

# ESR-Spektroskopie zur Untersuchung der Struktur von Makromolekülen – Beitrag zur Aufklärung intrazellulärer Energieübertragung

Silvia Domingo Köhler und Malte Drescher

Fachbereich Chemie, Graduiertenschule Chemische Biologie und Zukunftskolleg, Universität Konstanz

Im Vergleich zur methodisch verwandten NMR (Kernspinresonanz)-Spektroskopie ist die ESR (Elektronenspinresonanz)-Spektroskopie sensitiver pro Spin. Allerdings sind für die Anwendung der ESR-Methode ungepaarte Elektronen notwendig. Aus diesem Grund wurde diese Methode vorwiegend zur Untersuchung radikalischer Reaktionen eingesetzt, bis in den neunziger Jahren W. Hubbel und Mitarbeiter die ortsspezifische Spinmarkierung einführen und damit das weite Feld der Untersuchung diamagnetischer Makromoleküle durch die ESR-Spektroskopie eröffneten. In Kombination mit der Messung von Spin-Spin-Abständen können Strukturinformationen des Moleküls gewonnen werden.

Im Folgenden soll anhand einer biophysikalischen Studie zur Aufklärung intrazellulärer Energieübertragung in gramnegativen Bakterien die Leistungsfähigkeit der ESR-Spektroskopie in Kombination mit ortsspezifischer Spinmarkierung demonstriert werden.

## Ortspezifische Spinmarkierung

Abstandsmessungen in der ESR-Spektroskopie beruhen auf dem Prinzip der Messung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Spins [1]. Um diese Methode auf diamagnetische Moleküle anwenden zu können, müssen Spinmarker an spezifische Positionen des Moleküls eingebracht werden [2,3], dann kann die makromolekulare Dynamik und Struktur selbst in komplexer Umgebung untersucht werden [4]. Für die ortsspezifische Spinmarkierung werden meist Nitroxide verwendet [5,6], die in der generellen Form  $O-NR^1R^2$  vorliegen, wobei das freie Elektron zwischen Stickstoff und Sauerstoff delokalisiert ist. Nitroxide haben sich bewährt, da sie einen geringen Einfluss auf die Konformation des zu untersuchenden Systems zeigen [7,8]. Für die Spinmarkierung eines Proteins wird über Mutagenese gezielt ein Cystein in die Aminosäuresequenz eingebaut [9]. Mit spezifischen Reagentien,

wie z.B. MTSL (1-oxyl-2,2,5,5-tetra-methyl-pyrroline-3-methyl-methanethiosulfonate), wird über eine Disulfidbindung eine Modifikation des Cysteins herbeigeführt. In Abbildung 1 ist die schematische Darstellung einer solchen Bindung innerhalb einer Aminosäuresequenz zu sehen. Der Spinmarker besitzt aufgrund der rotatorischen Freiheitsgrade um die Einfachbindungen des Linkers strukturelle Flexibilität.

Mit diesen spinmarkierten Makromolekülen sind durch ESR-Messungen folgende Parameter zugänglich:

- Umgebungscharakteristika wie Polarität, Lösemittel- oder Sauerstoffzugänglichkeit
- Dynamik auf Zeitskalen von Piko- bis Mikrosekunden und
- Abstände zwischen zwei Spinmarkern innerhalb des Makromoleküls oder intermolekulare Abstände einfach markierter Makromoleküle.

Das ESR-Spektrum eines Nitroxids zeichnet sich durch drei Linien aus, die aus der Hyperfeinwechselwirkung zwischen dem Elektron und dem Kernspin ( $I = 1$ ) des  $^{14}N$  entsteht. Aufgrund anisotroper Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkung ist das ESR-Signal der Nitroxide von der Orientierung des Moleküls bezüglich des äußeren Magnetfeldes abhängig. Rotatorische Bewegungen des Moleküls können spektral unterschieden werden. Abbildung 2 zeigt zwei Beispielspektren für ein gebundenes und ein ungebundenes Nitroxid. Aufgrund der Detektion mittels Lock-in-Technik werden ESR-Spektren oft (und auch hier) als erste Ableitung des Absorptionssignals abgebildet. Ist ein Spinmarker an ein

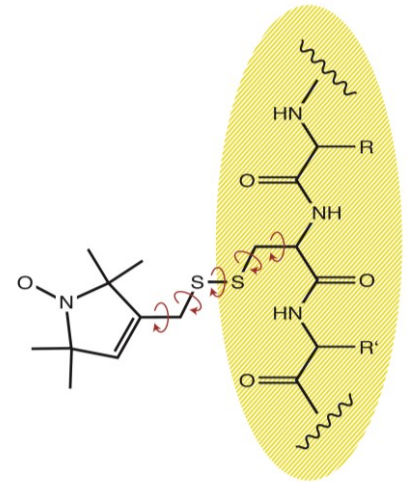


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Nitroxid-Spinmarkers gebunden an das Cystein einer beliebigen Aminosäuresequenz (gelb) (modifiziert aus [10]).

