

## Blitzschnell – mit THz-Pulsen die Änderung des Wassers verfolgen

*Dr. Benjamin Born<sup>1</sup> und Prof. Dr. Martina Havenith<sup>2</sup>*

*1. Weizmann Institute of Science, Israel und 2. Ruhr-Universität Bochum*

### Mehr als nur Hintergrund

#### THz-Spektroskopie öffnet neues Fenster auf die Dynamik des Wassers

Fast alle biologischen Prozesse finden im Wasser statt. Dennoch zeigen die meisten Biologiebücher Wasser nur als schwarzen Hintergrund – im Vordergrund stehen die Proteine. Neuere Forschungen weisen in eine andere Richtung: Wasser wird zunehmend vom passiven Zuschauer zum aktiven Mitspieler. Die Terahertz-Spektroskopie vermittelt einen neuen Blick auf das Wasser als „Matrix des Lebens“. Am Beispiel von Matrix-Metalloproteasen (MMP), Enzymen von zentraler medizinischer Bedeutung, untersuchen Bochumer Forscher gemeinsam mit Kollegen vom Weizmann Institut, Israel, und vom University of Texas Health Science Center, welche Rolle Wasser bei wichtigen biologischen Funktionen tatsächlich spielt. Den Einfluss des Wassers auf molekularer Ebene möchte nun ein internationaler Forschungsverbund -im beantragten Exzellenzcluster RESOLV der Ruhr-Universität- verstehen.

Wenn sich Biomoleküle wie bei der Proteinfaltung umordnen, aneinander binden oder in größeren Einheiten aggregieren (wie z.B. bei der Nervenkrankheit Alzheimer), geschieht dies immer im Wasser. Doch welche Rolle kommt den Wassermolekülen dabei zu? Bilden sie nur den beweglichen Hintergrund, sind sie passive Zuschauer oder sind sie aktive Mitspieler, die das Geschehen entscheidend mitgestalten? Welche Rolle spielt das Wasser bei der Proteinfaltung oder bei der Bindung zwischen Biomolekülen? Wenn das Wasser eine aktive Rolle hat und die Prozesse beeinflusst, geschieht dies zufällig, oder beeinflusst das Protein das Wasser in seiner Umgebung so, dass die entsprechende Funktion optimal unterstützt wird? Die Evolution hat im Wasser stattgefunden. Ist es daher nicht naheliegend, dass auch das Wasser in die Prozesse der Natur einbezogen wurde?

Eines der Schlüsselkonzepte, das bisher in der Biologie genutzt wurde, ist der so genannte hydrophobe Effekt. Dabei ging man davon aus, dass die Wassermoleküle eine ordnende Strukturierung um die wasserabweisenden (hydrophoben) Teile der Proteine einnehmen, ähnlich der im gefrorenen Zustands des Wassers. Die Proteinfaltung und Aggregation von

Proteinen wurde auf die Neigung von hydrophoben Flächen zurückgeführt, sich so anzuordnen, dass sie vom Wasser weg orientiert sind, da dies energetisch günstiger ist. Bei der Faltung ordnen sich die hydrophoben Teile im Inneren des Proteins an, während sich bei der Aggregation von zwei Proteinen deren hydrophobe Teile miteinander verbinden und dadurch der Wasserkontakt vermieden wird. Neuere mikroskopische Experimente bestätigen dieses Bild jedoch nicht, sondern zeigen neue Wege auf: Das statische Bild des strukturierten Wassers wird jetzt ersetzt durch eine Veränderung in den Wasserbewegungen in der Umgebung der Biomoleküle. Im normalen Wasser sind die einzelnen

