

Biomolekulare Interaktionsanalyse

Ein Werkzeug der funktionellen Proteomforschung?

Die genetische Information eines Organismus wird durch Proteine und Proteinkomplexe vermittelt und in eine zelluläre Funktion übersetzt. Im Vergleich zum eher statischen Genom stellt sich das Proteom als dynamische Gesamtheit aller exprimierten Proteine dar, abhängig von Zelltyp, Entwicklungsstatus und äußeren Signalen einer Zelle. Durch hochkomplexe Proteinnetzwerke werden zentrale zelluläre Prozesse gesteuert. Die Kontrolle biologischer Aktivitäten wird nicht nur durch die Expression, Struktur und Faltung von Proteinen, sondern auch durch ihre subzelluläre Lokalisation definiert.



Prof. Dr. Friedrich W. Herberg, Arbeitsgruppenleiter, Universität Kassel; Dipl.-Biol. Sonja Schweinsber, Doktorandin; Dr. Stephan Drewianka, Laborleiter, Biaffin GmbH & Co. KG, Dipl.-Biochem. Daniela Moll, Doktorandin

Proteinnetzwerke basieren zu einem großen Teil auf direkten Proteininteraktionen [1]. Die Dynamik dieser Netzwerke, die durch post-translationale Modifikationen (PTM) verschiedenster Art, aber auch durch zelluläre Cofaktoren wie Nukleotide und Metallionen beeinflusst werden, generiert eine immense Variabilität auf Proteomebene (Abb. 1). Fehlerhafte Signaltransduktionsnetz-

werke spielen eine entscheidende Rolle bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern. Durch die Untersuchung der molekularen Mechanismen von Proteinwechselwirkungen kann ein grundlegendes Verständnis für die Entstehung und die Therapie solcher Erkrankungen gewonnen werden. Die qualitative und quantitative Untersuchung der Bindungseigenschaften von Komponenten eines

Proteinnetzwerks ist ein zentrales Untersuchungsgebiet der funktionellen Proteomanalyse. Qualitative Aussagen (wer interagiert mit wem) lassen sich z.B. aus „Yeast Two Hybrid“ Experimenten [2] oder „Tap Tagging“ [3] kombiniert mit hochauflösender Massenspektrometrie (MS) treffen. Erst durch quantitative Analysen kann das Bindungsverhalten von Interaktionspartnern erfasst und in die Architektur eines intrazellulären Netzwerks eingeordnet werden. Dazu wird eine Vielzahl von Techniken benutzt, die unter dem Oberbegriff Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) zusammengefasst werden können.

