

# Licht am Ende des Tunnels

Mike Heilemann\*

Cotranslationale Proteinfaltung · Einzelmolekül-  
biophysik · Einzelmolekülfluoreszenz ·  
Grün fluoreszierendes Protein

Die Motivation für die Erforschung der Proteinfaltung liegt in der faszinierenden Frage, wie aus einer linearen Sequenz an Aminosäuren ein Protein mit einer definierten dreidimensionalen Struktur und einer spezifischen Funktion entsteht.<sup>[1,2]</sup> Den Großteil unseres Wissens über Proteinfaltung lieferten dabei bisher Experimente, in denen wir das wiederholte Falten nach der Denaturierung eines Proteins betrachteten. Jedoch ist die Zahl der möglichen Konfigurationen eines denaturierten Proteins für eine erneute Faltung größer als jene einer Peptidkette, die sich nach der Biosynthese durch das Ribosom faltet. Dies ist begründet durch die cotranslationale Faltung der Polypeptidkette, die bereits nach der Synthese einer kurzen Aminosäuresequenz einsetzt.<sup>[3]</sup> Die cotranslationale Proteinfaltung eröffnet der Polypeptidkette zusätzliche Reaktionswege für die ersten Schritte der Faltung und beeinflusst auf diese Weise die Faltungskinetik, während gleichzeitig die Kette durch das Ribosom bis zum Ende synthetisiert wird. Diese natürliche Art der Proteinfaltung lässt sich nur in ihrer angestammten Umgebung beobachten, idealerweise in einer lebenden Zelle. Experimentell einfacher zu realisieren ist das Studium der Proteinbiosynthese *in vitro*, indem Ribosomen in Vesikeln oder künstlichen Membranen verankert werden, um so den Bedingungen *in vivo* möglichst nahe zu kommen.<sup>[4]</sup> Dieser Ansatz vereinfacht die Beobachtung der Proteinfaltung und ermöglicht es, das System gezielt zu manipulieren. Die Synthese der Peptidkette in zellfreier Umgebung wird typischerweise auf etwa 1 bis 5 Aminosäuren pro Sekunde verlangsamt, im Vergleich zu etwa 10 bis 20 Aminosäuren pro Sekunde in einer lebenden Zelle.<sup>[3]</sup>

Unterschiedliche Einzelmolekültechniken von der Rasterkraftmikroskopie (AFM) bis hin zur Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie einzelner Moleküle haben in der Vergangenheit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Proteinfaltung geleistet. Diese Techniken haben den entscheidenden Vorteil, dass keine Information durch Mittelung verlorengeht und ferner die Notwendigkeit der Synchronisation entfällt. Insbesondere mit Fluoreszenzmethoden auf Einzelmolekülebene gelingt es, Wechselwirkungen und

Konformationsänderungen von Biomolekülen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung zu untersuchen, ohne das System entscheidend zu beeinflussen.<sup>[5–7]</sup>

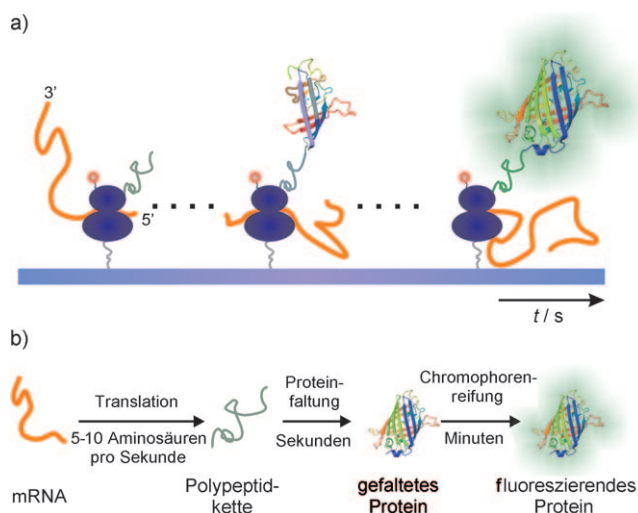
Eine Vielzahl an Methoden wurde eingesetzt, um die Faltung einzelner Proteine zu untersuchen. Besonders geeignete Techniken aus dem Bereich der Einzelmolekülfluoreszenz sind der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET) und der photoinduzierte Elektronentransfer (PET), da sowohl Konformationsänderungen im Bereich von Nanometern als auch schnelle Faltungskinetiken zugänglich sind;<sup>[7]</sup> somit eignen sich diese Verfahren ideal zur Untersuchung der Proteinfaltung.<sup>[8–10]</sup> Jedoch erforderten bisherige Arbeiten die Markierung des Proteins oder der Polypeptidkette mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der einerseits die Faltung und Entfaltung stören kann, andererseits aber auch die Beobachtung der Faltung direkt nach der Biosynthese nicht ermöglicht. Als alternative Einzelmolekültechnik, die ohne eine zusätzliche Sonde auskommt, wurde die Rasterkraftmikroskopie erfolgreich eingesetzt.<sup>[11]</sup>