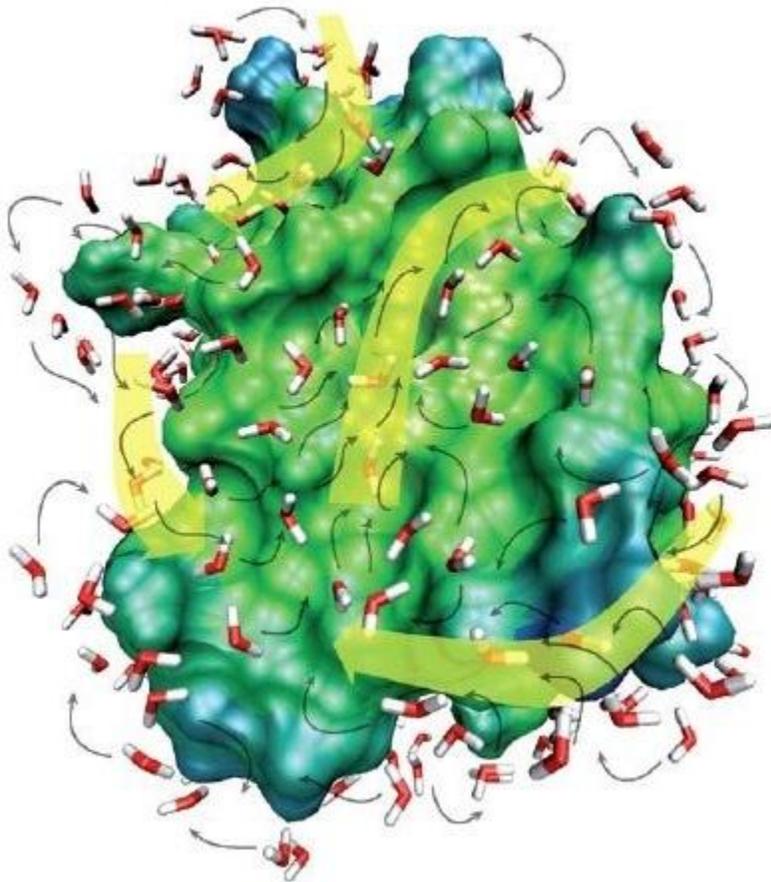


Abb. 1: Wassermoleküle tanzen um ein Protein (grün) herum.

Wassermoleküle meist tetraedrisch angeordnet, wobei sich im Mittel jede Picosekunde ( $10^{-12}$  sec) eine der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Wassermolekülen öffnet und die Wassermoleküle eine Drehung oder sonstige Bewegung ausführen, um dann wieder eine Bindung mit einem anderen Wassermolekül einzugehen. Es ist, als tanzten die Wassermoleküle (s. Abb. 1). In der Nähe des Biomoleküls kommt dieser „THz-Tanz“ des Wassers nicht zum Stillstand, sondern er wird nur langsamer. Während die bisherigen Röntgenstrukturmessungen nur einen Blick auf die wenigen vollkommen

unbewegten und kristallisierten Wassermoleküle freigaben, lassen neue experimentelle Methoden wie die THz-Spektroskopie (s. Info 1) neuerdings auch den Blick auf die bewegten Wassermoleküle zu. Bis zu 1000 Wassermoleküle können von einem einzelnen Protein in der Bewegung beeinflusst werden. Insgesamt zeigt sich ein überraschend differenziertes Bild, in dem der gekoppelten Protein-Wasserdynamik eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Enzyme erfüllen eine zentrale biologische Funktion, sie steuern biochemische Reaktionen. Um die Rolle des Wassers bei dieser enzymatischen Katalyse zu klären, kooperierten wir mit Prof. Dr. Irit Sagi vom Weizmann Institut in Israel (Abb. 2). In den Mittelpunkt der Untersuchung stellen wir Enzyme von besonderer biologischer oder medizinischer Relevanz. Aktueller Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion und zugleich Hot-Topic-Thema internationaler Tagungen ist die Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMP), nicht zuletzt wegen ihres möglichen Einflusses auf Erkrankungen wie beispielsweise Schlaganfall oder Krebs.

Zur Vorgeschichte: Vor fast 50 Jahren untersuchte der Biochemiker Jerome Gross gemeinsam mit seinem Kollegen Charles Lapiere in einem Labor am Massachusetts Institute of Technology (MIT) in Boston eingehend die Verwandlung der Kaulquappen in Frösche. Dabei wurden die beiden Wissenschaftler auf



Abb. 2: Kooperationspartner bei der Aufklärung der Rolle des Wassers bei enzymatischen Reaktionen: Moran Grossman und Prof. Dr. Irit Sagi vom Weizmann Institut, Israel, sowie Prof. Dr. Martina Havenith (v.l.n.r.). Dr. Benjamin Born (Mitte, hinten) setzt seine an der Ruhr-Universität begonnenen Forschungen nun am Weizmann Institut fort.

■ info 1

DAS TERAHERTZ-FENSTER

Der Terahertz (THz)-Bereich umfasst Frequenzen zwischen dem Mikrowellenbereich, der mit Hilfe von elektronischen Bauteilen erschlossen wird, und dem infraroten und optischen Spektralbereich, der gut durch Laserquellen (photonische Strahlungsquellen) abgedeckt werden kann. Die sog. THz-Lücke entstand, weil leistungsstarke, kompakte und gut handhabbare THz-Quellen fehlten. Mit den im letzten Jahrzehnt entwickelten sog. „THz-time-domain-Systemen“ stehen heute Strahlungsquellen zur Verfügung, die den gesamten Frequenzbereich von 0 bis 3 THz abdecken.

