

Interdisziplinäre Forschungsansätze

Wie funktionieren Proteine?

Proteine sind extrem vielseitige, hochintegrierte Bauelemente in der belebten Natur. Beispielsweise wäre ohne die katalytische Wirkung von Enzymproteinen kein Stoffwechsel und somit auch kein Leben möglich.

K. Gerwert

Das Verständnis des „Funktionierens“ von Proteinen mit möglichst hoher struktureller Auflösung und daraus resultierend die Möglichkeit, ihre Funktion zu manipulieren („Proteindesign“), ist von zentraler Bedeutung für die moderne Medizin und die anwendungsorientierte Biotechnologie. Durch Einsatz modernster physikalischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden können in interdisziplinären Forschungsansätzen die Strukturen und die Funktionen von Proteinen mit atomarer Auflösung bestimmt werden. Es können biologische Prozesse, wie z. B. das Sehen, heutzutage auf der molekularen Ebene verstanden werden.

Proteine

Drei Beispiele von Proteinen, die in einem solchen interdisziplinären Forschungsansatz am Lehrstuhl für Biophysik an der RUB untersucht werden, sollen das phantastische Leistungsvermögen von Proteinen illustrieren. Am intensivsten wurden von uns bisher Retinalproteine

untersucht. Durch kleine Variationen des immer gleichen Strukturmotivs, in Abb. 1a wiedergegeben, hat die Natur winzige und sehr leistungsfähige Bauelemente im Laufe der Evolution entwickelt, die die unterschiedlichsten Funktionen erfüllen können. Bausteine der Proteine sind 20 Aminosäuren. Das Retinalprotein Rhodopsin, der Sehfärbstoff unseres Auges, kann bereits durch ein einziges Lichtquant aktiviert werden, eine Signalkaskade auslösen und einen Sinnesreiz erzeugen. Ein anderes Retinalprotein, das Bakteriorhodopsin (Abb. 1b), kann nach Lichtanregung Protonen pumpen und somit einen elektrochemischen Gradienten aufbauen, also als kleines Solarkraftwerk Lichtenergie in chemische Energie wandeln; dagegen kann das Halorhodopsin statt positiv geladener Protonen lichtinduziert negativ geladene Chloridionen pumpen.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die untersucht werden, sind die photosynthetischen Reaktionszentren. Bei der Photosynthese wird ebenfalls Lichtenergie in chemische Energie gewandelt. Die Struktur des photosynthetischen Reaktionszentrums von Purpurbakterien, dem Protein, in dem der zentrale Schritt der Lichtenergieumwandlung stattfindet, konnte Anfang der 80er Jahre von den Deutschen Michel, Deisenhofer und Huber auf atomarer

Ebene bestimmt werden. Diese Leistung wurde 1988 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

In Abb. 2a erkennt man den schematischen Aufbau der Struktur und in 2b eine Molekülgraphik des Proteins. In dem Protein wird durch Lichteinfall ein sehr schneller Elektronentransfer induziert. Diese extrem schnellen Vorwärtsreaktionen des Elektrons hat die Natur durch eine sehr gute Passung der verschiedenen elektronenleitenden chromophoren Gruppen zueinander in dem Protein erzielt. Dieser erklärt die sehr hohe Effizienz mit der die Lichtenergie bei der Photosynthese in chemische Energie umgesetzt wird.

Das dritte Protein, das hier vorgestellt wird, ist das hras p21. Dieses Protein spielt eine zentrale Rolle für das Wachstum der Zellen. Es kann als Schalter betrachtet werden, mit dem das Wachstum an- und abgeschaltet werden kann. Kleinste Veränderungen am Protein können das Zellwachstum extrem stark beeinflussen, bildlich gesprochen, den Schalter blockieren. p21 spielt folglich bei unkontrolliertem Wachstum, dem Krebs, eine zentrale Rolle. In 90 Prozent aller Fälle von Bauchspeicheldrüsenkrebs und in bis zu 30 Prozent der übrigen Krebserkrankungen finden sich kleinste Veränderungen, sog. ortsspezifische Mutationen (d. h. Austausch einer Aminosäure), an p21.

