



# Zelluläre Prozesse durch Licht kontrollieren

Laser aktivieren das kleinstmögliche Schlüssel-Schloss-System

*Von Anja Störiko*

»Stellen Sie sich vor, wir könnten einzelne Zellen mit einer Art Fernbedienung von außen steuern«, träumt Ralph Wieneke, Juniorgruppenleiter in der Zellulären Biochemie. Licht als Steuerungsquelle habe entscheidende Vorteile, schildert Institutsleiter Robert Tampé: »Es schadet Zellen nicht und kann schnell und sehr genau reguliert werden.« Von ihrem Ziel ist die Arbeitsgruppe gar nicht so weit entfernt.

Ein großen Erfolgsschritt hatten die Wissenschaftler bereits vor drei Jahren sichtbar mit Licht gebannt: Sie »malten« das Goethe-Logo der Universität Frankfurt auf eine proteinbeschichtete Glasplatte – winzige 20 Mikrometer klein, ein Fünftel der Dicke eines Blatts Papier, nur sichtbar mit einem speziellen Mikroskop.



Die Arbeitsgruppe nutzte dazu das in fast allen Zellen verbreitete Molekül Glutathion, eine Verbindung aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin. Es spielt im Körper eine wesentliche Rolle bei der Regulierung des Elektronengleichgewichts (Redoxpotenzial). So fängt es beispielsweise aggressive Sauerstoffmoleküle ab und verhindert damit eine frühzeitige Zellalterung. Zusammen mit dem Enzym Glutathion-S-Transferase hilft es zudem bei der Entgiftung der Zelle, indem es Fremdstoffe bindet und anschließend ausscheidet. An das Glutathion synthetisierten die Wissenschaftler eine chemische Schutzgruppe aus Nitrophenylpropyl (NPP), das sich mit Licht wieder abspalten lässt. Solange diese Schutzgruppe gebunden ist, blockiert sie die Funktion von Glutathion. Nach Belichtung ist Glutathion wieder voll aktiv. Dieses Konstrukt wurde nun auf einer Glasplatte flächig verteilt. Anschließend belichteten die Wissenschaftler diese über eine Maske mit dem Goethe-Logo: Wie erwünscht, spaltete das Licht die NPP-Schutzgruppe ab und aktivierte so die Bindung an das Transferase-Enzym. Sichtbar wird das mit einer »präparierten« Glutathion-

S-Transferase, an die ein Protein gebunden ist, das bei Lichtanregung grün fluoresziert. Wird die Glasplatte mit diesem Fluorophor-Enzym behandelt, kann es nur dort binden, wo zuvor die Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Fluoreszenzbild entspricht dann der zuvor verwendeten Maske, also hier dem Goethe-Kopf.

### Wie finden Proteine zueinander?

Dies sind aber letztlich spielerische Vorarbeiten für das eigentliche Ziel, bestimmte Prozesse in der Zelle zeitlich und räumlich präzise zu steuern. »Wir zeigen mit diesen Versuchen, dass wir Protein- beziehungsweise Zellfunktionen raum- und zeitaufgelöst – also in 4-D – kontrollieren und untersuchen können«, so Wieneke.

