

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Nutzung von Nukleinsäure-Protein Wechselwirkungen für die Wirkanalytik von reaktiven Species

F. Lisdat¹, W. Stöcklein¹, F.W. Scheller¹, R. Brigelius-Flohè²,
D. Utepbergenov³, R. Haseloff³, I. Blasig³

¹Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie,
14415 Potsdam, PF 601553

²Deutsches Institut für Ernährungswissenschaften,
14558 Bergholz-Rehbrücke, Arthur-Scheunert-Allee 114-116

³Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie,
13125 Berlin, Robert-Rössle-Str. 10

Registriernummer der Online-Anmeldung: 181

Poster

Reaktive Species wie Superoxid, Stickstoffmonoxid oder Peroxynitrit sind in eine Vielzahl pathophysiologischer Situationen wie z.B. das Reperfusionssyndrom involviert [1]. Besonders hohe Konzentrationen treten auf, wenn das antioxidative Abwehrsystem nicht mehr in der Lage ist, den Radikalanstieg abzufangen. Die biomedizinische Forschung hat sich auf die Mechanismen der Freisetzung dieser Species unter unterschiedlichen Streßbedingungen fokussiert. Aus diesem Grund sind verschiedene analytische Meßmethoden für den Nachweis entwickelt worden. Sensorische Methoden bieten den Vorteil einer räumlich und zeitlich aufgelösten Analyse der Einzelteilchen [2]. Jedoch gibt es beträchtliche Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen reaktiven Species, was die Aussagefähigkeit von Einzelmessungen in komplexen Situationen einschränkt. Hier erscheint ein Summenparameter für die Radikalwirkung im Sinne einer Wirkanalytik aussagekräftiger.

Das 'iron regulatory protein 1' (IRP1) kann als ein solches Markerprotein betrachtet werden, dessen Konzentration Aufschluß über den zellulären Streßlevel gibt. Das Protein wird unter der Wirkung von oxidativem Streß aus dem 4Fe-4S-Enzym cytosolische Aconitase gebildet [3]. Das entstandene IRP1 zeigt im Gegensatz zur Aconitase eine ausgeprägte Bindungsaffinität zu spezifischen m-RNA-Strukturen - den sogenannten 'iron responsive elements' - IREs. Dieses Verhalten kann als Grundlage für die sensorische Detektion des Markerproteins genutzt werden.

In dem hier vorzustellenden experimentellen Ansatz wurde die Proteinbindung mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz detektiert. Hierzu wurde eine IRE-Konsensus-Sequenz in vitro

transkribiert und anschließend auf einem Carboxydextran-modifizierten Biacore-Chip immobilisiert. Eine relativ hohe Oberflächenbelegung (2000 RU /mm²) wurde sichergestellt.

Die Nukleinsäure-modifizierte Oberfläche erwies sich als sensitiv für IRP1-Konzentrationen in Lösung. Das Eisen-Schwefel-Cluster-freie Protein IRP1 hat seine enzymatische Aktivität für die Umwandlung von cis-Aconitat zu Aconitat (Aconitase Reaktion) verloren und besitzt statt dessen eine definierte Bindungsaktivität. Die deutliche Assoziation bzw. Dissoziation des Proteins in Bezug auf die IRE-modifizierte Sensoroberfläche erlaubte die Bestimmung der Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich. Das optische Meßsystem war sensitiv für IRP1 ab ca. 20nM und wurde bis zu Konzentrationen von 200 nM des Proteins charakterisiert.

Die gemessenen Effekte waren reproduzierbar mit einem Vertrauensintervall von $\pm 8\%$ für wiederholte IRP1 Injektionen von 50 nM.

Alternativ zum IRE wurde auch eine Mutante hergestellt, der 4 Nukleotide fehlten. Diese wurde ebenfalls auf dem Sensor-Chip immobilisiert. Damit konnte die Spezifität der Analyse nachgewiesen werden, da die Mutante im Gegensatz zum IRE keine Sekundärstruktur für eine spezifische Proteininteraktion ausbilden kann [4].

Matrixeffekte auf die IRP1-Bindung wurden eingehender untersucht, da für die Anwendung dieser optischen Methodik IRP1 in physiologischen Lösungen wechselnder Zusammensetzung nachzuweisen ist. Hierbei wurden der pH-Wert wie auch die Konzentration freier Thiole als entscheidende Faktoren identifiziert. Darüberhinaus konnte auch gezeigt werden, daß komplexe Matrices wie Zytosol von Makrophagen die Sensoroberfläche nicht gravierend verändern, so daß die Bindungsparameter nahezu erhalten blieben. Dies mag die Anwendbarkeit einer solchen Bindungsmessung für die Analyse von oxidativem Streß illustrieren.

Danksagung:

Die Autoren danken für die finanzielle Unterstützung seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft (INK 16B1-1 3.3).

Literatur:

- [1] Scandalios, J.G. (Ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997.
- [2] Lisdat, F. and Scheller, F.W., 2000, Anal. Lett. 33(1) 1-18.
- [3] Castro, L., Rodriguez, M., Radi, R., 1994, J. Biol. Chem. 269 (47), 29409-29415.
- [4] Hentze, M.W., Caughman, S.W., Roault, T.A., Barriocanal, J.G., Dancis, A., Harford, J.B., Klausner, R.D., 1987, Science 238 1570-73.