

# Neue Welten

Vibrationspektroskopie: Filme von proteingebundenem Wasser und lebenden Zellen

Prof. Dr. Klaus Gerwert

Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum

Seit Jahrhunderten bemühen sich Forscher, die für unser menschliches Auge nicht mehr auflösbaren Lebensprozesse im Detail sichtbar zu machen.

Dabei haben bahnbrechende Entwicklungen von mikro(spektro)skopischen Techniken die Grenze der Auflösung immer weiter verschoben. Mit jedem Verschieben der Grenze wurden neue Welten entdeckt. Da es sich bei den biologischen Vorgängen um dynamische Prozesse handelt, möchte man aber nicht nur Schnappschüsse einzelner Zustände, sondern am besten gleich einen ganzen Film mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung aufnehmen können. Die Auflösung dieser Prozesse ist aber nicht nur von rein akademischem Interesse. Kommt es zu Störungen in den Abläufen, erkranken die Lebewesen. Daher ist es von besonderem Interesse, die Mechanismen im Detail zu verstehen.

Dann kann auch die Ursache der Erkrankung elegant mit Wirkstoffen der personalisierten Medizin präzise behandelt werden, statt den Erkrankten über chirurgische Eingriffe oder Chemotherapien enorm belasten zu müssen.

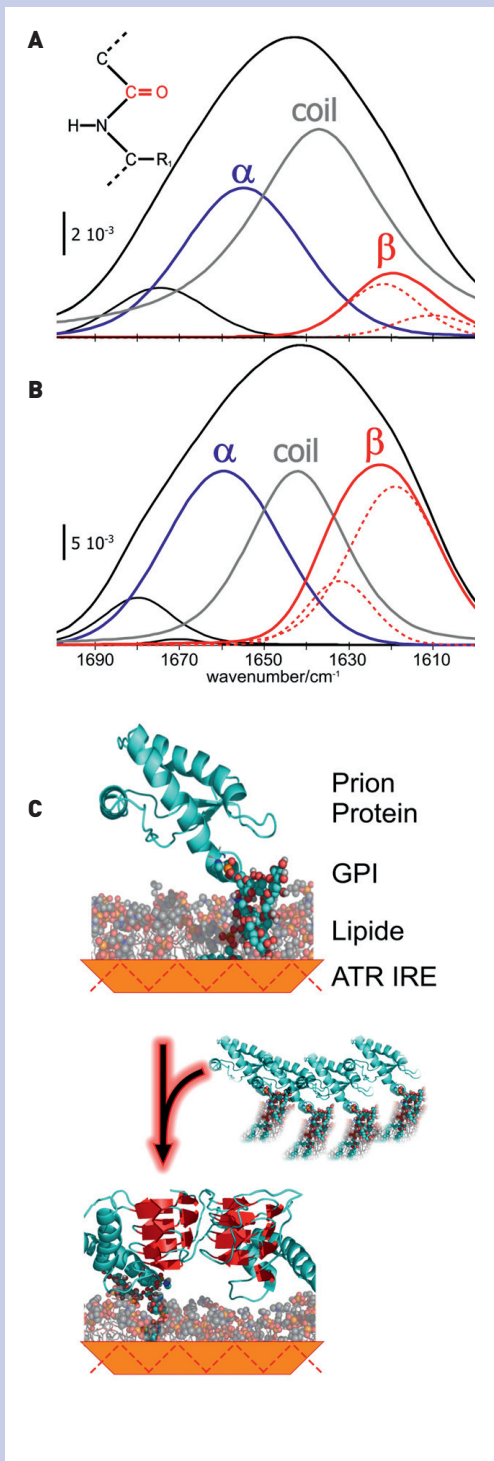
Letztendlich beruhen alle Erkrankungen auf Fehlfunktionen in der Zelle, die auf Defekten der Proteininteraktion und der Proteine in den Zellen beruhen. Nur wenige Techniken sind in der Lage, sowohl lebende Zellen als auch Proteininteraktionen insbesondere an Membranen und einzelne Proteine aufzulösen (Abb. 1). Aktuelle Ansätze der Vibrationspektroskopie, wie die zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie und konfokale Raman-Mikroskopie, ermöglichen aber genau diese analytische Herausforderung. Im Folgenden werden einige aktuelle Ergebnisse vorgestellt.

