

Intrazelluläre Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Malte Drescher

Methoden zur Aufklärung nativer Konformationen biologischer Makromoleküle in lebenden Zellen sind sehr gefragt – und rar. Jüngste methodische Entwicklungen erlauben jetzt intrazelluläre Abstandsmessungen mit Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.



◆ Die wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung biologischer Makromoleküle in vitro sind Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie. Beide liefern die aufgelösten Strukturen, die unsere Vorstellung von diesen Molekülen geprägt haben. Für Fragen, die diese beiden Techniken allein nicht beantworten können, ist Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) eine leistungsstarke Alternative.¹⁾ Ortsspezifische Spinmarkierung (site-directed spin labeling, SDSL), oft mit Nitroxiden, macht diamagnetische Makromoleküle, also solche ohne ungepaarte Elektronen, wie Proteine, Lipide, RNA oder DNA der ESR-Spektroskopie zugänglich.²⁾

In den letzten Jahren hat hier besonders die Möglichkeit, Abstände zwischen Spinmarkierungen zu

messen, für Aufsehen gesorgt. Das mit Abstand verbreitetste Verfahren dafür ist Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz (DEER),^{3,4)} gelegentlich auch als PELDOR für pulsed electron double resonance bezeichnet (siehe Kasten).

In-vitro-ESR-Experimente sind etabliert und verbreitet. Aber erst jüngste methodische Entwicklungen erlauben Abstandsbestimmungen zwischen Spinmarkierungen in der Zelle. Diese neuartige Methode ist ein wichtiges Bindeglied zwischen der klassischen molekularen biophysikalischen Chemie und der Systembiologie.

Gegenüber intrazellulären NMR-Experimenten hat intrazelluläre ESR-Spektroskopie zwei wesentliche Vorteile:

- ESR-Spektroskopie weist pro Spin eine größere Empfindlichkeit auf, daher sind deutlich niedrigere Konzentrationen möglich.
- ESR-Spektroskopie detektiert nur ungepaarte Elektronen, die selten vorkommen, da chemische Bindung gerade auf der Bildung von Elektronenpaaren beruht. Diese Einschränkung führt bei ortsspezifischer Spinmarkierung dazu, dass die Methode selbst in Zellen praktisch hintergrundfrei funktioniert.

Darüber hinaus profitiert die Methode davon, dass sie im Gegensatz

zur NMR-Spektroskopie keinem Größenlimit unterliegt. Dies ist insofern von Bedeutung, da das untersuchte Makromolekül mit hoher Wahrscheinlichkeit mit großen, unbeweglichen Makromolekülkomplexen interagiert.

Spinmarker

◆ Eine Voraussetzung für ESR-Untersuchungen sind paramagnetische Zentren. Diese lassen sich als Spinmarker einbringen. Besonders verbreitete Spinmarker sind Nitroxide der allgemeinen Form $\cdot\text{O-NR}_1\text{R}_2$. Das ungepaarte Elektron ist dabei über die N-O-Bindung delocalisiert und durch Methylgruppen sterisch abgeschirmt. Andere Teile des Moleküls können so mo-

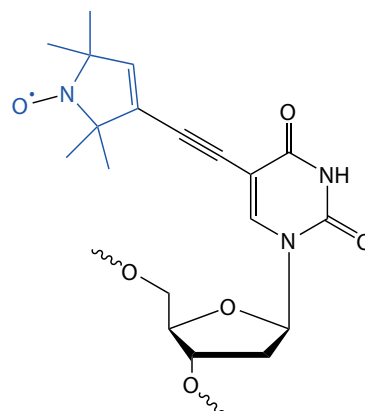


Abb. 1. Spinmarkiertes Nucleotid zum Einbau in eine DNA-Sequenz während der Festphasensynthese.

