

Polarisationsspektroskopie zur biophysikalischen Charakterisierung von Proteinen

Katharina Gimpl, Martin Textor, Jun. Prof. Dr. Sandro Keller

Molekulare Biophysik, Technische Universität Kaiserslautern

Viele Biomoleküle weisen eine molekulare Asymmetrie oder Chiralität auf, d. h. sie besitzen keine Drehspiegelachse. Diese Moleküle, zu denen beispielsweise Proteine, DNS und viele Zucker gehören, zeigen optische Aktivität. Strahlt man auf derartige Proben zirkular polarisiertes Licht ein, so ist die Wechselwirkung der Probe mit dem Licht abhängig von der Polarisationsrichtung des Lichts. Wird Licht unterschiedlicher Polarisation unterschiedlich stark absorbiert, spricht man von Dichroismus [1]. Absorptionsspektroskopische Methoden, die die Chiralität zur Probenanalyse nutzen, werden als chiroptische Methoden bezeichnet. Dazu zählen unter anderem die optische Rotationsdispersion (ORD) und die Zirkulardichroismuspektroskopie (CD; von engl. *circular dichroism*) im sichtbaren und im UV-Bereich sowie die magnetische Zirkulardichroismus- und die schwingungszirkuläre Dichroismuspektroskopie (VCD; von engl. *vibrational circular dichroism*). Polarisiertes Licht wird auch für die sog. Lineardichroismuspektroskopie (LD) eingesetzt, womit aber auch achirale Moleküle untersucht werden können, sofern diese eine – zumindest präferenzielle – Ausrichtung bezüglich der Laborkoordinaten einnehmen.

Eine Voraussetzung für alle diese Methoden ist, dass das eingestrahelte Licht polarisiert ist. Dabei ist es wichtig, zwischen linear und zirkular polarisiertem Licht zu unterscheiden. Von linear polarisiertem Licht spricht man, wenn der elektrische Feldvektor nur in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung schwingt. Bei zirkular polarisiertem Licht hingegen beschreibt die Spitze des elektrischen Feldvektors einen Kreis in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Bei rechts zirkular polarisiertem Licht beschreibt der E-Feldvektor entlang der Ausbreitungsrichtung einen Kreis im Uhrzeigersinn, bei links zirkular polarisiertem Licht einen Kreis gegen den Uhrzeigersinn. Im Folgenden werden wir auf zwei aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Dichroismuspektro-

skopie näher eingehen: die automatisierte CD-Spektroskopie (ACD) und die LD-Spektroskopie.

Automatisierte Zirkulardichroismuspektroskopie

Die Eigenschaft bestimmter Materialien, die Polarisation von Licht zu ändern, wurde bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts beschrieben und in der folgenden Zeit zur Untersuchung nahezu aller Materialien mit optischer Aktivität angewandt. Mit steigendem Interesse an der Struktur von Proteinen wurde die ORD zu einem wichtigen Instrument auf dem Gebiet der Biochemie, bis sie Mitte der 1960er Jahre weitgehend durch die CD-Spektroskopie verdrängt wurde [2]. Bei der CD-Spektroskopie wird der Unterschied in der Absorption zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch einen chiralen Chromophor gemessen. Chirale

Chromophore sind u. a. alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin.

Sogenannte induzierte optische Aktivität kann aber auch durch eine asymmetrische Umgebung hervorgerufen werden. So besitzen z. B. viele Biomoleküle helikale Strukturelemente, so dass die Carbonylgruppen der Peptidbindung nicht nur aufgrund des asymmetrischen Kohlenstoffatoms, sondern auch durch die Kopplung der Anregung mit benachbarten Peptidbindungen optische Aktivität zeigen. Dies wird an den unterschiedlichen CD-Spektren deutlich, die verschiedene Sekundärstrukturelemente liefern (s. Abb. 1a). So weist das Spektrum einer α -Helix zwei Minima sowie ein ausgeprägtes Maximum auf. Im Vergleich dazu zeigen Spektren von β -Faltblattstrukturen allgemein geringere Intensitäten, nur ein Minimum und ein weniger stark ausgeprägtes Maximum,