Abb 1 Die Vibrations(mikro)spektroskopie wird auf verschiedenen Skalen zur Analyse von Proteinreaktionsmechanismen, Proteininteraktionen an Membranen und von lebenden Zellen eingesetzt.

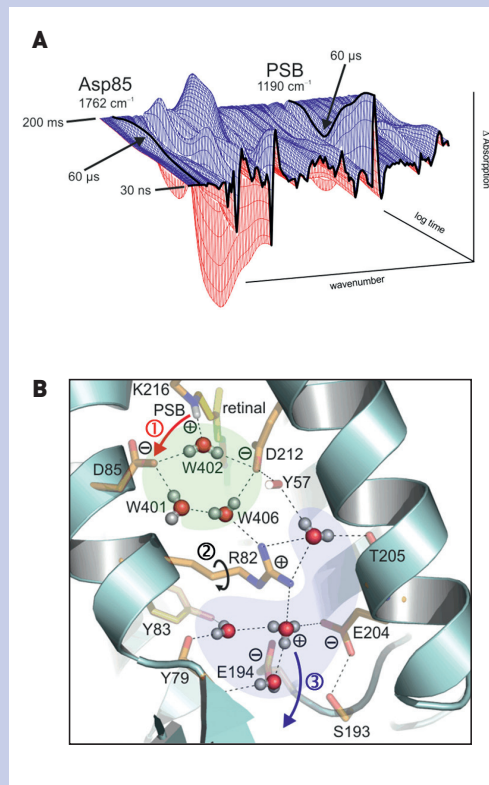




**Klaus Gerwert**, geb. in Reken/Westfalen, studierte Physik in Münster, promovierte in der Fakultät für Chemie und Pharmazie in Freiburg und habilitierte in physikalischer Chemie in Bielefeld. Nach der Promotion wechselte er an das Max-Planck-Institut in Dortmund und entwickelte die zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie an Proteinen. Ausgezeichnet mit einem Heisenberg-Stipendium der DFG, wechselte er zum Scripps Institut in Kalifornien. Mit 37 Jahren wurde er 1993 auf den Lehrstuhl für Biophysik an die Ruhr-Universität Bochum berufen. Er ist Gründer und Sprecher des SFB 642, GTP- und ATP-abhängige Membranprozesse. Seine Arbeit wurde 1992 mit dem Karl-Arnold-Preis der Nordrheinwestfälischen Akademie der Wissenschaften und Künste ausgezeichnet, deren Mitglied er seit 2008 ist. Er erhielt 2006 den Innovationspreis Ruhr vom Ministerpräsidenten NRW. In Zweitberufung ist er Direktor am Max-Planck-Partnerinstitut in Shanghai und „Fellow“ der Max-Planck-Gesellschaft. Seine Arbeiten konzentrieren sich auf die Untersuchung molekularer Reaktionsmechanismen von Proteinen, insbesondere von Membranproteinen. Dazu entwickelt er insbesondere zeitaufgelöste vibrationspektroskopische Methoden. Seit 2010 widmet er sich in PURE bildgebenden vibrationspektroskopischen Methoden an Zellen und Geweben.



**Abb. 2** Die konformationssensitive Amid I Bande entsteht durch die C=O-Streckschwingung des Proteinrückgrats (A). Die Bande ist in die einzelnen Sekundärstrukturelemente -Helix, -Faltblatt und Zufallsknäuel (random coil) zerlegbar. Die Struktur von nativ über seinen GPI-Anker an Membranen mit Lipidmikrodomänen (lipid rafts) gebundenem Prion-Protein entspricht der bereits bekannten Struktur des ankerlosen rekombinanten Prion-Proteins in freier Lösung (A, C oben). Bindet übermäßig viel Prion-Protein an die Membran, faltet es spontan zu -Faltblatt (B). Anhand der intermolekularen -Faltblatt Bande erkennt man den Beginn der Oligomerisierung (B, C unten). In den verwendeten Lösungen wurde keine Fehlfaltung beobachtet. Damit ist die hohe Konzentration durch Membranbindung wichtig für die Fehlfaltung.



