

Makromolekulare Umgebungen beeinflussen Proteine

Studium von Proteinen in Anwesenheit hoher Makromolekülkonzentrationen („molecular crowding“) mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Daryan Kempe¹ und Prof. Dr. Jörg Fitter^{1,2}

¹ I. Physikalisches Institut (IA), AG, Biophysik, RWTH Aachen, Deutschland

² Institute of Complex Systems (ICS-5), Forschungszentrum Jülich, Deutschland



Eine intensive Wechselwirkung von Proteinen mit anderen Makromolekülen kann wichtige Eigenschaften von Proteinen wie z. B. die Translationsbeweglichkeit oder den Konformationszustand signifikant verändern. Daher ist das Studium von Proteinen in makro-molekularen Umgebungen, die typischerweise physiologischen Bedingungen oder zellähnlichen Umgebungen sehr nahekommen, von großem Interesse. Prinzipiell ermöglicht die konfokale Fluoreszenzmikroskopie eine selektive Analyse ausgewählter Proteine in solchen Umgebungen. Allerdings müssen dabei einige methodische Schwierigkeiten und messtechnische Artefakte berücksichtigt beziehungsweise umgangen werden, um die Proteine verlässlich und quantitativ zu charakterisieren.

Der überwiegende Teil unseres Wissens zum Bereich der Proteinbiochemie stammt aus Experimenten mit Proteinen, die hoch verdünnt in Pufferlösungen mit Konzentrationen von einigen Gramm pro Liter vorliegen. Allerdings sind diese Bedingungen sehr verschieden von denen, wie sie in der lebenden Zelle vorliegen. Das zelluläre Zytoplasma ist mit vielen verschiedenen Makromolekülen angereichert. Diese können bis zu 20 % des Zellvolumens ausmachen, sodass eine Konzentration von einigen Hundert Gramm pro Liter vorliegt („molecular crowding“). Der resultierende Excluded-volume-Effect kann zu erhöhten effektiven Konzentrationen der zellulären Proteine führen und wesentliche physikalische Eigenschaften der Lösung verändern. So wird im Zytosol in diesen begrenzten Volumina z. B. die molekulare Beweglichkeit und Dynamik der Proteine verringert. Mögliche Konsequenzen des „molecular crowding“ sind verringerte Diffusions-

raten, Verschiebungen in Protein-Protein- bzw. Protein-Substrat-Assoziationsgleichgewichten, und Änderungen der Konformationsdynamik einzelner Proteine [1]. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie kann für Proteine in solchen Umgebungsbedingungen sehr detailliert Informationen liefern. Neben Messungen direkt in lebenden Zellen, die technisch aufwendig sind und typischerweise nicht die Datenqualität liefern wie In-vitro-Messungen, können zellähnliche Umgebungsbedingungen auch durch nichtbiologische Makromoleküle (z. B. PEG, Ficoll) nachgeahmt werden. In all diesen Fällen mit einer höheren Konzentration von makromolekularen Crowdern muss durch erhöhte Brechungsindizes der Lösung und durch molekulare Stöße der Crowder-Moleküle mit potenziellen Artefakten bei einer quantitativen Datenanalyse gerechnet werden.

