

Mechanismus der Nukleotid-vermittelten Inhibierung mitochondrialer Entkopplerproteine

Zusammenfassung

Eine genaue Regulation des Protonentransports in Mitochondrien ist essentiell für physiologische Prozesse wie ATP-Synthese, Wärmeproduktion durch mitochondriales Entkopplerprotein 1 (UCP1) und wahrscheinlich auch für die Regulation der Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) durch das Entkopplerprotein 2 (UCP2). Die in die Regulation des Protonentransports involvierten Proteine gewinnen daher zunehmend als Targets für Pharmaka in der Therapie von Adipositas sowie verschiedener entzündlicher, neurodegenerativer und ischämischer Krankheiten an Bedeutung. Wir und andere Forschergruppen haben bereits gezeigt, dass der UCP1/UCP2-vermittelte Protonentransport durch Purinnukleotide (PN) gehemmt wird. Allerdings sind die molekularen Grundlagen der Inhibierung noch nicht verstanden. Es ist darüber hinaus ein Rätsel, wie UCP *in vivo* funktioniert, obwohl ATP in sehr hohen (millimolaren) Konzentrationen in den Mitochondrien vorhanden ist.

Ziel dieses Projekts ist eine quantitative Charakterisierung der Bindung zwischen UCP und PN mit zwei verschiedenen Verfahren: (i) mit elektrophysiologischen Messungen der Membranleitfähigkeit und (ii) mit der hochauflösenden Rasterkraftmikroskopie („atomic force microscopy“, AFM). Zwei Modi des AFM, „topographical“ und „recognition“ (TREC), kommen dabei zum Einsatz. Die Funktionalisierung des Cantilievers mit PN ermöglicht die Identifizierung von Protein-Nukleotid-Bindungen bei gleichzeitiger Visualisierung des Zielproteins. Die Daten werden mit elektrophysiologischen Messungen verglichen, die sowohl die Bindung als auch die Inhibierung des Proteins in der Anwesenheit von PNs registrieren. Das gut etablierte Modell der Lipiddoppelschicht wird zum ersten Mal für detaillierte Studien der Kinetik von PN Bindung und Inhibierung in Abhängigkeit von pH, Osmolarität und Transmembranpotential eingesetzt. Verschiedene Purinnukleotide (Tri-, Di-, Monophosphate) werden vergleichend untersucht. Die kritische Analyse der Resultate beider Methoden wird vor dem Hintergrund der kürzlich veröffentlichten NMR-Struktur des UCP2-Proteins neue Erkenntnisse über die Struktur der Entkopplerproteine sowie den Mechanismus der Protein-Nukleotid-Bindung vermitteln. Letzteres schafft Voraussetzungen für neue pharmakologische Ansätze im Kampf gegen die oben erwähnten Krankheiten.