**Abb. 3 A** Die zeitabhängigen Änderungen der Infrarot-Absorptionen während des bR-Fotozyklus von 30 ns bis 200 ms in logarithmischer Darstellung bei 4  $\text{cm}^{-1}$  spektraler Auflösung simultan zwischen 1800  $\text{cm}^{-1}$  und 1000  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Protonierung von Asp85 [Bande bei 1762  $\text{cm}^{-1}$ ] und De- bzw. Reprotonierung der Schiff'schen Base (PSB) [Bande bei 1190  $\text{cm}^{-1}$ ] sind markiert. In 60  $\mu\text{s}$  wird ein Proton von der PSB zu Asp85 transferiert (B), was im Spektrum durch den Abfall der 1190  $\text{cm}^{-1}$  Absorption und den Anstieg der Absorption bei 1762  $\text{cm}^{-1}$  deutlich wird.

**Abb. 3 B** Durch eine Licht-induzierte Isomerisierung des Chromophors Retinal wird die starke H-Brücke des Wassers 402 zur PSB aufgebrochen und etwa die Hälfte der Lichtenergie im Protein gespeichert. Da die freie OH-Gruppe von Wasser 401 (dangling water) nach Isomerisierung wasserstoffbrückengebunden wird, stabilisiert Wasser 401 nicht länger die negative Ladung von Asp85 und der pK-Wert wird erhöht. Das Proton wandert von der zentralen Protonenbindestelle PSB zum Gegenion Asp85. Durch die Neutralisierung von Asp85 wird die Salzbrücke zu Arg82 gebrochen und Arg 82 dreht sich zum protonierten Wasserkomplex. Die Bewegung der positiv geladenen Guanidinium-Gruppe des Arg 82 destabilisiert den protonierten Wasserkomplex nahe der Proteinoberfläche. Das protonierte Wassercluster (blau schattiert) speichert ein Proton in einem so genannten Eigen-Kation ( $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_3$ ). Im Gegensatz zum zufälligen Grotthuss-Protonentransfer in Wasser wird im Protein der protonierte Wasserkomplex durch eine gezielte Bewegung des Arg82 deprotoniert. Im Protein wird das Proton in der zweiten Hydratschale über ortsfeste Aminosäuren, statt über flexible Wassermoleküle stabilisiert. Das Protein hat die physiko-chemischen Eigenschaften des Wassers genutzt, um schnell und gezielt das Proton zu transferieren.

## Infrarot- und Raman-Spektroskopie sind markerfreie Nachweismethoden

Jedes Molekül hat Schwingungen, die so charakteristisch sind wie ein Fingerabdruck. Daher kann ein Molekül ohne jede weitere Markierung anhand seiner charakteristischen Infrarot-Absorption oder seiner Raman-Emission identifiziert werden. Dazu werden Vibrationsniveaus, also die Schwingungsenergieniveaus eines Moleküls, angeregt. Deswegen spricht man in beiden Fällen von Vibrationspektroskopie. Die Vibrationsniveaus lassen sich mit geringer Energie anregen und benötigen daher im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie keine spezifischen Fluoreszenz-Label, mit denen die zu untersuchenden Objekte, z.B. Proteine, erst markiert werden müssen. Komplementär zur Fluoreszenzspektroskopie kann die Vibrationspektroskopie die Moleküle, und ihre biochemischen sowie strukturellen Eigenschaften direkt markerfrei nachweisen. Anders als in der Röntgenstrukturanalyse braucht z.B. ein Protein zur Strukturaufklärung nicht kristallisiert zu werden, sondern kann unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden.

## Neurodegenerative Erkrankung durch fehlgefaltete Proteinstruktur

Paradigmatisch für Proteine, die durch Fehlfaltung neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. Alzheimer auslösen, ist das Prion-Protein. Fehlgefaltet löst es die Rinderseuche BSE oder beim Menschen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit aus. Die Fehlfaltung des nativen, voll glykosylierten Prion-Proteins wurde von uns in nativer Membranbindung mit zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie analysiert [1]. Dazu wurde die Verschiebung der Amide I Bande aufgenommen (Abb. 2). Die Lage der intensiven Amid I Bande des Proteingerüsts, die C=O-Streckschwingung, ist im Spektrum abhängig von der Sekundärstruktur des Proteins. Wir konnten zeigen, dass eine Fehlfaltung in den krankmachenden Zustand nur bei Membranbindung des Proteins erfolgt, also die Anbindung Voraussetzung für diese Fehlfaltung ist.