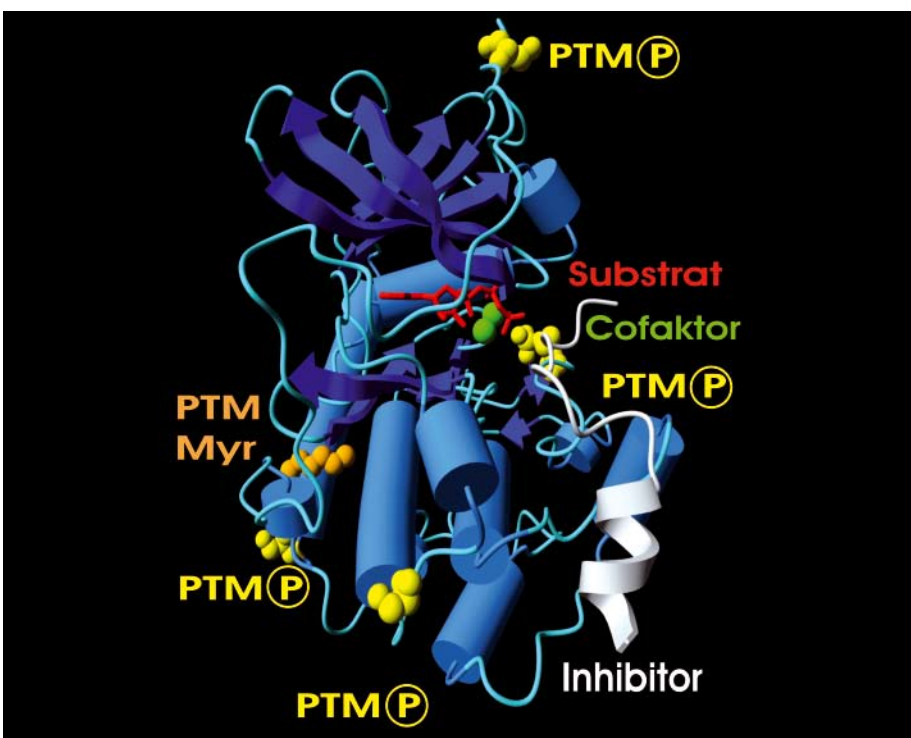


Abb. 1: Kristallstruktur einer Proteinkinase (1CDK, blau) im Komplex mit Inhibitor (grau), Substrat (rot) sowie Cofaktor (grün). Wichtige posttranslationale Modifikationen (PTM) wie Phosphorylierung (P, gelb) und Myristylierung (Myr, orange) sind hervorgehoben.

Werkzeuge in der Biomolekulare Interaktionsanalyse

Um hochakurate und detaillierte Bindungsdaten zu generieren, werden in der BIA Experimente im homogenen Format (z.B. proximity assays) wie auch im Festphasenformat (z.B. Protein-Microarrays) durchgeführt [4].

SPR erlaubt Echtzeitanalysen von Proteinwechselwirkungen

Der Einsatz von Biosensoren basierend auf Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR: engl. surface plasmon resonance) gilt als der „Goldstandard“ für die Echtzeituntersuchungen biologischer Wechselwirkungen. Das SPR-basierte Biacore System (Biacore AB) besteht aus einem Sensor-Chip, an dem der eine Interaktionspartner immobilisiert wird, einer

SPR-Detektionseinheit zur Bestimmung von Massenänderungen an der Sensoroberfläche und einem integriertem Mikroflusssystem, das den Transport des anderen Interaktionspartners über die Sensoroberfläche kontrolliert. Ein entscheidender Vorteil der hochauflösenden, kinetischen Analyse mit dieser Art von Biosensoren gegenüber der klassischen Gleichgewichtsanalyse ist die Möglichkeit der separaten Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass} und k_{diss}) [5]. Interaktionspartner können sogar in geringen Volumina wiedergewonnen werden und mittels MS identifiziert werden (BIA-MS). Biacoreanalysen sind leicht automatisierbar und es können Parameter wie Effekte von Cofaktoren (Abb. 2) oder pH-Änderungen, sowie der Einfluss von PTM auf die Bindungskinetiken direkt bestimmt werden [6]. Bindungskinetiken können allerdings auch durch die Immobilisierung des einen Interaktionspartners (kovalent oder nicht-kovalent z.B. über spezifische Fusionsanteile) beeinflusst werden.

AlphaScreen ist ein homogener, bead-basierter Assay

Im AlphaScreen (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay, Perkin Elmer) werden die (meist mit Fusionsanteilen versehenen) Bindungspartner an zwei unterschiedliche Arten von „Beads“ (Latexkügelchen, \varnothing 250 nm) gekoppelt. Durch die direkte physikalische Interaktion der Bindungspartner werden sog. Donor- und Akzeptorbeads in räumliche Nähe gebracht, so dass nach Anregung des Donorbeads Singuletsauerstoff freigesetzt wird und zum Akzeptorbead diffundiert. In letzterem wird dann ein quantifizierbares Lumineszenzsignal erzeugt. Der AlphaScreen ist hochdurchsatzfähig, jedoch müssen beide Interaktionspartner an Beads gekoppelt werden, was die Beweglichkeit der immobilisierten Moleküle, wie bei Chip-basierten Technologien, einschränken kann.