Während bei der optischen Spektroskopie einzelne Elektronen in der Elektronenhülle eines Atoms oder Moleküls angeregt werden, die IR-Spektroskopie die lokalisierte Anregung von intramolekularen Schwingungen in einem Molekül nutzt, kommt es durch THz-Strahlen zu einer kollektiven Anregung, z.B. von Wassernetzwerken, Gitterschwingungen oder Gerüstschwingungen von Proteinen im Bereich von 0,3 bis 1 nm.

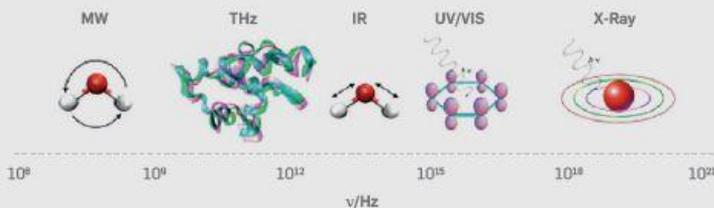


Abb.: Charakteristische Molekülanregungen für die Frequenzbereiche der Mikrowellen-, Terahertz-, Infrarot-, UV/VIS- und Röntgenspektroskopie.

eine „Aktivität“ aufmerksam, die bald „aus dem Frosch einen Prinzen“ machen sollte. Gross beobachtete während der mehrphasigen Metamorphose der Kaulquappen einen Abbau von starren Bündeln des Bindegewebsleims Kollagen, aus dem auch der menschliche Körper zu mehr als einem Viertel besteht. Diese Aktivität ließ sich auf das Enzym „Interstitielle Kollagenase“ zurückführen. Dieses Enzym besitzt die einzigartige Eigenschaft, Kollagenfasern in neutralem, also säurefreiem Medium, kontrolliert

abzubauen. 1962 war jedoch nur wenig mehr als der dargestellte empirische Befund bekannt. Heute, ein halbes Jahrhundert später, zeigt sich, dass der ursprüngliche Fund in Gross' Labor den Grundstein für die Entdeckung einer neuen Familie von Enzymen darstellte: der Matrix-Metalloproteasen.

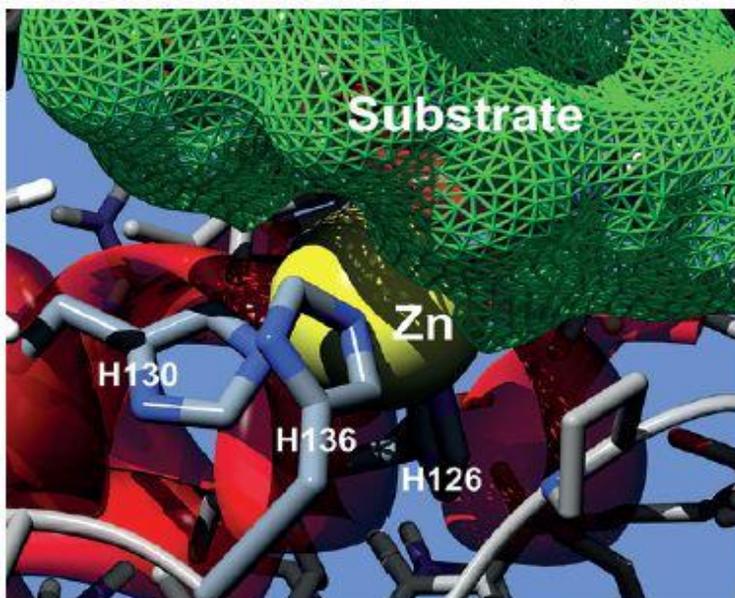
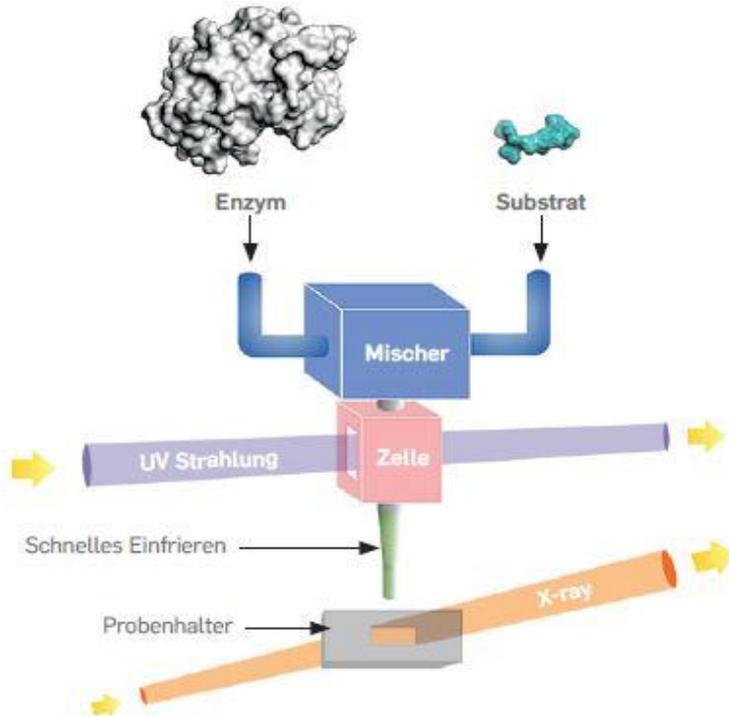


