

Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Bestimmung molekularer Reaktionsmechanismen von Proteinen

Klaus Gerwert, Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum

► Zum Verständnis biologisch-chemischer Prozesse auf der molekularen beziehungsweise der atomaren Ebene ist die Bestimmung der Struktur und der Funktion von Proteinen ein zentrales Element. In den vergangenen Jahrzehnten konnten mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse eine Vielzahl von Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung bestimmt werden. In jüngerer Zeit etablierte sich als eine alternative, strukturauflösende Methode für kleinere, wasserlösliche Proteine die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie. Beide Methoden liefern aber im wesentlichen die Struktur des ruhenden Proteingrundzustandes. Um die molekularen Reaktionsmechanismen zu bestimmen, benötigt man komplementär zu den strukturauflösenden noch zeitaufauflösende Methoden, die die Proteinaktivität in Echtzeit detektieren können. Eine gute Möglichkeit, Proteinreaktionen mit der intrinsisch hohen Zeitauflösung von Femtosekunden und atomarer Ortsauflösung zu bestimmen, bieten vibrationsspektroskopische Methoden. Bei Chromoproteinen, das heißt bei Proteinen mit einer im sichtbaren Spektralbereich absorbierenden prosthetischen Gruppe, kann die Resonanz-Ramanspektroskopie eingesetzt werden. Hierbei werden durch Streuung von sichtbarer Strahlung nur die Chromophorschwingungen resonant angeregt. Dadurch wird der Ramanstreuquerschnitt im Vergleich zur klassischen Raman-Spektroskopie um mehrere Größenordnungen erhöht. Diese Technik erlaubt im Prinzip, die Chromophorreaktionen atomar aufgelöst zu bestimmen; zum Beispiel konnte bei Bakteriorhodopsin mit Hilfe der Resonanz-Raman-Spektroskopie die Isomerisierung des Retinals von all-trans nach 13-cis identifiziert werden [1]. Weiterführend hat sich in den letzten Jahren die FTIR (Fourier Transform Infrarot)-Differenz-Spektroskopie als neue Methode etabliert [2]. Sie erlaubt im Prinzip nicht nur die Reaktionen des Chromophors nachzuweisen, sondern auch die der Proteinseitengruppen sowie strukturelle Bewegungen des Proteingerüsts, da nur die Vibrationsniveaus des elektronischen Grundzustandes angeregt werden müssen. Um aber aus der hohen Gesamtabsorption einer Proteinprobe mit umgebendem Wasser und Puffer

beziehungsweise Detergenz nur die Absorptionsbanden der funktionell entscheidenden Gruppen zu selektieren, müssen Differenzen zwischen dem Proteingrundzustand und einem aktivierten Proteinzustand gebildet werden [2].

FTIR-Differenz-Spektroskopie

Das Spektrum eines Proteins im mittleren infraroten Spektralbereich wird dominiert durch die Banden des Proteingerüsts, die sogenannten Amid I- ($\text{C}=\text{O}$; $1690\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$) und Amid II-Banden (C-NH ; $1550\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$) der Peptidbindungen. Die Lage der Banden ist indikativ für die Sekundärstruktur eines Proteins und kann für grobe Strukturvorhersagen genutzt werden. Neben dem Proteingerüst absorbiert noch Wasser stark im infraroten Spektralbereich (OH bei 1650

cm^{-1}). Um die Wasserabsorption zu reduzieren, arbeitet man mit wäßrigen Proteinfilmen von ca. 2 bis $10\text{ }\mu\text{m}$ Schichtdicke. Da die Absorptionsänderungen von etwa $\Delta A = 10^{-4}$ gegenüber der Hintergrundabsorption von bis zu 1 sehr klein sind, reicht die Meßgenauigkeit konventioneller, dispersiver Infrarotspektrometer nicht aus. Nutzt man allerdings die Vorteile von Fourier-Transform-Infrarotspektrometern, ist man in der Lage, auch diese kleinen Absorptionsänderungen noch zuverlässig zu bestimmen [3]. Die Vorteile gegenüber konventionellen dispersiven Geräten sind:

- der sogenannte Multiplexvorteil: da alle Wellenzahlen parallel gemessen werden, benötigt man nur eine sehr kurze Meßzeit.
- der sogenannte Jaquinot-Vorteil: da keine dispersiven Elemente eingesetzt werden, erhält man einen größeren Lichtdurchfluß im Vergleich zu dispersiven Anordnungen. Dies wirkt sich in einem stark verbesserten Signal/Rauschverhältnis aus.