FP ist schnell und voll automatisierbar

Fluoreszenzpolarisation (FP) benötigt die Fluoreszenzmarkierung nur eines kleinen Interaktionspartners, der durch polarisiertes Licht angeregt wird. Bei freier Beweglichkeit des markierten Interaktionspartners in Lösung ist das emittierte Licht nicht polarisiert. Wird der Ligand durch die Bindung an einen größeren Bindungspartner in der Anregungsebene gehalten, ist das emittierte Licht polarisiert, was als Messsignal genutzt wird.

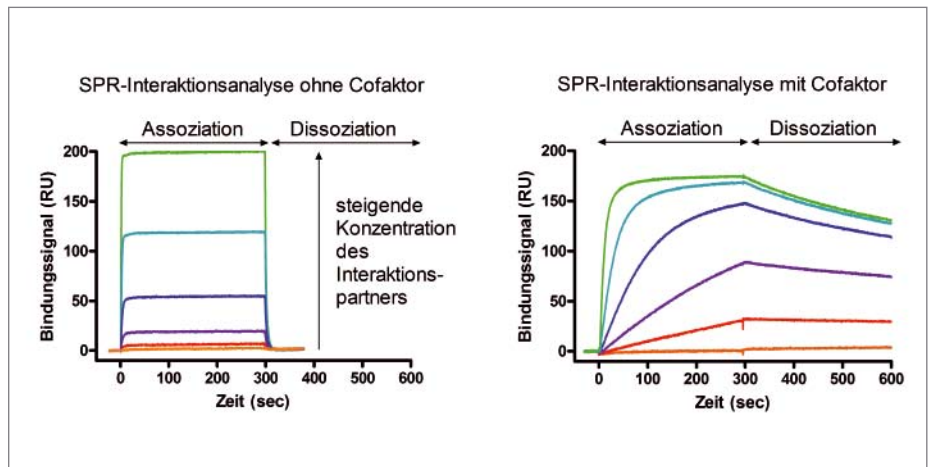


Abb. 2: Einfluss eines Cofaktors auf das Bindungsverhalten gemessen mit SPR. Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit werden erheblich durch den Cofaktor beeinflusst.

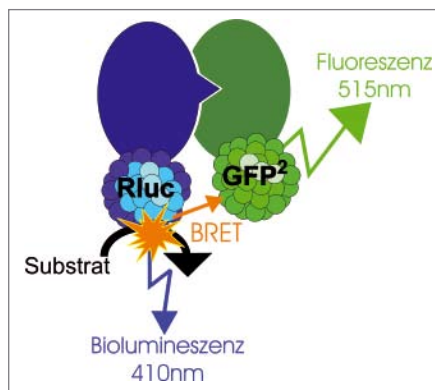


Abb. 3: Prinzip der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mittels BRET Die Interaktion zweier Proteine (blau u. grün) positioniert die beiden Reporterproteine (Rluc blau, GFP² grün). Nach Substratzugabe emittiert die Rluc Licht der Wellenlänge 410 nm und regt durch strahlungslosen Energieübergang (orange) GFP² zur Fluoreszenz bei 515 nm an.

FP ist ein universell einsetzbares System im homogenen Format, das mit wenig Aufwand voll automatisierbar ist. Im Verdrängungsformat lassen sich auch Gleichgewichtsbindungskonstanten (K_A bzw. K_D) für andere Interaktionspartner als die fluoreszenzmarkierten Partner erfassen. So lassen sich beliebige Substanzen ihrer Affinität entsprechend charakterisieren [4]. Da im Vergleich zu anderen Methoden der Zeitaufwand und die Materialkosten sehr gering sind, werden FP Messungen häufig von der pharmazeutischen Industrie in der Hochdurchsatzanalyse eingesetzt.