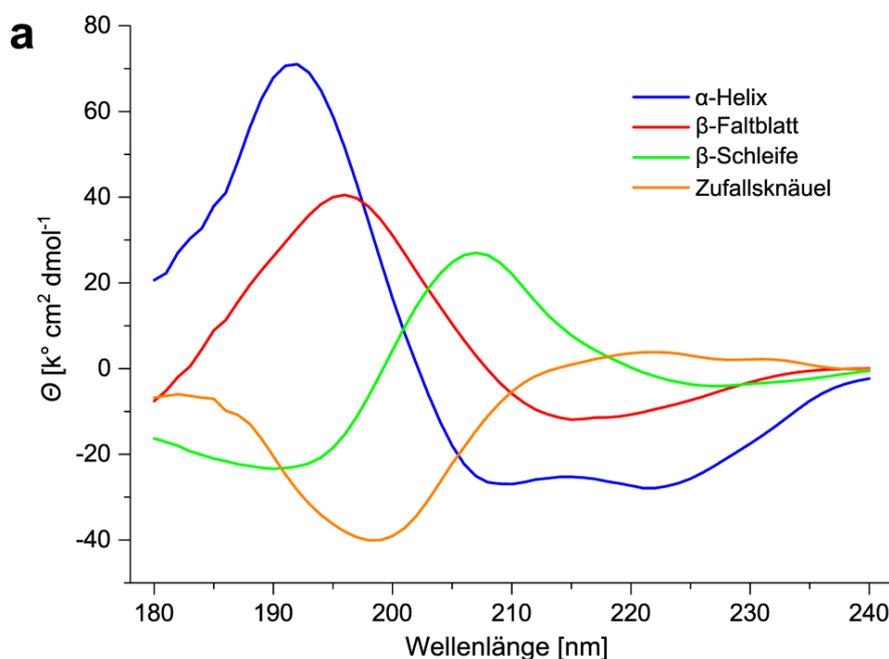


Abb. 1a: Vergleich verschiedener CD-Spektren: α -Helix, β -Faltblatt, β -Schleife und Zufallsknäuel. Aufgetragen ist das CD-Signal (θ) gegen die Wellenlänge. Die Referenzdaten wurden entnommen aus [5].

während ein ungeordnetes Protein ein einzelnes Minimum bei niedrigen Wellenlängen aufweist. Häufig wird die CD-Spektroskopie deshalb auch dazu eingesetzt, die verschiedenen Anteile von Sekundärstrukturelementen in einem Protein oder Peptid aufzuklären. Allerdings sind die einzelnen Banden sehr breit und überlappen stark (s. Abb. 1a), so dass eine eindeutige Zerlegung eines Spektrums in die einzelnen Sekundärstrukturelemente schwierig ist.

Die eigentliche Stärke der CD-Spektroskopie liegt aber im Vergleich relativer Signalveränderungen. Die Anregungskopplung führt dazu, dass das CD-Signal empfindlich auf Änderungen der Sekundärstruktur reagiert, wie sie beispielsweise durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz, die Bindung von Liganden oder die Variation der Umgebungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung des Lösungsmittels etc.) hervorgerufen werden [3,4]. Dies nutzt man u. a. bei Proteinfaltungsstudien. Hierbei wird ein Protein mit Hilfe von Denaturierungsmitteln (z. B. Harnstoff) entfaltet oder durch Verdünnung des Denaturierungsmittels wieder in seine gefaltete Struktur überführt. Diesen Übergang von gefalteter Konformation zu ungefalteter und zurück kann man sehr gut mit der CD-Spektroskopie beobachten. Weitere Anwendungen sind die Untersuchung der Proteinestabilität in Abhängigkeit verschiedenster Einflussfaktoren sowie kinetische und thermodynamische Studien von Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen [3,4].

