

Jörg Fitter

# Proteine sind Nanomaschinen der Zelle

Forschung an der Schnittstelle zwischen Biologie und Physik

Biomolecules like proteins act as small molecular machines and play a major role in almost any cellular process. Structural and dynamical details about biological macromolecules can be obtained from various fluorescence-based techniques. In particular measurements at the single molecule level offer the unique possibility to obtain detailed information on coexisting subpopulations of an ensemble of molecules. We employ in particular Förster-resonance energy-transfer (FRET) techniques, for example to characterize biosensors for biotechnological applications and to unravel details about the protein folding process.

Die Untersuchung von biologischen Makromolekülen, zum Beispiel von Proteinen oder Proteinkomplexen, spielt eine zentrale Rolle für das Verständnis der Funktionen in biologischen Zellen. So sind zum Beispiel detaillierte Kenntnisse über Proteineigenschaften essenziell zur Bekämpfung von Krankheiten und für Anwendungen im Bereich der Biotechnologie. Proteine erfüllen unterschiedlichste Aufgaben in der Zelle. Welche Aufgabe ein Protein im Detail hat, hängt maßgeblich von seiner dreidimensionalen Raumstruktur ab. Diese Struktur wird durch eine wohldefinierte Abfolge von 20 verschiedenen Aminosäuren (Proteinsequenz) bestimmt. Sie ist für jedes

Protein einzigartig. Für mittelgroße Proteine ergibt die Aneinanderreihung von etwa 150 bis 400 Aminosäuren eine Raumstruktur, die im gefalteten Zustand einen Durchmesser von wenigen Nanometern ( $10^{-9}$  Meter) aufweist. Damit sind Proteine zu klein, um Strukturinformationen über sie mithilfe der herkömmlichen Lichtmikroskopie zu erhalten. Es werden daher andere Methoden benötigt, die diese Informationen liefern können. Die Entwicklung solcher Methoden ist das klassische Arbeitsgebiet von Physikern. Stehen Fragestellungen aus der Biologie oder der Medizin im Mittelpunkt, handelt es sich um das Arbeitsgebiet der Biophysiker.

Bild 1: Mithilfe eines Konfokalmikroskops lässt sich ein sehr kleines Detektionsvolumen erzeugen.  
Foto: Peter Winandy

### Messungen mit Fluoreszenz-Techniken

Eine der wichtigsten Techniken zur Untersuchung von Proteinen ist die Fluoreszenzmikroskopie beziehungsweise die Fluoreszenzspektroskopie. Hier werden hochspezialisierte Fluoreszenzmikroskope dafür genutzt, die Struktur und die Dynamik von Proteinen sowie die Wechselwirkung zwischen Bindungspartnern zu untersuchen. Eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung dieser Techniken besteht darin, dass die Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein müssen. Dies kann zum einen durch spezifische Bindung von geeigneten Farbstoffen an ausgewählten Stellen im Protein erfolgen, zum anderen gibt es ein spezielles Protein, das von sich aus eine Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich zeigt, das sogenannte „green fluorescence protein“, kurz GFP. Für Anwendungen der Fluoreszenztechnik spielen folgende Methoden eine wichtige Rolle:

- Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), um die Struktur und Konformationsdynamik von Proteinen auf einer Längenskala von vier bis sechs Nanometern zu vermessen
- Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zur Bestimmung von extrem niedrigen Proteinkonzentrationen und von Diffusionseigenschaften der Moleküle

- Zweifarben-Ko-Lokalisierung kann die Bindung von zwei Wechselwirkungspartnern detektieren, wenn beide Partner Farbstoffe mit verschiedenen Farben tragen

Mithilfe der hochauflösenden Fluoreszenztechniken können nicht nur wichtige Proteineigenschaften charakterisiert werden. Die enorme Empfindlichkeit der Technik kann auch kleinste Probenmengen bis hin zum Einzelmolekül vermessen. Da in biologischen Systemen die Gesamtheit aller Proteine (einer Spezies) häufig eine große strukturelle und dynamische Heterogenität aufweist, sind Einzelmolekülmessungen besonders aufschlussreich. Sie ermöglichen es – im Gegensatz zu den normalerweise üblichen Ensemblemessungen – Strukturunterschiede der einzelnen Proteine zu identifizieren und quantitativ zu charakterisieren.

