

Magnetische Aminosäuren zur Vermessung von Proteinen

Die Konstanzer Chemiker Dr. Malte Drescher und Dr. Daniel Summerer haben gemeinsam eine innovative Methode zur magnetischen Proteinmarkierung entwickelt, die die Aufklärung von Proteinstrukturen im Zellinnern ermöglichen könnte. Dazu entwickelten die Forscher künstliche magnetische Aminosäuren, die bei der Biosynthese des Proteins direkt in der Zelle eingebaut werden. Die zum Patent angemeldete Methode könnte große Fortschritte in der Strukturbiologie mit sich bringen.

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins wird durch die Wechselwirkungen seiner Bausteine, der Aminosäuren bestimmt und ist entscheidend für die Funktion des Proteins. Trotz Fortschritten in der Bioinformatik ist eine Vorhersage dieser Struktur in vielen Fällen nicht möglich, weshalb der experimentellen Strukturbestimmung große Bedeutung zukommt. Unter den verschiedenen gebräuchlichen Methoden sticht vor allem die Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie hervor, mit der es möglich ist, Proteine direkt im Zellinnern zu vermessen (siehe Beitrag: Malte Drescher gibt Einblicke ins Zellinnere). Dazu werden die Proteine mit mehreren sogenannten Spinsonden markiert, die ungepaarte Elektronen enthalten und dadurch abstandsabhängig miteinander wechselwirken. Die markierten Proteine werden in Zellen injiziert, wo sie ihre natürliche Faltung annehmen. Über den gemessenen Abstand zwischen definierten Spinsonden können dann Rückschlüsse auf die dreidimensionale Struktur des Proteins in der Zelle gezogen werden.



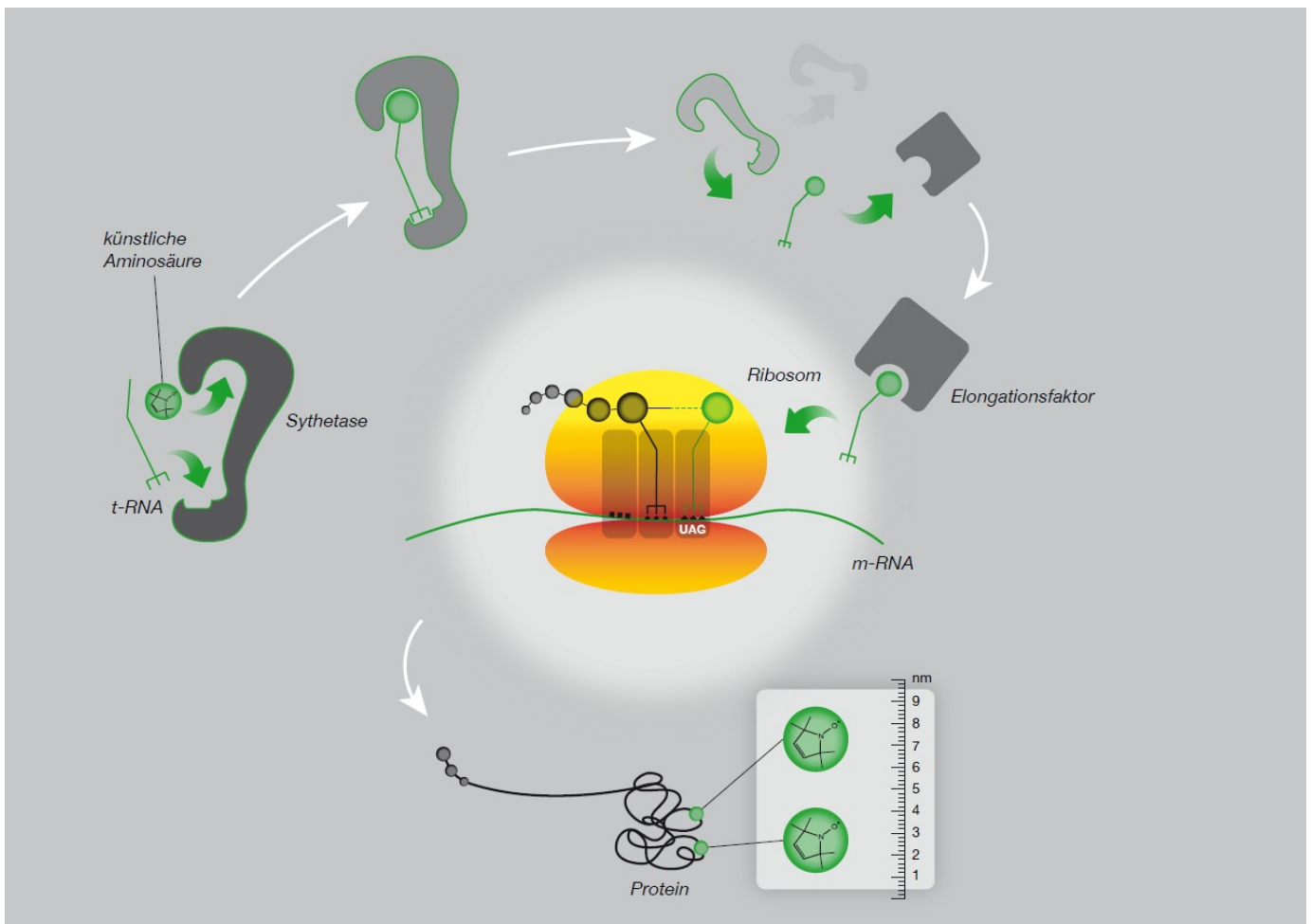
Für die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie werden die zu untersuchenden Zellsuspensionen in spezielle Probenröhrchen gefüllt.