Protein gebunden, spielen verschiedene Komponenten der Rotationsbewegung eine Rolle: i) die Bewegung des Nitroxids aufgrund der Flexibilität der Seitenkette (siehe Abb. 1); ii) die Beweglichkeit des Sekundärstrukturelements und iii) rotatorische Diffu-

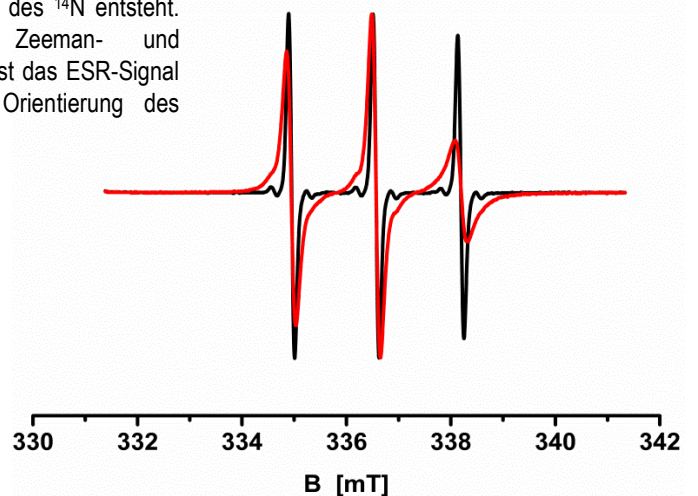


Abb. 2: ESR-Spektren eines ungebundenen Spinmarkers (schwarz) und eines Spinmarkers gebunden an ein Protein (TonB 59/69, siehe unten) (rot) in wässriger Lösung im X-Band bei ca. 9,4 GHz und  $T = 295$  K gemessen.

sion des Makromoleküls. Anhand quantitativer Auswertemethoden können die Rotationskorrelationszeiten in einem Intervall zwischen Piko- und Mikrosekunden ermittelt werden [11]. Über die Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten kann die Dynamik auch in Abhängigkeit von makromolekularen Interaktionen, z.B. Membranbindung, in porösen Materialien, etc., untersucht werden [12,13].

### ESR-Abstandsmessungen

Über Abstandsmessungen innerhalb eines Makromoleküls sind strukturelle Informationen zugänglich. Abstände zwischen paramagnetischen Zentren können in der gepulsten ESR über die Technik DEER (Double Electron Electron Resonance), auch als PELDOR (Pulsed Electron Double Resonance) bezeichnet, gemessen werden [14-17]. Der zugängliche Abstandsbereich liegt zwischen 1,8 nm und 6 nm für Membranproteine und bis zu 10 nm für deuterierte Proteine [17,18]. Diese Methode basiert auf der Messung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Elektronenspins, die proportional zu  $1/r^3$  vom Abstand und zusätzlich vom Winkel abhängt, der vom Verbindungsvektor zwischen den Spins und dem äußeren Magnetfeld eingeschlossen wird. Nitroxidmarker besitzen ein breites ESR-Spektrum, das es erlaubt, über eine spektrale Separation Spinmarker unabhängig voneinander zu adressieren. Dazu regen zwei Frequenzen (Beobachterfrequenz und Pumpfrequenz) des DEER-Experiments unterschiedliche Bereiche des ESR-Spektrums an. Dies hat den Vorteil, zwei identische Nitroxidmarker für die Spinmarkierung verwenden zu können. Im Vergleich zu FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) zwischen Akzeptor und Donor ist die Markierungsstrategie deshalb einfacher.