In Abbildung 1 ist ein experimenteller Aufbau für zeitaufgelöste FTIR-Messungen schematisch gezeigt. Simultan können die Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich detektiert werden. Weiterhin lassen

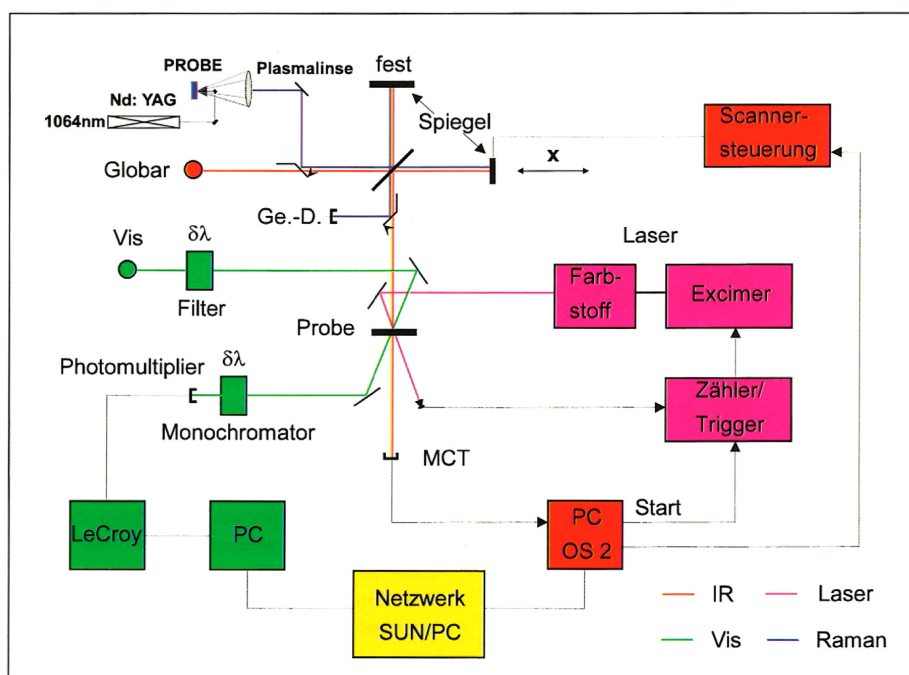


Abb. 1: Schema des von den Autoren entwickelten Meßaufbaus zur Durchführung von VIS-, FT-Raman und FTIR-Messungen. Die VIS-Anordnung (grün) besteht aus: Lichtquelle VIS, Interferenzfilter, Monochromator, Photomultiplier, Transientenrekorder (LeCroy) und PC; die FTIR-Anordnung (basierend auf Bruker IFS 66V; rot) aus dem Michelson-Interferometer mit Global, dem Strahlteiler, den festen und beweglichen Spiegeln, MCT-Detektor und PC. Die Probe wird mit einem Lichtblitz angeregt, der mit Hilfe eines Excimer-Laser gepumpten Farbstofflasers (Lambda-Physik) erzeugt wird (violett). Die Daten werden auf einem lokalen Netzwerk (gelb) aus SUN-Workstations und PCs ausgewertet. Die FT-Raman-Anordnung (blau) besteht aus dem Nd: YAG-Laser, dessen 1064 nm-Laserlinie an der Probe gestreut wird. Die Raman-gestreute Strahlung wird über eine Plasmalinsse gesammelt, in das Interferometer eingespiegelt und über einen sehr empfindlichen Ge-(Germanium) Detektor nachgewiesen.

sich damit auch FT-Raman-Messungen durchführen. In dem interferometrischen Aufbau nach Michelson fällt das vom Globar ausgestrahlte IR-Licht auf einen Strahlteiler, der im Idealfall 50% der einfallenden Strahlung auf einen festen und 50% auf einen beweglichen Spiegel lenkt. Die von den Spiegeln reflektierte Strahlung fällt auf den Detektor (MCT; Mercury-Cadmium-Tellurid). Je nach Gangunterschied, abhängig von der Position des beweglichen Spiegels (=Scanner), interferieren die reflektierten Strahlen am Detektor und man erhält in Abhängigkeit von dem zurückgelegten Spiegelweg X eine Intensitätsänderung der infraroten Strahlung, ein sogenanntes Interferogramm. Dieses stellt die Fouriertransformierte des Spektrums dar. Da das Interferogramm diskret und digitalisiert vorliegt, wird die diskrete Fouriertransformation (DFT) verwendet. Auf die Details und Randbedingungen, die bei der DFT zu beachten sind, soll hier nicht eingegangen werden. Eine gute Darstellung findet sich in [3].

Zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie

In einigen Fällen kann ein aktivierter Proteinzustand bei tiefen Temperaturen stabilisiert werden. Es werden dann die Spektren des ruhenden und eines aktivierten Zustandes des Proteins hintereinander in einem konventionellem Meßmodus im Minutenbereich aufgenommen und anschließend wird die Differenz gebildet [4]. Da die durch die Proteinaktivität verursachten Absorptionsänderungen sehr klein sind, kann die Aktivierung des Proteins nur „*in situ*“ in dem Gerät zum Beispiel durch Lichtanregung erfolgen.

