie binden. Anschaulich bedeutet dies, dass ein Floh einen bestimmten Abschnitt auf einem 50 Kilometer langen Haar finden muss, das in einen Medizinball geknäuel ist. Die DNA im Zellkern ist nun nicht irgendwie chaotisch zusammengeballt, sondern strikt organisiert: Zunächst bilden Histon-Proteine mit der DNA sogenannte Nukleosomen, in denen jeweils circa 150 Basenpaare in zwei engen Windungen aufgewickelt sind und sich wie die Perlen einer Kette auf dem Genom aneinanderreihen. Die Nukleosomenkette ist wieder zu höheren Strukturen gefaltet; schließlich nimmt jedes Chromosom ein separates „Chromosomen-Territorium“ im Zellkern ein. Damit ein Protein an die DNA binden und seine Funktion erfüllen kann, muss es seinen Wirkort im Dickicht des Genoms finden und die Nukleosomenstruktur öffnen. Wie zugänglich die DNA ist, wird unter anderem durch chemische Modifikationen der Histone geregelt.

Unser Ziel ist es, zu verstehen, wie Proteine, die als Transkriptionsfaktoren ihren Dienst tun, im Zellkern an ihren Wirkort gelangen, um dort Gene an- und abzuschalten, und wie die Veränderungen an den Histonen die Struktur des Genoms beeinflussen. Das ist nicht nur wichtig für das Verständnis der Biologie, es kann auch praktische Anwendungen finden: Die veränderte Struktur und Aktivität von Genen spielt beim Entstehen von Krankheiten, etwa von Krebs, eine entscheidende Rolle, und Substanzen, die die räumliche Struktur des Genoms beeinflussen, können sich als wichtige Medikamente herausstellen – das erste Krebsmedikament, das die Genomstruktur beeinflusst, wurde vor Kurzem zugelassen.

Neue Methoden der Mikroskopie

Um unser Forschungsziel zu erreichen, gilt es, die Wege und Wechselwirkungen von Proteinen nachzuvollziehen.

Doch wie lassen sich Moleküle im Innern von Zellen beobachten? Ein Verfahren, das die Zellbiologie weit vorangebracht hat, nutzt fluoreszierende, „leuchtende“ Proteine. Sie lassen sich mit gentechnischen Methoden an andere Proteine anheften. Werden Zellen, die derart markierte Proteine enthalten, mit kurzwelligem Anregungslicht bestrahlt, geben die markierten Proteine Fluoreszenzlicht längerer Wellenlänge ab und lassen sich dann selektiv beobachten. Für die Entdeckung der „autofluoreszierenden Proteine“, deren Entwicklung und Anwendung erhielten die Wissenschaftler Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien im Jahr 2008 den Nobelpreis für Chemie.

In einem klassischen Fluoreszenzmikroskop wird die gesamte Zelle mit Anregungslicht beleuchtet. Das Objektiv bildet dann nicht nur die scharfe Fokusebene, sondern auch die davor und dahinter liegenden unscharfen Bereiche ab. Das Ergebnis ist ein sehr verschwommenes Bild von der Zelle. Um eine zweidimensionale Ebene beobachten und die restlichen Bereiche ausblenden zu können, entwickelte der Physiker Ernst Stelzer am EMBL, dem Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg, die „Lichtscheibenfluoreszenz-Mikroskopie“ (englisch: Light Sheet Fluorescence Microscopy, LSFM). Dank einer speziellen Optik wird dabei nicht die komplette Zelle, sondern nur eine etwa zwei Mikrometer dünne Ebene beleuchtet. Das macht es möglich, „nur“ diejenigen Proteine zu beobachten, die sich in dieser Ebene befinden. Verschiebt man die beleuchtete Zone, lassen sich in kurzer Zeit sehr scharfe räumliche Bilder von Zellen aufnehmen.

Die LSFM wird in vielen Bereichen der Biologie eingesetzt, beispielsweise, um die Entwicklung von kleinen Organismen über längere Zeit zu beobachten, ihren Blutkreislauf in Echtzeit bildlich darzustellen oder Prozesse in der Zellmembran oder im Zytoskelett zu analysieren. Der Einsatz von LSFM zur Darstellung der Beweglichkeit von Proteinen ist ein neues Feld. Moderne Elektronik und schnelle Rechner machen es möglich, die Mobilität in Echtzeit als bildgebenden Parameter einzusetzen und so ein Bild der biologischen Prozesse in Raum und Zeit zu gewinnen.