### Der Mehrwert von Einzelmolekülmessungen

Die Detektion einzelner farbstoffmarkierter Proteine kann in einem Weitfeldmikroskop erfolgen. Zur Beobachtung müssen die einzelnen Proteine gut voneinander getrennt auf der Oberfläche eines Deckglases verankert sein. Praktikabler für die Probenherstellung ist die Detektion einzelner Proteine, die in Pufferlösung frei diffundieren. Hierbei wird

mithilfe eines Konfokalmikroskops ein sehr kleines Detektionsvolumen erzeugt. In diesem Volumen befindet sich in einem gegebenen Zeitintervall immer nur ein fluoreszenzmarkiertes Molekül. Während dieses Zeitintervalls von einigen Millisekunden wird die Fluoreszenzemission des Moleküls gemessen. Im Falle des Förster-Resonanzenergietransfers wird die Fluoreszenz von zwei Farbstoffen gemessen, die beide an das Protein gebunden sind, aber jeweils eine unterschiedliche Farbe aufweisen. Das Verhältnis der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten dieser beiden Farben – auch Donor- und Akzeptoremission genannt – kann zur Berechnung des Abstandes zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen genutzt werden. Somit lässt sich durch eine geeignete Wahl der Farbstoffbindungsstellen das Protein mithilfe von FRET strukturell charakterisieren.

Die Vermessung von Hunderten oder Tausenden Einzelmolekülen liefert wertvolle Informationen über die verschiedenen Proteinstrukturen, die gleichzeitig in einer Proteinlösung vorliegen können.

Solche Einzelmolekül-FRET-Messungen können eine wichtige Rolle bei Anwendungen im Bereich der Lebenswissenschaften spielen. Im Falle der Biotechnologie liefern sie zum Beispiel wertvolle Informationen, um das Design von Biosensoren zu optimieren. Diese

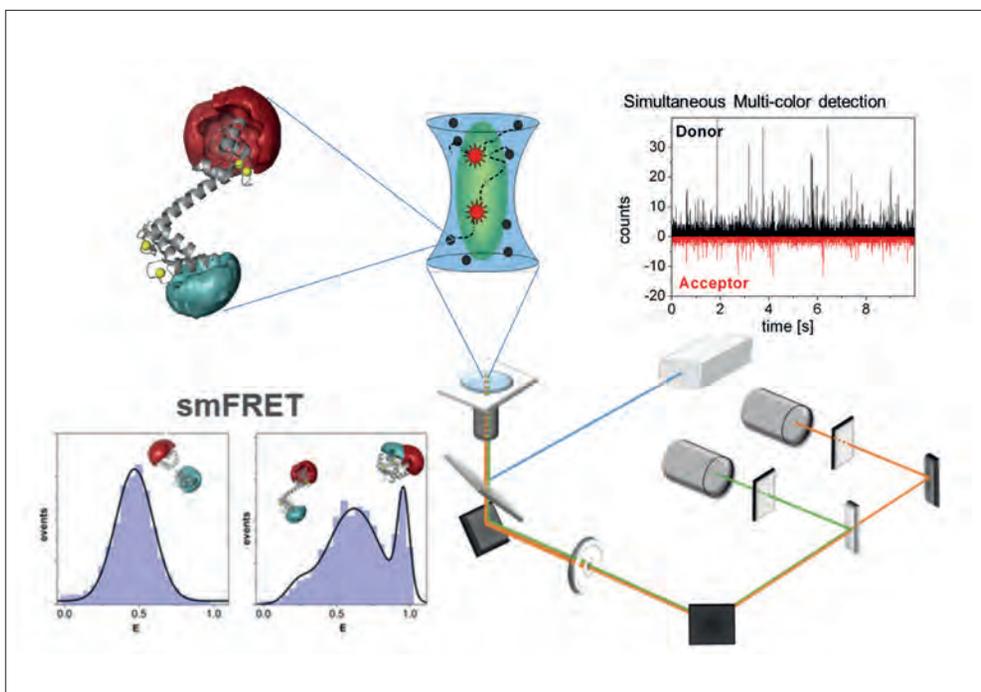


Bild 2: Schema einer Messung am Konfokalmikroskop. Beispielhaft wird hier mittels der Einzelmolekül-FRET-Methode (smFRET) ein zweifach farbstoffmarkiertes Protein (humanes Calmodulin) strukturell charakterisiert.