Eine schematische Darstellung der Vierpuls-DEER-Pulssequenz ist in Abbildung 3 zu sehen. Auf der Beobachterfrequenz  $\nu_{\text{obs}}$  folgt nach einer Hahn-Echo-Sequenz ein refokussierender Puls. Die Intensität des refokussierten Echos wird als Funktion von  $t'$  aufgenommen. Auf der Pumpfrequenz  $\nu_{\text{pump}}$  invertiert ein  $\pi$ -Puls zur Zeit  $t'$  die Spins in einem anderen spektralen Bereich. Durch die Dipol-Dipol-Kopplung zwischen den beiden Spins führt die Invertierung zu einer Modulation der Echointensität mit der Dipol-Dipol-Wechselwirkungsfrequenz.

### Anwendungsbeispiel

Die Anwendung von ESR-Abstandsmessungen in Kombination mit ortsspezifischer Spinmarkierung soll hier am Beispiel eines

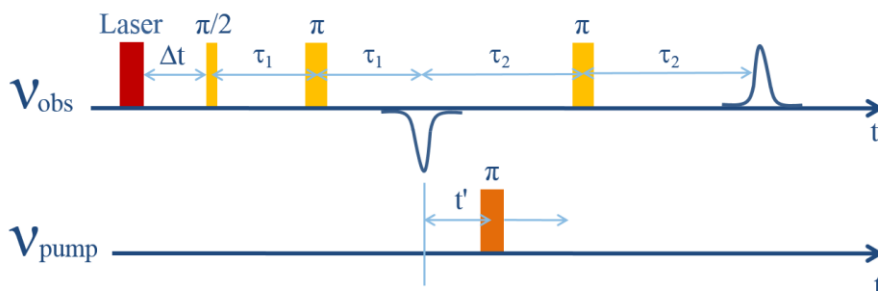


Abb. 3: Vierpuls-DEER-Pulssequenz. Die Frequenz für die Beobachtersequenz ist mit  $\nu_{\text{obs}}$  bezeichnet, die der Pumpsequenz mit  $\nu_{\text{pump}}$ .

biologischen Makromoleküls erklärt werden. Gramnegative Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) zeichnen sich durch zwei Membranen (äußere und innere Membran) aus, die das Zytoplasma (Zellinnere) von der Zellumgebung trennen. Sehr große Nährstoffe können nur über sogenannte Außenmembranrezeptoren (Outer Membrane Receptor: OMR) in das Zellinnere gelangen [19]. Für den Transport durch den Rezeptor ist Energie notwendig, die nur an der inneren Membran in Form eines Protonengradienten zwischen Periplasma (Membranzwischenraum, 15-20 nm [20]) und Zytoplasma vorliegt [21]. Wie kann Energie von der inneren Membran an die äußere transferiert werden? Das Protein TonB spielt bei dieser Fragestellung eine zentrale Rolle [22]. Der N-Terminus ist in der inneren Membran verankert, der Hauptteil befindet sich im Periplasma und zeigt eine hohe Bindungsaffinität an den N-Terminus des Rezeptors, der sogenannten TonB-Box [23]. Könnte man beweisen, dass TonB lang und starr genug ist, das Periplasma zu überbrücken, wäre die funktionelle Verbindung zwischen den Membranen hergestellt. Verschiedene Hypothesen, wie es dann zu einem Energie-

übertrag kommt, sind in der Literatur zu finden [24-26]. Die Anwendung der bekanntesten Strukturauf Lösungsmethoden Röntgenstrukturanalyse und NMR sind einerseits aufgrund der fehlgeschlagenen Kristallisation und andererseits der Größe des Proteins nicht anwendbar. ESR-Abstandsmessungen nach ortsspezifischer Spinmarkierung sind die ideale Methode, um langreichweitige Informationen über die Struktur und die Länge dieses Proteins zu erhalten [24].

Abbildung 4 zeigt die Primärstruktur von TonB [27]. Für die ESR-Abstandsmessungen wurde ein periplasmatisches Fragment verwendet (in blau unterlegt, Residuen 56-126). Durch ortsspezifische Cystein-Mutagenese (rot markierte Aminosäuren) und Derivatisierung mit dem Spinmarker MTSL sind sechs doppelt spinmarkierte TonB-Mutanten hergestellt worden: TonB 59/69, TonB 59/76, TonB 69/76, TonB 69/84, TonB 88/106, und TonB 106/120. Die beiden Zahlen entsprechen jeweils den Positionen der Residuen im nativen TonB, die durch Cysteine ersetzt wurden. Die Bindung der Spinmarker wurde durch Messung ihrer Mobilität nachgewiesen (Abb. 2)



Abb. 4: TonB-Aminosäuresequenz. In blau unterlegt ist das 70 Aminosäuren lange, prolinreiche Segment, das für die ESR-Untersuchungen herangezogen wurde. Rot markierte Residuen stellen die Angriffspunkte der Mutagenese dar.