Molekulare Bewegungskarten

Warum ist die Bewegung von Molekülen in der Zelle so entscheidend, um ihre biologische Funktion zu verstehen? Viele biologische Prozesse sind erst durch spontane Zufallsbewegungen von Atomen und Molekülen – die „Brown'sche Molekularbewegung“ – möglich. Sie ist dafür verantwortlich, dass ein Protein seine Bindungsstelle auf der DNA findet und Gene anschalten kann oder dass Enzyme mit kleinen Molekülen in der Zelle wechselwirken und Stoffwechselforgänge in Gang setzen können. Ein Schwerpunkt unserer Arbeit ist es, die Zufallsbewegungen der Moleküle des Genoms und assoziierter Proteine in der lebenden Zelle zu analysieren.

„Wie sich die Moleküle im Innern der Zellen bewegen, ist noch immer wenig verstanden und ein aktuelles Forschungsgebiet der Biophysik.“

Bereits seit den 1970er-Jahren gibt es eine Methode, die es erlaubt, die zufälligen Bewegungen von Molekülen zu vermessen und statistisch zu analysieren: die Fluoreszenz-korrelations-Spektroskopie (FCS). Dabei werden ein Laserstrahl durch ein Mikroskop in die Probe geschickt und die angeregte Fluoreszenz im Fokus beobachtet. Der Fokus ist sehr klein (etwa 0,5 Mikrometer breit und zwei Mikrometer lang) und enthält nur sehr wenige Moleküle. Deshalb ändert sich das Fluoreszenzsignal deutlich, wenn sich einzelne Moleküle in den Beobachtungsfokus hinein- oder hinausbewegen. Wertet man anschließend die zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenz mit statistischen Methoden aus, lassen sich Informationen über die Bewegung und die Konzentration der fluoreszierenden Moleküle sowie die Eigenschaften ihrer zufälligen Bewegungen gewinnen.

Das Innere einer Zelle enthält lange Fadenmoleküle wie die DNA im Zellkern oder lange Filamentproteine im Zellsaft (Zytosol), einem insgesamt dicht gedrängten gallertartigen Milieu, in dem auch zahlreiche kleinere Proteine und andere Moleküle gelöst sind. Trotz dieser Fülle müssen Proteine gezielt an ihren Wirkort gelangen. Die thermische Bewegung aller Moleküle in der Zelle „durchmischt“ das System so, dass molekulare Begegnungen genügend häufig stattfinden. Wie sich diese Bewegungen und Wechselwirkungen aber genau abspielen, ist noch wenig verstanden und ein aktuelles Thema der Biophysik.

Wie wäre es, wenn man die schnellen und langsamen Bewegungen eines Moleküls in der Zelle als Bild darstellen könnte? Die Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie erlaubt solche Messungen, kann aber eine Probe nur Punkt für



PROF. DR. JÖRG LANGOWSKI studierte Biochemie an der Medizinischen Hochschule Hannover und promovierte dort, nach einem einjährigen Aufenthalt an der Stanford University, über den Mechanismus der Restriktions-Endonuklease EcoR1. Es folgte ein Postdoc-Aufenthalt an der University of Washington in Seattle. Nach einer einjährigen Tätigkeit an seinem früheren Institut in Hannover ging er als Gruppenleiter an die EMBL-Außenstelle in Grenoble. Seit 1994 ist er Professor für Biophysik an der Universität Heidelberg und leitet die Abteilung „Biophysik der Makromoleküle“ am Deutschen Krebsforschungszentrum. Jörg Langowski ist Alumnus und Vertrauensdozent der Studienstiftung des deutschen Volkes und ehemaliger Heisenberg-Stipendiat.

Kontakt: jl@dkfz.de

Punkt abtasten; zudem beansprucht jede einzelne Messung mindestens zehn bis 15 Sekunden. Um eine Mobilitätskarte der Moleküle erstellen zu können, werden 50 bis 100 Punkte benötigt, was einer Messzeit von etwa einer Viertelstunde entspricht. Lebende Zellen ertragen jedoch nur eine begrenzte Bestrahlungszeit mit dem Laser, sonst werden sie unwiderruflich geschädigt. Dieses Messproblem lässt sich lösen, kombiniert man die Lichtscheibenfluoreszenz-Mikroskopie (LSFM) mit der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS).