ITC liefert eine Vielzahl von Messparametern

Als einzig wirklich markierungsfreie Methode beruht die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) auf der Tatsache, dass bei jeder Art von Reaktion Energie in Form von Wärme entweder freigesetzt (exotherme Reaktion) oder absorbiert (endotherme Reaktion) wird. Zur Messung wird in einer Messzelle der eine In-

teraktionspartner vorgelegt, der andere Interaktionspartner durch eine rotierende, computergesteuerte Präzisionspritze hinzu titriert und die Wärme, die in der Messzelle freigesetzt oder absorbiert wird, gemessen. So können in einem einzigen Experiment fünf charakteristische thermodynamische bzw. bindungsspezifische Größen einer Reaktion bestimmt werden: Stöchiometrie der Reaktion (n), Gleichgewichtsassoziationskonstante (K_A), Freie Energie (ΔG), Enthalpie (ΔH) und die Entropie (ΔS) der Bindung [7]. Die Kenntnis dieser Größen kann Aufschluss über Bindungsmechanismus geben. ITC benötigt allerdings relativ hohe Konzentrationen an Interaktionspartnern.

BRET misst Proteininteraktionen in lebenden Zellen

Alle bisher aufgeführten Methoden basieren auf der Verwendung von gereinigten Komponenten in einem *in vitro* Analysesystem. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von *in cell* Reportersystemen. Beispielhaft ist hier Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer, BRET, dargestellt (Abb. 3). Für BRET-Analysen werden die Interaktionspartner direkt als Fusion mit einem Reporterprotein in eukaryotischen Zellen exprimiert. Das Donorkonstrukt, das eine Fusion mit *Renilla Luciferase* darstellt, emittiert beim Umsatz des Substrats Deep Blue C Energie. Ein Akzeptorprotein, das für GFP² (eine Variante des Green fluorescent proteins) kodiert, wird nur dann strahlungslos zur Fluoreszenz angeregt, wenn die an die Reporterproteine fusionierten Interaktionspartner aneinander binden [8, 9]. Aus dem Verhältnis zwischen Biolumineszenz und Fluoreszenz kann nun in lebenden

Zellen die Interaktion zweier Proteine quantifiziert werden.

Fazit

Jede der beschriebenen Methoden vermittelt dem Forscher Erkenntnisse in der Analyse von Proteininteraktionen. Dabei muss der gewählte Versuchsansatz auf die individuelle Fragestellung innerhalb der funktionellen Proteomanalyse abgestimmt werden. Erst die Verknüpfung mehrerer auf unterschiedlichen Parametern beruhenden Methoden vermittelt einen umfassenderen Einblick in das komplexe Netzwerk der Interaktionen von Biomolekülen mit den dazugehörigen Bindungspartnern und Cofaktoren. Jedoch lässt sich durch die Vereinfachung zu einer *in vitro* Situation das Netzwerk nur sehr begrenzt nachstellen, zumal bei der Verwendung gentechnisch veränderter Proteine PTM fehlerhaft sein können.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Frank Gessellen für die Hilfe bei der Visualisierung der Kristallstruktur. Teile dieser Arbeit werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (He1818/4) und das BMBF (01GR0441 Human Brain Proteom) gefördert. Sonja Schweinsberg ist Stipendiatin des Graduiertenkollegs der UNIK.

Referenzen

- [1] Jordan J. D. *et al.*: Cell 103, 193–200 (2000)
- [2] Gavin A. C. *et al.*: Nature 415, 141–147. (2002)
- [3] Puig O. *et al.*: Methods 24, 218–229 (2001)
- [4] Moll D. *et al.*: Journal of Neuronal Transmission, in press (2006)
- [5] Hahnefeld C. *et al.*: Methods Mol Med 94, 299–320 (2004)
- [6] Yaqub S. *et al.*: Biochem J 372, 271–278 (2003)

- [7] Moll D. *et al.*: in: Proteomics in drug research, Wiley-VCH Verlag (2006)
- [8] Xu Y. *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A 96, 151–156 (1999)
- [9] Prinz A. *et al.*: Cellular signalling, in press (2006)

Kontakt:

Dipl.-Biochem. Daniela Moll

Dipl.-Biol. Sonja Schweinsberg

Prof. Dr. Friedrich W. Herberg

Universität Kassel

FB18, Abteilung Biochemie

Tel.: 0561/804-4511

Fax: 0561/804-4466

herberg@uni-kassel.de

www.biologie.uni-kassel.de/biochemistry/biochemistry.htm

Dr. Stephan Drewianka

Biaffin GmbH & Co KG