Prof. Dr. Klaus Gerwert, Lehrstuhl für Biophysik an der Ruhr-Universität Bochum, Inhaber des Akademie-Preises 1992 der Rheinisch-Westfälischen Akademie der Wissenschaften

Retinal Proteins, common features

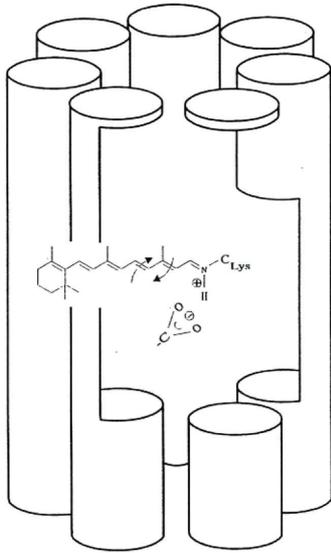


Abb. 1a: Zeigt in a schematisch den Aufbau der Retinalproteine und in b eine Molekülgraphik des Bakteriorhodopsins. Das Protein hat die Maße 5,8 nm x 3,3 nm x 2,4 nm und hat ein Molekulargewicht von 27000 Dalton. Es besteht aus 7 α -Helices (Säulen), in deren Mitte der Chromophor, das Retinal, eingebettet ist. Das Retinal ist über eine protonierte Schiff'sche Base (C=NH⁺) an eine Lysin Aminosäure und somit kovalent an das Protein gebunden. Die positive Chromophorladung wird durch die negative Ladung einer Aminosäure stabilisiert. Dieses Strukturmotiv findet sich in allen Retinalproteinen wieder.

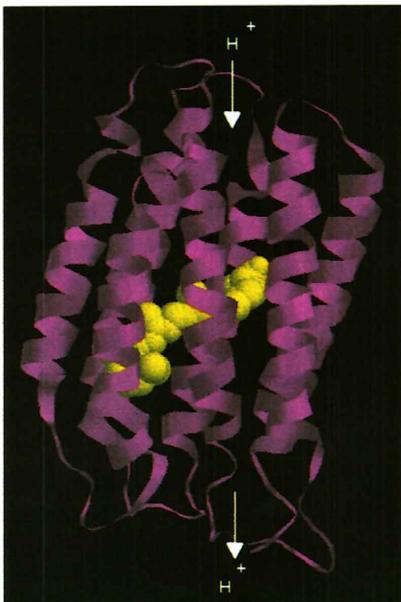


Abb.1b: Die α -Helices sind in Violett, das Retinal in Gelb und die Richtung der Protonenpumpe wiedergegeben

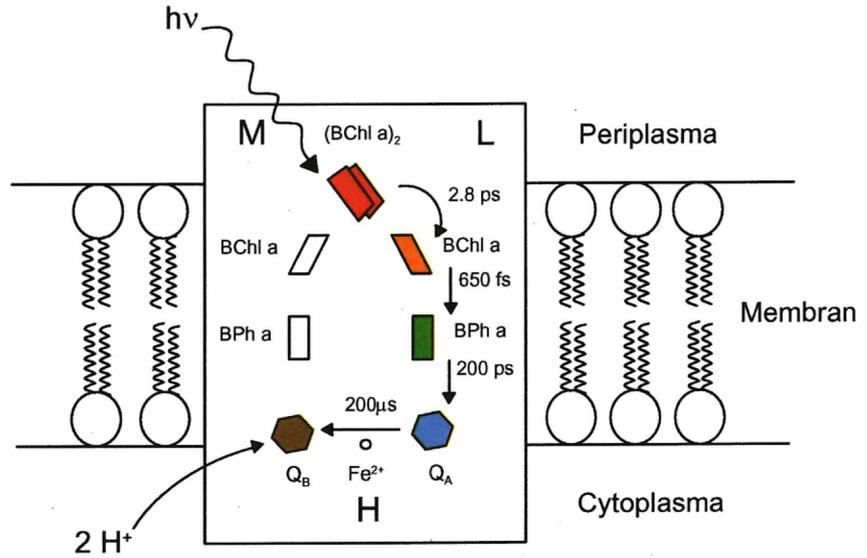
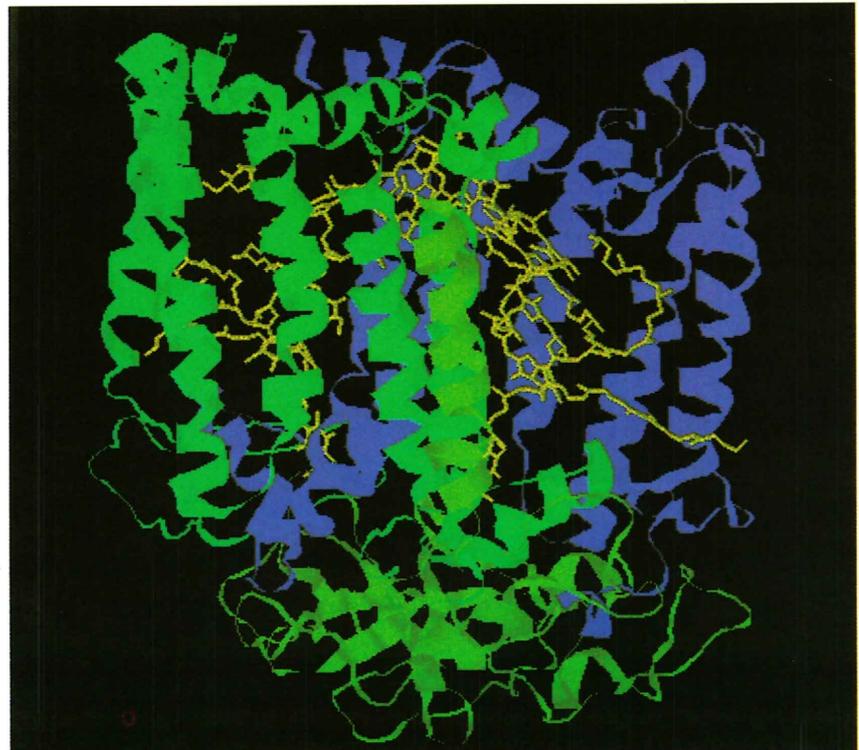