Durch die Entwicklung zeitaufauflösender Techniken kann man heute aber im Prinzip die gesamte Reaktionsfolge einer Proteinaktivität in Echtzeit unter physiologischen Bedingungen aufnehmen. Es stehen dazu verschiedene Techniken zur Verfügung:

- „rapid scan-Technik“: Hierbei werden während des Reaktionsablaufs in sehr schneller Folge Interferogramme aufgenommen. Mit der von uns benutzten Anordnung können vollständige Spektren von 1800 bis 800 cm^{-1} in 10 ms bei 4 cm^{-1} spektraler Auflösung mit der geforderten hohen Auflösung der Absorptionsänderungen gemessen werden [5]. Dies ist die zur Zeit physikalisch realisierbare Grenze, da der Scanner nicht höher beschleunigt werden kann.
- „Stroboskoptechnik“: Hierbei werden die Interferogramme zunächst mit der „rapid-

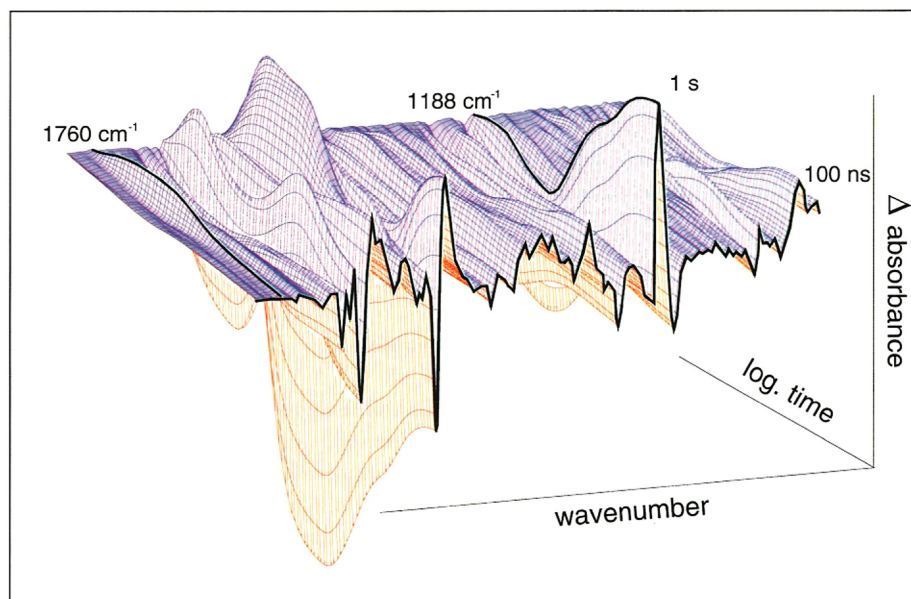


Abb. 2: Dreidimensionale Darstellung der IR-Absorptionsänderungen während des Bakteriorhodopsin-Photozyklus zwischen 1800 und 1000 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} und einer Zeitauflösung von 100 ns. Die Absorptionsänderungen sind in der Größenordnung von 10^{-3} bis 10^{-4} gegenüber einer Hintergrundextinktion von 1.

scan“-Technik aufgenommen. Nach der Datenaufnahme werden die verschiedenen Interferogramme mit Hilfe einer geeigneten Software in einzelne Segmente geteilt. Diese Segmente werden sortiert und zu neuen Interferogrammen zusammengesetzt, die dann fouriertransformiert werden. Durch diese Neusortierung der Segmente erzielt die Arbeitsgruppe des Autors eine Verbesserung um den Faktor 500, das heißt, es wird eine Zeitauflösung von 20 μs erreicht [6].

- „step-scan-Technik“: Bei dieser Technik wird der Scanner an den einzelnen Interferogrammpunkten angehalten, und es wird jeweils die zeitabhängige Intensitätsänderung nach Reaktionsinitiierung gemessen (Step Scan) [7]. Die Intensitätsänderungen an den einzelnen Interferogrammpunkten werden dann rechnerisch so umsortiert, daß man komplette Interferogramme zu bestimmten Zeiten erhält. Damit erreicht die Arbeitsgruppe des Autors momentan eine Zeitauflösung von 100 ns [8]. Die Grenze der Zeitauflösung der MCT-Detektoren liegt bei 10 ns. Die technische Schwierigkeit bei dieser Meßtechnik besteht darin, den Scanner während der Datenaufnahme bis auf 1 bis 2 nm genau an der Halteposition stabil zu halten.

Beschränkt man sich auf die Messung der Zeitabhängigkeit bei nur wenigen ausgesuchten Wellenzahlen, kann, analog zu den Photolyseanordnungen im sichtbaren Spektralbereich, ein Aufbau mit gepulsten IR-Quellen eingesetzt werden. Dabei werden im infraro-

ten Spektralbereich bereits Zeitaufösungen in der Größenordnung von Picosekunden erzielt. Man muß allerdings anmerken, daß für die Bandenzuordnung und somit für die Interpretation der Spektren die Aufnahme vollständiger Spektren unerlässlich ist.

Zuordnen der Absorptionsbanden

Für die Zuordnung der Absorptionsbanden zu molekularen Gruppen des Proteins werden biochemische und molekularbiologische Methoden eingesetzt. Durch Vergleich der Differenzspektren von Wildtyp-Protein und von verändertem Protein können die Banden zugeordnet werden. Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Methoden, die Proteingruppen zu verändern.