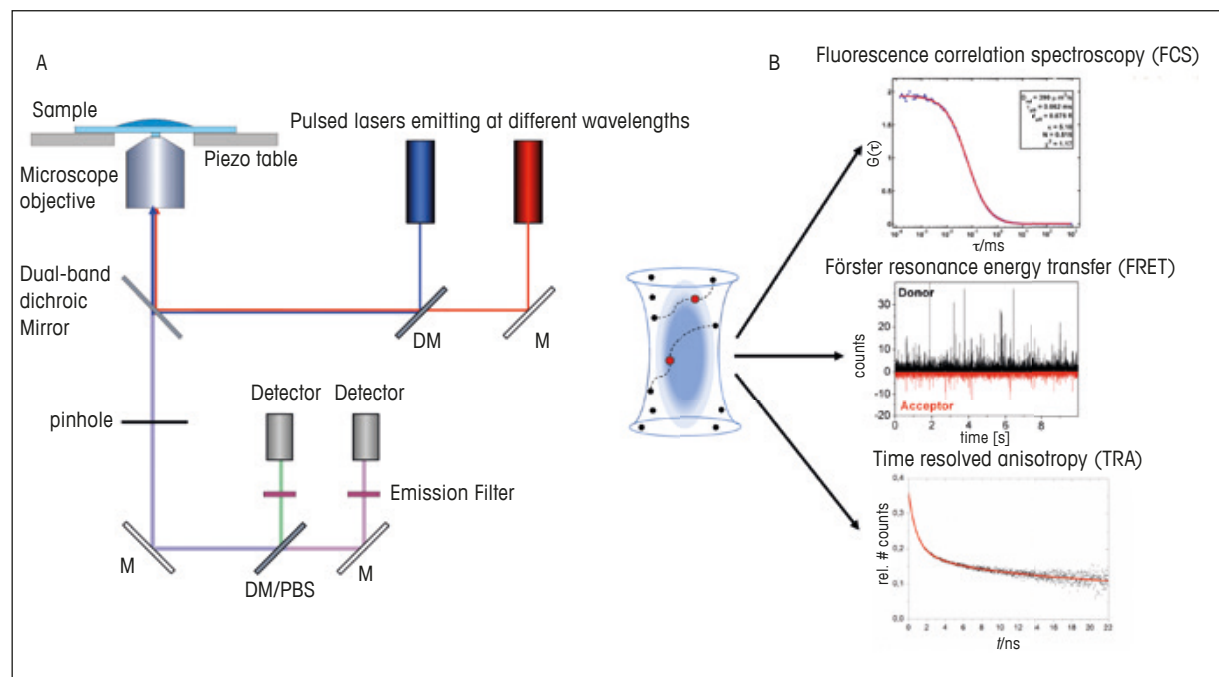


Abb. 1 Schematischer Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops mit simultaner Zweikanal-detektion (A). Das Fluoreszenz-emissionslicht kann über einen dichroitischen Spiegel in zwei verschiedene Farben für FRET-Anwendungen oder über einen

Polarisations-Strahlteiler in zwei Polarisationsrichtungen für TRA-Anwendungen aufgetrennt werden. Darüber hinaus können Auto- und Kreuzkorrelationen (FCS) mit den Signalen der Detektionskanäle durchgeführt werden (B).

Proteincharakterisierung mithilfe der Fluoreszenz-Multiparameteranalyse

Bei der konfokalen Fluoreszenzdetektion wird das Anregungslicht auf ein kleines, beugungsbegrenztes Volumen in der Proteinlösung fokussiert. Ein optimaler Informationsgehalt bezüglich der Messung mit frei diffundierenden Proteinen ist mit einer sogenannten Fluoreszenz-Multiparameteranalyse zu erhalten. Dabei werden eine gepulste Laserlichtanregung und eine simultane Zweikanalfluoreszenzdetektion genutzt (siehe Abb. 1 und [2]). Die folgenden drei Methoden finden am häufigsten Anwendung, um Proteineigenschaften zu charakterisieren. (i) Die Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS) liefert detaillierte Informationen über die Proteinkonzentration in der Messlösung und über die Translationsdiffusion der Proteine. (ii) Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) kann genutzt werden, um bimolekulare Bindungen zwischen Interaktionspartnern zu studieren. Darüber hinaus können bei geeigneter Farbstoffmarkierung Proteinkonformationen und Konformationsänderungen verfolgt werden. (iii) Die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie (TRA) ermöglicht es, innerhalb eines gewissen Zeitfensters die Rotationsbewegung der Proteine zu bestimmen. Alle diese Parameter sowie deren Variation durch makromolekulare Umgebungen spielen eine wichtige Rolle für intermolekulare Wechselwirkungen, wie sie z.B. in der Enzymatik oder in der biologischen Signalverarbeitung auftreten.

Konfokale Fluoreszenzmessungen in hoch konzentrierten Lösungen

Bei Anwendungen der hochauflösenden konfokalen Fluoreszenzmikroskopie auf eine Probe mit hoher Konzentration von Makromolekülen (Crowder) spielen zwei Faktoren eine essenzielle Rolle. Ein erhöhter Brechungsindex in der Messlösung (mit Bezug auf Wasser bei Wasserimmersionsobjektiven) hat ein verändertes konfokales Detektionsvolumen (in Größe und Form) zur Folge. Dies kann zahlreiche Artefakte, hauptsächlich in der FCS-Analyse, hervorrufen [3]. Des Weiteren bewirkt die hohe Konzentration von Makromolekülen in der Umgebung der Proteine eine große Rate von molekularen Stößen. Eine Folge ist die reduzierte Translations- und Rotationsbeweglichkeit der Proteine in dieser Lösung. Zusätzlich kann aber je nach Eigenschaft der umgebenen Makromoleküle durch molekulare Stöße auch die Fluoreszenzeigenschaft verändert werden (siehe Abb. 2). Solche sogenannten Fluoreszenzlöschprozesse haben einen gravierenden Einfluss auf die Fluoreszenzquantenausbeute des am Protein gebundenen Farbstoffs. Aus diesem Grund muss bei quantitativen FRET-Analysen die Quantenausbeute jedes gebundenen Farbstoffs bei den unterschiedlichen Umgebungsbedingungen bestimmt werden [4]. Wir haben kürzlich eine Methode etabliert, mit der Messungen zur Bestimmung der Quantenausbeute schnell und einfach mit dem Konfokalmikroskop durchgeführt werden können [5]. Insgesamt besteht also die Herausforderung bei solchen Messungen häufig darin,