© Universität Konstanz

So herausragend diese Methode auch ist, so hat sie doch auch Nachteile, wie Dr. Malte Drescher von der Universität Konstanz beschreibt. „Die konventionelle Spinmarkierung ist sehr aufwändig, da die zu untersuchenden Proteine erst in vitro vorbereitet werden müssen“, so Drescher. Da die Markierung an die Aminosäure Cystein angeknüpft wird, müssen zuerst alle vorhandenen DNA-Codierungen für Cysteine entfernt und anschließend an den gewünschten Stellen neu eingeführt werden, bevor das Protein exprimiert und die eigentliche Markierung durchgeführt werden kann. „Die nativen Cysteine können aber selbst für die Struktur entscheidend sein“, gibt der Physikochemiker zu bedenken. Darum war er auf der Suche nach einer einfacheren Methode, beispielsweise einer genetisch kodierten, künstlichen Aminosäure, wie sie häufig zur Expression von Proteinen mit maßgeschneiderten Funktionen eingesetzt wird (siehe Beitrag: Rotes Licht beleuchtet Regulationsmechanismen der Genexpression und Daniel Summerer: Neue Wege zur Biosynthese funktional erweiterter Proteine).

Mit einem Trick zum Erfolg

Auf der Suche nach Kooperationspartnern, die das bisher Unmögliche möglich machen könnten, musste sich Drescher nicht lange umsehen. Fachbereichskollege Dr. Daniel Summerer, Chemiker an der Universität Konstanz, beschäftigt sich in seiner Forschung mit der Erzeugung künstlicher Aminosäuren und kannte daher das Potenzial, das magnetische Aminosäuren bergen. „Allerdings waren an der Entwicklung einer paramagnetischen künstlichen Aminosäure, wie sie für diese Anwendung nötig wäre, in der Vergangenheit alle Arbeitsgruppen, die auf diesem Gebiet forschten, gescheitert“, erklärt er. Die besondere Herausforderung liegt dabei in der Reaktivität dieser Aminosäuren in Zellen, die nur schlecht verstanden ist. Zwar ist bekannt, dass der Magnetismus solcher Verbindungen in Zellen schnell verloren geht, doch ist nicht klar, welche konkreten chemischen Reaktionen dabei ablaufen. Um eine solche Aminosäure in Proteine in Zellen einzubauen ist jedoch eine Umprogrammierung der Proteinbiosynthesemaschinerie von Zellen notwendig, was eine hohe Stabilität der Aminosäure erfordert.



Schema des Einbaus einer künstlichen Aminosäure ins Protein: (von links) Beladung der t-RNA mit der künstlichen Aminosäure durch eine Synthetase, Transport der beladenen t-RNA zum Ribosom, Bindung der Aminosäure und Einbau ins wachsende Polypeptid, Abstand von zwei eingebauten Aminosäuren im gefalteten Zustand.
 © Universität Konstanz

Darum machte Summerer sich mit seiner Gruppe an die Arbeit, die Synthese für magnetische Aminosäuren zu entwickeln, die Proteinbiosynthese dementsprechend zu modifizieren und Prozesse für die Proteinmarkierung zu etablieren. „Hier ist uns der Durchbruch gelungen“, sagt Summerer. Um unerwünschte Reaktionen sowie den Verlust des Magnetismus zu vermeiden, hat seine Arbeitsgruppe einen Trick genutzt. „Für die aufwändige Umprogrammierung haben wir nicht die magnetischen, sondern stabile Ersatzamino­säuren verwendet, die den tatsächlichen Zielamino­säuren strukturell sehr ähnlich sind“, schildert Summerer. Die derart veränderte Proteinbiosynthese war anschließend trotzdem in der Lage auch die magnetischen Aminosäuren zu verwenden und mit hoher Zuverlässigkeit in verschiedene Proteine einzubauen, wie erste Versuche zeigten.