Abb. 3: Wie ein Enzym an ein Substrat – hier mit dem aktiven Zentrum Zink (Zn) – bindet, schauen sich Forscher am Weizmann Institut mit atomarer Auflösung an (Abb. unten). Dazu werden die Zwischenstufen der Annäherung und Bindung von Enzym und Substrat gefroren und anschließend mit Hilfe von Röntgenstrahlung im Detail sichtbar gemacht (Abb. oben).

Matrix-Metalloproteasen befinden sich außerhalb unserer Zellen in den Zellzwischenräumen, der so genannten extrazellulären Matrix (Info 2), und erfüllen dort auf molekularer Ebene Aufgaben als Nachrichtenvermittler, Manager, oder bilden Wartungseinheiten. Durch den Abbau der extrazellulären Matrix sind Matrix-Metalloproteasen aktiv und unmittelbar am Umbau unseres Gewebes beteiligt, zum Beispiel an der Embryogenese, der Wundheilung oder auch am Tumorstadium. Zudem prozessieren in Netzwerken organisierte Matrix-Metalloproteasen Signalmoleküle und steuern so die Antwort ganzer Zellen auf äußere Impulse, was wiederum von spezifisch-wirksamen körpereigenen Gegenspielern – den sog. Proteaseinhibitoren – unterbunden wird. Die Reichhaltigkeit der möglichen Einsatzgebiete von Matrix-Metalloproteasen macht diese Enzymfamilie zu einem möglichen Ansatzpunkt für die gezielte Medikamentenentwicklung. Matrix-Metalloproteasen vermitteln

eine Vielzahl pathologischer und physiologischer Prozesse, wie Angio- und Morphogenese, Arthritis und Tumormetastase. Neueste Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass auch Rheuma durch eine MMP-Fehlfunktion ausgelöst werden könnte. Ein eingehendes Verständnis der Funktionsweise von Matrix-Metalloproteasen ist daher ein zentrales Forschungsobjekt mit wichtigen Anwendungen.

■ info 2

**ZWISCHEN DEN ZELLEN: VERMITTELN, MANAGEN UND WARTEN**

Die extrazelluläre Matrix ist ein wesentlicher Bestandteil des Bindegewebes von Lebewesen und umfasst alle Strukturen außerhalb der Zellen, d.h. im Zellzwischenraum. Sie besteht aus Fasern und Grundsubstanz, dazu gehören Kollagen, Aggrecan, Tenascin, Glykoproteine und Kohlenhydrate. Die zentrale Eigenschaft der extrazellulären Matrix, Zell-Zell-Kontakte zu vermitteln, erfordert eine hohe Dynamik und Flexibilität, deren molekulare Ursachen noch nicht vollständig verstanden sind.