◆ QUERGELESEN

- » Ortsspezifische Spinmarkierung macht diamagnetische Makromoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren für die Elektronenspin-Resonanz(ESR)-Spektroskopie zugänglich.
- » Mit Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz-Experimenten lassen sich die Abstände der Spinmarker in einem Makromolekül bestimmen.
- » Für intrazelluläre ESR-Messungen werden spinmarkierte Moleküle in Zellen injiziert. Solche Experimente liefern beispielsweise Informationen über die Struktur von DNA in Zellumgebung.

difiziert werden, dass der Spinmarker an das zu untersuchende Makromolekül bindet. Ist dieses Makromolekül diamagnetisch, also ohne weiteres paramagnetisches Zentrum, erzeugt allein der Spinmarker das ESR-Spektrum. Dies ist beispielsweise bei DNA-Sequenzen der Fall. Über Festphasensynthese kann ein spinmarkiertes Nukleotid in DNA-Sequenzen eingebaut werden (Abbildung 1).

Die Grundlage der Abstandsmessungen zwischen solchen Spinmarkierungen ist deren Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die über $1 \cdot r^{-3}$ vom Abstand r abhängt. Darüber hinaus ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung jedoch auch vom Win-

kel zwischen externem Magnetfeld und Spin-Spin-Verbindungsvektor abhängig. Schnelle Orientierungsänderung des Spin-Spin-Vektors, also beispielsweise schnelle rotatorische Diffusion des doppelt spinmarkierten Makromoleküls, mittelt über alle Orientierungen und damit die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu null. Deshalb werden Abstandsmessungen nahezu ausschließlich in immobilisiertem Zustand durchgeführt, nämlich an einem Schnappschuss der makromolekularen Konformationen, der durch Schockgefrieren erhalten wird. Dadurch eröffnet sich zudem die Möglichkeit, die Temperatur für die ESR-Relaxationszeiten zu

optimieren. In solchen schockgefrorenen Proben beobachtet man eine zufällige Verteilung der Molekülorientierungen, so dass das dipolare Spektrum aus der Überlagerung aller Orientierungen des Spin-Spin-Vektors besteht.

Gepulste Experimente

◆ Um die Dipol-Dipol-Wechselwirkung von konkurrierenden Wechselwirkungen zu trennen, eignen sich gepulste Experimente.⁵⁾ Mit Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz, DEER, sind Abstandsverteilungen zwischen einem und zehn Nanometern messbar, so dass auch flexible Struktu-

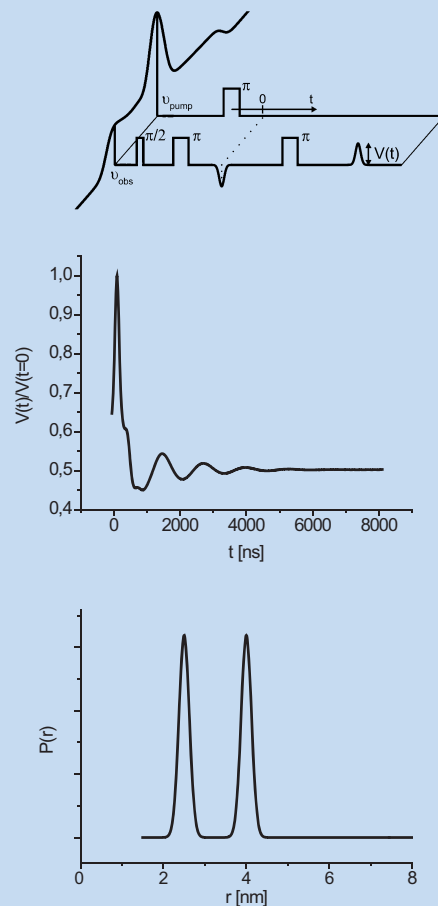
◆ Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz

Die Pulssequenz für das Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz-(DEER)-Experiment zeigt die obere Abbildung. Das Nitroxidspektrum (schwarz) in gefrorener Lösung zeigt bei einer Messfrequenz von etwa 10 GHz eine spektrale Breite von etwa 180 MHz. Deshalb ist es möglich, spektral nicht überlappende Pulse bei zwei Frequenzen einzustrahlen, welche die in der Probe vorhandenen Spins in A- (Beobachterspins, blau) und B-Spins (gepumpte Spins, rot) aufteilen. Dementsprechend adressiert die Pulssequenz bei ν_{obs} nur die A-Spins, der Puls mit der Frequenz ν_{pump} klappt nur die B-Spins. Mit der Beobachter-Frequenz wird zunächst eine Zwei-Puls-Hahn-Echo-Sequenz eingestrahlt; das resultierende Echo ist mit negativer Phase dargestellt. Ein dritter Puls mit gleicher Frequenz führt zu einem refokussierten Echo der A-Spins.

Um die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu den B-Spins zu messen, wird zwischen den beiden π -Pulsen der Beobachtersequenz ein Pump-Puls eingestrahlt, der die B-Spins invertiert. Diese Invertierung ändert das lokale Magnetfeld am Ort der A-Spins. Strahlt man

nun den Pump-Puls zu verschiedenen Zeiten t ein, wird die Intensität des refokussierten Echos $V(t)$ mit der Frequenz der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen A- und B-Spin, ω_{dd} moduliert. Die Auftragung der Intensität $V(t)$ gegen die Zeit t nach einer Korrektur bezüglich der intermolekularen Wechselwirkungen bezeichnet man als Formfaktor. (Abbildung Mitte, sichtbar ist die Modulation des Signals aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen A- und B-Spins.)

Die intramolekulare Abstandsverteilung erhält man aus der Analyse dieses Formfaktors. Da es sich um ein zumindest geringfügig unterbestimmtes Problem handelt, ist für einen modellfreien Ansatz die Tikhonov-Regularisierung zu verwenden, ein mathematisches Verfahren, das über die Wahl eines Regularisierungsparameters einen Kompromiss zwischen Glätte der Abstandsverteilung (Abbildung unten) und Anpassung an die (verrauschten) experimentellen Daten optimiert.



Oben: Pulssequenz für ein DEER-Experiment; schwarz: Nitroxidspektrum, blau: Beobachterfrequenz, rot: Pumpfrequenz. Die Intensität $V(t)$ des refokussierten Echos ist mit der Dipol-Dipol-Wechselwirkungsfrequenz zwischen A- und B-Spins moduliert. Mitte: Simulierter Formfaktor, bei dem die normierte Echointensität $V(t)/V(t=0)$ über der zeitlichen Position des Pumpimpulses t aufgetragen ist.

Unten: Zugrundeliegende Abstandsverteilung.

ren oder parallel vorliegende Konformationen untersucht werden können.

Für die komplementäre Technik FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), die zur Abstandsmessung in biologischen Makromolekülen weit verbreitet ist, sind zwei unterschiedliche, vergleichsweise große Chromophore erforderlich, die darüber hinaus noch entsprechend dem erwarteten Abstand auszuwählen sind. Dagegen kommen ESR-Abstandsmessungen mit zwei kleinen, identischen Spinmarkern aus, die über einen großen Abstandsbereich präzise sind.

DEER-Experimente gibt es in vitro bereits seit über zehn Jahren. Abstandsmessungen in Zellen hingegen haben erst die jüngsten methodischen Entwicklungen möglich gemacht. Über das erste erfolgreiche intrazelluläre DEER-Experiment an einem Protein, dem Ubiquitin, berichteten Igarashi et al. im Jahr 2010,⁶⁾ kurz darauf wurde die Technik auf RNA- und DNA-Modellsysteme übertragen.^{7,8)}