Abb. 2a: Zeigt schematisch den Aufbau des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrums von Rhodobakter sphaeroides und in b eine Molekülgraphik. Das Protein hat die Maße 8 nm x 6 nm x 3 nm und hat ein Molekulargewicht von 100 000 Dalton. Nach Lichteinfall wird ein Chlorophyll (BChl a)₂ oxidiert, das freiwerdende Elektron wird in Bruchteilen von Sekunden über das accessorische Chlorophyll (BChl a), einem Pheophetyn (BPh a), einem Chinon Q_A und schließlich zum Chinon Q_B transferiert. Nachdem das Q_B ein zweites Elektron aufgenommen hat, wird es aus der wässrigen Phase protoniert. Ebenfalls ist die Lipidmembran angedeutet.

Abb. 2b: In der Molekülgraphik sind das Proteingerüst bestehend aus drei Proteineinheiten (blau, grün, hellgrün) und die chromophoren Gruppen (gelb) wiedergegeben



Naturwissenschaften

Abb. 3 zeigt die Struktur von p21 mit gebundenem GTP. Die Struktur wurde mit atomarer Auflösung am Max-Planck-Institut in Heidelberg durch Wittinghofer und Goody bestimmt. Die sog. GTPase-Aktivität, d.h. die Abspaltung eines Phosphatrestes von dem an p21 gebundenen GTP (Guaninriphosphat), ist in diesen sog. onkogenen Mutanten verlangsamt. Es kann also durch die Untersuchung des GTPase-Mechanismus eine Ursache für Krebsentstehung auf der molekularen Ebene bestimmt werden. Nachdem der Mechanismus verstanden sein wird, ergibt sich mittelfristig die Möglichkeit, Pharmaka zu entwickeln, die diese Störung „reparieren“ können.

Physikalische Methoden

Diese drei Beispiele zeigen, welche unterschiedlichen und für biologische Prozesse zentrale Funktionen Proteine erfüllen. Nunmehr zu den Methoden, mit denen wir am Lehrstuhl für Biophysik die Funktionen solcher Proteine auf atomarer Ebene bestimmen. Dazu stellen wir exemplarisch die Untersuchungen an der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin vor.

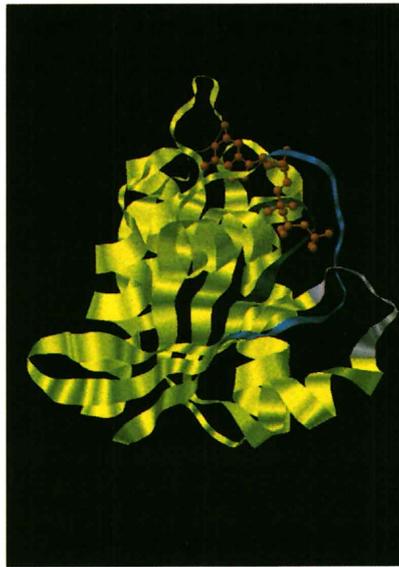
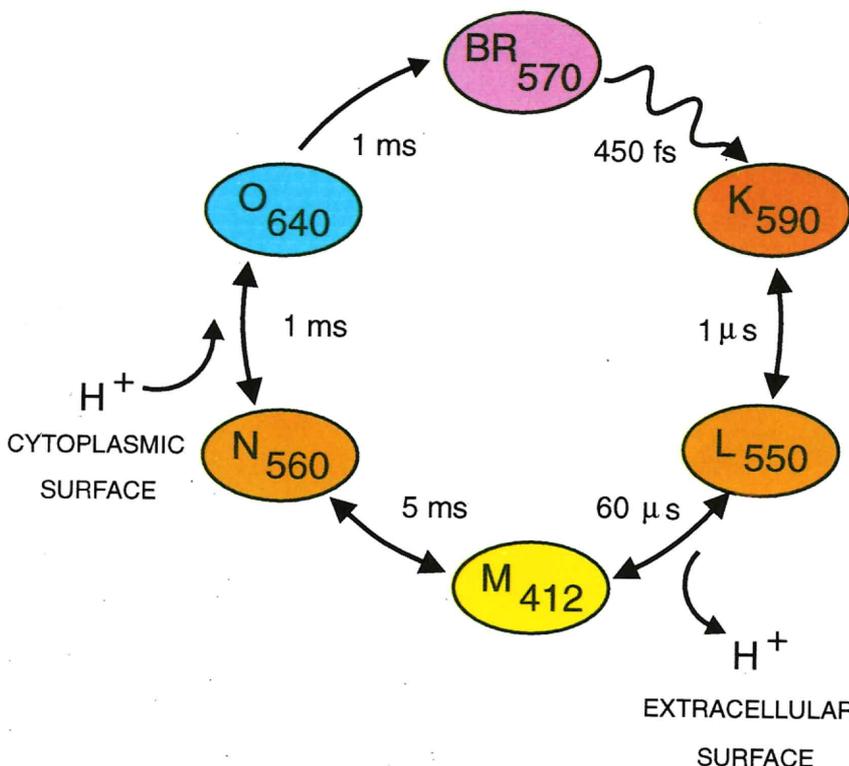