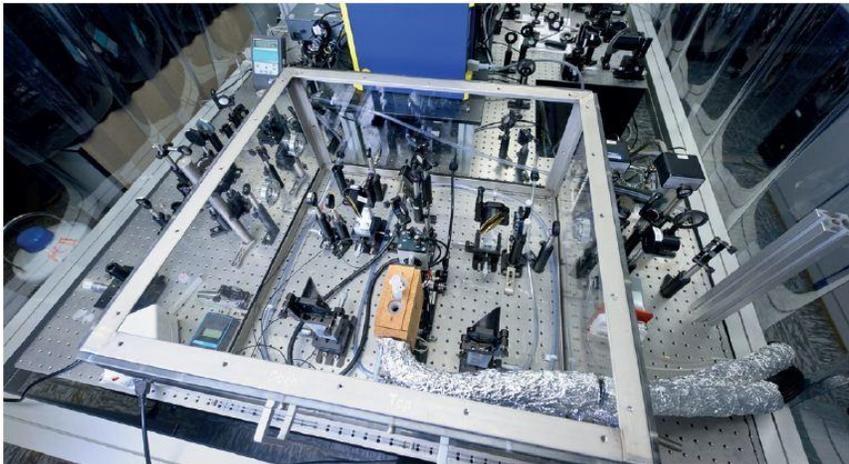


Abb. 4a: Anlage für Kinetische Terahertz-Absorptionsmessungen (KITA) im Terahertz-Labor der Ruhr-Universität: In dem sog. Stopped-Flow-Mischer im Vordergrund werden Enzym und Substrat innerhalb von 50 msec zusammengebracht. Dahinter befindet sich der Strahlengang eines THz-time-domain-Spektrometers und ganz im Hintergrund Pumplaser, der sog. fsec-Ti-Sa-Laser. Linsen und vergoldete Spiegel fokussieren den Puls auf einen GaAs-Emitter, in dem THz-Strahlung erzeugt wird, die den Puls nach dem Durchgang durch die Probe wieder fokussiert und auf einen Detektor leitet.

Die Gruppe von Prof. Dr. Irit Sagi am Weizmann Institut, Israel, hat in den letzten Jahren eine neue Methode entwickelt, um mit Hilfe von zeitaufgelöster Röntgenstrukturbestimmung die einzelnen Reaktionsschritte bei der enzymatischen Katalyse von MMP aufzuklären. Dazu werden während der Bindung die Strukturen zu definierten Zeitpunkten schockartig tiefgefroren. Diese gefrorenen Zwischenstufen der Annäherung und Bindung von Enzym und jeweiligem Reaktionspartner (Substrat) werden anschließend an eine Synchrotronstrahlungsquelle (Teilchenbeschleuniger)

transportiert, wo die Strukturen mit der Auflösung von einzelnen Atomen im Detail sichtbar gemacht werden können. Man nutzt dazu die vom Synchrotron produzierte Röntgenstrahlung mit einer Frequenz, die bevorzugt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms - hier dem Metallion Zink - wechselwirkt, um anhand der gestreuten Strahlung Auskünfte über die genaue Position der benachbarten atomaren Partner anhand ihrer Elektronendichteverteilungen zu bekommen. Mit Hilfe von hochenergetischer Röntgenstrahlung lässt sich die unmittelbare atomare

Umgebung des Zinkions im aktiven Zentrum abbilden. Neben der hohen räumlichen Auflösung der ersten atomaren Schale um das Zinkion können durch vorheriges Einfrieren von Reaktionszwischenstufen ganze Reaktionszyklen zeitaufgelöst untersucht werden. Die zeitliche Auflösung beträgt wenige Millisekunden. Sie wird begrenzt durch den Mischprozess, der die Enzym-Substrat-Reaktion startet, und die Zeit, die die Reaktionsmischung zum Gefrieren benötigt (s. Abb. 3).

So erhielten wir ein genaues Bild darüber, zu welchem Zeitpunkt Enzym und Substrat sich aneinander anlagern, miteinander reagieren und ein enzymatisch aktiver „Michaelis-Komplex“ gebildet wird, in dem das Substrat dann abgebaut bzw. verdaut wird. Dieser Prozess der Verbindung aus einem Enzym und einem zu verdauenden Reaktionspartner,



Abb. 4b: Detailaufnahme: Detektionseinheit für die THz-Pulse – im Vordergrund dieses so genannten Electro-Optical-Samplings sind die Polarisatoren (mit einer 360°-Einteilung) zu sehen, im Hintergrund ein Photodetektor. Die Polarisationsdrehung wird durch das elektrische Feld des THz-Pulses mittels eines „Probelasers“ nachgewiesen.

dem Substrat, wurde zuerst von den Biochemikerinnen Michaelis und Menten beschrieben.

Es zeigte sich, dass bereits nach wenigen Tausendstelsekunden die ersten Enzym- und Substrat-Moleküle begannen, einen Komplex auszubilden, der nach etwa fünf Hundertstelsekunden zum Abbau des Substrates führte. Letztlich geht wieder das unveränderte Enzym aus dem enzymatischen Abbau hervor. Der gesamte Prozess war nach ca. einer Sekunde abgeschlossen.

Parallel zu diesen Experimenten wurde die in Bochum neu entwickelte Kinetische Terahertz-Absorptionsspektroskopie (KITA) eingesetzt, um die Änderungen der Wasserbewegungen während der Bindung und des enzymatischen Prozesses „live“ zu verfolgen (Abb. 4 a u. b).