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese kann gezielt eine bestimmte Aminosäure ausgetauscht werden. Ist diese Gruppe an der Aktivität beteiligt, fehlt ihre entsprechende Absorptionsbande im Spektrum des veränderten Proteins im Vergleich zu dem des Wildtyp-Proteins. Allerdings ändert eine spezifische Mutation möglicherweise auch die Struktur des Proteins, insbesondere beim Austausch geladener Gruppen. Der Vergleich des Wildtyp-Differenzspektrums mit dem des Mutanten-Differenzspektrums zeigt aber mögliche Strukturveränderungen in dem mutierten Protein an. Weicht das Differenzspektrum des mutierten Proteins stark von dem des Wildtyps ab, liegt eine Strukturveränderung vor. Fehlt dagegen nur eine Bande und stimmen die übrigen Banden in beiden Differenzspek-

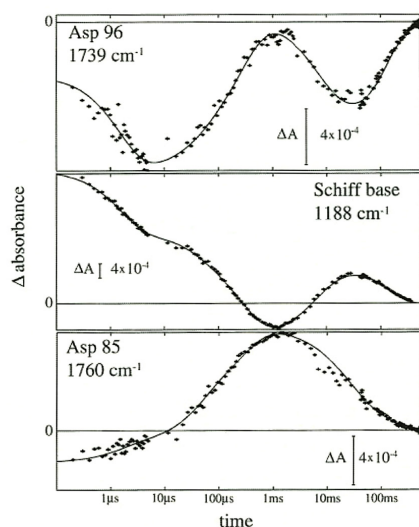


Abb. 3: Absorptionsänderungen bei ausgewählten Wellenzahlen in Abhängigkeit von der Zeit aus der dreidimensionalen Darstellung in Abbildung 2. Sie repräsentieren Reaktionen von Schlüsselgruppen des Proteins. Bei 1188 cm^{-1} (Schiff'sche Base) zeigt das nicht zeitaufgelöste Entstehen der Bande die Isomerisierung des Retinals von all-trans nach 13-cis, das Verschwinden repräsentiert die Deprotonierung der Schiff'schen Base im Intermediat M und ihr Wiedererscheinen die Reprotonierung im Intermediat N. Das abschließende Verschwinden der Bande zeigt die Reoisomerisierung nach all-trans-Retinal. Bei 1760 cm^{-1} (Asp 85) zeigt das Entstehen der Bande die vorübergehende Protonierung der Carboxylgruppe von Aminosäure Asp 85 im Intermediat M. Bei 1739 cm^{-1} repräsentiert das Verschwinden der Bande im Intermediat L eine Umgebungsänderung der protonierten Carboxylgruppen der Aminosäuren Asp 96 und Asp 115. Das zweite Verschwinden der Bande in N zeigt eine vorübergehende Deprotonierung von Asp 96.

treten gut überein, ist davon auszugehen, daß die funktionell aktive Struktur trotz Mutationen weitgehend intakt geblieben ist.

Im Vergleich zu dieser invasiven Technik kann eine Zuordnung auch mit Hilfe der nichtinvasiven Isotopenmarkierung erfolgen. Durch Isotopenmarkierung wird die Absorptionsbande der markierten Molekülgruppe frequenzverschoben und kann somit identifiziert werden. Hierbei wird die Struktur des Proteins nicht beeinflusst. Kleinere Chromophore oder Liganden können durch chemische Synthese ortsspezifisch isotopenmarkiert werden [9]. Isotopenmarkierte Chromophore können dann in das Apoprotein eingebaut werden (Beispiel in Abb. 5).

Eine isotopenmarkierte Aminosäure läßt sich in Bakterien biosynthetisch inkorporieren. Bei diesem Verfahren wird allerdings die betroffene Aminosäure an allen dafür kodierenden Positionen ins Protein eingesetzt und

eine spezifische Bandenzuordnung ist nur durch Kombination mit ortsspezifischer Mutagenese möglich.

Da die Isotopenmarkierung im Gegensatz zur Mutation eine nicht-invasive Technik darstellt, wird für die Zukunft als ideale Markierungsmethode eine ortsspezifische Isotopenmarkierung der Aminosäureseitengruppe angestrebt.

Beispiele

Bakteriorhodopsin

Der lichtgetriebene Protonenpumpmechanismus des Bakteriorhodopsins wurde mit vielen verschiedenen Methoden untersucht, die dazu beitrugen, daß es heute eine detaillierte Vorstellung über die Struktur und den molekularen Mechanismus dieses Membranproteins gibt [aktuelle Übersicht in 10]. Hier sollen nur die Beiträge der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie dargestellt werden. Nach Lichtanregung durchläuft das Bakteriorhodopsin einen Photozyklus mit den Intermediaten J, K, L, M, N und O. Im Verlauf des Zyklus werden vektoriell Protonen gepumpt. In Abbildung 2 sind die IR-Absorptionsänderungen während des Bakteriorhodopsin-Photozyklus in einer dreidimensionalen Darstellung wiedergegeben. In der sogenannten Fingerprintregion zeigt zum Beispiel das Verschwinden (negativ) der drei Banden bei 1213 cm^{-1} , 1202 cm^{-1} und 1167 cm^{-1} und das Entstehen (positiv) der Bande bei 1188 cm^{-1} die (nicht zeitaufgelöste) all-trans- nach 13-cis-Isomerisierung des Chromophors Retinal. Dies ist in dem Bakteriorhodopsin-Pumpmodell in Abbildung 4 illustriert. Ausgewählte Kinetiken sind in Abbildung 3 gezeigt. Das Verschwinden der Bande bei 1188 cm^{-1} zeigt die Deprotonierung der Schiff'schen Base in dem L- nach M-Übergang an, das Wiedererscheinen der Banden mit kleinerer Absorption die Reprotonierung in dem M-nach N-Übergang und das endgültige Verschwinden die Rückisomerisierung nach all-trans-Retinal. In der Carbonyl-Gegend beobachtet man bei 1760 cm^{-1} die Protonierung von Asp 85, der katalytischen Protonenbindungsstelle auf der protonenabgebenden Seite (Abb. 3). Diese stimmt mit der Deprotonierungskinetik der $\text{C}=\text{NH}^+$ bei 1188 cm^{-1} gut überein (Abb. 3) [5]. Bei 1739 cm^{-1} kann die Umgebungsänderung in L und die Deprotonierung in N von Asp 96, der katalytischen Protonenbindungsstelle auf der protonenaufnehmenden Seite, beobachtet werden [5]. Die Deprotonierung stimmt mit der Reprotonierung der Schiff'schen Base gut überein (Abb. 3). Der