Abb. 3: Zeigt die Struktur von hras p21. Man erkennt neben dem Protein in Gelb das gebundene Guaninriphosphat (GTP) in Rot. Die Abspaltung der 3. Phosphatgruppe wird von dem Protein katalysiert. Die farbig eingezeichneten Loops spielen dabei eine wichtige Rolle.

dopsin vor. Spektroskopische Methoden, d.h. Methoden, die auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie beruhen, sind ideal geeignet, die Reaktionen von Proteinen mit sehr hoher Zeitauflösung zu bestimmen. Am



Lehrstuhl für Biophysik kommen im wesentlichen vier verschiedene Methoden zum Einsatz, die im folgenden näher erläutert werden.

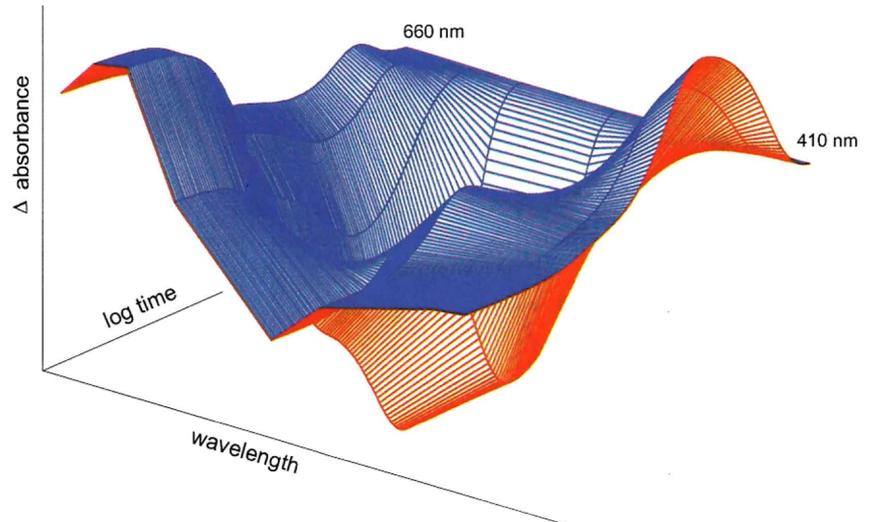
Die VIS (Elektronen)-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von sichtbarer (visibler) Strahlung mit Materie. Nur Proteine, die mit zusätzlichen Gruppen, den Chromophoren, (d.h. im sichtbaren Spektralbereich absorbierend) ausgestattet sind, können damit untersucht werden.

Das Bakteriorhodopsin mit seinem Chromophor Retinal absorbiert im gelben Spektralbereich bei 570 nm. Nach Lichtanregung durchläuft das Bakteriorhodopsin in etwa 8 ms eine zyklische Reaktion mit verschiedenen Zwischenstufen (Intermediate) in deren Verlauf Protonen gepumpt werden. Diese Intermediate unterscheiden sich durch verschiedene Absorptionsmaxima im Sichtbaren. Der detaillierte Photozyklus ist in Abb. 4a wiedergegeben. Er kann durch zeitaufgelöste Messungen der Absorptionsänderungen an den verschiedenen Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich bestimmt werden. In Abb. 4b sind in einer dreidimensionalen Darstellung diese Absorptionsänderungen wiedergegeben.

