

Detektion von Protein –Wechselwirkungen mit Hilfe zeitaufgelöster UV -Fluoreszenzspektroskopie ein neues Verfahren zur Analyse von Proteinchips

Sven Peters, Dr. Peter Schellenberg, IPHT, Abtlg. NanoBiophotonik, vorname.name@ipht-jena.de
Paulius Grigaravičius, FLI-Leibniz

Nach der Etablierung der DNA-Chips war ein weiterer Schritt die Entwicklung von Protein Microarrays. Allerdings sind Proteine im Vergleich zu Nukleinsäuren sowohl im Hinblick auf Funktionalität wie auf Struktur weitaus heterogenere Biomoleküle, was eine Systematisierung der Technik erschwert. Insbesondere im Hinblick auf die Markierung der Proteinbindungspartner ergeben sich spezifische Probleme. Da die Funktionalität von Proteinen von der Struktur determiniert ist, kann eine strukturelle Änderung der Proteine infolge Markierung mit einem Fluorophor zu einer Veränderung der Funktionalität führen.

In diesem Praktikumsversuch wird ein neues labelfreies Verfahren zur Detektion von Protein -Protein und Protein -Ligand -Wechselwirkungen verwendet, wobei die mit einer Markierung verbundenen Nachteile vermieden werden. Die Anwendbarkeit der Methode auf die Analyse von Proteinchips wird untersucht. Zur Detektion der Protein -Protein und Protein -Ligand Wechselwirkungen macht man sich die intrinsische UV-Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren TRP und TYR zunutze. Deren Fluoreszenzlebensdauer ist von der Umgebung der jeweiligen Aminosäure abhängig und entsprechend kann die Zerfallszeit durch Bindungsergebnisse beeinflusst werden. Auch spezifische Prozesse wie Förster Resonance Energy Transfer (FRET) oder Quenching können die Lebensdauern verändern.

Bei den Experimenten kommt ein frequenzverdreifachter Ti:Sa –Laser zum Einsatz, der Lichtpulse mit einer Lebensdauer von ca 100 fs bei Wellenlängen um 290 nm emittiert. Die Detektion der Fluoreszenzabklingzeit erfolgt entweder mit Time Correlated Single Photon Counting oder mit einer Streakkamera.

Die Einzelheiten zum Versuch und zusätzliche Literatur zu den Geräten wird im Rahmen einer Vorbesprechung ausgegeben. Es wird dringend angeraten, sich möglichst frühzeitig mit den Betreuern in Verbindung zu setzen !

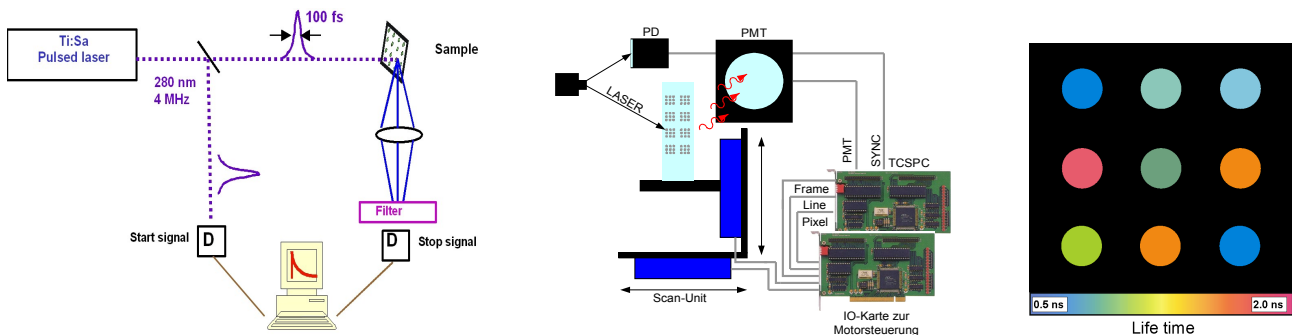


Abb.: Typische Bestandteile des experimentellen Aufbaus, Links Apparatur, Mitte Scaneinheit, Rechts Lebensdauer-Image

Literatur

1. Striebel, H. M.; Schellenberg, P.; Grigaravičius, P.; Greulich, K. O., Readout of protein microarrays using intrinsic time resolved UV fluorescence for label-free detection. *Proteomics* 2004, 4 (6), 1703-1711.
2. Templin, M. F.; Stoll, D.; Schrenk, M.; Traub, P. C.; Vohringer, C. F.; Joos, T. O., Protein microarray technology. *Drug Discovery Today* 2002, 7 (15), 815-822.
3. Wilson, D. S.; Nock, S. Recent developments in protein microarray technology. *Angewandte Chemie* 2003, 115, 510-517.