

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

Untersuchung von Interaktionen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des humanen NPY5-Rezeptors mit Hilfe von Reflektometrischer Interferenzspektroskopie

Dipl.-Chem. Cornelia Hänel

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen

Auf der Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen

Tel. 07071-29-74667

cornelia.haenel@ipc.uni-tuebingen.de www.barolo.ipc.uni-tuebingen.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 209

Poster

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion. Diese in der Zellmembran integrierten Proteine vermitteln eine Vielzahl einlaufender äußerer Signale, so dass die Zelle angemessen auf Veränderungen reagieren kann.

Fehlfunktionen signalübertragender G-Proteine tragen zu Krankheiten wie Cholera, Keuchhusten, Krebs, Alzheimer, Parkinson oder Diabetes bei. Medikamente, die auf die Regulation eines bestimmten G-Protein-gekoppelten Rezeptors Einfluß nehmen können, sind daher von großem Interesse.

Es wurde hier als Modellsystem für den Nachweis der Interaktionen von GPCRs mit den entsprechenden Targets der NPY-Rezeptor und das Neuropeptid Y, welches zur Familie der Pankreas-Peptide zählt, verwendet. NPY ist das im Gehirn am weitesten verbreitete Neuropeptid. Neben einer Vielzahl von Funktionen, die nicht im Zusammenhang mit der Regulierung der Nahrungsaufnahme stehen, ist es das potenteste orexigene Signal, d.h. es ist das stärkste Appetit-erzeugende Stimulans. Außerdem ist es für die Regulierung des Blutdrucks verantwortlich [1].

Die Schwierigkeit der Charakterisierung von Interaktionen membrangebundener Rezeptoren mit den jeweiligen Rezipienten ist ihre geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln und der damit notwendige Zusatz von stabilisierenden Tensiden. Außerdem kann eine optische Methode zur Messung dieser stark streuenden Proben aus Membranpräparationen problematisch sein.

Ein weiteres Problem bei der Messung von GPCRs ist die Markierung der Proben mit zum Beispiel Fluoreszenzmarkern, die die Wechselwirkung der Targets mit den Rezeptoren nachhaltig beeinflussen kann. Auch im Hinblick auf ein späteres Screening wäre eine zeitaufgelöste, markierungsfreie Methode zur Charakterisierung der Interaktionen von Vorteil.

Die bei den vorliegenden Messungen verwendete markierungsfreie, optische Transduktionsmethode der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie RIfS beruht auf der Mehrfachreflexion von Weißlicht an dünnen Schichten. Aus dem Interferenzmuster der reflektierten Strahlen wird die Änderung der optischen Schichtdicke zeitaufgelöst gemessen und es kann so zum Beispiel die Bindung eines Rezeptors an einen oberflächengebundenen Liganden verfolgt werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 3 pg/mm² Protein und ist somit für die Detektion der Interaktionen von Proteinen geeignet [2].

Am Beispiel der Wechselwirkung zwischen dem Neurotransmitter NPY5 [1] mit dem NPY-Rezeptor wurde die Möglichkeit zur markierungsfreien zeitaufgelösten Messung dieser Interaktion demonstriert. Hierzu wurde das aus 36 Aminosäuren bestehende Peptid an Position 14 durch Austausch mit einem Cysteinrest modifiziert und über einen Maleinimido-capronsäure-N-Succinimidylester (EMCS) an die Oberfläche immobilisiert. Die Bindung eines rekombinanten, aus einer Membranpräparation gewonnen NPY5-Rezeptors an das immobilisierte Neuropeptid erfolgte aus einer unverdünnten und unaufgearbeiteten Lösung in einer Konzentration von 200nM und wurde online verfolgt. Durch eine Inhibierung des Rezeptors in Lösung mit einer Konzentration von der 10-fachen K_D an NPY5 konnte die Spezifität der Bindung nachgewiesen werden.

Zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen der Membranpräparation mit der Transduceroberfläche wurden diese mit einem Polyethylenglykolderivat modifiziert. Dadurch konnten die unspezifischen Wechselwirkungen des NPY-Rezeptors mit der Oberfläche gegenüber den herkömmlichen Aminodextranoberflächen auf ein akzeptables Maß reduziert werden [3].

Literatur

- [1] Beck-Sickinger, A. und Jung, G (1995) *Biopolymers (Peptide Science)*., **37**, 123-142.
- [2] Schmitt, H-M.;Brecht, A.; Piehler, J; Gauglitz, G. (1997) *Biosensors & Bioelectronics.*, **11**, 809-816
- [3] Piehler, J; Brecht, A.; Valiokas, R.;Liedberg, B.;Gauglitz, G. (2000); *Biosensors & Bioelectronics.*, **15**, 473-481

- [a] <http://www.barolo.ipc.uni-tuebingen.de>