Für die ESR-Abstandsmessungen wurden die spinmarkierten Proben in wässriger Lösung (H<sub>2</sub>O/Glycerin (2:1)) präpariert und in ein Quarzröhrchen mit 3 mm Außendurchmesser transferiert. Die Probe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um einen „Schnappschuss“ der Proteinkonformationen zu erhalten. Die Messungen finden, um die Elektronenspinrelaxationszeiten zu optimieren, bei einer Temperatur von T = 50 K statt. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der Abstandsmessungen an den sechs Doppelmutanten. Links sind sechs DEER-Kurven nach einer Hintergrundkorrektur dargestellt (dünne Linien). Die Korrektur ist notwendig, da auch intermolekulare Abstände zur Messkurve beitragen, aber im vorliegenden Fall nur intramolekulare Beiträge interessieren. Zur quantitativen Auswertung der Messdaten muss der Beitrag der Spinmarkerflexibilität zur Abstandsverteilung eliminiert werden. Verfügt man über eine Kristall- oder NMR-Struktur des Proteins kann man über Rotamerbibliotheken (siehe Abb. 6) die bevorzugten Positionen des Spinmarkers am Protein berechnen und die daraus gewonnene Abstandsverteilung mit den Messergebnissen vergleichen. Im hier vorliegenden Fall ist keine Struktur bekannt, weshalb ein statistischer Ansatz zur Auswertung verwendet wird. Die Analyse der Messkurve erfolgt über die Anpassung einer Riceverteilung als Abstandsverteilung [28]. Die Ergebnisse der Abstandsverteilungen für die sechs Doppelmutanten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Breite der Abstandsverteilung spiegelt dabei nicht den Fehler der Messmethode wider, sondern vielmehr die Flexibilität des untersuchten Makromoleküls einschließlich der spinmarkierten Seitenketten. Unter Berücksichtigung der Linkerflexibilität folgt daraus, dass die Proteinkonformation relativ steif, aber nicht total rigide ist. Um die Abweichung vom idealen Modell eines starren, geraden Stäbchens abschätzen zu können, wurde eine Dreiecksvermessung mit Hilfe von drei Doppelmutanten TonB 59/69, TonB 69/76 und TonB 59/76 durchgeführt. Addiert man die Einzelmessungen für die Segmente 59-69 und 69-76, kommt man auf eine Summe von 5,2 nm, was etwa 20 % länger ist als der direkt gemessene Abstand zwischen 59-76 von 4,2 nm. Die Annahme einer entsprechenden Flexibilität wird durch die Tatsache untermauert, dass die Breite der Abstandsverteilung mit zunehmendem Abstand größer wird (siehe Tabelle 1). Unter Berücksichtigung der gefundenen Flexibilität ergibt sich eine mittlere axiale Länge von 0,3 nm pro Aminosäure. Dies ist konsistent mit einer Polyprolin II (PPII)-Struktur, einer links-

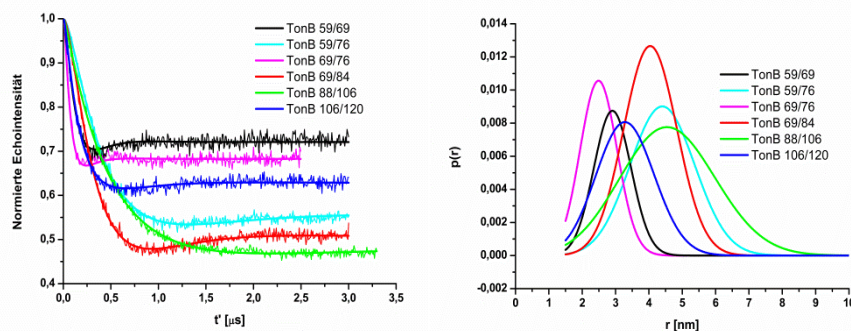


Abb. 5: Ergebnisse der DEER-Messungen an sechs TonB-Doppelmutanten in wässriger Lösung bei T = 50 K. Hintergrundkorrigierte Daten der DEER-Experimente (schmale Linie). Fit mit einer Riceverteilung (dicke Linien) und resultierende Abstandsverteilungen [24].