Eine der größten Schwierigkeiten bei intrazellulären DEER-Experimenten in Kombination mit Nitroxid-Markierung liegt in der Reduktion des Nitroxids in der zellulären Umgebung und der daraus resultierenden kurzen Lebensdauer der Spinmarkierung. Da dieser Reduktionsprozess enzymatisch ist,⁹⁾ führen geringe Änderungen an der Struktur des Spinmarkers zu deutlichen Unterschieden in der Halbwertszeit in der Zelle. So weist der in Abbildung 1 gezeigte Spinmarker eine Halbwertszeit von etwa 30 Minuten auf, während es das Ana-

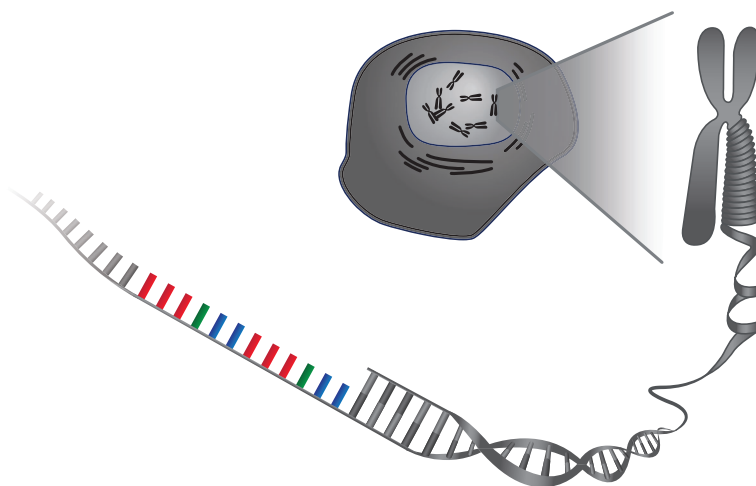


Abb. 2. Telomere (griechisch: End-Teile) sind die aus repetitiver DNA und assoziierten Proteinen bestehenden Enden der Chromosomen. Sie sind die für die Stabilität von Chromosomen wesentlichen Strukturelemente der DNA. Für die Stabilisierung ist die Sekundärstruktur des einzelsträngigen 3'-Überhangs wichtig.

logon mit einem Sechsring auf eine Halbwertszeit von lediglich einer Minute bringt.

Frosch-Eizellen

◆ Für intrazelluläre ESR-Spektroskopie werden spinmarkierte Moleküle durch eine Mikroinjektion in das Cytoplasma eingebracht. Eine solche Mikroinjektion ist grundsätzlich an einer Reihe von Zelltypen durchführbar. Um jedoch den experimentellen Aufwand und damit die Anzahl der zu präparierenden Zellen so gering wie möglich zu halten, wählt man für intrazelluläre ESR-Spektroskopie möglichst große Zellen. Ideal für diesen Zweck sind die Eizellen des Glatten Krallenfroschs (*Xenopus laevis*), da aufgrund ihrer Größe (zirka 1,2 mm Durchmesser und 1 μ L Volumen) nur etwa 60 Zellen für ein ESR-Experiment erforderlich sind.

Die Eizellen des Glatten Krallenfroschs dienen für unterschiedliche biologische, biochemische und biophysikalische Experimente in vielen Laboren. Für die Mikroinjektion für andere Anwendungen existieren vergleichsweise unkomplizierte Protokolle, die für die intrazelluläre ESR-Spektroskopie modifiziert und eingesetzt werden können. Für die Aufklärung von DNA-Konformationen werden bis zu etwa 50 nL Stammlösung in die animale, dunkel pigmentierte Hemi-sphäre der Eizellen im Stadium VI, in dem kernähnliche Bedingungen vorherrschen, injiziert.

