Mit Nanoporen epigenetische Veränderungen schneller erkennen

Als epigenetische Modifikationen bezeichnete Veränderungen spielen unter anderem bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle. Sie schnell und zuverlässig analysieren zu können, könnte zum Beispiel wesentlich dazu beitragen, die personalisierte Therapie weiterzuentwickeln. Einem Forschungsteam des Physiologischen Instituts der Universität Freiburg ist es nun gelungen, die chemischen Veränderungen an Proteinen, die für epigenetische Modifikationen typisch sind, mithilfe der Nanoporen-Analytik zu charakterisieren. Ihre Forschungsergebnisse haben die Forschenden in der Fachzeitschrift „Journal of the American Chemical Society (JACS)" veröffentlicht.

Nanoporen haben sich in den vergangenen Jahren zu einem breit einsetzbaren Werkzeug für die Analyse von Molekülen entwickelt. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften ermöglichen sie, die Struktur von Molekülen innerhalb von Sekundenbruchteilen zu analysieren: Als zylindrisch angeordnete Proteine formen sie winzige Kanäle von nur wenigen millionstel Millimetern (Nanometern) Durchmesser, die sich in Biomembranen einbetten lassen. „Für die Versuche legen wir eine konstante Spannung über die Membran an, sodass Ionen aus dem umgebenden Medium durch die Pore fließen. So entsteht ein konstanter, präzise messbarer elektrischer Strom durch die Pore", erläutert Prof. Dr. Jan C. Behrends von der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg, in dessen Labor die nun veröffentlichten Experimente stattfanden. Wenn jedoch ein Molekül in die Pore wandert, wird der Strom blockiert – und zwar umso stärker, je größer das Molekül ist.

Ein Protein im Blick der Forschung: H4

Im Rahmen der nun veröffentlichten Experimente widmeten die Freiburger Wissenschaftler sich der Untersuchung des sogenannten Histon-Proteins H4. Dieses Protein ist in allen Zellen mit Zellkern fest mit der DNA assoziiert und eines der am besten erforschten Ziele epigenetischer Modifikationen. Besonders ein Bereich am N-terminalen Ende des Proteins ist von diesen Modifikationen betroffen. „Dort weist die Proteinsequenz mehrmals die Aminosäure Lysin auf", erläutert Behrends. An diese Lysine, die entsprechend ihrer Position in der Proteinkette z.B. als K8, K12 und K16 bezeichnet werden, können im Rahmen epigenetischer Modifikationen zum Beispiel Azetyl- oder Methylgruppen angehängt werden. Welche chemische Veränderung an welcher Lysin-Position stattfindet, ist durchaus von medizinischer Bedeutung, wie der Freiburger Physiologe darlegt. „Eine Azetylierung an K16 zum Beispiel ist wichtig für die menschliche Entwicklung, eine Methylierung an K12 spielt nach neuesten Ergebnissen aus der Uniklinik Freiburg eine Rolle bei der Entstehung mancher Prostata- und Lungentumoren."

Veränderungen mit Hilfe einer Nanopore erkennen

Bei ihren Versuchen konnten Behrends und sein Team nun H4-Fragmente mit oder ohne Acetylierung, sowie Fragmente mit einer, zwei oder drei Acetylierungen deutlich unterscheiden. Darüber hinaus gelang ihnen der Nachweis, dass die von ihnen verwendete Nanopore auch gegenüber dem Ort der Acetylierung empfindlich war: So blockierten Histon-Fragmente mit einer Acetylgruppe an K8 den Strom durch die Pore stärker als solche, die an K12 acetyliert waren, und diese wiederum stärker als solche mit einer K16-Acetylierung. „Diese Sensitivität erstaunt insofern, als diese Fragmente hinsichtlich ihrer Masse und ihres Gesamtvolumens identisch sind", sagt Behrends. Der Porenstrom scheint also nicht nur für die Größe, sondern auch für die Form des Moleküls empfindlich. Ebenso gut ließen sich die verschiedenen Varianten zweifach acetylierter Histon-Fragmente – K8 und K12, K8 und K16 bzw. K12 und K16 – trotz auch hier gleicher Masse unterscheiden. Auch unterschiedlich stark und an unterschiedlichen Positionen methylierte H4-Fragmente blockierten den Strom durch die Pore unterschiedlich stark – wenngleich nicht so deutlich wie die acetylierten Varianten.