Die Wissenschaftler Jan Krieger und Jan Buchholz aus unserer Arbeitsgruppe haben die LSFM-FCS-Kombination realisiert. Hierzu werden mit einer sehr schnellen Kamera etwa 1.000 bis 2.000 Bilder pro Sekunde aufgenommen. Jeder Bildpunkt stellt ein kleines Volumen der Zelle dar, dessen Durchmesser durch die seitliche Auflösung der Kamera (circa 0,5 Mikrometer) und dessen Länge durch die Dicke der Lichtscheibe (circa zwei Mikrometer) gegeben ist. In jedem einzelnen dieser Volumenelemente kann gemessen werden, wie sich die Fluoreszenz zeitlich verändert. Daraus lässt sich die Mobilität der Moleküle berechnen. Zusätzlich lässt sich charakterisieren, wie zwei mit verschiedenen Farbstoffen markierte Moleküle miteinander wechselwirken, da unsere Lichtscheibenfluoreszenz-Mikroskopie gleichzeitig Bildserien in zwei Farben aufnehmen kann.

Mit diesem neuen System untersuchte Agata Pernuš während ihrer Doktorarbeit, wie der Transkriptionsfaktor AP-1 im Kern lebender Zellen an das Erbmolekül bindet. AP-1 besteht aus zwei Untereinheiten und ist

„Neue Methoden der Mikroskopie erlauben es, einzelne Proteine, ihre Bewegungen und ihre Wechselwirkung mit anderen Molekülen unmittelbar zu beobachten.“

für die Aktivierung einer ganzen Reihe von Genen verantwortlich, beispielsweise für Gene, die für die „Differenzierung“ von Zellen, das Heranreifen zu Zellen mit spezieller Funktion, zuständig sind. Agata Pernuš konnte mit der LSFM-FCS zeigen, dass die beiden Proteinuntereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 in bestimmten Bereichen des Zellkerns aneinander binden (dimerisieren). Interessanterweise erwies sich die Mobilität der Proteine in genau diesen Bereichen als stark verringert. Daraus lässt sich schließen, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 in diesen Regionen an die DNA gebunden ist. Damit war gezeigt: Die Dimerisierung der Untereinheiten von AP-1 ist für die Funktion des Proteins notwendig, und das dimerisierte Protein ist vollständig an die DNA gebunden.

Ein sehr aufschlussreiches neues Ergebnis erhielt Giulia Marcarini aus unserer Arbeitsgruppe, als sie das Protein „Lamin“ mit LSFM-FCS untersuchte. Lamin ist ein Bestandteil der Zellkernhülle (Lamina). Bereits bekannt war, dass Bereiche des Chromatins – des Gesamtkomplexes aus DNA und Proteinen – an der Peripherie des Zellkerns an Lamin binden und dass Lamin außerdem im Innern des Zellkerns ein Netzwerk bildet. Als wir die Bewegungen von Lamin (grün markiert) und die Bewegungen des Chromatins (rot markiert) mit LSFM-FCS verfolgten, erkannten wir, dass Lamin nicht nur an der Peripherie, sondern auch im Innern des Zellkerns mit Chromatin assoziiert ist. Die Elastizität des von Lamin gebildeten Netzwerks scheint wesentlich zur Stabilität des Genoms beizutragen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich das Chromatin in Zellen, denen Lamin fehlt, deutlich langsamer bewegt. Da für viele zelluläre Prozesse Bereiche des Genoms miteinander wechselwirken müssen, die weit voneinander entfernt liegen, könnte eine biologische Funktion von Lamin darin bestehen, diese Wechselwirkungen zu beschleunigen.

Aufschlussreicher Energietransfer

Damit ein Transkriptionsfaktor seinen Dienst tun kann, muss er seinen Wirkort im Zellkern erreichen, die Nukleosomenstruktur öffnen und an die DNA binden. Diesen Vorgang haben wir mit einer weiteren optischen Methode analysiert, die sich „Förster-Resonanzenergietransfer“, kurz FRET, nennt. Ihren Namen trägt sie nach dem Göttinger Physiker Theodor Förster, der den physikalischen Prozess im Jahr 1946 erstmals theoretisch beschrieb. Es kommt dabei zur Übertragung von Anregungsenergie zwischen zwei fluoreszierenden Molekülen: einem Donor (Spender) und einem Akzeptor (Empfänger). Der Donor wird dazu beispielsweise mit grünem Licht angeregt und strahlt sodann gelbes Fluoreszenzlicht ab. Ist ein Akzeptor in der Nähe, der durch die gelbe Lichtwellenlänge angeregt wird, kann der Donor seine Anregungsenergie auch direkt und „strahlungslos“ auf den Akzeptor übertragen. Der Akzeptor wird dadurch seinerseits angeregt und strahlt dann beispielsweise rotes Fluoreszenzlicht ab. Insgesamt lässt