## **Zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie an Membranproteinen**

Ist ein Protein als Schlüsselbaustein eines biologischen Prozesses identifiziert, kann man den molekularen Reaktionsmechanismus mithilfe der zeitaufgelösten FTIR-Differenzspektroskopie im Detail bestimmen. Durch die Differenzbildung werden aus der Hintergrundabsorption der gesamten Probe nur die funktionell aktiven Gruppen des Proteins selektiert. Dazu muss die Proteinreaktion präzise gestartet werden. Alle Reaktionen in dem Protein werden dann simultan mit Nanosekunden-Zeitauflösung im infraroten Spektralbereich aufgenommen. Durch Vergleich mit ortsspezifischen Mutanten oder durch Isotopenmarkierung können die einzelnen IR-Banden eindeutig molekularen Gruppen des Proteins zugeordnet werden. In der Regel werden die Messungen an rekombinanten Proteinen durchgeführt.

## **Gebundene Wassermoleküle leiten Protonen in ein Membranprotein**

Am Beispiel der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin wird hier die zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie illustriert. Der Transportweg eines Protons, ausgehend von der zentralen Protonenbindestelle, der protonierten Schiff'schen Base (PSB) über Asp85 und einem protonierten Wasserkomplex, einem so genannten Eigenkation, konnte im Detail mithilfe der zeitaufgelösten FTIR-Differenzspektroskopie nachgewiesen werden [2]. In Abbildung 3 ist der Mechanismus im Detail gezeigt. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Protonenabgabegruppe sich wie eine Diode verhält, daher wurde analog der Begriff „Protonendiode“ eingeführt [3]. Dies erklärt, warum der Protonentransfer in dem Protein gerichtet ist. In freiem Wasser ist der Protonentransfer zufällig in beliebige Richtungen. Damit ein Protonengradient an der Zellmembran von dem Protein aufgebaut werden kann, hat das Protein aus dem ungerichteten Prozess in Wasser einen gerichteten Prozess in seinem Innern durch Anwendung der Gesetze der physikalischen Chemie erzeugt. Wir konnten mit unseren Beobachtungen die Ergebnisse aus der klassischen physikalischen Chemie in die heutige molekulare Biologie übertragen.

