

Den Vermittlern zwischen Zellen auf der Spur

Transmembranproteine machen fast ein Drittel des Gesamtproteingehaltes von Zellen aus. Etwa die Hälfte der am Markt befindlichen Medikamente sind auf die Funktion einer bestimmten Klasse dieser Proteine gerichtet, nämlich die der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Insgesamt wenig bekannt jedoch sind bis heute die Mechanismen des Membraneinbaus und der Faltung von Membranproteinen. Unter anderem anhand von bakteriellen Membranproteinen aus E. coli oder Fusobacterium nucleatum versucht Dr. Jörg H. Kleinschmidt Licht ins Dunkel zu bringen, unter spezieller Beachtung der Rolle der Chaperone.



Dr. Jörg H. Kleinschmidt forscht an der Universität Konstanz
© AG Kleinschmidt

Die räumliche Anordnung sowie Funktionsweise von Membranproteinen markiert biochemisch betrachtet immer noch einen recht unbekanntem Fleck auf der Karte der Wissenschaftler. Das liegt unter anderem daran, dass sie sehr schwer in ausreichenden Mengen zu isolieren sind, da sie nur in geringen Mengen natürlich vorkommen. Wegen ihrer Lipid-Umgebung haben Membranproteine eine hydrophobe Oberfläche und sind daher nur schwer ohne Verlust an funktioneller Aktivität in Lösung zu bringen. „Die heterologe Überproduktion, das heißt die Expression und Isolation aus Fremdorganismen wie beispielsweise Bakterien, Hefe, oder Insektenzellen ist oft toxisch oder führt zu Fehlfaltungen“, berichtet Dr. Jörg Kleinschmidt. Mit seiner Forschergruppe untersucht der Biophysiker den Faltungsmechanismus einer Klasse von Membranproteinen, die eine fassartige Struktur aufweisen, der sogenannten β -Fass-Membranproteine. Zudem geht er der Frage auf den Grund, wie die Wechselwirkung von Membranproteinen und Faltungshelferproteinen, zu denen beispielsweise molekulare Chaperone gehören, im Detail aussieht.

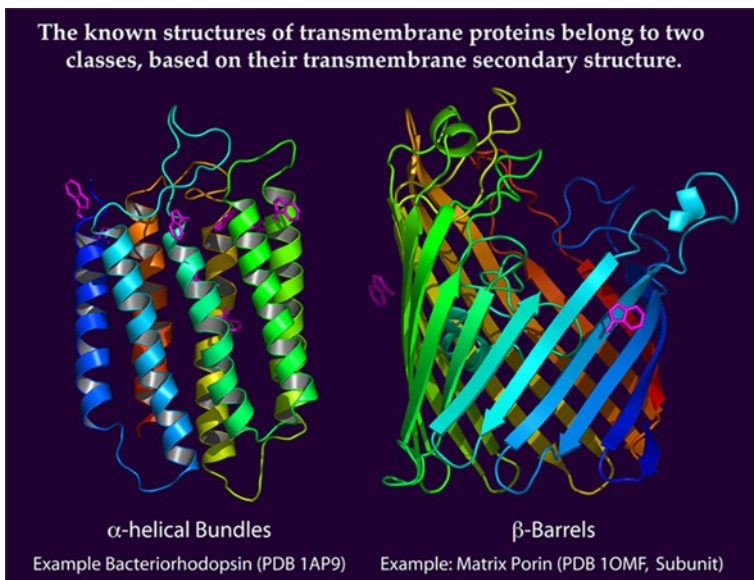
„Vorteilhaft ist, dass sich β -Fass-Membranproteine meist komplett in wässriger Lösung durch hohe Konzentrationen chaotroper Substanzen, z. B. Guanidiniumchlorid, entfalten lassen, wobei die Sekundärstruktur nahezu vollständig verloren geht“, erklärt Dr. Jörg Kleinschmidt. Verdünnt man ihm zufolge die Denaturierungsmittel in Gegenwart von Detergensmicellen (Aggregate von Detergenz-Molekülen) oder Lipid-Doppelschichten (Vesikel bzw. Liposomen), so falten viele dieser Proteine direkt zurück, ohne dazu zwingend Faltungshelferproteine zu benötigen. Die β -Fass-Membranproteine sind für Faltungsstudien generell leichter zugänglich als die weitaus hydrophoberen α -helikalen Membranproteine.