sich beobachten, dass die Fluoreszenz des Donors (gelb) schwächer und die Fluoreszenz des Akzeptors (rot) stärker wird, je näher sich die beiden Farbstoffmoleküle kommen. Die Stärke des Energietransfers kann deshalb als Maß für den Abstand der beiden Moleküle dienen. In der Biophysik ist FRET ein Standardverfahren, um die Struktur von Molekülen zu untersuchen. Dazu werden zwei vorgegebene Positionen im Molekül mit je einem roten und einem grünen Fluorophor markiert und aus dem FRET-Wert der Abstand der beiden Moleküle bestimmt. Macht man das an mehreren Punkten, lässt sich die räumliche Struktur des Moleküls ermitteln.

Mit FRET-Messungen konnte Katalin Tóth in unserer Gruppe im Jahr 2001 erstmals den räumlichen Verlauf der aus dem Nukleosom herausragenden DNA bestimmen. Überraschenderweise wich der Verlauf der DNA deutlich von dem ab, der zuvor aufgrund der Kristallstruktur vermutet worden war: Das Nukleosom erwies sich als deutlich „offener“; andere Arbeitsgruppen konnten das später mit röntgenkristallographischen Untersuchungen größerer Chromatineinheiten bestätigen. Mit unseren weiteren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass Modifikationen an den Histonen, die das Chromatin zugänglicher machen und damit Gene aktivieren, auch eine deutliche Öffnung der Struktur des Nukleosoms bewirken. Mit Computersimulationen konnten wir zwischenzeitlich zeigen, wie die Wechselwirkung zwischen den Histonen und der DNA die Nukleosomstruktur öffnen oder schließen kann.

Einzelne Moleküle sichtbar machen

FRET ist eine wichtige Methode, um strukturelle Informationen zu erhalten, erlaubt aber nur Aussagen über Mittelwerte einer großen Anzahl von Molekülen. Diese Einschränkung kann umgangen werden, beobachtet man einzelne Moleküle. Möglich macht das die „Einzelmolekülspektroskopie“. Mit ihr ist ein leistungsfähiges Werkzeug verfügbar, um Strukturübergänge und Wechselwirkungen in biologischen Molekülen auf sehr kurzen Längenskalen (ein bis zehn Nanometer) zu verfolgen, ohne die Moleküle auf Oberflächen oder durch Kristallisation immobilisieren zu müssen. Die Einzelmolekülspektroskopie ist von zentraler Bedeutung für die Biophysik und die physikalische Chemie und eine wesentliche Basis für die heute mögliche Lichtmikroskopie mit höchster Auflösung. Für diese Weiterentwicklung der Mikroskopie erhielten der deutsche Physiker Stefan Hell – außerplanmäßiger Professor an der Universität Heidelberg – und die amerikanischen Wissenschaftler Eric Betzig und William Moerner im Jahr 2014 den Nobelpreis für Chemie.

Typischerweise wird in einem Spektrometer eine Probe vermessen, die pro Kubikzentimeter Billionen von Molekülen enthält. Bei der Einzelmolekülspektroskopie hingegen verringert man das Volumen einer Probe derart, dass immer

THROUGH THE MOLECULAR JUNGLE

HOW DO PROTEINS FIND THEIR TARGET IN THE GENOME?

JÖRG LANGOWSKI

Switching genes in the cell on and off takes a complex interplay of changes in the genome structure and of proteins binding to specific target sites. The details of this molecular dance are not yet fully known, but they are essential for our understanding of how genes work in healthy and diseased cells. The Langowski group has developed a range of microscopy methods to investigate the dynamics of proteins acting on the genome.

One technique, light sheet microscopy, is used to visualise proteins as they move inside cells. A micrometre-thin slice of the sample is illuminated through special optics; fluorescent molecules in this slice are then imaged through a microscope lens onto a fast, highly sensitive camera that can record several thousands of images per second. Using this microscope, scientists in the group could show that certain transcription factors always dimerise when they bind to DNA, and that the lamin proteins form an elastic network that holds the genome together. Furthermore, single-molecule spectroscopy is used to observe the smallest units of the genome, the nucleosomes, as they change their structure to open or close access to the genetic information. The scientists discovered not only how nucleosomes open and close, but also how their stability is influenced by chemical modifications of the proteins and DNA in the genome.