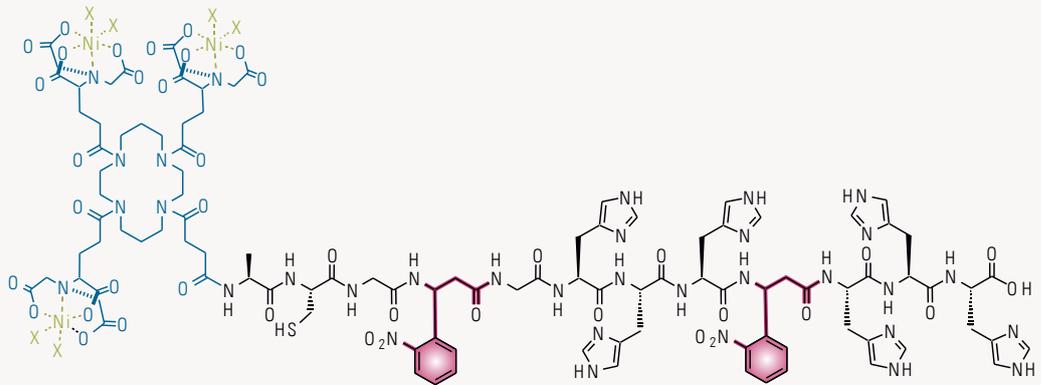
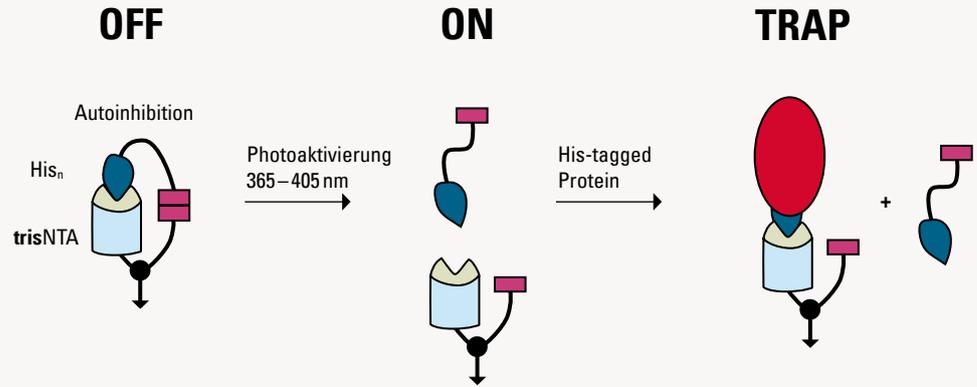
Diesem Ziel kamen die Forscher mit einem weiteren Projekt näher, das es erlaubt, in der Zelle die Zusammenlagerung von Proteinen räumlich und zeitlich zu verfolgen: Dazu entwickelten die Chemiker eine photoaktivierbare (PA) Verbindung namens PA-trisNTA (Nitrilo-Essigsäure). »Tris« steht für drei Gruppen, die an ein zyklisches Molekülgerüst geknüpft sind und ganz gezielt an ausgewählte Proteine binden können. An der vierten Molekül-»Ecke« ist eine photoaktivierbare Kette von Aminosäuren gebunden, die das trisNTA hemmt. Dieser zusätzliche Arm beinhaltet zwei lichtspaltbare Aminosäuren und sorgt dafür, dass PA-trisNTA inaktiv ist. Belichtung führt nun dazu, dass die lichtempfindlichen Aminosäuren abgespalten werden. Dadurch wird das trisNTA freigesetzt und kann sich an speziell markierte Proteine anlagern. Verwendet werden dazu Proteine, die ebenfalls mit einer kurzen Aminosäure-Kette (aus Histidinen, daher »His-Tag«) versehen sind – eine häufig verwendete Markierung, mit deren Hilfe Proteine aufgereinigt werden können. An diese Histidin-Kette bindet das »befreite« trisNTA höchst

### AUF DEN PUNKT GEBRACHT

- Um die Funktion und Wechselwirkung bestimmter Proteine in der Zelle zu verstehen, werden sie zunächst mit lichtaktivierbaren Schutzgruppen gezielt blockiert. Spaltet Licht die Schutzgruppe ab, werden die Proteine aktiv.
- Eingebettet in Hydrogele lassen sich zelluläre Vorgänge in 3-D räumlich und zeitlich hochaufgelöst verfolgen.
- Ziel ist es, komplexere Vorgänge in Zellen oder kleinen Organismen zu studieren.

1 Im »Off«-Zustand ist die Verbindung PA-trisNTA an eine photoaktivierbare Kette gebunden und damit chemisch inaktiv. Durch Belichtung wird die Kette abgespalten (»On«-Zustand). Das freigesetzte trisNTA kann sich dann an Proteine, die mit einer kurzen Aminosäure-Kette aus Histidinen (»His-Tag«) markiert sind, höchst selektiv, sehr schnell und mit hoher Affinität binden. Unten ist die chemische Struktur des PA-trisNTAs gezeigt.

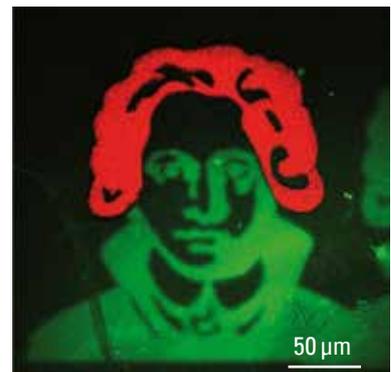
Prinzipien der Photoaktivierung zur Kontrolle zellulärer Prozesse



