

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

Odorant-Bindeproteine (OBPs) als molekulare Detektoreinheiten für die Erkennung und Diskriminierung von Duftstoffen

Dietrich Löbel, Marion Jacob, Viola Weber, Phillip Grote und Heinz Breer

Institut für Physiologie, Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, D-70593 Stuttgart

Tel. 0711 / 459 2267

didi@uni-hohenheim.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 174

Poster

Das olfaktorische System ist in der Lage, Tausende von Duftstoffen zu diskriminieren und sie z.T. in geringste Konzentrationen zu detektieren. Diese enorme Erkennungskapazität wird generell auf die Vielfalt an Odorantrezeptoren der olfaktorischen Sinneszellen zurückgeführt. Man geht jedoch davon aus, daß die Duftstoffmoleküle zunächst mit den sogenannten Odorant-Bindeproteinen (OBPs) interagieren, die als Transporter die überwiegend hydrophoben organischen Moleküle durch die wässrige Mucusbarriere zu den Sinneszellen transferieren [1]. OBPs gehören zu den Lipocalinen, die sich durch eine simple aber sehr rigide beta-Faß Struktur mit einer hydrophoben Bindungstasche und einer überwiegend hydrophilen Proteinoberfläche auszeichnen; sie stellen damit ideale „Lösungsvermittler“ für hydrophobe Substanzen dar.

Die Entdeckung von mehreren OBP-Subtypen in einer Spezies und die geringe Sequenzhomologie der Subtypen untereinander legte die Vermutung nahe, dass die unterschiedlichen OBPs für die Interaktion mit distinkten chemischen Strukturklassen spezialisiert sind, d.h. über eine gewissen Ligandenspezifität verfügen. Im Hinblick auf detaillierte Analysen der Bindungseigenschaften von OBPs wurden drei identifizierte OBP-Subtypen der Ratte in *E. coli* als Histidin-Fusionsproteine überexprimiert und unter nativen Bedingungen gereinigt. Für die Charakterisierung der Wechselwirkungen dieser Proteine mit verschiedenen Liganden wurde ein markierungsfreier fluoreszenzspektroskopischer „Schnelltest“ entwickelt, der auf einer reversiblen Interaktion von OBP mit Fluoreszenzchromophor beruht [2]. Durch die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors bei einer spezifischen Wechselwirkung mit dem OBP sind die gebundenen Chromophoren im Emissionsspektrum selektiv erkennbar; eine Trennung von freiem und gebundenen Chromophore wird dadurch überflüssig. Diese Methode scheint für ein Hochdurchsatzscreening prädestiniert zu sein.

Die Bindung von Duftstoffen wurde nun in Konkurrenzexperimenten überprüft, wobei die Verdrängung des Chromophoren spektroskopisch erfasst werden konnte. Für die Konkurrenz des Protein/Chromophoren-Komplexes wurden Duftstoffe unterschiedlicher organischer Strukturklassen eingesetzt und die Bindungsaffinitäten der drei rekombinanten OBPs analysiert. Dabei zeigte sich, dass jeder OBP-Subtyp offenbar unterschiedliche Duftstoffklassen bindet; wobei die Ligandenspektren zwischen den einzelnen Subtypen nur geringfügig überlappen.

Die Struktur und Größe der Bindungstasche wird von 16 Aminosäure (AS)-resten determiniert, die auf sieben der acht beta-Stränge lokalisiert sind. Anhand von Proteinstrukturdaten [3] und Sequenzvergleichen wurden die kritischen AS-Positionen in den einzelnen OBPs bestimmt. Um eine deutliche Verbesserung der Expression- und Fluoreszenzeigenschaften und veränderte Bindungseigenschaften zu erreichen, wurde in einem Proteinengineering-Ansatz das OBP3, welches sehr stabile physiko-chemische Eigenschaften aufweist und die höchste fluoreszenzspektroskopische Quantenausbeute liefert, als „backbone“-Protein verwendet und die Bindungstasche dieses Protein modifiziert. Dieser Ansatz erlaubt die Herstellung von OBP-Chimären mit neuen Bindungsspezifitäten; es konnten Mutanten erzeugt werden, die eine höhere Selektivität und Affinität für ausgewählte Duftstoffen aufweisen. Durch weitere gezielte Veränderungen der Bindungstasche wurden OBP-Mutanten generiert, die durch Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz ein direktes Monitoring der Liganden-Bindung ermöglichen. Ausserdem konnte die Sensitivität des Systems auf ein Niveau gehoben werden, das eine Duftstoffdetektion im Mikrotiterplatten-Format erlaubt. Mit diesem Ansatz ist es erstmals gelungen, physiologisch relevante Komponenten des olfaktorischen Systems in ein einfaches und effizient zu handhabendes Meßsystem zu integrieren.

Literatur

- [1] Pelosi, P (1994) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 199-228.
- [2] Löbel, D., Marchese, S., Krieger, J., Pelosi, P. and Breer, H. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **254**, 318-324.
- [3] Vincent, F., Löbel, D., Brown, K., Spinelli, S., Grote, P., Breer, H., Cambillau, C. and Tegoni, M. (2001) *J. Mol. Biol.*, **305**, 459-469.