Die VIS-Spektroskopie erlaubt allerdings nur generelle Aussagen über den Photozyklus, wie z.B. Halbwertszeiten und die Lage der Absorptionsmaxima. Detailliertere Informationen, z.B. zu den strukturellen Veränderungen des Chromophors, erhält man erst durch Einsatz einer aufwendigeren Technik: der Raman-Spektroskopie. Diese beruht auf der Streuung von sichtbarer oder NIR (Nahes Infrarot) Licht an der Probe. Man mißt den Frequenzunterschied zwischen dem einfallenden und dem gestreuten Licht. In Abb. 5 ist ein Ramanspektrum des Bakteriorhodopsin-Grundzustandes gezeigt. Man kann daraus schließen, daß das Retinal in gestreckter sogenannter all-trans Konfiguration vorliegt. Nach Lichtanregung „knickt“ das Retinal ein, man spricht von einer all-trans nach 13-cis Isomerisierung

Abb. 4a: Zeigt den Photozyklus des Bakteriorhodopsins mit den verschiedenen Intermediate, K, L, M, N, O, als Indizes die Lage der jeweiligen Absorptionsmaxima und die Halbwertszeiten für die Übergänge.

Abb. 4b: Hier sind die entsprechenden Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich während des Photozyklus in Abhängigkeit von der Zeit zwischen 680 nm und 410 nm in einer 3D-Darstellung aufgetragen. Die Zeitauflösung beträgt 100 ns. Man erkennt z.B. das Verschwinden der ursprünglichen Absorption bei 570 nm, das Entstehen einer Bande für das K Intermediat bei 660 nm und für das M Intermediat eine Bande bei 410 nm.



um die C13=C14 Bindung. Dies kann man aus den Verschiebungen der Ramanbanden im Intermediat K erkennen. Durch diese Bewegung wird die positive Chromophorladung von der negativen Gegenladung entfernt („Ladungstrennung“) (siehe Abb. 1a) und damit die Lichtenergie in elektrostatische Energie gewandelt. Das Retinal kann sehr schnell, in 450 femtosekunden (0,000000000000450 Sekunden), isomerisieren. Diese extrem kurzen Zeiten sind heute mit der VIS und Raman-Spektroskopie auflösbar.

Die Raman-Spektroskopie erlaubt zwar sehr detaillierte Aussagen zu den strukturellen Veränderungen des Chromophors, weist aber in Bakteriorhodopsin keine Aminosäuren nach. Daher haben wir als weitere Methode die *zeitaufgelöste FTIR (Fouriertransforminfrarot)-Differenz-Spektroskopie* entwickelt. Die IR Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von infraroter (IR) Strahlung mit Materie. Da jede chemische Gruppe eine charakteristische Absorption im infraroten Spektralbereich besitzt, können Reaktionen aller Gruppen eines Proteins mit hoher struktureller und hoher Zeitauflösung bestimmt werden. Um aber aus der Gesamtabsorption eines Proteins, das durch die Absorptionen des Proteingerüsts und des Wassers stark dominiert wird, überhaupt die sehr kleinen Absorptionen der wenigen, funktionell wichtigen Gruppen zu

Abb. 5: Zeigt ein Ramanspektrum vom BR Grundzustand. Jede Molekülgruppe des Chromophors hat eine für sie charakteristische Bande, z.B. zeigt die C₁₄-C₁₅ Gruppe eine Bande bei 1202 cm⁻¹. Das Bandenmuster zwischen 1300 und 1100 cm⁻¹ zeigt die all-trans Konfiguration an.

selektieren, bilden wir Differenzen zwischen dem Grundzustand und den Intermediaten. Da die funktionell wichtigen Gruppen aber nur etwa 1000 bis 10 000 mal geringer absorbieren im Vergleich zur unerwünschten Hintergrundabsorption, müssen wir eine extrem empfindliche Methode, die FTIR-Differenz-Spektroskopie einsetzen. In Abb. 6 ist ein Schema des von uns entwickelten Meßaufbaus wiedergegeben.

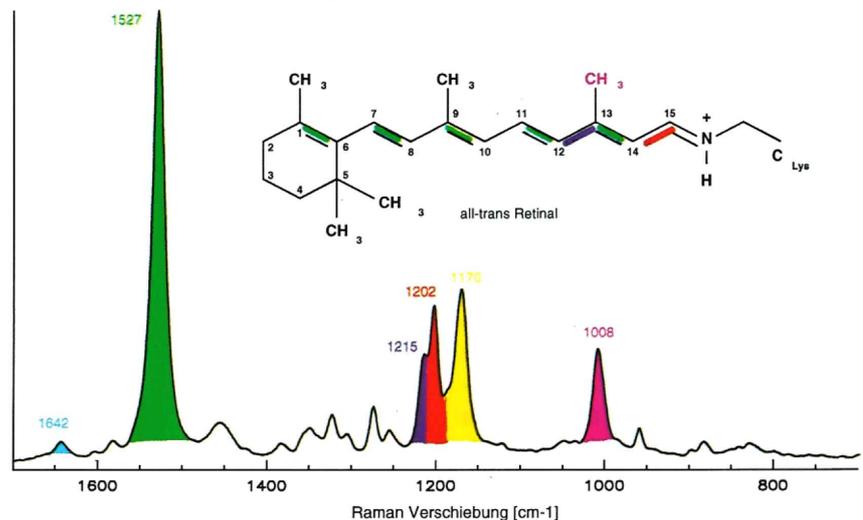
In Abb. 7 sind in einer 3D-Darstellung die Absorptionsänderungen im IR während eines Photozyklus gezeigt. Sie reflektieren im Prinzip alle im Protein ablaufenden Reaktionen.