Fluoreszierende Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) und davon abgeleitete Varianten werden vielfach als Fluoreszenzsonden eingesetzt. Das Verständnis des Faltungswegs sowie dessen Kinetik sind von großer Bedeutung.<sup>[12,13]</sup> Wichtige Erkenntnisse über die Entfaltung einzelner GFP-Moleküle wurden mithilfe von Rasterkraftmikroskopie sowie von gezielten Mutationen der Peptidkette gewonnen.<sup>[14]</sup> Um jedoch die Eigenschaft der Fluoreszenz zu erlangen, muss nach der Biosynthese und Faltung ein autokatalytischer Reifungsprozess stattfinden, der die Chromophoreinheit aus drei Aminosäuren bildet. Dieser Reifungsprozess, der je nach fluoreszierendem Protein Minuten bis Stunden dauern kann, begrenzt den Einsatz als Fluoreszenzsonde für die Mikroskopie schneller Prozesse in lebenden Zellen und begründet die Suche nach neuen Varianten des GFP und die Charakterisierung ihrer Faltung und Reifung.

Ein eleganter Ansatz zur Untersuchung der Faltung und Reifung von GFP wurde kürzlich von Katranidis et al. vorgestellt.<sup>[15]</sup> In ihrem Experiment wurden alle Schritte der Translation mithilfe von Fluoreszenz auf Einzelmolekülebene beobachtet: von der Synthese der Polypeptidkette über die cotranslationale Faltung bis zur Reifung zum fluoreszierenden Protein. Dazu wurden einzelne, mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markierte Ribosomen auf einer Glasoberfläche verankert und mit einem zellfreien Transkriptions-Translations-Puffer umgeben. Das Entstehen eines gereiften GFP-Moleküls konnte durch die intrinsische Fluoreszenz

[\*] Dr. M. Heilemann  
Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie und  
Bielefeld Institute for Biophysics and Nanoscience  
Universität Bielefeld  
Fax: (+49) 521-106-2958  
E-Mail: heileman@physik.uni-bielefeld.de

nachgewiesen werden, ohne dass eine zusätzliche Fluoreszenzmarkierung erforderlich war. Darüber hinaus wurde mit GFP-Emerald eine neue Variante des fluoreszierenden Proteins vorgestellt, die sich durch eine schnelle Faltung und Reifung auszeichnet. Die vom Ribosom synthetisierten Proteine wurden durch das Anfügen einer zusätzlichen Sequenz von 31 Aminosäuren fest verankert. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass genügend Zeit zur Faltung und Reifung zur Verfügung steht, sodass einzelne GFP-Emerald-Moleküle sowohl durch ihre Fluoreszenz als auch durch Kollaboration mit dem Fluoreszenzsignal der Ribosomen detektiert werden konnten. Insgesamt wurde bei mehr als 10 % aller Ribosomen ein intaktes GFP-Emerald-Molekül detektiert (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** a) Synthese und Reifung einzelner GFP-Emerald-Moleküle: Einzelne, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Ribosomen wurden im Experiment auf einer Glasoberfläche verankert und zusammen mit dem Plasmid des fluoreszierenden Proteins GFP-Emerald mit einem zellunabhängigen Transkriptions-Translations-System umgeben. Die transkribierte mRNA wurde durch Ribosomen in eine Polypeptidkette übersetzt. Bereits nach der Synthese einer kurzen Aminosäurekette beginnt die cotranslationale Faltung. Nach der vollständigen Faltung des Proteins vollendet ein autokatalytischer Reifungsprozess die Synthese des fluoreszierenden Proteins. b) Kinetische Daten zur Reifung von GFP-Emerald wurden aus zeitabhängigen Messungen gewonnen. Die Größe der charakteristischen Zeitkonstanten (5.3 Minuten) wurde hauptsächlich mit dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Chromophorbildung erklärt.

In weiteren Experimenten untersuchten Katranidis et al. die Kinetik der Synthese einzelner GFP-Emerald-Proteine; dazu wurde zunächst die Zeit vom Beginn der Translation bis zum Fluoreszenzsignal der Proteine gemessen. Aus diesen Daten wurde eine monoexponentielle charakteristische Zeitkonstante von 5.3 Minuten bestimmt, wobei eine signifikante Zahl an Proteinen bereits nach etwa einer Minute vollständig gereift war. Aus den kinetischen Daten zogen die Autoren weitere Schlüsse: 1) Die Synthese einer Peptidkette in vitro läuft bemerkenswert schnell ab, vergleichbar mit der Synthese in vivo; 2) die Faltung von GFP-Emerald, die von der cotranslationalen Faltung der entstehenden Peptidkette unterstützt wird, ist ebenfalls schnell abgeschlossen, sodass

die charakteristische Zeit von 5.3 Minuten hauptsächlich der autokatalytischen Reifung des Chromophors zugeschrieben werden kann. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass GFP-Emerald mit seinen Faltungs- und Reifungseigenschaften eine vielversprechende Sonde für die Mikroskopie in lebenden Zellen ist.