DNA-Quadruplexe

◆ Um nachzuweisen, dass sich intrazelluläre DEER-Messungen auf DNA-Sequenzen anwenden lassen, hat unsere Gruppe zunächst eine mit zwei Nitroxiden

KARRIERESERVICE

GDCh

STELLENMARKT

GDCh-Karriereservice
und Stellenmarkt
Varrentrappstraße 40-42
60486 Frankfurt am Main

Tel. 0 69/7917-665
Fax 0 69/7917-322

E-Mail karriere@gdch.de
stellenmarkt@gdch.de

markierte DNA-Doppelhelix aus sieben Basenpaaren injiziert. Kontrollexperimente in wässriger Lösung ergaben den für eine B-DNA-Struktur erwarteten und in vitro gefundenen Spin-Spin-Abstand von 3,2 nm.⁸⁾ Dieser Abstand wurde auch in der Zelle detektiert. Ähnliche Experimente haben die Arbeitsgruppen von Thomas Prisner und Volker Dötsch in Frankfurt zeitgleich an einer Sequenz mit zwölf Basenpaaren durchgeführt.⁷⁾

Intrazelluläre Abstandsmessungen an Nukleinsäuren sind besonders für die Untersuchung der Struktur polymorpher Sequenzen von Bedeutung. Ein Paradebeispiel dafür sind DNA-Quadruplexe, die im Gegensatz zu DNA-Duplex-Strukturen viele Konformationen aufweisen, die sich in der Orientierung ihrer Einzelstränge oder der Anordnung der Schleifen unterscheiden. Gleichzeitig spielt die Bildung von Quadruplexen innerhalb der Telomere am Ende des Chromosoms (Abbildung 2) eine wichtige Rolle für dessen Schutz und für die Regelung des Zellzyklus. Die Wiederholeinheit des menschlichen Telomers $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ nimmt beispielsweise abhängig von der Art der koordinierten monovalenten Ionen völlig unterschiedliche Quadruplexkonformationen an. Diese ähnlich stabilen Konformationen können durchaus gleichzeitig vorliegen.¹⁰⁾ Auch in der Zelle bestätigen NMR-Daten koexistierende Konformationen, auch wenn eine Zuordnung bisher nicht gelang.¹¹⁾

Für ein intrazelluläres ESR-Experiment wurde diese menschliche Telomer-Sequenz $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ ortsspezifisch spinmarkiert und ungefaltete Sequenz in lebende Zellen injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten zeigte sich eine bimodale Abstandsverteilung, die Abstände entsprechen zwei koexistierenden Konformationen, nämlich der parallelen Propeller- und der antiparallelen Korbstruktur (Abbildung 3).¹²⁾