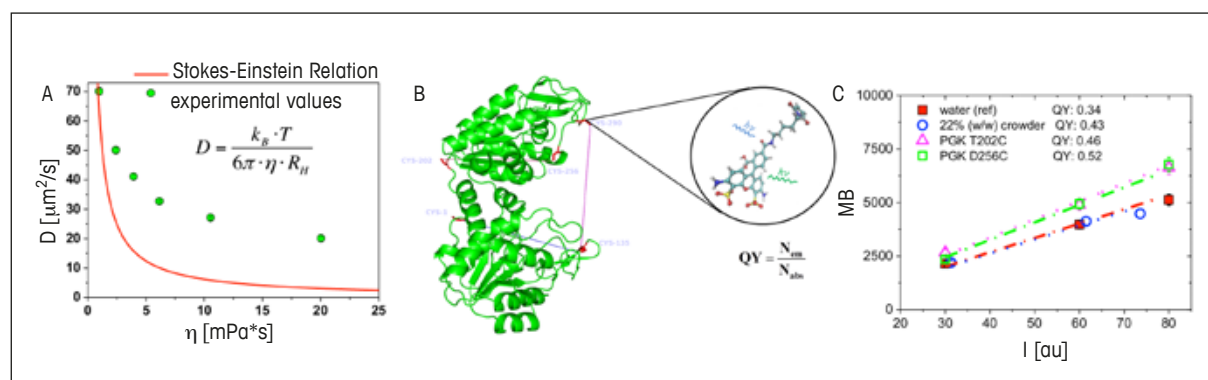


Abb. 2 Für ein Protein (Streptavidin) ist die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Viskosität einer makromolekularen Lösung (Crowder: Ficoll70) für verschiedene Crowder-Konzentrationen gezeigt. Hierbei ist ersichtlich, dass die gemessenen Daten nicht mit der Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben werden können (A). Für Fluoreszenzfarbstoffe, die an spezielle Positionen im Protein

gebunden sind (B), kann die Quantenausbeute je nach Position (z. B. Aminosäure 202 bzw. 256) oder aber mit unterschiedlicher Proteinumgebung variieren. Messdaten zur Bestimmung der Quantenausbeuten (siehe [5]) und die resultierenden Werte sind in der Abb. C gegeben.

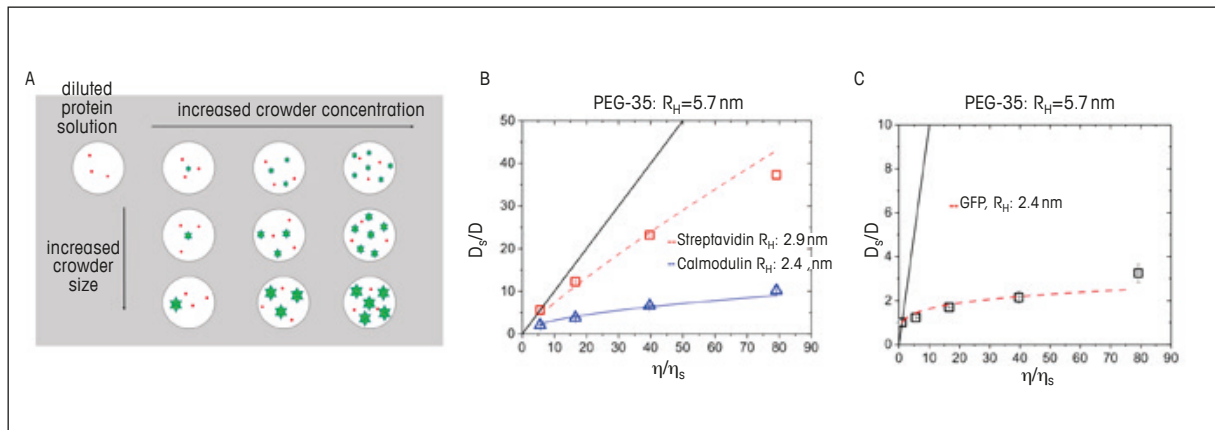


Abb. 3 Die Diffusionseigenschaften werden nicht nur durch die Konzentration der Crowder- Moleküle beeinflusst, sondern auch durch das Größenverhältnis zwischen Crowder- Molekülen und diffundierenden Proteinen (A,B). Dies ist in einer Auftragung der Verhältnisse zwischen Diffusion im Crowder (D) und Diffusion in