TonB-Fragment	Abstand $\mu_R$ [nm]	Breite der Verteilung $\sigma$ [nm]
TonB 69/76	2,4 ± 0,15	0,6 ± 0,1
TonB 59/69	2,8 ± 0,15	0,6 ± 0,1
TonB 106/120	3,0 ± 0,15	0,9 ± 0,1
TonB 69/84	3,9 ± 0,15	0,8 ± 0,1
TonB 59/76	4,2 ± 0,15	1,1 ± 0,1
TonB 88/106	4,1 ± 0,15	1,5 ± 0,15

Tabelle 1: Übersicht der Parameter, die eine Riceverteilung zur Anpassung an die DEER Messungen charakterisieren (siehe Abbildung 5) [24].

händigen Helix, bei der eine Umdrehung von n = 3 Aminosäuren gebildet wird. Eine solche Konformation ist typisch für prolinreiche Peptide oder Proteine in wässriger Lösung [29-32].

Einschließlich des C-Terminus, dessen hochaufgelöste Kristallstruktur eine Länge von 6,5 nm aufweist [33], ergibt sich für den periplasmatischen Teil von TonB eine Gesamtlänge von über 20 nm, die ausreicht, um das Periplasma zu überbrücken

### Zusammenfassung

Mittels ortsspezifischer Spinmarkierung und ESR-Spektroskopie sind Struktur- und Dynamikuntersuchungen an diamagnetischen Makromolekülen in komplexer Umgebung möglich.

Die Anwendung dieser Methode zur Aufklärung der Struktur des TonB-Proteins zeigt erstmals, dass TonB in Form einer PolyprolinII-Helix vorliegt und lang genug ist, das Periplasma zu überbrücken. Dies könnte eine mechanische Energieübertragung von der inneren Membran zum Außenmembranrezeptor ermöglichen.

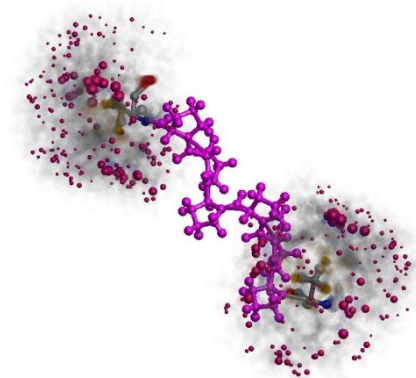


Abb. 6: Darstellung der Spinmarker-Linker-Flexibilität an einer zweifach spinmarkierten Polyprolin II-Helix. Die Wahrscheinlichkeit der Markerposition ist über die Größe der roten Kugeln dargestellt.



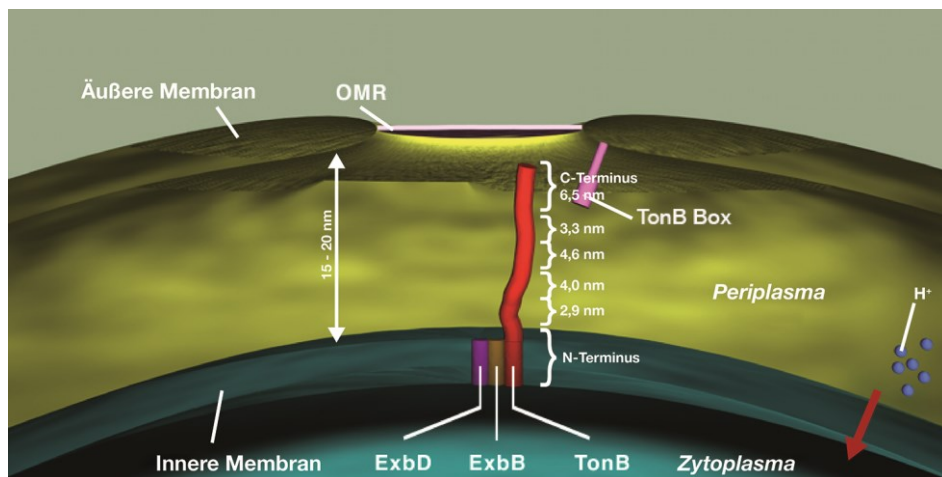


Abb. 7: Veranschaulichung der TonB-Struktur zwischen innerer und äußerer Membran. Die aus den DEER-Messungen gewonnenen Abstände sind eingetragen, um zu verdeutlichen, dass der prolinreiche Part des Proteins das Periplasma überspannen kann. OMR (Outer Membrane Receptor) bezeichnet den Außenmembranrezeptor, der Komplex der Proteine ExbD und ExbB könnte einen Einfluss auf die mechanische Energieübertragung des TonB-Proteins haben [34,35].