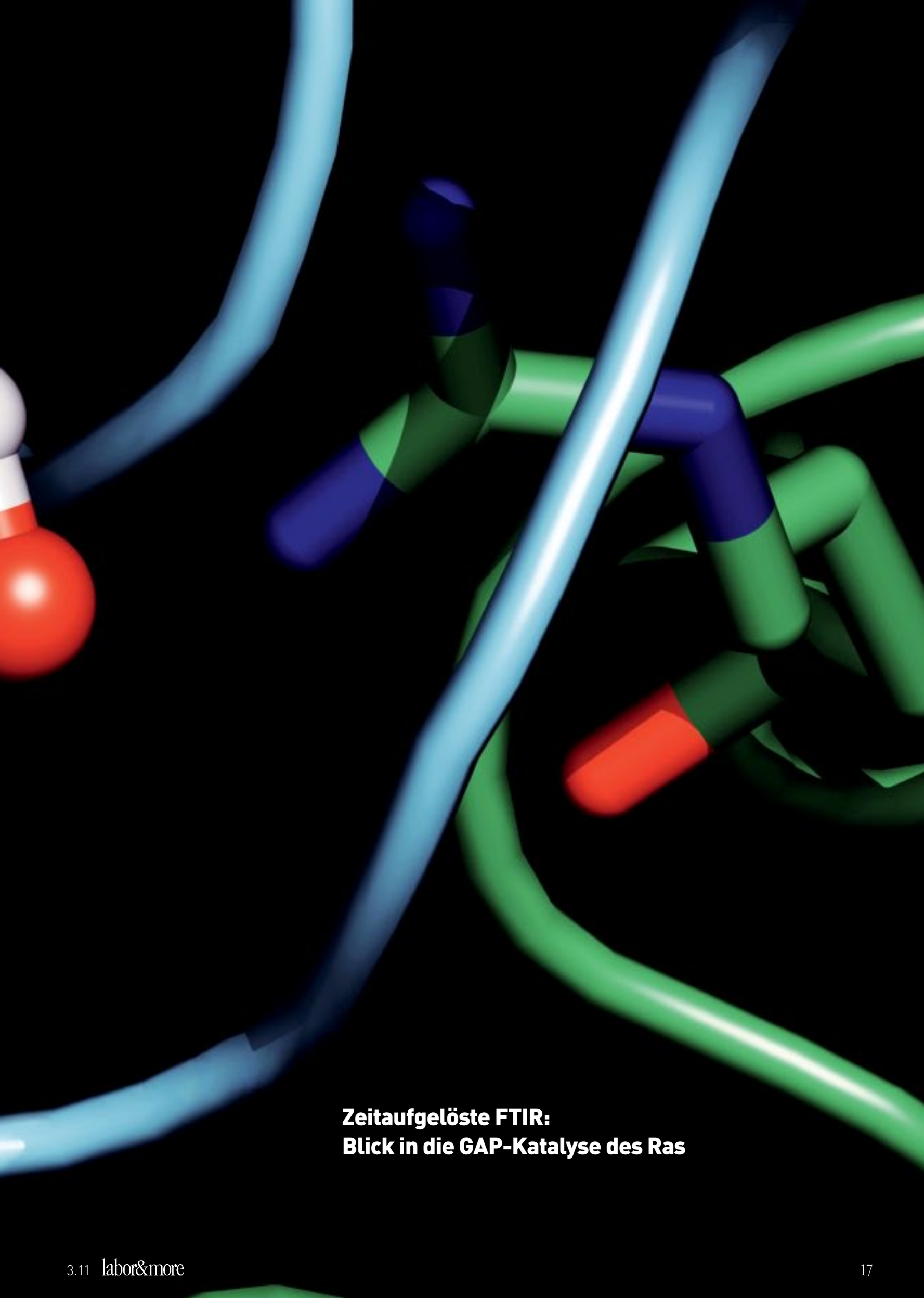
## **Das membrangebundene Ras-Protein**

Das kleine Guanosintriphosphat (GTP) bindende Ras-Protein funktioniert als molekularer Schalter, der ein Wachstumssignal in der Zelle auslöst. In rund 30% aller menschlichen Tumoren finden sich onkogene Mutationen mit Einfluss auf die GTPase-Aktivität des Proteins, z.B. K-Ras bei Darmtumoren. In zeitaufgelösten FTIR-Experimenten kann die GTPase-Reaktion mit Hilfe von fotolabilem so genannten caged-GTP gestartet werden. Ein kurzer UV-Laserblitz spaltet die verwendete caged-Gruppe (o-Nitrophenylethyl) ab und startet somit die GTP-Hydrolysereaktion des Ras-Proteins. In der lebenden Zelle wird die Hydrolyse durch so genannte GAP-Proteine (GTPase aktivierend) katalysiert und damit geregelt. In onkogenen Mutationen kann das Ras-Protein zwar aktiviert werden, aber das Abschalten durch die Hydrolyse, insbesondere die Katalyse durch GAP, ist gestört. Damit kommt es zu unkontrollierten Wachstumssignalen, die letztendlich mit zur Krebsentstehung beitragen. In Abbildung 4 werden die GTP-Hydrolyse des Ras-Moleküls und die Beschleunigung durch das GAP gezeigt. Dabei konnte zum ersten Mal ein für die Katalyse wichtiger Zwischenschritt aufgelöst werden [4].

Das Ras-Protein ist über Lipidanker an der Zellmembran gebunden. Mit Hilfe der ATR-Technik (Messung mit abgeschwächter Totalreflexion) konnte Ras in seiner natürlichen Umgebung an einer Lipidmembran FTIR-spektroskopisch untersucht werden [5]. Damit kann jetzt das Interaktionsnetzwerk des Ras-Proteins und der Einfluss von Wirkstoffen auf diese Interaktionen im Detail studiert werden. Könnte man das Interaktionsnetzwerk von onkogen-mutiertem Ras mit kleinen Wirkstoffmolekülen beeinflussen, so wäre dies ein molekularer Ansatz im Rahmen der personalisierten Medizin. Die FTIR-spektroskopische ATR-Technik liefert ein markerfreies Nachweisystem zur Identifizierung von Wirkmechanismen möglicher Leitsubstanzen in der personalisierten Medizin [6]. Die ATR-Technik funktioniert ähnlich wie die Oberflächenplasmonresonanz, engl. Surface Plasmon Resonance (SPR), liefert aber die biochemische Information durch Vibrationspektroskopie.