Obwohl Messungen mit geringen Probenmengen, ohne Markierung der Proteine und in Lösung durchgeführt werden können und die Datenanalyse unkompliziert ist, war die CD-Spektroskopie bisher keine Methode mit hohem Messdurchsatz, um beispielsweise die Stabilität eines Proteins in einer Vielzahl von Puffern zu testen. Dies liegt einerseits an den hohen optischen Anforderungen, die die Messzelle erfüllen muss und die dadurch Messungen im Mikrotiterplattenformat verunmöglichen, und andererseits an der zeit- und arbeitsaufwändigen Reinigung der Küvette. Diese beiden Einschränkungen werden durch ein ACD-Spektrometer überwunden [4]. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um ein konventionelles CD-Spektrometer, das mit einer Probenkammer mit Durchflussküvette ausgestattet und mit einem dreiachsigen Roboterarm zur Probenvorbereitung verbunden ist (s. Abb. 1b). Mit diesem Aufbau können bis zu vier Mikrotiterplatten mit je 96 Kammern automatisiert vermessen werden. In einem Zyklus aus drei Schritten wird zuerst eine Probe in die Durchflussküvette überführt. Nach einer gewissen Zeit

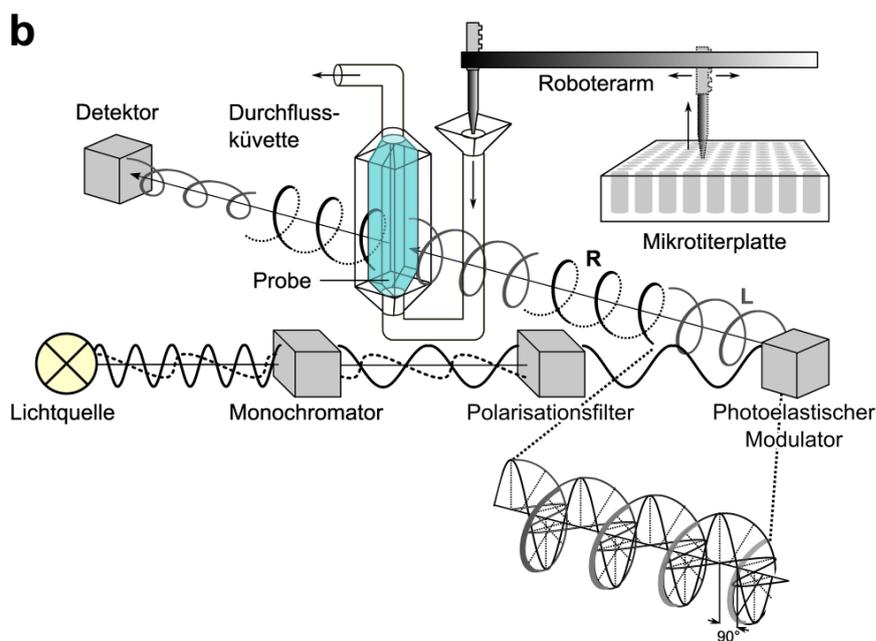


Abb. 1b: Schematischer Aufbau eines ACD-Spektrometers. Für eine Messung relevante Bauteile: Roboterarm mit Durchflussküvette sowie optische Bauteile zur Erzeugung (Lichtquelle, Monochromator, Polarisationsfilter und photoelastischer Modulator) und Detektion links (L) bzw. rechts (R) zirkular polarisierten Lichts. Zirkular polarisiertes Licht wird durch Überlagerung zweier linear polarisierter Wellen erzeugt, die zueinander senkrecht polarisiert und um 90° phasenverschoben sind.

zur Äquilibration wird diese nach zuvor vom Nutzer gesetzten Parametern vermessen. Zum Schluss wird die Durchflusszelle in einer ebenfalls programmierbaren Reihenfolge mit verschiedenen Reinigungslösungen gespült und getrocknet [4].

Die Möglichkeit 384 Proben vollautomatisch zu vermessen, macht die CD-Spektroskopie für neue Anwendungen interessant. So kann beispielsweise die chemische oder thermische Stabilität von Antikörpern in einer Vielzahl von Puffern überprüft werden, um optimale Bedingungen für die Langzeitstabilität zu finden. Auch andere rekombinant hergestellte Proteine können bezüglich ihrer Struktur und Stabilität in verschiedenen Umgebungen untersucht werden. Darüber hinaus ermöglicht die große Anzahl präziser Daten eine statistische Auswertung und kann genutzt werden, um homologe Proteine bezüglich struktureller Ähnlichkeit zu vergleichen. Aufgrund der Automatisierung sind Pipettierfehler und andere prozessbedingte Abweichungen vernachlässigbar gering, so dass eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet ist.