Knowing how proteins act on genes in the living cell is not only fundamentally interesting to biologists and physicists; it is an important prerequisite for medical application. For example, gene activity is central for understanding cancer, and substances capable of interfering with such regulatory processes might one day become essential drugs. An accurate description of gene regulatory mechanisms – from the route travelled by a transcription factor to its interaction with DNA – will help us understand the cell as a functioning system that is more than the sum of its parts. This raises hopes of finding entirely new diagnostic and therapeutic procedures. ●

PROF. DR JÖRG LANGOWSKI studied biochemistry at Hannover Medical School. After spending a year at Stanford University, he returned to Hannover to earn his doctoral degree with a thesis on the mechanism of restriction endonuclease EcoR1. The post-doc phase of his career took him to the University of Washington in Seattle. Following another year at his former institute in Hannover, he accepted a position as Group Leader at the EMBL branch in Grenoble. In 1994 he became Professor of Biophysics at Heidelberg University and head of the Biophysics of Macromolecules division at the German Cancer Research Center. Jörg Langowski is an alumnus and tutor of the German National Academic Foundation (Studienstiftung des deutschen Volkes) and a former Heisenberg Fellow.

Contact: jl@dkfz.de

“Understanding gene regulation is not just of fundamental interest to biologists – it also raises hopes of finding new diagnostic and therapeutic procedures for frequent human illnesses.”

nur ein Molekül zu sehen ist. Dies ist zu erreichen mit einem Laserstrahl, der in die Probe geschickt wird, und mit einer Optik, die genau dort die Fluoreszenz beobachtet. Da sich die Moleküle thermisch bewegen, treffen sie pro Sekunde einige Male den Laserfokus. Dieses Aufeinandertreffen verrät ein kurzer Lichtblitz, den empfindliche Detektoren auffangen.

Ist das Molekül – wie bei unseren Nukleosomen – mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert, kann man aus dem Verhältnis der Lichtintensitäten im Donor- und Akzeptorkanal den FRET-Wert und somit für jedes einzelne Molekül den Abstand der beiden Farbstoffe ermitteln (single-pair FRET; spFRET). So lässt sich erkennen, ob alle Moleküle die gleiche Struktur haben – oder ob es verschiedene Unterstrukturen gibt, bei denen der Abstand unterschiedlich ausfallen wird. Mit einer reinen Mittelwertmessung einer großen Anzahl von Molekülen wäre dieser Nachweis nicht möglich.

In unserer Arbeitsgruppe konstruierte Alexander Gansen ein hochleistungsfähiges spFRET-Gerät, das Katalin Tóth, Vera Böhm und Kathrin Tegeler in den letzten Jahren genutzt haben, um die möglichen Unterstrukturen von Nukleosomen und deren Übergänge systematisch zu vermessen. Damit ist es ihnen gelungen, ein detailliertes Modell der Öffnung von Nukleosomen aufzustellen. Anders als erwartet zeigte sich, dass das Nukleosom zunächst in einen Zustand übergeht, in dem noch alle acht Histon-Proteine, aus denen das Nukleosom besteht, an die DNA gebunden sind. Erst danach lösen sich die Histon-Proteine nacheinander von der DNA ab. In der lebenden Zelle befinden sich zu jeder Zeit etwa ein Prozent aller Nukleosomen in diesem offenen Zustand, der damit ein sehr guter „Angriffsort“ für Proteine ist, die mit der DNA wechselwirken sollen.

Die Kenntnis, wie Proteine im Zellkern Gene an- und abschalten, ist nicht nur allein von grundsätzlichem biologischen Interesse, sondern auch eine wichtige Voraussetzung für Anwendungen in der Medizin. Die Aktivität von Genen spielt beispielsweise bei Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle, und Substanzen, die in solche Regulationsprozesse einzugreifen vermögen, könnten sich als wichtige Medikamente herausstellen. Ein genaues Verständnis der Genregulation – von den Wegen eines Transkriptionsfaktors bis hin zu seinem Wirkort und der Wechselwirkung mit der DNA – kann uns gekoppelt mit Computersimulationen dabei helfen, die Zelle als funktionierendes System zu verstehen, das mehr ist als die Summe seiner Teile. Dies lässt auf gänzlich neue Diagnose- und Therapieverfahren hoffen. ●

„Das Verständnis der Genregulation ist nicht allein von grundlegendem biologischen Interesse – es verspricht auch neue Ansätze für die Diagnose und Therapie häufiger Erkrankungen.“