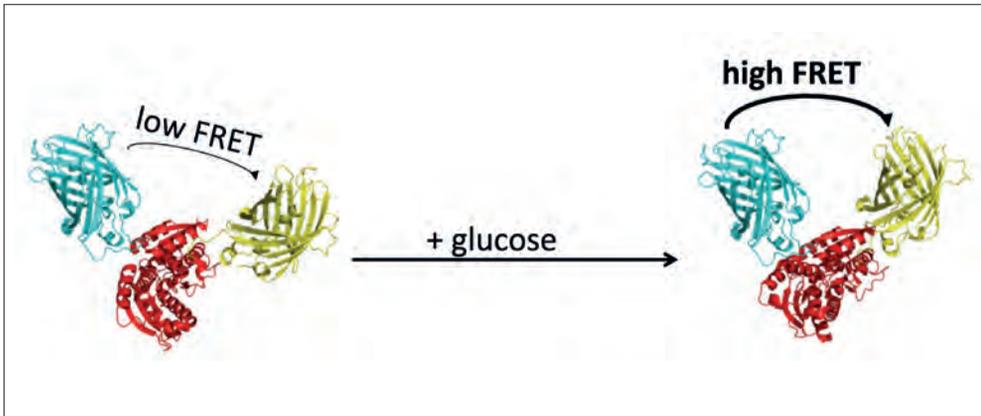


Bild 3: Darstellung eines Sensorproteins (rot), an das zwei FP unterschiedlicher Farbe (hellblau und gelb, FRET-Paar) gebunden sind. Eine Konformationsänderung im Sensorprotein, hier hervorgerufen durch Bindung von Glukose, ändert den Abstand zwischen den FP und damit über FRET die Eigenschaften des Fluoreszenzlichts.

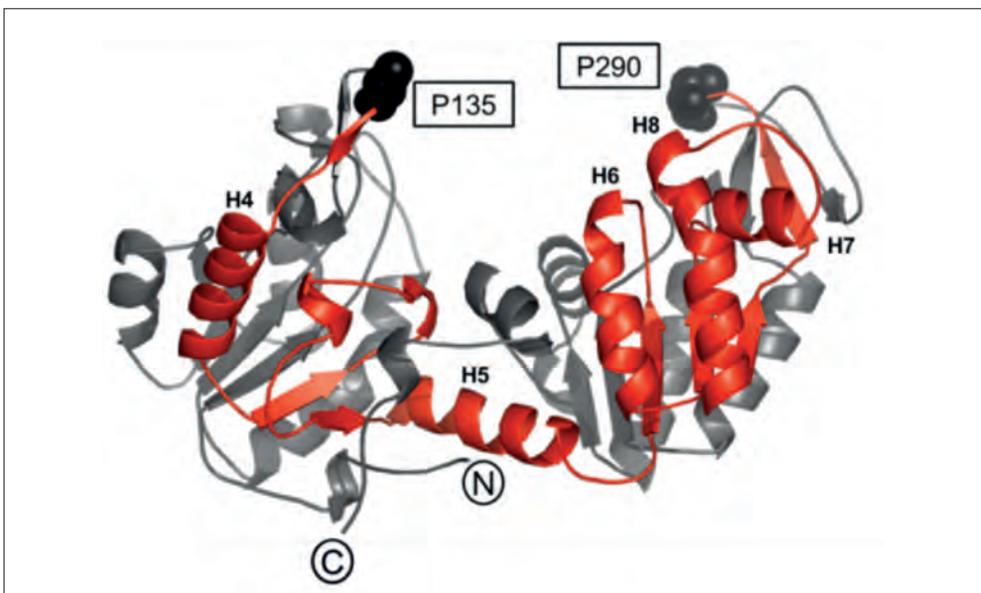


Bild 4: Darstellung der Phosphoglycerat-Kinase mit Farbstoffen an den Positionen P135 und P290 in der Aminosäuresequenz markiert.

Messungen können aber auch helfen, den Proteinfaltungsprozess genauer zu verstehen. Zahlreiche Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington beruhen auf Fehlern bei der Proteinfaltung.

Wie für alle proteinbiochemischen und biophysikalischen Studien muss auch im Falle der oben vorgestellten Verfahren das zu untersuchende Protein in reiner Form hergestellt und für die jeweilige Messtechnik präpariert werden. Im Falle der hier vorgestellten Fluoreszenztechniken stellt besonders die zellfreie Proteinbiosynthese zur Probenherstellung für Einzelmolekül-FRET-Messungen einen sehr effizienten Ansatz dar. Hierbei werden die Vorteile eines offenen, leicht für eine Modifikation des herzustellenden Proteins brauchbaren Proteinsynthese-Assays (Reaktionsmischung zur Proteinsynthese) genutzt, um die Proteine dieser Proben dann mithilfe der

Einzelmoleküldetektion zu sortieren und im Detail zu charakterisieren. Diese Messtechnik ermöglicht das Aussortieren von fehlerhaften Molekülen (fehlerhaft gefaltete oder unvollständig farbstoffmarkierte Proteine) und liefert eine extrem gute Datenqualität. Darüber hinaus werden nur kleinste Probenmengen benötigt. Dieser Ansatz demonstriert beispielhaft, wie gewinnbringend ein vertieftes Zusammenspiel von biologischen Verfahren mit fortgeschrittenen physikalischen Messtechniken sein kann. Im Folgenden werden hierfür einige Anwendungsbeispiele präsentiert.