Lineardichroismusspektroskopie

Bei mehr als der Hälfte aller pharmakologischen Wirkstoffziele handelt es sich um Membranproteine mit helikaler Struktur. Von besonderem Interesse im Rahmen der Charakterisierung eines solchen Proteins ist seine Topologie – hierunter wird gemeinhin

verstanden, ob und in welcher Richtung verschiedene Abschnitte des Proteins die Membran durchspannen oder auf welcher Seite der Membran sich welche Proteinbereiche befinden. Sequenzinformationen können darüber zwar bedingt Vorhersagen liefern, jedoch können sie keine Auskunft über die genaue Orientierung des Proteins in der Membran geben.

Neben den oben beschriebenen Anwendungen der CD-Spektroskopie wurden Versuche unternommen, anhand von CD-Daten die Anteile an Transmembranhelices, die sich senkrecht durch die Membran erstrecken, und die Anteile an peripheren Helices, die der Membranoberfläche aufliegen, zu ermitteln. Hierfür ist allerdings, ebenso wie zur Bestimmung der Anteile verschiedener Sekundärstrukturen, eine Zerlegung der CD-Spektren notwendig, deren Ergebnis stark von den verwendeten Referenzspektren abhängt [3]. Für die Fragestellung nach der Ausrichtung der Helices eines Membranproteins oder -peptids stellt die LD-Spektroskopie eine weitaus besser geeignete Methode dar [6]. LD-Spektroskopie erlaubt aber nicht nur die Differenzierung zweier extremer Helixanordnungen, sondern liefert bei sorgfältiger Auswertung den Winkel, den eine oder mehrere Helices zur Membransenkrechten einnehmen.

Im Gegensatz zur CD-Spektroskopie muss bei einer LD-spektroskopischen Messung den zu untersuchenden Molekülen grund-

sätzlich eine bestimmte Ausrichtung auferlegt werden. Dies erreicht man durch eine makroskopische Orientierung der Probe, wobei verschiedene Methoden zum Einsatz kommen können (s. Abb. 2a). Die Ausrichtung kleiner hydrophober Moleküle kann z. B. durch Strecken einer Polymerfolie erreicht werden, auf die die Probe aufgetragen wurde, oder durch Verformung eines mit der Probe beladenen Gels. Die Längsachse länglicher Moleküle orientiert sich dabei parallel zur Vorzugsrichtung des Polymers bzw. Gels. Moleküle mit einem Dipolmoment können in Gegenwart eines elektromagnetischen Feldes magnetisch ausgerichtet werden. Die Methode der Wahl für größere Biomoleküle in Lösung ist jedoch die Ausrichtung in einem laminaren Fluss [7].

Hierfür findet typischerweise eine sogenannte Couette-Zelle Anwendung (s. Abb. 2b). Die Probe befindet sich dabei zwischen einem inneren Zylinder und einem äußeren Hohlzylinder aus optisch durchlässigem Material wie Quarzglas. Einer der beiden Zylinder fungiert als Stator, während der andere mit mehreren tausend Umdrehungen pro Minute in Rotation versetzt wird. Durch den entstehenden Schergradienten in der Lösung werden beispielsweise Proteoliposomen entlang der Flussrichtung gestreckt und nehmen eine ellipsoide Gestalt an. Die Membranproteine oder -peptide richten sich dabei entsprechend der Flussrichtung aus.

Unabhängig von der zur Orientierung verwendeten Methode wird die Probe mit linear polarisiertem Licht durchstrahlt, dessen Polarisationssebene zwischen einer zur Orientierungsachse parallelen und einer senkrechten Ausrichtung alterniert. Die chromophoren Gruppen der Probe – in Membranproteinen sind dies vor allem Helizes und aromatische Seitenketten – absorbieren das linear polarisierte Licht in Abhängigkeit ihrer Orientierung unterschiedlich stark. Der Lineardichroismus entspricht der Differenz zwischen der Absorption des parallel und der des senkrecht polarisierten Lichts [8].