reiner Pufferlösung (D_s) gegen die entsprechenden Verhältnisse der Viskosität für die Translationsdiffusion zu erkennen (B). Auch für die Rotationsdiffusion ist eine Größenabhängigkeit zu erkennen (C).

in den erzielten Messdaten die Messartefakte zu identifizieren, sie zu separieren, um somit verlässliche Parameter der Proteineigenschaften zu ermitteln. Dies ist zumeist bei In-vitro-Messungen – z.B. bei für Lösungen mit künstlichen Crowdern oder für Lysate durch geeignete Kalibriermessungen – möglich.

Eine große Rate makromolekularer Stöße verändert das Verhalten der Proteine

Ein seit langer Zeit gut bekanntes Phänomen einer hochkonzentrierten makromolekularen Lösung stellt die erhöhte Viskosität im Vergleich zu reinen Pufferlösungen dar. Diese erhöhte Viskosität führt zu einem reduzierten Translationsdiffusionskoeffizienten. In einer qualitativ ähnlichen Form nimmt auch die Rotationsbeweglichkeit der gelösten Proteine in makro-molekularen Lösungen ab. Beide Effekte können gut mit der FCS bzw. der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie untersucht werden (siehe Abb. 2, 3). Eine quantitative Beschreibung der Translationsbewegung in Abhängigkeit von der Viskosität (η) wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung (siehe Abb. 2) und durch die Stokes-Einstein-Debye-Gleichung für Rotationsbewegungen gegeben ($\sim 1/\eta$). Typischerweise wird die Viskosität der makro-molekularen Lösungen mit einem Kugelfallviskosimeter gemessen und in den oben genannten Gleichungen zur Beschreibung des Diffusionsverhaltens eingesetzt. Interessanterweise zeigen hierbei die über Fluoreszenzmessungen ermittelten Diffusionswerte eine starke Abweichung von dem durch die Gleichungen vorgegebenen Verhalten (Abb. 2, 3). Der Grund hierfür ist durch die Tatsache gegeben,

dass die effektive Viskosität für ein diffundierendes Protein von der Größe des makromolekularen Crowders abhängt. Bei genauerer Betrachtung stellt man sogar fest, dass im Wesentlichen das Größenverhältnis des diffundierenden Proteins und des umgebenen Crowders den relevanten Parameter darstellt. Ein ähnliches Verhalten ist auch bezüglich der Rotationsdiffusion zu beobachten. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch die Rigidität des Crowders (d.h. flexibles oder rigides kompaktes Makromolekül) sowie die Form der diffundierenden Proteine einen Einfluss auf die Proteindiffusion haben. Alle diese Diffusionseigenschaften können potenziell einen direkten Einfluss auf Assoziationsraten und somit auf intermolekulare Bindungen zwischen Wechselwirkungspartnern in zellulären Prozessen haben.

In weiteren Beispielen haben wir mithilfe von Fluoreszenzanisotropiemessungen die Rotationsbeweglichkeit von Proteinen charakterisiert, die in zellfreier Synthese hergestellt wurden. Im Zentrum dieser Untersuchung stand ein Vergleich der Proteine bzw. der Polypeptidketten, die direkt nach der Synthese noch am Ribosom gebunden waren, mit jenen, deren Peptidkette schon getrennt vom Ribosom war [6]. Auch hier spielen häufige molekulare Stöße, in diesem Fall zwischen der Polypeptidkette und dem Ribosom, eine zentrale Rolle. Diese Stöße reduzieren signifikant die Rotationsbeweglichkeit des Proteins und haben zudem einen Einfluss auf die co-translationale Proteinfaltung, die schon mit der unvollständig synthetisierten am Ribosom gebundenen naszierenden Polypeptidkette beginnt.