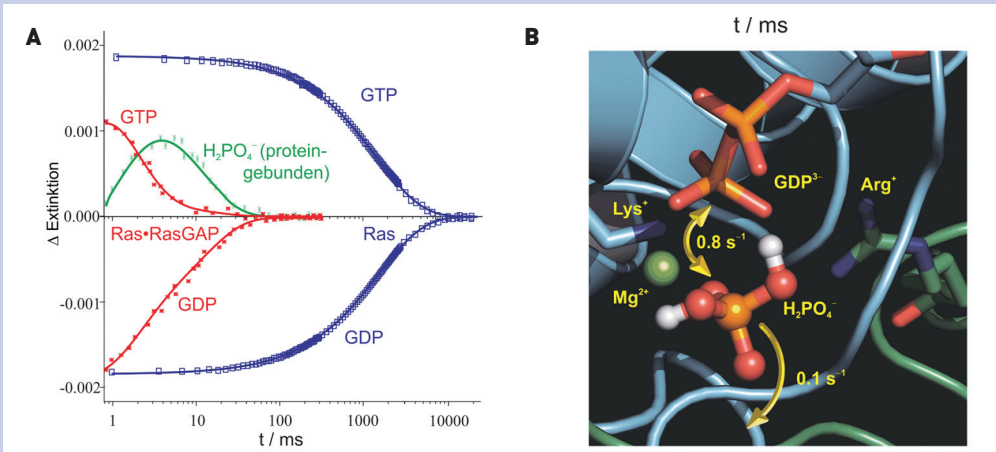
# imaging

A 3D molecular model is shown against a black background. The model consists of several interconnected components: a network of light blue rods and spheres, a central green sphere, and a cluster of red and orange spheres with white and red rods. The spheres are rendered with a glossy, reflective surface, and the rods are smooth and cylindrical.