„Wir konnten mit unseren Versuchen erstmals zeigen, dass die Nanoporen-Analytik erlaubt, Moleküle nicht nur anhand ihrer Größe, sondern auch anhand ihrer Form zu unterscheiden", resümiert Studienleiter Behrends. Wie molekulardynamische Simulationen der ebenfalls an der Studie beteiligten Arbeitsgruppe von Aleksei Aksimentiev von der Universität Illinois/USA zeigen, spielt dafür das sehr inhomogene elektrische Feld im Innern der Pore eine Schlüsselrolle.

Zukunftsvision: eine optimierte medizinische Diagnostik

Während die Sequenzierung von DNA mithilfe von Nanoporen bereits etabliert sei und kommerziell betrieben werde, beginne die Entwicklung der Nanoporen-basierten Analyse von Proteinen erst, betont Behrends. „Die Schwierigkeit bei der Sequenzierung von Proteinen besteht darin, dass es sich hier um Moleküle mit sehr uneinheitlichem Ladungsmuster handelt." Während die – negativ geladene – DNA im elektrischen Feld zielgerichtet wandert und so Baustein für Baustein durch die Pore gezogen werden kann, bestehen Proteine aus Bausteinen – den Aminosäuren – mit unterschiedlicher Ladung. Eine gerichtete Bewegung im elektrischen Feld sowie ein „Abtasten" Aminosäure für Aminosäure ist daher nicht möglich. Für ihre Experimente setzten die Freiburger Wissenschaftler deshalb auf einen anderen Ansatz: Anstelle einer Pore mit einer kurzen Engstelle, wie sie bei der DNA-Sequenzierung eingesetzt wird, verwendeten sie eine maßgeschneiderte Pore mit einer Art Molekülfalle. „Dadurch konnte das gesamte Proteinfragment auf einmal eingefangen werden", sagt Behrends.

Bis zu welcher Fragmentgröße diese Art der Analyse eingesetzt werden kann, ist noch nicht klar. Zusatzexperimente zeigen jedoch, dass die Methode auch für die Analyse der bislang in der epigenetischen Forschung verwendeten H4-Fragmente geeignet sein wird. Diese umfassen 14 statt der hier verwendeten zehn Aminosäuren und werden apparativ sehr aufwendig mit Tandem-Massenspektrometrie auf epigenetische Modifikationen. Mithilfe der Nanoporen, hoffen die Forschenden, wird die Analyse wesentlich einfacher, schneller und kostengünstiger sowie patientennah durchführbar.

Die Nanoporen-Analytik von Proteinen für die medizinische Diagnostik weiter auszubauen und in konkrete Produkte und Dienstleistungen umzusetzen, ist auch eines der zentralen Vorhaben des kürzlich bewilligten BMBF-Zukunftsclusters nanodiagBW, den Behrends gemeinsam mit Prof. Dr. Felix von Stetten von der in diesem Projekt federführenden Hahn-Schickard-Gesellschaft leitet.

Publikation

Ensslen, Tobias; Sarthak, Kumar; Aksimentiev, Aleksei and Behrends, Jan C.: Resolving Isomeric Posttranslational Modifications Using a Biological Nanopore as a Sensor of Molecular Shape (Journal of the American Chemical Society), DOI: 10.1021/jacs.2c06211

Pressemitteilung

31.08.2022
Quelle: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Weitere Informationen

Prof. Dr. med. Jan C. Behrends
Physiologisches Institut
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Tel.: +49 (0)761 203 5146
E-Mail: jan.behrends(at)physiologie.uni-freiburg.de

Sarah Brender
Hochschul- und Wissenschaftskommunikation
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Tel.: +49 (0)761 203 95391
E-Mail: sarah.brender(at)pr.uni-freiburg.de

- Albert-Ludwigs-Universität Freiburg