#### **Biosensoren: Effektive Nanowerkzeuge**

Eine erfolgreiche Anwendung der FRET-Spektroskopie besteht darin, die ligandeninduzierte Konformationsänderung eines sogenannten Sensorproteins dafür zu nutzen, die Konzentration dieses Liganden, also

Bindepartners, zu bestimmen. In der Natur gibt es zahlreiche Proteine, die spezifisch Liganden, zum Beispiel Glukose, Calcium oder spezielle Aminosäuren binden können. Diese Sensorproteine werden genutzt, um die chemische Zusammensetzung der Zellumgebung für einen Organismus zu „vermessen“. Viele solcher Sensorproteine arbeiten nach dem Prinzip einer Venus-Fliegenfalle: Die Bindung des Liganden ruft im Sensorprotein eine interne Scharnierbewegung hervor. Solche Konformationsänderungen stellen ein Signal für die Zelle dar, die dann Auskunft über die chemische Zellumgebung gibt. Werden an solche Sensorproteine zwei fluoreszierende Proteine (FP) gebunden, lässt sich das Signal über Fluoreszenzlicht (unter Verwendung der FRET-Methode) auslesen. Von diesem Mechanismus wird in zahlreichen biotechnologischen und zellbiologischen Anwendungen Gebrauch gemacht.

Hierbei ist das Design solcher Sensoren von großer praktischer Relevanz, da viele unterschiedliche Sensoren für unterschiedliche Analyte, auch für verschiedene Konzentrationsbereiche, gebraucht werden. Die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit erfordert eine enge Zusammenarbeit zwischen Biologen und Physikern (Spektroskopikern). Dabei stellen die Biologen zunächst das Konstrukt der beteiligten Proteine her. Anschließend überprüfen Physiker die gewünschten Funktionseigenschaften mit spektroskopischen Verfahren. Kürzlich hat die Arbeitsgruppe des Lehr- und Forschungsgebiets Biophysik in Zusammenarbeit mit Biotechnologen des Forschungszentrums Jülich die Palette der Methoden zur Sensoroptimierung durch Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie erweitert. Am Beispiel eines Glukosesensors konnte gezeigt werden, dass die Technik eine deutlich genauere Analyse und Beurteilung der hergestellten Sensoren ermöglicht. Damit helfen die Einzelmolekültechniken bei einer zielgerichteten Sensoroptimierung.