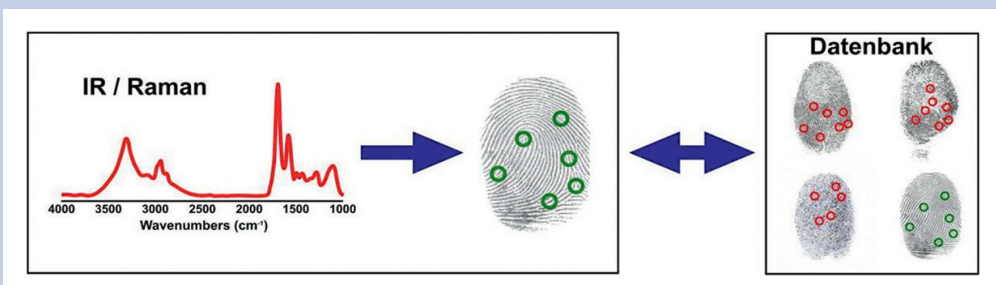


**Zeitaufgelöste FTIR:  
Blick in die GAP-Katalyse des Ras**

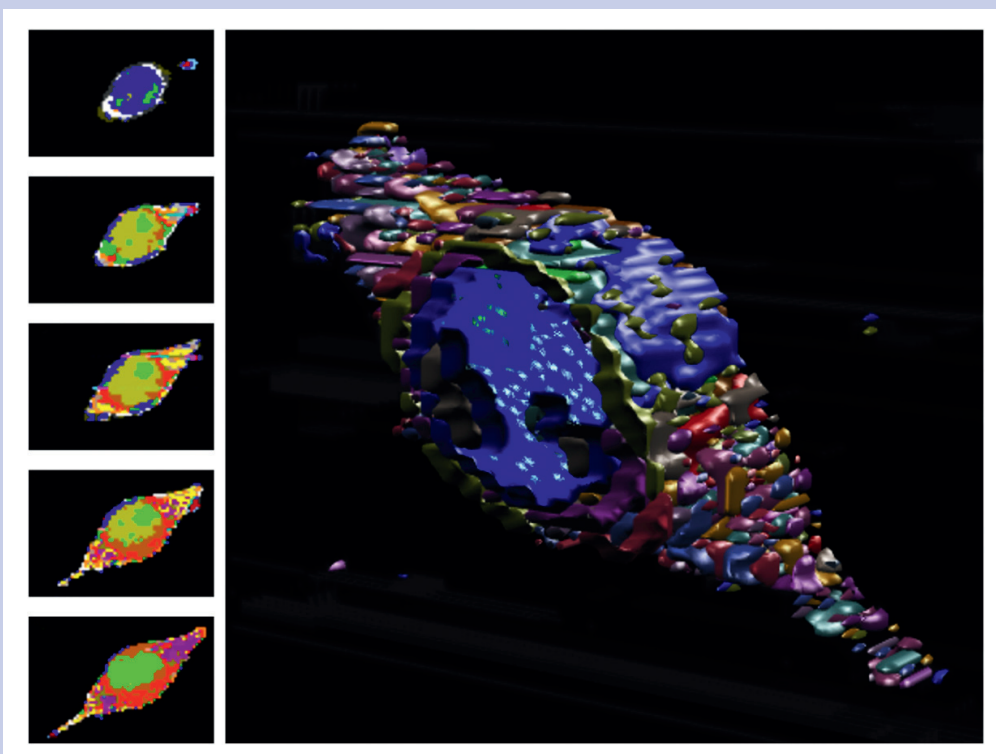
# imaging



**Abb. 4** A) Kinetiken ausgewählter Marker-Banden für die GTPase-Reaktion des Ras-Proteins (blau) und von Ras-RasGAP (rot). Die Protein-Protein-Interaktion des Ras mit dem GAP führt zu einer Beschleunigung der Reaktion um 5 Größenordnungen. Außerdem entsteht bei der Ras-RasGAP katalysierten Reaktion nicht direkt das Produkt  $\text{GDP} + \text{P}_i$ , sondern es tritt ein Zwischenschritt (grün) auf. Diesem konnte aufgrund seines Spektrums die in B) gezeigte Struktur zugeordnet werden.



**Abb. 5** Das Vibrationspektrum einer Probe (Protein, Gewebe, Körperflüssigkeit etc.) spiegelt den biochemischen Zustand wider. Damit ist es so charakteristisch wie ein Fingerabdruck und erlaubt die Identifikation anhand einer Datenbank mit geeignetem Vergleichsalgorithmus.



**Abb. 6** Links: Konfokale Raman-mikrospektroskopische markerfreie Index-Bilder einer lebenden Zelle. Diese lassen sich zu einem dreidimensionalen Index-Bild der Zelle (rechts) rekonstruieren.

## Raman-Imaging an lebenden Zellen

Geht man weiter von dem In-vitro-System, einem rekombinanten Protein oder einem membranrekonstituierten Protein zu einer lebenden Zelle, muss die Vibrationspektroskopie anders eingesetzt werden: Bei IR- und Raman-Mikroskopen werden die gesamten biochemischen Eigenschaften ortsaufgelöst jeweils an allen gemessenen Bildpixel-Punkten integral dargestellt. Einzelne Proteine, Lipide oder DNS werden dabei nicht mehr aufgelöst, sondern die Gesamtheit aller Analyten wird gemessen. Man kann also nicht mehr wie in den beiden vorherigen Beispielen im Detail über einzelne Proteine Aussagen treffen, jedoch erhält man ein integrales Bild, einen spektralen Biomarker, der den biochemisch-strukturellen Zustand an der gemessenen Stelle z.B. einer Biopsieprobe wie einen Fingerabdruck wiedergibt (Abb. 5). Wie bei der Identifikation anhand eines Fingerabdrucks muss eine Datenbank aufgebaut werden, um die spektralen Biomarker als Klassifikator bei der Annotation von Zellkomponenten einsetzen zu können. Die konfokale Raman-Mikroskopie erlaubt dabei zusätzlich verschiedene Schnitttiefen aufzunehmen. Diese lassen sich dann zu einem dreidimensionalen Bild der Zelle zusammensetzen (Abb. 6). Die einzelnen subzellulären Komponenten werden markerfrei simultan erfasst.