Molekularbiologische Methoden

Um die Daten interpretieren zu können, müssen im nächsten Schritt die einzelnen Banden spezifischen Gruppen im Protein zugeordnet werden. Dies ge-

schieht durch Kombination mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden. Zum einen kann durch eine Isotopenmarkierung, d.h. Austausch eines Atoms durch das etwas schwerere Isotop, die Schwingungsfrequenz einer Gruppe verändert werden. Die Bande der markierten Gruppe verschiebt sich im Vergleich zur Bande im Spektrum der unmarkierten Probe und kann damit zugeordnet werden. Eine andere Möglichkeit eröffnet die Gentechnologie. Man kann mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese eine beliebige Aminosäure gegen eine andere austauschen, d.h. wie bei einem Legobaukasten einen Baustein gegen einen anderen ersetzen. Die Bande der ausgetauschten Gruppe fehlt dann im Spektrum der Proteinmutante im Vergleich zum Spektrum des unmodifizierten Proteins.

Am Bild des Legobausteins erkennt man auch die Problematik. Es wird ein Baustein nicht durch einen baugleichen sondern einen etwas unterschiedlichen ersetzt. Dies kann die Struktur des Proteins



Naturwissenschaften

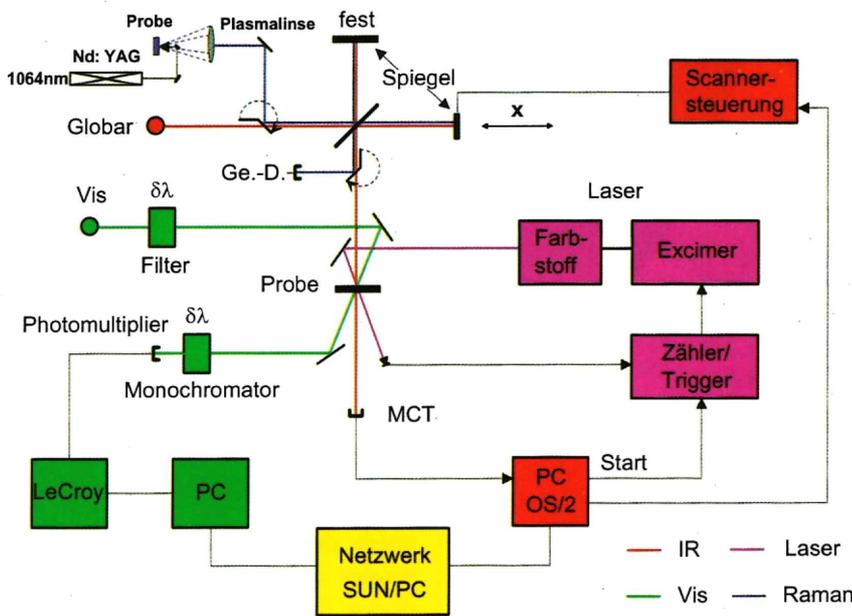


Abb. 6: Zeigt schematisch den von uns entwickelten Meßaufbau. Er erlaubt VIS, FTIR und FTRaman Messungen. Die VIS Anordnung in Grün besteht aus (VIS, Filter, Monochromator, Photomultiplier, Transientenrekorder leCroy und PC); die FTIR Anordnung (basierend auf Bruker IFS 66 V) in Rot aus dem Michelson Interferometer mit Globar, dem Strahlteiler, den festen und beweglichen Spiegeln, MCT-Detektor und PC. Die Probe wird mit einem Lichtblitz angeregt, der mit Hilfe eines Excimer Laser gepumpten Farbstofflasers (Lambda Physik) erzeugt wird (violett). Die Daten werden auf einem lokalen Netzwerk (gelb) bestehend aus SUN Workstations und PC's ausgewertet. Die FTRaman Anordnung besteht aus dem Nd: YAG Laser, dessen 1064 nm Laserlinie an der Probe gestreut wird und die Raman gestreute Strahlung wird über eine Plasmalinsen gesammelt, in das Interferometer eingespiegelt und über ein Ge-Detektor nachgewiesen. Mit speziellen Techniken, die eine Stabilität an der Halteposition des beweglichen Spiegels von ± 2 nm erfordern, können wir heute MIR Spektren von 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} und einer Zeitauflösung von 100 ns (10^{-9} s) aufnehmen.