Die THz-Absorptionsspektroskopie eröffnet erstmals den Blick auf die schnelle Fluktuation des Wassernetzwerks. In unseren ersten Arbeiten 2006 konnten wir zeigen, dass selbst kleinste Änderungen in diesen Fluktuationen empfindlich mittels THz-Absorptionsspektroskopie nachgewiesen werden können. Die Kinetische THz-Absorptionsspektroskopie bietet nun die

Möglichkeit, diese Änderungen als Funktion der Verzögerungszeit nach einem Startschuss für eine Reaktion „live“, d.h. in kurzen Zeitabständen von 1 msec mit Hilfe von noch kürzeren „THz-Blitzlichtaufnahmen“ sichtbar zu machen.

■ info 3

**EXZELLENZCLUSTER RESOLV: LÖSUNGSMITTELPROZESSE INTERDISZIPLINÄR UND INTERNATIONAL ERFORSCHEN**

Das Lösen (Solvatation) einer chemischen Substanz ist einer der grundlegendsten Vorgänge in der Chemie. Die meisten chemischen Reaktionen, wichtige industrielle Prozesse und nahezu alle biologischen Vorgänge finden in flüssiger Phase statt. Trotz ihrer fundamentalen Bedeutung sind Solvatationsprozesse auf molekularem Niveau bisher kaum verstanden.

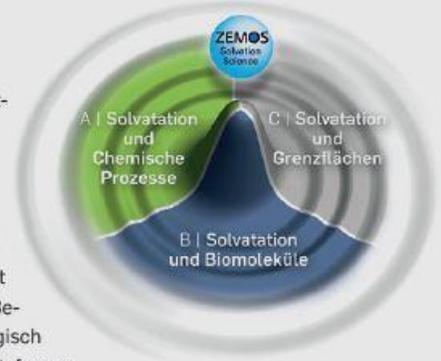
Inzwischen wird die aktive Rolle des Lösungsmittels aber immer sichtbarer: Lösungsmittel können zum Beispiel chemische Reaktionen optimieren und die Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen, von Elektrolyten für Brennstoffzellen oder die Entwicklung von Batterien mit höherer Energiedichte beeinflussen.

Um Solvatationsprozesse umfassend zu erforschen, haben sich die drei Universitäten der Universitätsallianz Metropole Ruhr (UAMR) mit drei Max-Planck-Instituten und dem Fraunhofer Institut UMSICHT zu RESOLV (Ruhr Explores Solvation) zusammengeschlossen. Weitere 18 internationale Universitäten sind über Kooperationsabkommen eingebunden. Mit RESOLV (Sprecherin: Prof. Dr. Martina Havenith) hat die RUB inzwischen die Endrunde der Exzellenzinitiative II des Bundes und der Länder erreicht.

Ein neues „Zentrum für molekulare Spektroskopie und Simulation solvensgesteuerter Prozesse“ (ZEMOS) wird zukünftig rund 100 Wissenschaftlern aus Chemie, Biochemie und Ingenieurwis-

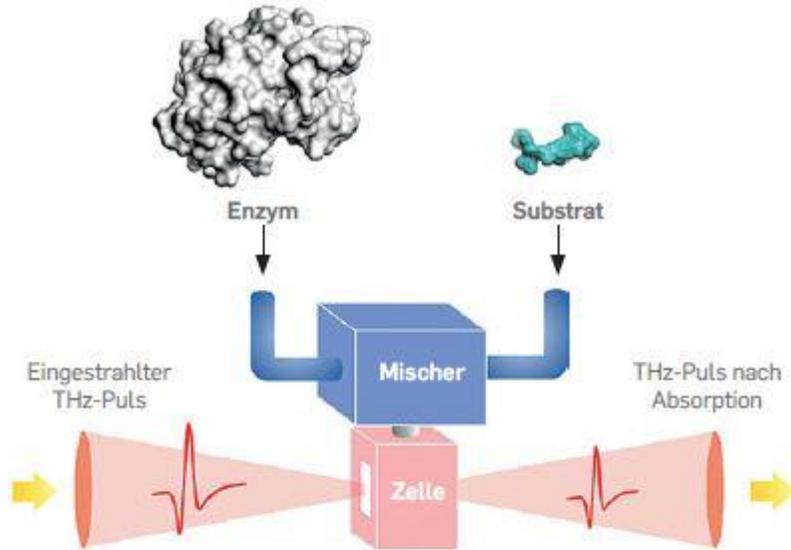
senschaften erstmals in Deutschland die Möglichkeit geben, „Solvation Science“ interdisziplinär und mit unmittelbarem Bezug zu technologisch wichtigen Zukunftsfragen zu erforschen.