Die Bedeutung der Arbeit ist vielfältig: Einerseits wurde ein neuer Ansatz vorgestellt, der die Beobachtung der Faltung einzelner fluoreszierender Proteine erheblich erleichtert und somit die Konstruktion und Charakterisierung neuer Proteine entscheidend vereinfacht. Fluoreszierende Proteine, die sich schnell falten und schnell reifen, sind vor allem für die mikroskopische Verfolgung schneller Prozesse in lebenden Zellen wünschenswert. Aber auch eine genauere Charakterisierung und somit ein besseres Verständnis einzelner Schritte des Faltungswegs fluoreszierender Proteine, insbesondere auch zu Beginn der Biosynthese, kann nun erwartet werden.

Der vorgestellte Ansatz könnte auch auf Proteine ausgedehnt werden, die keine intrinsische Fluoreszenz zeigen, zum Beispiel durch den Einsatz fluoreszierender Aminosäuren oder das Anbringen von Fluoreszenzsonden während der ersten Schritte der Biosynthese. Der gleichzeitige Einsatz von Fluoreszenzsonden mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften könnte die Beobachtungsmöglichkeiten erweitern, sodass auch Strukturinformationen wie Abstände und deren kleinste Änderungen durch FRET-Analysen zugänglich werden.<sup>[16]</sup> Ferner könnten fluoreszenzmarkierte tRNA-Moleküle eingesetzt und somit die Verlängerung der Peptidkette mit den ersten Schritten cotranslationaler Faltung korreliert werden. Eine Verbindung mit neuen Mikroskopiemethoden, welche die Lokalisierung fluoreszierender Sonden mit einer Genauigkeit von etwa einem Nanometer<sup>[17]</sup> oder die Beobachtung von Strukturen weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze ermöglichen, ist ebenso denkbar. Hierdurch könnten die ersten Momente des Wachstums einer Polypeptidkette bis zum funktionellen Protein visualisiert werden.<sup>[18,19]</sup>

Zusammenfassend hat die Arbeit von Katranidis et al. viele neue experimentelle Möglichkeiten eröffnet, und neben einer Vielzahl neuer Anwendungen können wir für die Zukunft auch ein besseres, grundlegendes Verständnis der Proteinbiosynthese und -faltung erwarten.

Online veröffentlicht am 7. April 2009

- [1] K. A. Dill, S. B. Ozkan, M. S. Shell, T. R. Weikl, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 289.
- [2] A. R. Fersht, V. Daggett, *Cell* **2002**, *108*, 573.
- [3] A. N. Fedorov, T. O. Baldwin, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32715.
- [4] R. A. Marshall, C. E. Aitken, M. Dorywalska, J. D. Puglisi, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 177.
- [5] N. G. Walter, C. Y. Huang, A. J. Manzo, M. A. Sobhy, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 475.
- [6] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676.
- [7] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2698; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2642.
- [8] X. Michalet, S. Weiss, M. Jager, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1785.
- [9] B. Schuler, W. A. Eaton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 16.
- [10] G. Ziv, G. Haran, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2942.

- [11] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, D. J. Müller, *Science* **2000**, 288, 143.
- [12] R. Tsien, *J. Cell Biol.* **2007**, 179, 6.
- [13] G. U. Nienhaus, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9130; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8992.
- [14] M. Mickler, R. I. Dima, H. Dietz, C. Hyeon, D. Thirumalai, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 20268.
- [15] A. Katranidis, D. Atta, R. Schlesinger, K. H. Nierhaus, T. Choli-Papadopoulou, I. Gregor, M. Gerrits, G. Buldt, J. Fitter, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1790; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1758.
- [16] M. Heilemann, P. Tinnefeld, G. Sanchez Mosteiro, M. Garcia Parajo, N. F. Van Hulst, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6514.
- [17] A. Yildiz, P. R. Selvin, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 574.
- [18] M. Heilemann, P. Dedecker, J. Hofkens, M. Sauer, *Laser Photonics Rev.* **2009**, 3, 180.
- [19] S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, 6, 24.

# Chemie

## rund um die Uhr

### Das Buch zum Jahr der Chemie

Das offizielle Buch der Gesellschaft Deutscher Chemiker und des BMBF ist ein wahrer Lesespaß und Augenschmaus.



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Wiley-VCH, Kundenservice  
Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim  
Tel.: +49 (0) 6201 606-400, Fax: +49 (0) 6201 606-184  
E-Mail: service@wiley-vch.de, www.wiley-vch.de



Mädefessel-Herrmann, K. /  
Hammar, F. /  
Quadbeck-Seeger, H.-J.  
Herausgegeben von der  
Gesellschaft Deutscher  
Chemiker  
2004. X, 244 Seiten, mehr  
als 300 Abbildungen kom-  
plett in Farbe. Gebunden.  
€ 27,90  
ISBN 978-3-527-30970-2

 **WILEY-VCH**

42272805\_gu