- kempe@physik.rwth-aachen.de
- fitter@physik.rwth-aachen.de

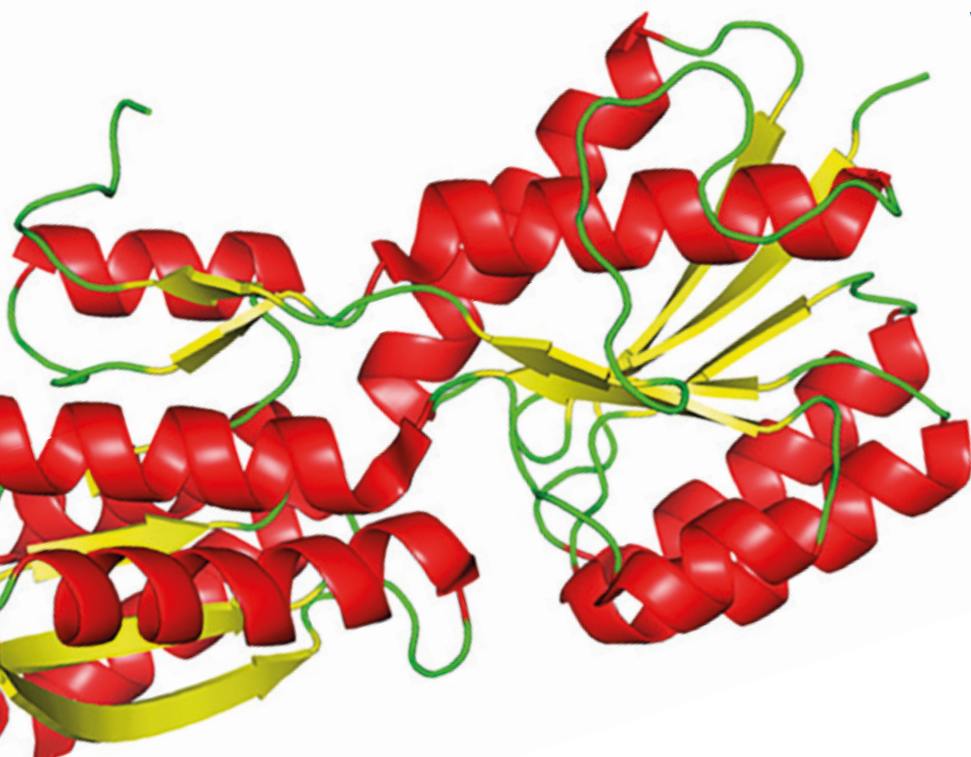




Daryan Kempe, Jg. 1982, studierte Physik an der Universität zu Köln. Seine Diplomarbeit zum Thema zeitaufgelöster Fluoreszenztechniken fertigte er in der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik am Institut für komplexe Systeme des Forschungszentrums Jülich an. Seit 2012 promoviert er am 1. Physikalischen Institut der RWTH Aachen im Bereich Biophysik. Schwerpunkt seiner Arbeit ist die Entwicklung fluoreszenzbasierter Methoden zur Charakterisierung von biologischen Makromolekülen in komplexen Umgebungen.



Jörg Fitter, Jg. 1963, studierte Physik an der Universität Hamburg. Nach seiner Promotion an der FU Berlin war er im Bereich der Neutronenstreuung und der molekularen Biophysik am Hahn-Meitner-Institut in Berlin und am Forschungszentrum Jülich tätig. Er habilitierte sich in der Physikalischen Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und war Arbeitsgruppenleiter am ICS-5 (Institute of Complex Systems, Molekulare Biophysik, im Forschungszentrum Jülich). Seit 2012 ist er Professor für Biophysik an der RWTH Aachen und leitet kommissarisch das ICS-5. Jörg Fitter engagiert sich seit 2011 als Fakultätsmitglied in der „International Helmholtz Research School of Biophysics and Soft Matter (IHRS Biosoff)“. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der methodischen Entwicklung sowie der Anwendung von fluoreszenzbasierten Einzelmolekültechniken.



Literatur

- [1] H.-X. Zhou (2013) FEBS Lett. 587, 1053–1061
- [2] J. Fitter et al. (2011) Soft Matter, 7, 1254–1259
- [3] J. Enderlein et al. (2004) Current Pharmaceutical Biotechnology, 5, 155–161
- [4] M. Gabba et al., (2014) Biophys. J., 107, 1913–1923
- [5] D. Kempe et al. (2015) J. Phys. Chem. B, 119, 4668–4672
- [6] P. Lamprou et. al. (2014) ChemBioChem, 15, 977–985



Den Beitrag finden Sie
auch online im q&more-Portal
■ www.bit.ly/qmore1601-02