Auf knapp 4.000 Quadratmetern wird ZEMOS die Expertise von mehr als 20 Arbeitsgruppen an der RUB, an den Max-Planck-Instituten für Kohlenforschung (Mülheim) und für Eisenforschung (Düsseldorf) sowie dem Fraunhofer Institut UMSICHT (Oberhausen) bündeln. In ZEMOS werden sog. Core Facilities den beteiligten Arbeitsgruppen die für Solvation Science entscheidenden Techniken zugänglich machen. Außerdem wird ZEMOS Labor und Arbeitsräume für kooperative Forschungsprojekte, für Nachwuchsgruppen und für die neu gegründeten Transferzentren der RUB – das Center for Electrochemical Sciences (CES) und das Applied Competence Cluster Terahertz (ACC THz) – zur Verfügung stellen.



Im vorliegenden Fall wurden das Enzym und das Substrat in einer Mischapparatur, ähnlich der am Weizmann Institut, zusammengebracht (s. Abb. 5, oben). In dem Gemisch aus einem millionstel Liter von Enzym (MMP) und Substrat liegt das Substrat im Überschuss (1:20) vor, damit jedes Enzymmolekül mit hoher Sicherheit mit einem Substrat reagieren kann. Die genaue Einstellung der Konzentrationsverhältnisse von Enzym zu Substrat verhindert ein zufälliges, diffusionskontrolliertes Zusammenfinden der Reaktionspartner. Allerdings wurden jetzt keine Zwischenstufen eingefroren. Mit Hilfe von ultrakurzen (Femtosekunden-) THz-Pulsen verfolgten wir die Reaktion in Wasser in Echtzeit. Pro Sekunde sendet ein so genanntes THz-time-domain-system 100 000 000 THz-Pulse aus, die die Änderung der THz-Absorption präzise messen. Dabei zeigen sich deutliche Änderungen in den Wasserbewegungen, die zeitlich eindeutig mit strukturellen Änderungen korrelierten (s. Abb. 6). Die Ergebnisse eröffnen laut einem Kommentar in der Zeitschrift Nature „ein erstaunliches Bild darüber, wie präzise biologische Moleküle Wasser manipulieren, damit sie ihre Funktion ausführen können“. In der Umgebung der in Wasser gelösten biologischen Moleküle

verlangsamt sich die Dynamik des Wassers systematisch um 40 bis 60 Prozent im Vergleich zur Dynamik im reinen und unbeeinflussten Wasser (sog. Bulk Wasser). Dieser Einfluss auf die Wassernetzwerkdynamik reicht von der Proteinoberfläche weit ins Wassernetzwerk hinein, wodurch weitere Biomoleküle, mögliche Reaktionspartner, beeinflusst werden können.



In den Experimenten konnten wir zeigen, dass während des Andockens (Enzym-Substrat-Bindung) die Bewegung des Wassers verlangsamt wird. Dies zeigt sich am ausgeprägtesten in der Nähe des aktiven Zentrums. Dieser Effekt wurde bei allen untersuchten enzymatisch aktiven Komplexen gefunden, allerdings nicht bei solchen Enzym-Substrat-Verbindungen, in denen das Protein nur mechanisch andockt (Inhibitoren), aber keine enzymatische Funktion initiiert wird.

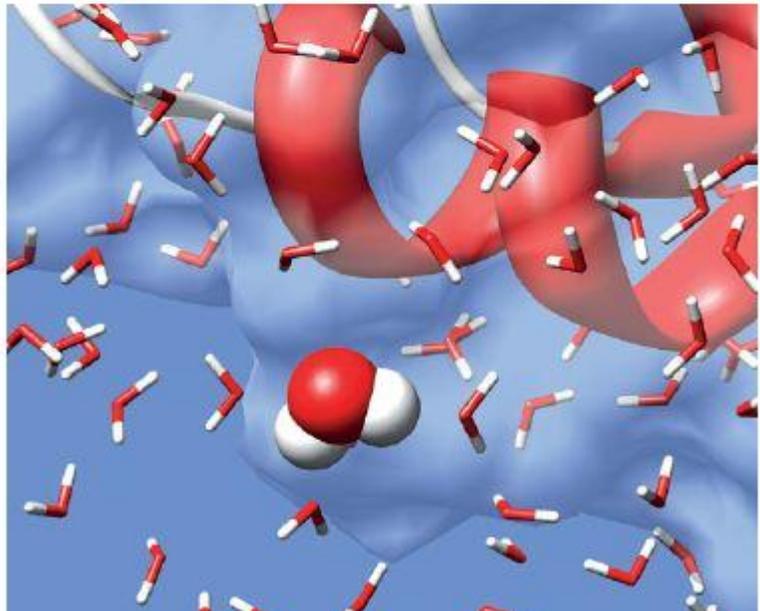


Abb. 5: Schematischer Aufbau der kinetischen Terahertz-Absorptionsmessungen (oben). Enzym im Wassernetzwerk (unten) – der Ausschnitt zeigt eine Alpha Helix des Proteins (rot) als Strukturbaustein des Enzyms.