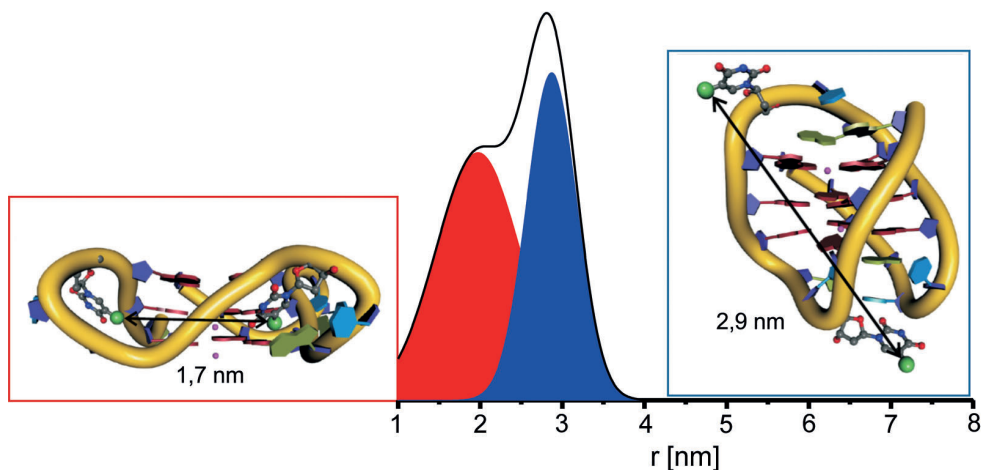


Abb. 3. Intrazelluläre Quadruplexkonformationen der menschlichen Telomersequenz. Die intrazelluläre ESR-Abstandsmessung startete 15 Minuten nach Injektion der ungefalteten Sequenz $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ in Eizellen des Glatten Krallenfroschs (*Xenopus laevis*). Die Abstandsverteilung zwischen den an den Positionen 5 und 11 angebrachten Spinmarkierungen (grüne Kugeln) weist auf eine Koexistenz der parallelen Propeller- (links, Abstand 1,7 nm) und der antiparallelen Korbstruktur (rechts, Abstand 2,9 nm) hin.¹²⁾

Ausblick

◆ Dieser erste Nachweis einer intrazellulären Faltung eines Makromoleküls mit ESR-Abstandsmessungen zeigt zugleich den Bedarf für weitere methodische Entwicklungen. So deuten beispielsweise Kontrollexperimente darauf hin, dass für das Quadruplex-Experiment 15 Minuten Inkubationszeit nicht ausreichen, um das Konformationsgleichgewicht zu erreichen. Deshalb sind jetzt Spinmarker zu entwickeln, die auch in der zellulären Umgebung stabil sind; ein Ansatz könnten Gadolinium-Marker sein. Alternativen zur Mikroinjektion, beispielsweise Elektroporation, werden die Anwendbarkeit der Methode auf weitere Zelltypen erweitern.

Malte Drescher, Jahrgang 1975, leitet eine Emmy-Noether-Gruppe im Bereich physikalische und biophysikalische Chemie an der Universität Konstanz. Dort ist er Mitglied im Vorstand der Graduiertenschule Chemische Biologie und im Zukunftskolleg. Malte.Drescher@uni-konstanz.de
www.uni-konstanz.de/drescher



Literatur und Anmerkungen

- 1) *EPR-Spectroscopy, Applications in Biology and Chemistry* (Hrsg.: M. Drescher, G. Jeschke), Springer Verlag, Heidelberg, 2012.
- 2) W. L. Hubbell, C. Altenbach, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1994, 4, 566.
- 3) A. D. Milov, A. B. Ponomarev, Y. D. Tsvetkov, *Chem. Phys. Lett.* 1984, 110, 67.
- 4) M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* 2000, 142, 331.
- 5) A. Schweiger, G. Jeschke, *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*, Oxford University Press, Oxford, 2005.
- 6) R. Igarashi, T. Sakai, H. Hara et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8228.
- 7) I. Krstic, R. Hänsel, O. Romainczyk, J. W. Engels, V. Dötsch, T. F. Prisner, *Angew. Chem.* 2011, 123, 5176.
- 8) M. Azarkh, O. Okle, V. Singh, I. T. Seemann, J. S. Hartig, D. R. Dietrich, M. Drescher, *Chembiochem*, 2011, 12, 1992.
- 9) M. Azarkh, O. Okle, P. Eyring, D. R. Dietrich, M. Drescher, *J. Magn. Reson.* 2011, 212, 450.
- 10) V. Singh, M. Azarkh, T. E. Exner, J. S. Hartig, M. Drescher, *Angew. Chem.* 2009, 121, 9908.
- 11) R. Hänsel, S. Foldynova-Trantirkova, F. Löhr et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 15761.
- 12) M. Azarkh, V. Singh, O. Okle, D. R. Dietrich, J. S. Hartig, M. Drescher, *ChemPhysChem* 2012, 13, 1444.

Der Autor bedankt sich bei Jörg Hartig und Daniel Dietrich und deren Mitarbeitern sowie bei Mykhailo Azarkh für die Zusammenarbeit. Christian Hintze, Marco Wassmer und Martin Spitzbarth haben die Abbildungen zu diesem Artikel erstellt. Dem Physikalischen Institut des KIT Karlsruhe sei für eine Geräteleihgabe gedankt, der DFG für die Unterstützung dieser Forschung (DR 743/2–1).