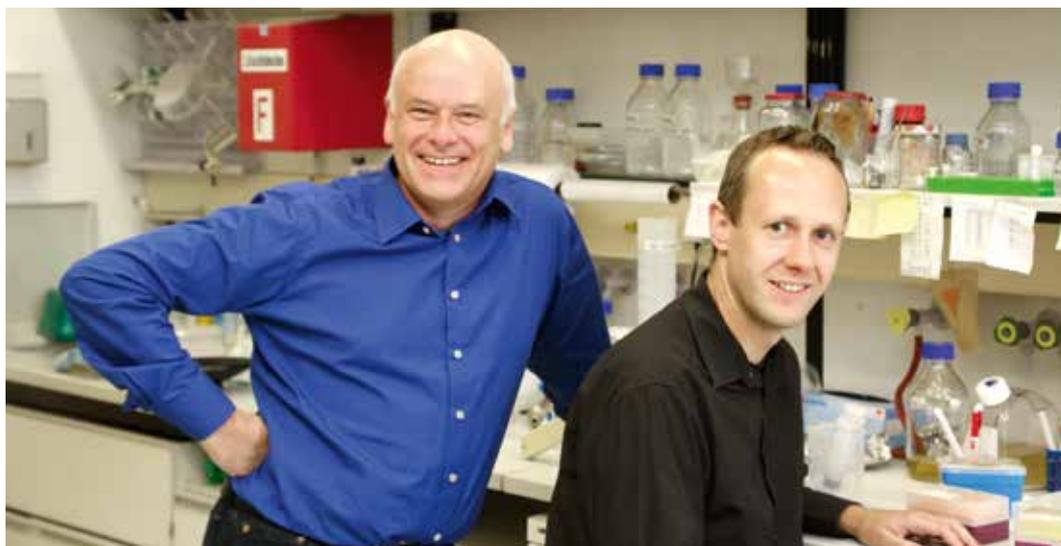
selektiv, sehr schnell und mit hoher Affinität (Abb. 1). »Mit diesem System haben wir das kleinstmögliche Schlüssel-Schloss-System, das es derzeit gibt«, so Wieneke.

Um diesen Effekt in drei Dimensionen untersuchen zu können, fixierten die Forscher das PA-trisNTA in einem durchsichtigen Hydrogel – »das ist ein ähnliches Material, das in Einweg-Windeln Wasser bindet und für die Saugkraft sorgt«, so Tampé. Mithilfe moderner Mikroskope können die Wissenschaftler nun zeitlich und räumlich genau verfolgen, wie sich in den belichteten Bereichen die His-markierten Proteine zusammenlagern. Punkt für Punkt und Zeile für Zeile werden die geschriebenen Proteinstrukturen mithilfe eines hochauflösenden konfokalen Rasterlasermikroskops »abgelesen«.

Komplexer wird das Ganze noch, wenn lichtempfindliche Substanzen verwendet werden, die auf unterschiedliche Wellenlängen reagieren. So können verschiedene Proteinreaktionen ausgelöst und als mehrfarbiges Muster sowohl räumlich als auch zeitlich sichtbar gemacht werden.



Der »Fernbedienung« von Zellreaktionen kommen die Wissenschaftler also schon näher. Mit diesem Prinzip wird es in Zukunft möglich, einzelne in Hydrogele eingebettete Zellen, aber auch transparente Organismen wie Fadenwürmer zu untersuchen. »Wir kennen heute die einzelnen Komponenten der Zellen, aber nicht, wie sie in Raum und Zeit miteinander reagieren und an ihr Ziel kommen«, ergänzt Tampé. »Mit diesem lichtgesteuerten System können wir einzelne Proteine in Raum und Zeit verfolgen, manipulieren, kontrollieren, steuern ...«



### Blitzschnelle Aktivierung in winzigen Volumina

Mithilfe eines weiteren Tricks gelang es den Forschern, die dreidimensionale Auflösung weiter zu verbessern. Hierzu verwendeten sie wieder das oben erwähnte Glutathion, das mit einer Schutzgruppe versehen wurde, die das Molekül blockiert, aber durch Licht abgespalten werden kann [siehe Anja Störiko: »Steuerung mit Licht aus dem Chemiebaukasten«, Seite 35]. Dies wird mit einem Zwei-Photonen-Laser äußerst präzise aktiviert: Statt üblicherweise nur ein Photon regen hier gleichzeitig zwei Photonen das Molekül an. Dadurch erhöhen sich die Präzision und vor allem die räumliche Auflösung beträchtlich. Diese Photoaktivierung ist dreimal schneller als mit nur einem Photon. Außerdem geschieht dies in winzigen Volumina: In einem Femtoliter – einem milliardstel Liter! – ist es noch möglich, den Laserstrahl so genau auszurichten, dass er auf einem Punkt konzentriert ist und Streulicht vermieden werden kann. Zudem kann der Laserstrahl vergleichsweise tief in Gewebe eindringen, so dass es auch möglich sein sollte, tierische und menschliche Organe zu untersuchen. Darauf weisen erfolgreiche Ergebnisse in Hydrogelen hin, die präzise dreidimensionale Abbilder lieferten.