Ein Chromophor absorbiert linear polarisiertes Licht am stärksten, wenn dessen Polarisationssebene zur Längsachse des Chromophors parallel ist. Chromophore mit einer parallelen Ausrichtung ihrer Längsachse zur Orientierungsachse bedingen demnach positiven LD, während solche mit senkrechter Ausrichtung negativen LD zeigen. Dementsprechend beobachtet man für periphere Helizes, deren Längsachse parallel zur Membranoberfläche der Vesikel bzw. zur Flussrichtung in der Couette-Zelle ausgerichtet ist, ein positives LD-Signal im Absorp-

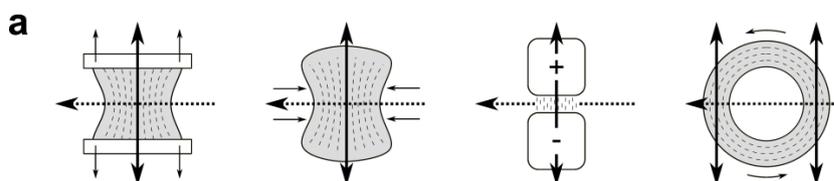


Abb. 2a: Möglichkeiten zur makroskopischen Ausrichtung der Probe: Streckung einer Polymerfolie, Pressen eines Gels, Ausrichtung im elektromagnetischen Feld oder im laminaren Fluss. Der Strahlengang (gepunktet) ist stets senkrecht zur Orientierungsachse (durchgezogen).

tionsbereich der Peptidbindungen. Transmembranhelizes dagegen zeigen in diesem Bereich mit ihrer Längsachse senkrecht zur Membranoberfläche ein negatives LD-Signal [9].

Durch Normierung des LD-Signals auf die isotrope Absorption der Probe erhält man den sogenannten reduzierten LD, der unabhängig von der Konzentration der Probe ist und in direkter Beziehung zum Winkel eines Chromophors zur Membransenkrechten steht, der bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert. Damit ermöglichen LD-Messungen für Membranproteine bekannter Struktur die Erstellung eines dreidimensionalen Membranbindungsmodells [8].

Neben Membranproteinen können mittels LD-Spektroskopie auch andere lange, flexible Biomoleküle untersucht werden, wie etwa Proteine des Zytoskeletts, die Strukturmethoden wie Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie kaum zugänglich sind. Auch für die Untersuchung von Interaktionen zwischen Biomolekülen und DNA ist die LD-Spektroskopie bestens geeignet. Obwohl die Prinzipien des LD bereits seit Ende der

1970er Jahre bekannt sind, wurde diese Methode aufgrund technischer Hürden bislang eher zurückhaltend genutzt. Allerdings erfährt die LD-Spektroskopie zurzeit eine Belebung und mag sich dank fortschreitender Methodenentwicklung und der Verfügbarkeit kommerzieller Geräte in Zukunft einem größeren Nutzerkreis erschließen.

Ausblick

Die CD-Spektroskopie ist schon seit langer Zeit eine Routineanwendung in der Grundlagenforschung, wohingegen ihre Anwendungsmöglichkeiten v. a. in der industriellen Forschung in der Vergangenheit häufig durch den geringen Probendurchsatz begrenzt waren. Mit der Automatisierbarkeit der Probenvorbereitung und Messung mit Hilfe eines ACD-Spektrometers wird sie nun allerdings auch für Anwendungen interessant, bei denen ein höherer Probendurchsatz unerlässlich ist. Obwohl es mit der Dichroismuspektroskopie methodisch bedingt nicht möglich ist, hochaufgelöste Strukturinformationen zu erhalten, liefert die LD-Spektrosko-