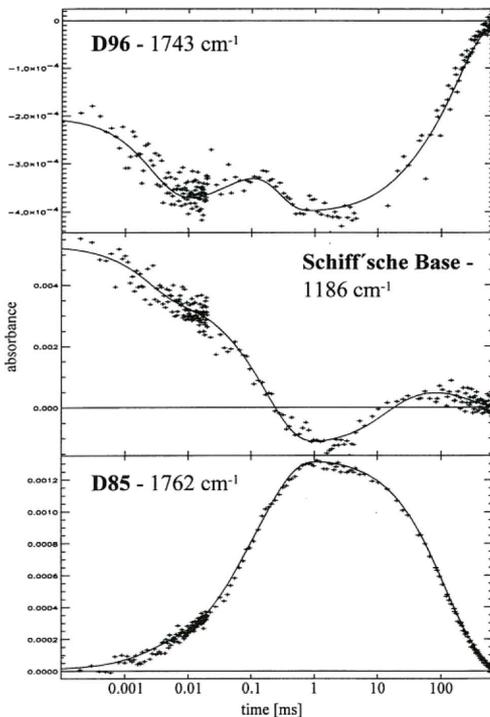
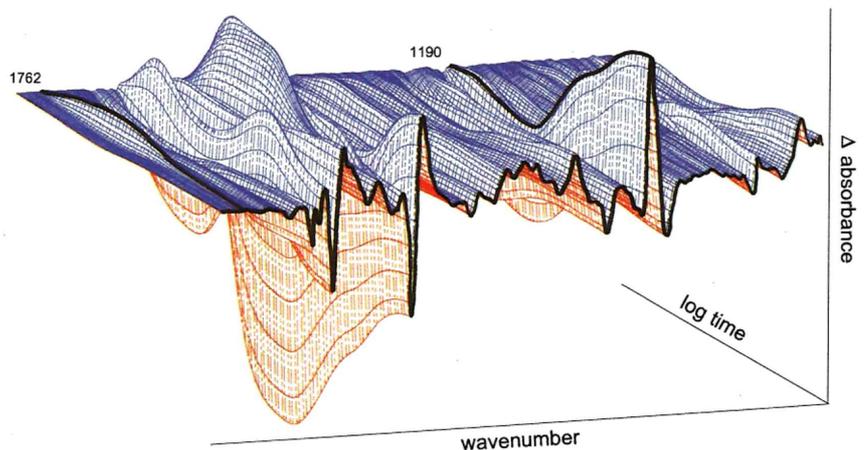


Abb. 7b: Zeigt Absorptionsänderungen bei den einzelnen Wellenzahlen in Abhängigkeit von der Zeit aus der 3D-Darstellung in Abb. 7a. Sie repräsentieren Reaktionen von Schlüsselgruppen des Proteins. Bei 1186 cm^{-1} (Schiff'sche Base) zeigt das nicht zeitaufgelöste Entstehen der Bande die Isomerisierung des Retinals von all-trans nach 13-cis, das Verschwinden repräsentiert die Deprotonierung der Schiff'schen Base und ihr Wiedererscheinen die Reptonierung. Das abschließende Verschwinden der Bande zeigt die Reisoomerisierung nach all-trans Retinal. Bei 1765 cm^{-1} (D85) zeigt das Entstehen der Bande die vorübergehende Protonierung der Carboxylgruppe von Aminosäure asp 85 im Intermediat M. Bei 1742 cm^{-1} (D96) repräsentiert das Verschwinden der Bande im Intermediat L eine Umgebungsänderung der protonierten Carboxylgruppe der Aminosäure asp 96 und das zweite Verschwinden der Bande in N eine vorübergehende Deprotonierung dieser Gruppe.

Abb. 7a: Zeigt eine 3D-Darstellung der IR Absorptionsänderungen während des Bakteriorhodopsin Photozyklus zwischen 1800 und 1000 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} und einer Zeitauflösung von 100 ns . Die Absorptionsänderungen sind in der Größenordnung von 10^{-3} bis 10^{-4} gegenüber einer Hintergrundextinktion von 1. Die negativen BR-Banden zwischen 1300 und 1100 cm^{-1} entsprechen den BR-Banden im Ramanspektrum, die in beiden Spektren die Retinalschwingungen repräsentieren.



und damit auch die Funktion stark verändern. Daher streben wir für die Zukunft an, ein neues nicht-invasives Verfahren zu entwickeln, das die Vorteile der Isotopenmarkierung mit der ortsspezifischen Mutagenese verknüpft: die ortsspezifische Isotopenmarkierung. Hierbei wird, um im Bild zu bleiben, nur die Farbe, nicht aber die Form eines Legobausteins verändert. Dieses Verfahren erfordert eine sehr aufwendige sogenannte „in vitro“ Translation der Proteine im Reagenzglas und nicht mehr „in vivo“ in einem Bakterium.