intramolekulare Protonentransfer erfolgt über ein Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk unter Beteiligung von internen Wassermolekülen, wie kürzlich experimentell nachgewiesen wurde [11, 12]. Die Banden in der Amid I- (1660 cm^{-1}) und Amid II-Gegend (1550 cm^{-1}) (Abb. 2) zeigen eine Peptidgerüstbewegung an, die entscheidend für die Vektorialität der Pumpe ist [6].

Neben dem Bakteriorhodopsin wird auch das Retinalprotein Rhodopsin intensiv mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie bearbeitet [13].

Bakterielles photosynthetisches Reaktionszentrum

Weiterhin werden auch die Proteine, die bei der Photosynthese eine Rolle spielen, FTIR-spektroskopisch untersucht [Übersicht in 14]. Da die dreidimensionale Struktur aufgeklärt ist, können die Experimente an diesem System gezielter durchgeführt und leichter interpretiert werden. Kürzlich wurde zum

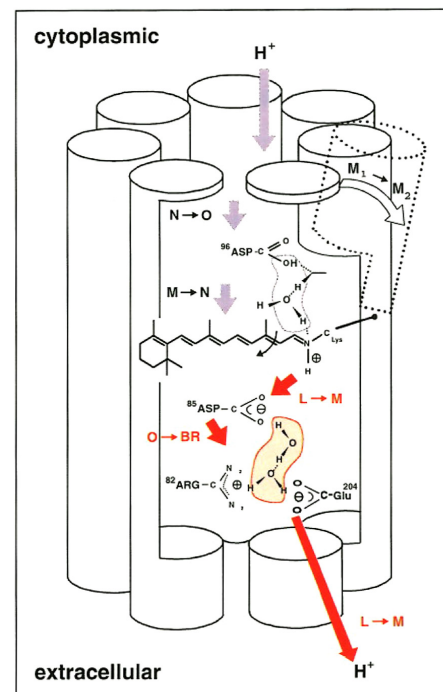


Abb. 4: Protonenpumpmodell des Bakteriorhodopsins. Nach Isomerisierung des Retinals wird das Schiff-Base-Proton in dem L- nach M-Übergang an Asp 85 abgegeben. Simultan wird ein weiteres Proton von dem H-Brücken-Netzwerk nach außen abgegeben. Die Schiff'sche Base wird von Asp 96 in der M- nach N-Reaktion reprotont. Dabei spielen interne Wassermoleküle zwischen Schiff'scher Base und Asp 96 eine wichtige Rolle. Weiterhin ist die Bewegung einer Helix in dem M₁- nach M₂-Schritt für die Vektorialität der Pumpe wichtig. In der N- nach O-Reaktion wird Asp 96 reprotont und das Retinal reoisomerisiert nach all-trans. Schließlich wird in der O-BR-Reaktion Asp 85 deprotoniert und somit der Ausgangszustand wieder erreicht.

Beispiel mit der FTIR-Spektroskopie gezeigt, daß die C=O-Gruppe an Position 4 des Ubichinons an der Q_A -Bindestelle eine ungewöhnlich starke H-Brücke zum Protein aufweist, im Gegensatz zur Bindung an der Q_B -Bindestelle [9, 15]. Diese strukturellen Details waren mit Hilfe der Röntgenstruktur nicht auflösbar. In Abbildung 5 ist die Zuordnung der 4-C=O-Bande des Ubichinons exemplarisch dargestellt. Dieser Befund trägt zum Verständnis der unterschiedlichen Rolle des Ubichinons an der Q_A - beziehungsweise Q_B -Bindestelle und den schnellen Vorwärtselektronentransfer von Q_A nach Q_B bei.