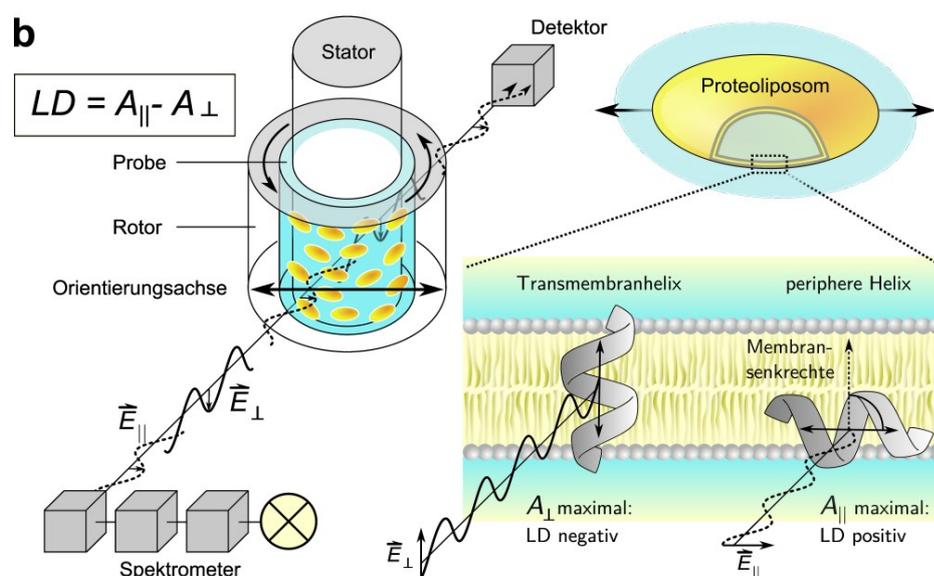


Abb. 2b: LD-Spektroskopie. In einer Couette-Zelle werden Membranproteine in Proteoliposomen durch Scherkräfte ausgerichtet. Transmembranhelizes absorbieren linear polarisiertes Licht maximal, das senkrecht zur Orientierungsachse polarisiert ist, während periphere Helizes parallel polarisiertes Licht absorbieren.

pie dennoch wichtige Informationen über die Orientierung von Proteinen in Membranen. Damit bietet sie mit vergleichbar geringem methodischem Aufwand Einblicke, die mit vielen anderen Strukturmethoden nicht zugänglich sind. Den Weg zur Routineanwendung hat die LD-Spektroskopie noch vor sich. Mit der Verfügbarkeit neuer Gerätemodule, die die Aufrüstung bestehender CD-Spektrometer für LD-Messungen ermöglichen, ist jedoch ein erster Schritt in diese Richtung getan.

Literaturverzeichnis

- [1] Demtröder, W.: *Experimentalphysik 2. Elektrizität und Optik*. Springer Verlag (2006), 4. Auflage, Kapitel 7.
- [2] Yang, J. T.: *Remembrance of Things Past: A Career in Chiroptical Research*. In Fasman, G. D. (Hg): *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Plenum Press (1996), Kapitel 1.
- [3] Winter, R./Noll, F./Czeslik, C.: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Vieweg + Teubner (2011), 2. Auflage, Kapitel 4.
- [4] Fiedler, S./Cole, L./Keller, S. (2013): *Automated Circular Dichroism Spectroscopy for Medium-Throughput Analysis of Protein Conformation*. *Anal. Chem*, **85**, 1868–1872.
- [5] Brahms, S./Brahms, J. (1980): *Determination of Protein Secondary Structure in Solution by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism*. *J. Mol. Biol.*, **138**, 149–178.
- [6] Rodger, A. (2008): *How to Study DNA and Proteins by Linear Dichroism Spectroscopy*. *Sci. Prog.*, **91**, 377–396.
- [7] Rodger, A./Nordén, B.: *Circular Dichroism & Linear Dichroism*. Oxford University Press (2008); 2. Auflage, Kapitel 1.
- [8] Rodger, A./Nordén, B.: *Circular Dichroism & Linear Dichroism*. Oxford University Press (2008); 2. Auflage, Kapitel 3.
- [9] Winter, R./Noll, F./Czeslik, C.: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Vieweg + Teubner (2011), 2. Auflage, Kapitel 3.