Im nächsten Schritt wurden die Aminosäuren eingesetzt, um Proteinstrukturen in Zellen zu untersuchen. „Zuerst haben wir zwei Aminosäuren in ein Protein bekannter Struktur eingebaut und die magnetischen Wechselwirkungen zwischen beiden gemessen, um die Funktionstüchtigkeit der Methode zu testen“, erläutert Drescher. Aus der Stärke der Wechselwirkungen konnte der Abstand der beiden berechnet werden. „Unser experimentelles Ergebnis stimmte mit den theoretischen Vorhersagen, basierend auf der bekannten Struktur, überein. Die Methode funktioniert also“ erklärt er weiter.

Großes Potenzial zur Untersuchung biologischer Strukturen

Die künstlichen Aminosäuren enthalten jeweils ein ungepaartes Elektron, das auf der N-O-Bindung (de-)lokalisiert und sterisch abgeschirmt ist. Dieses ungepaarte Elektron sorgt dafür, dass die Aminosäure (para-)magnetisch ist und mittels ESR-Spektroskopie detektiert werden kann. „Die Verwendung solcher Aminosäuren bietet vollkommen neue Eigenschaften und Perspektiven, die mit anderen Methoden nicht zugänglich sind - wie eben die Messung von präzisen, absoluten Abstandsverteilungen in Proteinen ohne störende Hintergrundsignale“, beschreibt Summerer begeistert. Dieser Vorteil ist besonders in einer komplexen Umgebung wie dem Zellinnern von Bedeutung. Auch die Befürchtung, die künstlichen Aminosäuren könnten die Eigenschaften des markierten Proteins beeinflussen, können die Forscher entkräften. „Im Vergleich zu anderen Sonden, zum Beispiel Fluoreszenzfarbstoffen, die chemisch an ein Protein angekoppelt werden, ist unsere magnetische Sonde winzig und die durch sie erwartbare Störung klein oder nicht vorhanden“, erklärt Drescher. Im Gegensatz zur konventionellen Spinmarkierung können außerdem alle nativen Cysteine im Protein belassen werden, was entscheidend für die natürliche Faltung sein kann, und auch bisher unzugängliche Stellen können markiert werden.

Zukünftig arbeiten die Forscher daran, über die Abstandsmessungen mit Hilfe der magnetischen Aminosäuren bisher unbekannte Strukturen aufzuklären, auch eine Weiterentwicklung der Methode ist geplant. „Unsere bislang veröffentlichten Ergebnisse wurden in E. coli Bakterien erzielt und erste Experimente mit menschlichen Zellen sind aber vielversprechend, sodass wir zuversichtlich sind, die Methode auch in verschiedenen Säugerzellen etablieren zu können“, erläutert Summerer. Gemeinsam haben die Chemiker ihre Methode auch zum Patent angemeldet. Neben dem Einsatz für die Untersuchung biologisch relevanter Systeme ist damit auch eine wirtschaftliche Nutzung der Erfindung möglich. „Wir haben bereits Gespräche mit der Industrie aufgenommen und ein konkretes Projekt für eine Produktentwicklung wird bereits bearbeitet“, schildert Summerer.

Fachbeitrag

05.05.2014

Bettina Baumann

BioLAGO

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

Dr. Malte Drescher

Physikalische Chemie

Universität Konstanz

Tel.: +49 (0)7531/ 88-5262

E-Mail: malte.drescher(at)uni-konstanz.de

Dr. Daniel Summerer

Chemische Biologie

Universität Konstanz

Tel.: +49 (0)7531/ 88-5669

E-Mail: daniel.summerer(at)uni-konstanz.de

- ▶ Malte Drescher gibt Einblicke ins Zellinnere
- ▶ Rotes Licht beleuchtet Regulationsmechanismen der Genexpression
- ▶ Daniel Summerer: Neue Wege zur Biosynthese funktional erweiterter Proteine

Der Fachbeitrag ist Teil folgender Dossiers



Bioanalytik - Neue Techniken zur Charakterisierung biologischen Materials



Chemische Werkzeuge für biologische Anwendungen

Universität Konstanz