Interessant ist für die Forscher dabei unter anderem aufzuklären, warum die Faltung im Modellsystem spontan verläuft, in Zellen jedoch bestimmte Proteine zugegen sein müssen. Keine leichte Aufgabe, denn Proteine können theoretisch eine sehr große Zahl möglicher Konformationen einnehmen, wobei zumeist jedoch nur eine räumliche Anordnung funktionell ist. „Welche Konformation das ist, erfordert eine Vielzahl von Berechnungen und enorme Computerkapazitäten“, verweist Dr. Jörg Kleinschmidt auf die Notwendigkeit mehr Informationen über die Prinzipien von Proteinfaltungen zu erhalten, um Algorithmen zur Strukturvorhersage zu optimieren. Für die Transmembranregionen von Membranproteinen ist dies ihm zufolge jedoch etwas leichter, da die Lipid-Doppelschicht, in die Membranproteine eingebettet sind, zu Restriktionen für die möglichen Konformationen“ führt.

Faltungshelferproteine bestimmen Faltungsgeschwindigkeit

Gegenstand der Analysen bilden Membranproteine aus Bakterien, darunter OmpA aus E. coli und FomA aus Fusobacterium nucleatum oder auch aus eukaryotischen Zellen. Letztere schließen zum Beispiel spannungsabhängige anionenselektive Kanäle aus Mitochondrien oder den humanen Tachykinin Rezeptor NK₂R ein, einem 7 α -Helixbündel-Transmembranprotein, das die Kontraktion von glattem Muskelgewebe vermittelt.

Für den Faltungsmechanismus haben Dr. Jörg Kleinschmidt und sein Team herausgefunden, dass Sekundär- und Tertiärstruktur von β -Fass-Membranproteinen synchronisiert ausgebildet werden und die Faltungsgeschwindigkeit unter anderem von der hydrophoben Schichtdicke der Membran abhängt. „Wir haben weiterhin lösliche Komplexe der Chaperone Skp (Seventeen kilo-Dalton Protein) mit entfalten Außenmembranproteinen aus verschiedenen Bakterien charakterisiert und den Einfluss der Chaperone auf die Membranproteinfaltung beschrieben“, ergänzt der Konstanzer Wissenschaftler. Die Geschwindigkeiten von Proteinfaltungen können im Allgemeinen jedoch sehr unterschiedlich sein. Bei löslichen Proteinen kann dies innerhalb weniger Millisekunden geschehen, für β -Fass-Membranproteine findet man in Zellen Faltungsgeschwindigkeiten im Sekunden- bis Minutenbereich, wie Dr. Jörg Kleinschmidt bemerkt. Für die Faltung in Lipid-Doppelschichten, die als Modellmembranen dienen, liegt die Faltungsgeschwindigkeit im Bereich von wenigen Minuten bis mehreren Stunden. Sie hängt dabei von den Konzentrationen des Membranproteins und der Membranen ab. Bei gleichen Konzentrationen ist die Zusammensetzung der Membran entscheidend, z.B. die Art der Lipidspezies, oder auch die hydrophobe Schichtdicke der Membran. Wichtig ist, ob Faltungshelferproteine anwesend sind. „Für β -Fass-Membranproteine steigt die Faltungsgeschwindigkeit in Gegenwart von Chaperonen, d.h. von Proteinen, die Fehlfaltungen verhindern, stark an“, so



Zwei strukturell unterschiedliche Klassen von Transmembranproteinen stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen: α -Helix- und β -Fass-förmige.
© PDB 1AP9 / PDB 1OMF

Kleinschmidt. Auch hängt die Faltungsgeschwindigkeit von der Größe des Proteins ab und von seinen physikalischen Eigenschaften.

Neben Skp konnten die Forscher Effekte von zwei weiteren Chaperonen auf die Membranproteinfaltung biochemisch nachweisen. Für Außenmembranproteine von Bakterien charakterisierten sie darüber hinaus einen membranständigen Proteinkomplex, der in Zellen für die Membranproteinfaltung notwendig ist. „Für Entwicklungen von Rückfaltungsverfahren von α -helikalen Transmembranproteinen haben wir ein heterologes Expressionssystem für den humanen Tachykinin Rezeptor NK₂R entwickelt, der für die Kontraktion glatter Muskeln bedeutend ist“, erklärt Dr. Jörg Kleinschmidt.

Strukturbildung in drei Stufen

Mehrere zugrundeliegende, mechanistische Prinzipien, nach denen die Strukturbildung und Faltung von Transmembranproteinen erfolgen, konnten Wissenschaftler bisher entschlüsseln und dabei wichtige Faktoren ermitteln. So kann der Membraneinbau und die Faltung von Membranproteinen sowohl co-translational als auch post-translational erfolgen. „Für die co-translationale Faltung ist der membranständige Sekretionskomplex (kurz: Sec-Komplex) sehr wichtig, der aus drei Untereinheiten besteht“, berichtet Kleinschmidt. Dieser Komplex ermöglicht Einbau und Faltung von Membranproteinen mit α -Helix-Transmembranstruktur. Die gegenwärtigen Erkenntnisse haben zu einem Drei-Stufen-Modell geführt, in dem zunächst die α -Helices der Transmembransegmente unabhängig voneinander in die Membran inserieren und dann in einer zweiten Stufe lateral in der Ebene der Membran assoziieren. In der dritten Stufe bilden die Proteine peripherale Strukturelemente aus bzw. binden prothetische Gruppen, wie z.B. Retinal in Rhodopsin oder Hämgruppen in Cytochromen.