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese haben wir die Banden der Schlüsselgruppen des Bakteriorhodopsins identifiziert. In Abb. 7b sind die Zeitverläufe der Absorptionsänderungen dieser drei Schlüssel-Gruppen wiedergegeben. Aus

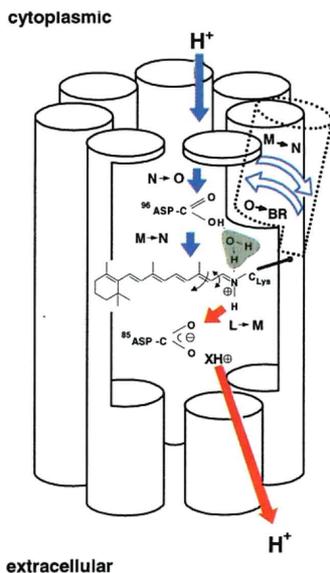


Abb. 8: Zeigt das von uns entwickelte Protonenpumpmodell des Bakteriorhodopsins. Nach Isomerisierung des Retinals wird das Schiff-Base-Proton in dem L nach M Übergang an asp 85 abgegeben. Simultan wird ein weiteres Proton von einer anderen Gruppe XH nach außen abgegeben. Die Schiff'sche Base wird von asp 96 in der M nach N Reaktion reprotoniert. Dabei spielen interne Wassermoleküle zwischen Schiff'scher Base und asp 96 eine wichtige Rolle. Weiterhin ist die Bewegung einer Helix in der M und N Reaktion wichtig für die Vektorialität der Pumpe. In der N nach O Reaktion wird asp 96 reprotoniert und das Retinal reisomerisiert nach all-trans. Schließlich wird in der O-BR Reaktion asp 85 deprotoniert und der Ausgangszustand erreicht.

diesen Ergebnissen konnten wir auf den in Abb. 8 wiedergegebenen Protonenpumpmechanismus des Bakteriorhodopsins schließen.

Als weitere Technik ist in jüngerer Zeit die ESR- (Elektronen-Spin-Resonanz) Spektroskopie dazugekommen. Diese beruht auf der Wechselwirkung von Mikrowellenstrahlung mit Materie, die in einem Magnetfeld plaziert ist. Sie erlaubt insbesondere Aussagen über die Beweglichkeit von einzelnen Baugruppen eines Proteins. Diese müssen allerdings mit einem entsprechenden Spinlabel markiert werden. Durch Einfügen zweier benachbarter Spinlabels wollen wir in Zukunft Abstandsänderungen der Molekülgruppen während der Proteinaktivität bis auf wenige nm (Nanometer) genau bestimmen.

In theoretischen Arbeiten versuchen wir durch Simulationsrechnungen, wie Molekulardynamiksimulationen und „Molecular-modelling“, in Modellrechnungen das Funktionieren der Proteine besser zu verstehen. Weiterhin machen wir Vorhersagen, wie bestimmte Proteine, die weniger gut erforscht sind, im Prinzip funktionieren könnten, oder wie sich bestimmte Mutationen auf die Funktion auswirken können.

Sonderforschung

Durch eine enge Zusammenarbeit von Biologen, Physikern und Chemikern am Lehrstuhl für Biophysik wollen wir dazu beitragen, ein besseres Verständnis der Funktionsweise von Proteinen, den Bausteinen des Lebens, in den kommenden Jahren zu erreichen und damit das für Anwendungen in der Medizin und Biotechnologie notwendige Grundlagenwissen erweitern. Diese Arbeiten werden besonders gute Rahmenbedingungen erhalten durch die Einrichtung eines Sonderforschungsbereiches mit dem Titel „Strukturelemente und Molekulare Mechanismen von Proteinen bei Energieübertragung und Signalvermittlung“. Dieser SFB ist positiv von der DFG begutachtet worden und soll durch Senatsbeschluss der DFG Mitte November zum 1. Januar 1996 eingerichtet werden. ■

Danksagung

An den beschriebenen Arbeiten sind beteiligt gewesen: Dr. Johannes le Coutre, Dipl.-Phys. Benedikt Heßling, Dipl.-Biol. Ronald Brudler, Dipl.-Chem. Valentin Cepus, cand. phys. Robin Rammelsberg. Die Arbeiten sind gefördert vom Wissenschaftsministerium NRW, der DFG (insbesondere durch ein Heisenberg-Stipendium), der EG, dem Boehringer-Ingelheim Fonds und dem Fonds der chemischen Industrie.

Für eine sichere Zukunft

Sichere Arbeitsplätze, Umweltschutz und eine zuverlässige Energieversorgung sind wesentliche Voraussetzungen für eine lebenswerte Zukunft. Hierzu leisten wir wichtige Beiträge. Für eine gesicherte Zukunft.



VEW ENERGIE Aktiengesellschaft
Bezirksdirektion Ruhr-Lippe
Wielandstraße 82 · 44791 Bochum