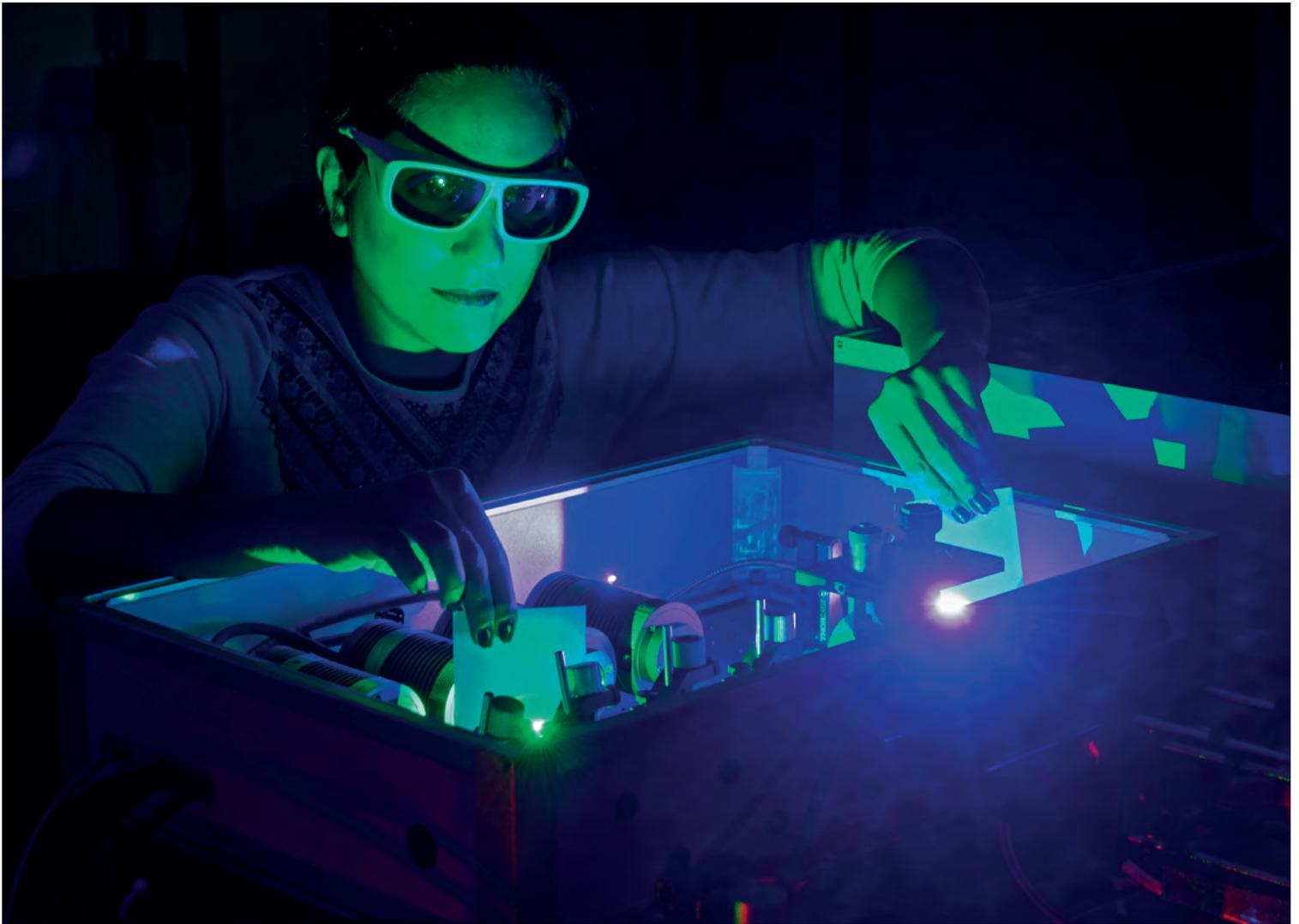


Bild 5: Eine Mitarbeiterin der AG Biophysik arbeitet am Konfokalmikroskop.  
Foto: Peter Winandy

### **Analyse von Zwischenzuständen bei der Proteinfaltung**

Das Entstehen einer wohldefinierten dreidimensionalen Raumstruktur einer Aminosäurekette wird Proteinfaltung genannt. Bei diesem elementaren zellulären Prozess können Fehler auftreten, die zum einen verhindern, dass funktionsfähige Proteine entstehen. Darüber hinaus können falsch- oder fehlgefaltete Proteine zelltoxische Aggregate bilden, von denen bekannt ist, dass sie die Ursache zahlreicher Krankheiten darstellen. Häufig sind gerade die Zwischenzustände (Faltungsintermediate) während des Faltungsvorgangs besonders anfällig für Fehlfaltungen. Um Details dieser Faltungsintermediate genauer zu verstehen, wird die Einzelmolekül-FRET-Methode angewendet. Eine Probe für Ensemblemessungen besteht typischerweise aus sehr vielen Molekülen ( $\sim 10^{17}$ ). Die Proteinfaltung

der einzelnen Proteine dieser Probe läuft aber zeitlich nicht synchron ab, was zu gemittelten und damit weniger präzisen Messwerten führen kann. Die Analyse von einzelnen Molekülen kann dagegen deutlich genauere Informationen liefern.

Im Falle eines größeren Proteins (415 Aminosäuren), das typischerweise zahlreiche Faltungsintermediate aufweist, wurden Einzelmolekül-FRET-Studien durchgeführt. Das hier untersuchte Protein, die Phosphoglycerat-Kinase (PGK), wurde dafür an zwei ausgewählten Positionen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Vermessung der Abstände zwischen den Markierungspositionen mithilfe der FRET-Methode kann während des Faltungsprozesses erfolgen. Dadurch konnten wertvolle Informationen über die wichtigen Faltungsintermediate gewonnen werden. Weitere Informationen über diese Intermediate er-

geben sich, wenn nicht nur ein Abstandspaar vermessen wird, sondern viele verschiedene Abstandspaare mit Markierungen an anderen Positionen.

---

### **Autor**

Univ.-Prof. Jörg Fitter betreut das Lehr- und Forschungsgebiet Biophysik am I. Physikalischen Institut (IA).

---