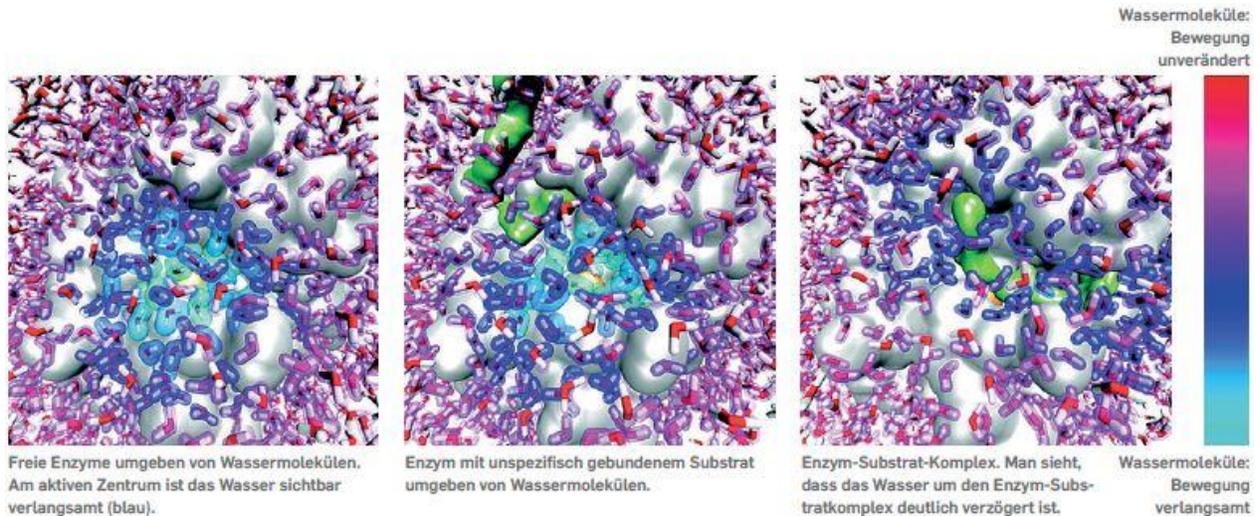


Abb. 6: Während der Bindung von Enzym und Substrat zum sog. Michaelis-Komplex verändert sich die Wasserdynamik. Die Wasserstoffbrückenbindungen brechen am aktiven Zentrum deutlich langsamer auf (hellblau) als bei normalem Restwasser (rot). Zudem verlangsamen sich bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes die Wassernetzwerkbewegungen weitreichend im Umfeld des Substrats (hellblau bis dunkelblau).

Molekulare Erkennung ist mehr als die Zusammenführung von Rezeptor (Enzym) und Substrat. Wir sind überzeugt, dass dem Lösungsmittel Wasser als kritischem Bestandteil eine entscheidende Rolle bei biologischen Funktionen zukommt – ein Aspekt, der bei der synthetischen Nachbildung von Enzymen oder Gewebe, etwa bei der Entwicklung von Medikamenten zur Entzündungshemmung, zu berücksichtigen ist. Eine weitergehende offene Frage ist die nach der spezifischen Rolle des Wassers bei biologischen Prozessen. Hier stehen wir erst am Anfang der Untersuchungen. Allerdings ist klar, dass nur Methoden, die das Wasser nicht mehr nur als Medium ansehen, sondern molekulare dynamische Prozesse sichtbar machen, uns helfen werden, diese Rolle zu verstehen. Dazu bedarf es neuer Entwicklungen im Bereich des Experiments, aber auch im Bereich der Simulation – in beiden haben wir an der Ruhr-Universität den Grundstock für ein neues Forschungsgebiet (Solvation Science) gelegt. Wassermoleküle sind nicht nur ein Hintergrundmedium, das durch ein Wegtreten den Weg für die Hauptakteure auf der Bühne, das Enzym und das Substrat, freimacht – Wassermoleküle sind dann aktive Mitspieler im Spiel des Lebens: Nur im Wasser kann der Frosch zum Prinzen werden...

Dr. Benjamin Born, jetzt Department of Biological Regulation, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel; Prof. Dr. Martina Havenith, Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Fakultät für Chemie und Biochemie.

**Quelle:**

Ruhr-Universität Bochum, RUBIN Winter 2011