Anregungen mit „Caged“-Verbindungen: h-ras p21, Ca-ATPase, Cytochromoxidase, Acetylcholinrezeptor

Durch den Einsatz sogenannter „caged“-Substanzen, die durch UV-Licht aktivierbar sind, können auch Proteine, die nicht aus den photobiologischen Bereich kommen, untersucht werden. Der GTPase-Mechanismus des onkogenen GTP-bindenden Proteins h-ras p21 kann mit Hilfe von caged-GTP gestartet werden, in dem mit einem UV-Blitz die caged-Gruppe abgetrennt wird. Mit Hilfe von isotoptenmarkiertem caged-GTP konnten die Phosphatbanden in den IR-Spektren, insbesondere die γ -Phosphatbande, zugeordnet werden [16]. Damit steht jetzt ein neuer methodischer Ansatz zur Verfügung, mit dem sowohl die intrinsische als auch die GAP (G-aktivierende Protein)-katalysierte GTPase-Reaktion zeitaufgelöst auf der atomaren Ebene untersucht werden kann.

Durch Einsatz von caged-ATP beziehungsweise caged- Ca^{2+} wird der molekulare Mechanismus der Ca^{2+} -ATPase untersucht [17, 18]. Weitere Beispiele sind die Redoxreaktionen der Cytochrom- und Chinol-Oxidase, die mit dem caged-Elektronendonator Riboflavin induziert werden [19] und der Acetylcholinrezeptor, der mit caged-Carbamoylcholin angeregt wurde [20].

Literatur

Ein ausführliches Verzeichnis ist beim Autor erhältlich

- [1] Braiman, M.S., and Rothschild, K. (1988): *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 17, 541-570
- [2] Gerwert, K. (1993): *Current Opinion Structural Biology* 3, 769-773
- [3] Griffith, P., *Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy* Wiley, New York (1975)
- [4] Siebert, F., Mäntele, W., and Gerwert, K. (1983): *Eur. J. Biochemistry* 136, 119-127
- [5] Gerwert, K., Souvignier, G. and Hess, B. (1990): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9774-9778
- [6] Heßling, B., Souvignier, G., and Gerwert, K. (1993): *Biophysical J.* 65, 1929-1941
- [7] Uhlmann, W., Becker, A., Taran, C., and Siebert, F. (1991): *Applied Spectroscopy* 45, 390-397

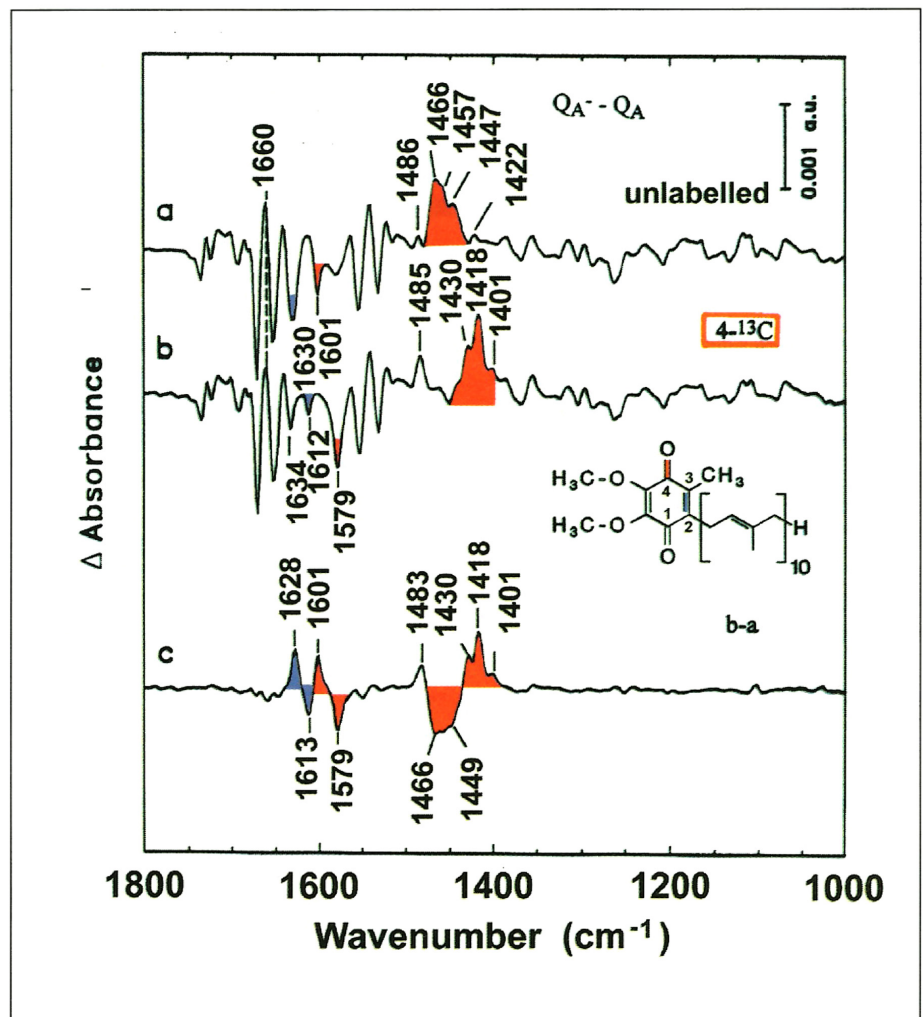


Abb. 5: $Q_A^- - Q_A$ -Differenzspektren von photosynthetischen Reaktionszentren (*Rb. sphaeroides*). In A ist die unmarkierte und in B die mit $4-^{13}C$ markierte Ubichinon rekonstituierte Probe gezeigt. In C ist die Doppeldifferenz zwischen A und B wiedergegeben. Man erkennt die Verschiebung der 2,3-C=C von 1628 cm^{-1} nach 1613 cm^{-1} , die ungewöhnlich niedrige Frequenz der 4-C=O bei 1601 cm^{-1} , die sich nach 1579 cm^{-1} verschiebt. Die 4 C-O-Bande verschiebt sich von 1466/1447 cm^{-1} nach 1430 cm^{-1} /1418 cm^{-1} .