Durch Einsatz von Infrarot-Mikroskopen lassen sich ganz analog ortsaufgelöste Informationen von Gewebeschnitten erhalten. Mithilfe von Pathologen werden dann diese Indexfarbenbilder durch Vergleich mit klassisch angefärbten Proben annotiert. Multivariate Statistik mit der Verwendung von breiten Spektralbereichen verbessert die Analyse. Am Ende dieser Entwicklung soll mit Hilfe der Vibrationspektren Gewebe objektiv in einem automatischen Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität klassifiziert werden. Dies ist uns kürzlich für Darmkrebs-Biopsieproben automatisiert gelungen.

Zur Entwicklung dieser Methoden und der Translation in die klinische Forschung ist das europäische Proteinforschungsinstitut PURE mit Unterstützung der NRW-Landesregierung in 2010 gegründet worden.

[gerwert@bph.rub.de](http://gerwert@bph.rub.de)

#### Literatur

- [1] Elfrink, K., Ollesch, J., Stöbr, C., Willbold, D., Riesner, D., Gerwert, K. *Structural changes of membrane anchored PrPC. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 10815-10819 (2008).
- [2] Garczarek, F., Gerwert, K. *Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy, Nature* (439) 109-112 (2006).
- [3] Wolf, S., Freier, E., Potschies, M., Hofmann, E., Gerwert, K. *Gerichteter Protonentransfer in Membranproteinen mittels protonierter proteingebundener Wassermoleküle: eine Protonendiode. Angew. Chem.* 2010, 122, 7041-7046.
- [4] Kötting, C., Bleszenobl, M., Suveyzdis, Y., Goody, R.S., Wittingbofer, A., Gerwert, K. *A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein. Proc. Natl. Acad. Sci USA* (103) 13911-13916 (2006) (coverstory).
- [5] Guldenbaupt, J., Adigüzel, J., Kublmann, J., Waldmann, H., Kötting, C., Gerwert, K. *Secondary structure of lipidated Ras bound to a lipid bilayer. FEBS J.* 275, 5910-5918 (2008).
- [6] Kötting C., Suveyzdis Y., Bojja R.S., Metzler-Nolte N., Gerwert K., *Label-Free Screening of Drug-protein Interactions by trF-TIR Spectroscopic Assays Exemplified by Ras Interactions. Applied Spectroscopy* 64 (2010) 967– 972.
- [7] El-Masbtoly, S.F., Mavarani, L., Kötting, C., Gerwert, K., *Manuskript in Vorbereitung.*

## Europäisches Protein Forschungsinstitut (PURE)

### Krankheiten erkennen, bevor sie gefährlich werden

Einmal zum Blutabnehmen, eine Urinprobe, und alle wichtigen Vorsorgeuntersuchungen sind erledigt – noch ist das Zukunftsmusik, aber das Europäische Proteinforschungsinstitut PURE (Protein-research Unit Ruhr within Europe) arbeitet daran. Die Mission von PURE ist die Suche nach krankheitsanzeigenden Proteinen, so genannten Biomarkern, für Erkrankungen wie Blasenkrebs, Leberkrebs, Alzheimer oder Parkinson. So wie jeder Mensch einen einzigartigen Fingerabdruck hat, gibt es für jede Erkrankung ein charakteristisches Proteinprofil. Erkennt man Krankheiten wie Krebs oder Alzheimer bereits im frühen, noch symptomlosen Zustand, kann sehr viel schonender und erfolgreicher behandelt werden als heute. Zusätzlich werden in PURE modernste Techniken der Bioanalytik weiterentwickelt, insbesondere Proteomanalytik und vibrationspektroskopische Imagemethoden.

### Federführend beteiligt an PURE (Sprecher Klaus Gerwert) sind:

Prof. Dr. Thomas Brüning  
Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung Bochum (IPA),  
Institut der RUB

Prof. Dr. Klaus Gerwert  
Lehrstuhl Biophysik der RUB, Fellow der Max-Planck-Gesellschaft

Prof. Dr. Helmut E. Meyer  
Medizinisches Proteom-Center der RUB

Prof. Dr. Jens Wiltfang  
LVR-Klinikum, Klinik der Universität Duisburg-Essen

Prof. Dr. Andrea Tannapfel  
Institut für Pathologie, RUB

Prof. Dr. Wolf Schmiegel,  
Medizinische Universitätsklinik, RUB, Knappschafts-  
krankenhaus

Prof. Dr. Dirk Strumberg  
Marienhospital Herne, Universitätsklinikum der RUB

→ [www.pure.rub.de](http://www.pure.rub.de)