### Signalweiterleitung auf molekularer Ebene verstehen

In aktuellen Arbeiten versuchen die Wissenschaftler, diese methodischen Ansätze für gezielte Forschungsanwendungen einzusetzen. So verfolgen sie derzeit die Zusammenlagerung von Proteinen, die immer als Paar aktiv sind und wirken. Diese »Dimere« aus zwei gleichen oder auch verschiedenen Untereinheiten müssen sich in der Zelle finden und paaren. Diesen Vorgang verfolgt die Arbeitsgruppe, indem sie die Untereinheiten durch die lichtaktivierbaren Werkzeuge in räumliche Nähe bringt. So lässt sich beispielsweise beobachten, wie sich ein

solches Dimer in der Zellmembran findet, in der es anschließend als Rezeptor wirksam ist.

Ein weiteres Projekt beschäftigt sich mit dem Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor, der in Tumoren gehäuft auftritt. Mit Licht wollen die Forscher den Rezeptor gezielt anregen und kontrollieren. »Wenn man solche Protein-Protein-Wechselwirkungen auslösen und verfolgen kann, ist das ein erster Schritt, um die »Mechanik« der Signalweiterleitung zu verstehen«, so Tampé. »Es wäre faszinierend, die Rezeptordynamik zu verstehen, also wie viele Rezeptoren benötigt werden, um Signale weiterzugeben, damit eine zelluläre Antwort ausgelöst wird«, ergänzt Wieneke. Den wesentlichen Fortschritt ihrer Forschung sehen beide darin, dass nun zelluläre Signale in Raum und Zeit exakt kontrolliert und beobachtbar werden. Verschiedene Wellenlängen des Lichts erlauben dabei eine parallele, unabhängige Steuerung unterschiedlicher Ereignisse.

Der nächste Schritt ist nun, einzelne Zellen oder gar kleine Organismen in Hydrogele einzubetten und im lebenden Organismus zu verfolgen, wo sich Proteine zusammenlagern und in Wechselwirkung treten. »Passiert das an einem bestimmten Zellende? Wie viele Signalproteine sind nötig, um eine Antwort auszulösen? Wie groß sind die Proteinkomplexe bei der Signalweiterleitung?«, fallen Tampé gleich etliche Fragestellungen ein. Dank erfolgreicher interdisziplinärer Zusammenarbeit, hochaufgelöster moderner Mikroskopiemethoden, des Einfallsreichtums der Mitarbeiter und der faszinierenden Eigenschaften von Licht werden diese spannenden Denkmodelle sicher in den nächsten Jahren Realität. ●

**Prof. Dr. Robert Tampé** (links), Jahrgang 1961, promovierte 1989 in Biochemie an der TU Darmstadt. Nach einem Forschungsaufenthalt an der Stanford University, USA, wurde er Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und zugleich Gruppenleiter am Institut für Biophysik der TU München (Habilitation 1996). 1998 erhielt er eine C4-Profsur für Physiologische Chemie/Zelluläre Biochemie am Klinikum der Universität Marburg. Seit 2001 leitet er das Institut für Biochemie an der Goethe-Universität. Er ist Sprecher des SFB 807 Transport und Kommunikation über biologische Membranen. Neben seiner Mitgliedschaft im Direktorium des Exzellenzclusters Makromoleküle Komplexe erhielt er eine Honorar-Professur an der University of California San Francisco (UCSF) und der Kyoto University (Japan).

**Dr. Ralph Wieneke**, Jahrgang 1978, promovierte 2009 in organischer Chemie an der Philipps Universität Marburg über künstliche Biopolymere in der Biomineralisierung. Nach einem kurzen Gastaufenthalt an der Georg-August Universität Göttingen war er zunächst Postdoc am Institut für Biochemie an der Goethe-Universität. Seit 2013 ist er dort Juniorengruppenleiter mit eigenen geförderten DFG-Projekten. Seine Forschungsinteressen gelten der (opto-) chemischen Biologie mit Fokus auf die Entwicklung und Anwendung von lichtgesteuerten Werkzeugen für die gezielte Proteinmodifizierung. Spezielles Interesse gilt dabei der »Mechanik der Signaltransduktion« (Receptor clustering).

### Die Autorin

**Dr. Anja Störiko**  
(weitere Informationen auf Seite 36)