- [8] Rammelsberg, R., Heßling, B., Chorogiewski, H. and Gerwert, K.: *Applied Spectroscopy: in the press*
- [9] Brudler, R., de Groot, H.J.M., van Liemt, W.B.S., Steggerda, W.F., Esmeijer, R., Gast, P., Hoff, A.J., Lugtenburg, J., Gerwert, K. (1994): *EMBO J.* 13, 5523-5530
- [10] Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M., and Henderson, R. (1996): *J. Mol. Biol.* 259, 393-421
- [11] Je Coutre, J., Tittor, J., Oesterhelt, D., Gerwert, K. (1995): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4962-4966
- [12] Je Coutre, J., and Gerwert, K. (1996): *FEBS Letters* 398, 333-336
- [13] Fahmy, K., Siebert, F., and Sakmar, T.P. (1994): *Biochemistry* 33, 9753-9761
- [14] Mäntele, W. (1993): *TIBS* 18, 197-202
- [15] Brudler, R., de Groot, H.J.M., van Liemt, W.B.S., Gast, P., Hoff, A.J., Lugtenburg, J., and Gerwert, K. (1995): *FEBS Letters* 370, 88-92
- [16] Gerwert, K., Cepus, V., Scheidig, A., Goody, R.S. (1994): *Time Resolved Vibrational Spectroscopy* VI. Lau, A., Siebert, F., Werncke, W., (eds.) Springer-Verlag, Berlin, 185-187
- [17] Barth, A., Kreutz, W., and Mäntele, W. (1991): *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 115-123
- [18] Troullier, A., Gerwert, K., and Dupont, Y. (1996): *Biophysical Journal*, in the press

- [19] Lübken, M., and Gerwert, K. (1996): *FEBS Letters* 397, 303-307

- [20] Görne-Tschelnokow, U., Hucho, F., Naumann, D., Barth, A., and Maentele, W. (1992): *FEBS Lett.* 2, 213-217

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Klaus Gerwert
Ruhr-Universität Bochum
Fakultät für Biologie
Lehrstuhl für Biophysik
D-44780 Bochum
Tel.: 0234-7004461
Fax: 0234-7094238

Habilitierte stellen sich vor

Transposonen bei Hyphenpilzen:

Struktur, Funktion und Anwendung

Frank Kempken, Lehrstuhl für Allgemeine Botanik, Ruhr-Universität Bochum

► Transposonen sind mobile genetische Elemente, die nicht an einen bestimmten Genomort gebunden sind. Durch Exzision und Integration an neue Genorte verändern sie den strukturellen Aufbau eines Genoms. Liegt die Integrationsstelle in einem Bereich, der für ein Gen kodiert, wird auch die Genexpression und damit die Merkmalsausbildung beeinflusst. Die bei Eukaryonten vorkommenden Transposonen werden in zwei Klassen eingeteilt: Elemente der Klasse I transponieren über ein RNA-Intermediat mit Hilfe einer Reversen Transkriptase,

sen Laborstämmen keine Transposonen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde für den Discomyceten *Ascobolus immersus* schon in den achtziger Jahren genetische Instabilität beobachtet [3], der erste Hinweis auf die Existenz von transponierbaren Elementen.

Für die Identifizierung von Transposonen in Hyphenpilzen wurde daher zum einen *Ascobolus immersus* verwendet, zum anderen ein biotechnologisch relevanter Pilz, *Tolypocladium inflatum*, der Produzent des Immunsuppressivums Cyclosporin.

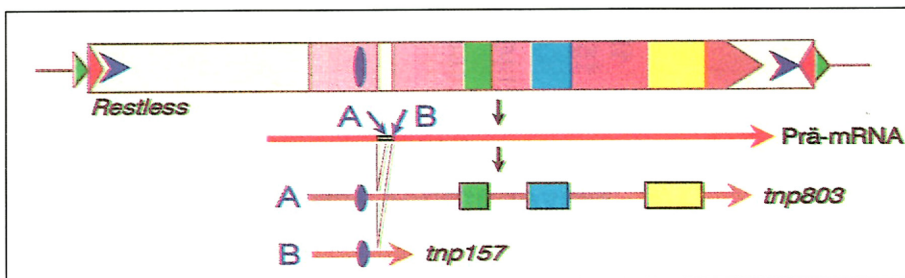


Abb. 1: Alternatives Spleißen von Restless. Schematische Darstellung des Transposons Restless (oben), darunter das Primärtranskript (Prä-mRNA, roter Pfeil) und je nach Verwendung der beiden 3'-Spleißstellen (A, B) tnp803 oder tnp157.