Die Außenmembranproteine von Bakterien oder Zellorganellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten, die β -Fass-Transmembranstruktur aufweisen, falten nach anderen Prinzipien. „In Bakterien werden Außenmembranproteine durch den Transmembranprotein-Komplex SecYEG in das Periplasma transportiert, wo sie an lösliche Chaperone binden, bevor sie durch diese zur Außenmembran gelangen“, stellt Dr. Jörg Kleinschmidt fest. In Zellen ist für den Einbau in die Außenmembran ein weiterer Proteinkomplex notwendig. Im Modellexperiment der Wissenschaftler zeigte sich hingegen, dass die β -Fass-Membranproteine spontan in bestimmte Membranen falten können, ohne dass dazu weitere Proteine benötigt werden. „Die Eigenschaften der Membranlipide sind dabei sehr wichtig“, sagt der Konstanzer Biophysiker.

Mit eigenen Analysemethoden zum Ziel

Für die Analyse der Faltung von Membranproteinen sowie von Protein-Protein-Wechselwirkungen arbeitet das Team um Dr. Jörg Kleinschmidt mit molekularbiologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden. Dafür sehr gut geeignet ist insbesondere die Koppelung ortsgerechter Mutagenese zur Expression und biochemischen Markierung von Protein-Punktmutanten mit Fluoreszenz- oder Elektronenspinresonanzspektroskopie. „Um den Einbau von Membranproteinen in Membranen zu untersuchen, haben wir zeitaufgelöste Fluoreszenzlöschungsverfahren entwickelt, für die wir beispielsweise markierte Membranlipide einsetzen“, erklärt der Forscher der Uni Konstanz. Ähnlich lassen sich zeitaufgelöst auch Konformationsänderungen in Membranproteinen mit doppelt markierten Proteinen untersuchen. Um festzustellen, ob β -Fass-Membranproteine nach ihrer Faltung in Membranen auch funktionieren, werden Messungen zur Einzelkanal-Leitfähigkeit (single-channel conductance recordings) eines Transmembranproteins durchgeführt. Für die Bestimmung der Sekundärstruktur von Membranproteinen verwendet das Team die Circular dichroismus-Spektroskopie.

Industriepartner für pharmakologisch interessanten Rezeptor gesucht

Aktuell arbeiten Kleinschmidt und sein Team mit einer dänischen Firma zusammen, die z. B. Aquaporin-Membranproteine benutzt, um damit Filter für hochreines Wasser herzustellen. „Dieser Firma haben wir ein Membranporin für Tests und Entwicklungen zur Verfügung gestellt“, bemerkt der Biophysiker. Sehr interessiert ist die Arbeitsgruppe an einer Kooperation hinsichtlich Faltung und Funktion von membranständigen Rezeptoren. Hierzu haben die Konstanzer Wissenschaftler für den Tachykininrezeptor NK₂R kürzlich eine Methode entwickelt, diesen in Milligramm-Mengen zu isolieren. „Der Rezeptor ist pharmakologisch interessant, da man davon ausgeht, dass Tachykinine z.B. für die Hyperaktivität der Bronchien bei Asthma, bei chronischen Darmerkrankungen oder bei Blasenentzündungen bedeutend sind“, betont Dr. Jörg Kleinschmidt. Um NK₂R hinsichtlich seiner Faltung und Funktion zu analysieren, wäre ihm zufolge die Finanzierung einer Doktorarbeit im Rahmen einer Industriekollaboration sehr hilfreich.

Membranproteine als Biosensoren

Eine weitere Anwendung auf dem Forschungsgebiet besteht im Design modifizierter oder gar komplett neuer Membranproteine mit neuen Eigenschaften. So lassen sich beispielsweise Eigenschaften von β -Fass-Transmembranproteinen durch Austausch von Aminosäureresten verändern oder β -Fass-Membranproteine als Biosensoren einsetzen. „Einige dieser Proteine sind selektive Transmembrankanäle, die den Transport von Gelöstem, zum Beispiel Nährstoffen wie Zucker, über eine Membran ermöglichen“, so Dr. Jörg Kleinschmidt.