Erläuterung der Symbole: grüne Dreiecke: „target site duplications“, (TSD); rote Dreiecke: terminale, invers repetitive Sequenzen (TIR); blaue Pfeile: subterminale kurze Wiederholungssequenzen; offener Pfeil mit rotem Farbverlauf: offener Leserahmen, von Intron (hellgelb) unterbrochen; blaues Oval: DNA-Binde-Motiv; grünes, blaues und gelbes Rechteck: Konsensus-motive von hAT-Transposasen;

Klasse II-Elemente sind auf der DNA-Ebene mittels einer Transposase durch Exzision und Reintegration mobil [1, 2].

Zu Beginn der neunziger Jahre waren für alle wichtigen Organismengruppen Transposonen nachgewiesen worden, allerdings mit Ausnahme der Hyphenpilze; gerade diese sind aber für die Biotechnologie und als Krankheitserreger bei Pflanzen, Tieren und dem Menschen von großer Bedeutung. Außerdem bietet die Verwendung von Hyphenpilzen wegen ihrer relativ kleinen Genome deutliche Vorteile für bestimmte Untersuchungen, zum Beispiel bei der Analyse des Einflusses von Transposonen auf die Genomstruktur und Organisation. Die üblicherweise verwendeten Laborstämme der klassischen Untersuchungsobjekte *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* erwiesen sich jedoch als genetisch sehr stabil, und tatsächlich wurden in die-

Nachweis von repetitiven Sequenzen in Hyphenpilzen

Transposonen sind meist in größeren Kopienzahlen im Genom vorhanden und werden daher zu den repetitiven DNA-Elementen gezählt. Die Charakterisierung repetitiver DNA war daher ein erster Schritt zur Identifizierung von Transposonen in Hyphenpilzen, da zum Beispiel heterologe Sonden nicht zur Verfügung standen [4, 5]. Da der Gehalt an repetitiven Sequenzen in Hyphenpilzen insgesamt relativ gering ist und die meisten Gene nur einmal im Genom vorkommen, war davon auszugehen daß – abgesehen von den vermuteten Transposonen – lediglich die rDNA-Gene repetitiv vorliegen. Bei der differentiellen Hybridisierung von Lambda-Genbanken mit *Ascobolus*- und *Tolypocladium*-DNA enthielten 6 % Lambda-Klone repetitive

Sequenzen, zumeist rDNA-Gene, und 0,5 bis 1% der Lambda-Klone die gesuchten nicht-ribosomalen repetitiven DNA-Spezies [6, 5]; diese wurden daraufhin überprüft, ob es sich bei ihnen tatsächlich um Transposonen handelt. Dabei wurde unter anderem aus *Ascobolus immersus* ein Retroelement (unveröff. Daten) und aus dem Hyphenpilz *Tolypocladium inflatum* (ATCC34921) das Klasse II-Transposon Restless identifiziert [7].

Struktur des Ac-ähnlichen Transposons Restless aus Tolypocladium inflatum

In einem Lambda-Klon, der repetitive DNA aus *T. inflatum* enthielt, wurde eine 4097 Bp große Insertion identifiziert, die von 20 Bp-langen terminalen invers repetitiven Sequenzen (TIR) flankiert wird (Abb. 1). Im Genom des ATCC34921-Stammes kommen etwa 15 Kopien dieser Sequenz vor. Die Elemente werden von 8 Bp-langen sogenannten „target site duplications“ (TSD) flankiert, wie sie bei Transposonen als Folge des Integrationsprozesses entstehen. Damit wies das repetitive Element die strukturellen Merkmale von Transposonen auf. Durch die Sequenzanalyse wurde ein großer, von einem Intron unterbrochener Leserahmen identifiziert, dessen abgeleitete Aminosäure-Sequenz konservierte Sequenzmotive aufweist, die typisch für Transposasen der sogenannten hAT-Familie sind. Hierzu werden eine Reihe von Transposonen gezählt, die gemeinsame Eigenschaften aufweisen [8], wie kurze, teilweise konservierte TIR oder die bei der Integration in die genomische DNA hervorgerufene acht Basenpaare lange TSD. Zu den bekanntesten Vertretern der hAT-Familie gehört das Transposon Activator (Ac) aus Mais [9]. Aufgrund der strukturellen Organisation und der Sequenzhomologien des in *T. inflatum* gefundenen Elementes handelt es sich ganz offenbar um ein Transposon, dem wir den Namen Restless gaben [7]. Es unterscheidet sich von allen anderen mittlerweile für Hyphenpilze beschriebenen Transposonen, die entweder Klasse I-Elemente darstellen oder zur Tc1/Mariner-Gruppe gehören [10].

Funktionsanalyse von Restless

Wie bereits erwähnt, ließen Sequenzvergleichen darauf schließen, daß das Transposon Restless für ein Genprodukt kodiert, das die Funktion einer Transposase hat. Obwohl die Aminosäuresequenzen von Transposasen recht unterschiedlich sind, lassen sich bei denen der hAT-Familie drei konservierte Sequenzmotive erkennen, die auch bei Restless gefunden wurden. Als erster