## Literatur

- [1] A. Schweiger and G. Jeschke, *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*, reprinted 2005 (Oxford University Press, Oxford, 2005).
- [2] W.L. Hubbell and C. Altenbach, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 566 (1994).
- [3] W.L. Hubbell, A. Gross, R. Langen, and M.A. Lietzow, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 649 (1998).
- [4] M. Azarkh, V. Singh, O. Okle, I.T. Seemann, D.R. Dietrich, J.S. Hartig, and M. Drescher, *Nature protocols* **8**, 131 (2013).
- [5] G.I. Likhtenshtein, *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*, (Wiley-VCH, 2008).
- [6] J.P. Klare and H.J. Steinhoff, *Photosynth. Res.* **102**, 377 (2009).
- [7] R.S. Alexander, S.K. Nair, and D.W. Christianson, *Biochemistry-US* **30**, 11064 (1991).
- [8] H.S. Mchaourab, M.A. Lietzow, K. Hideg, and W.L. Hubbell, *Biochemistry-US* **35**, 7692 (1996).
- [9] A.P. Todd, J. Cong, F. Levinthal, C. Levinthal, and W.L. Hubbell, *Proteins* **6**, 294 (1989).
- [10] M. Drescher, *EPR Spectroscopy: Applications in Chemistry and Biology*, (Springer, Berlin, 2012).
- [11] D.E. Budil, K.A. Earle, and J.H. Freed, *J. Phys. Chem.* **97**, 1294 (1993).
- [12] M. Wessig, M. Drescher, and S. Polarz, *J. Phys. Chem. C* **117**, 2805 (2013).
- [13] M. Robotta, C. Hintze, S. Schildknecht, N. Zijlstra, C. Jungst, C. Karreman, M. Huber, M. Leist, V. Subramaniam, and M. Drescher, *Biochemistry-US* **51**, 3960 (2012).
- [14] G. Jeschke, *Chem. Phys. Chem.* **3**, 927 (2002).
- [15] A.D. Milov, A.B. Ponomarev, and Y.D. Tsvetkov, *Chem. Phys. Lett.* **110**, 67 (1984).
- [16] G. Jeschke, *Macromol. Rapid Comm.* **23**, 227 (2002).
- [17] G. Jeschke, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 419 (2012).
- [18] R. Ward, A. Bowman, E. Sozudogru, H. El-Mkami, T. Owen-Hughes, and D.G. Norman, *J. Magn. Res.* **207**, 164 (2010).
- [19] C.N. Cornelissen, G.D. Biswas, J. Tsai, D.K. Paruchuri, S.A. Thompson, and P.F. Sparling, *J. Bacteriol.* **174**, 5788 (1992).
- [20] L.L. Graham, R. Harris, W. Villiger, and T.J. Beveridge, *J. Bacteriol.* **173**, 1623 (1991).
- [21] J. Gumbart, M.C. Wiener, and E. Tajkhorshid, *Biophys. J.* **93**, 496 (2007).
- [22] C.C. Wang and A. Newton, *J. Biol. Chem.* **246**, 2147 (1971).
- [23] M. Kim, G.E. Fanucci, and D.S. Cafiso, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11975 (2007).
- [24] S. Domingo Köhler, A. Weber, S.P. Howard, W. Welte, and M. Drescher, *Protein Sci.* **19**, 625 (2010).
- [25] R.A. Larsen, T.E. Letain, and K. Postle, *Mol. Microbiol.* **49**, 211 (2003).
- [26] C. Chang, A. Mooser, A. Pluckthun, and A. Wlodawer, *J. Biol. Chem.* **276**, 27535 (2001).
- [27] K. Postle and R.F. Good, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5235 (1983).
- [28] S. Domingo Köhler, M. Spitzbarth, K. Diederichs, T.E. Exner, and M. Drescher, *J. Magn. Reson.* **208**, 167 (2011).
- [29] M. Kuemin, S. Schweizer, C. Ochsenfeld, and H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15474 (2009).
- [30] A.A. Adzhubei and M.J.E. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **229**, 472 (1993).
- [31] S. Kakinoki, Y. Hirano, and M. Oka, *Polym. Bull.* **53**, 109 (2005).
- [32] B.K. Kay, M.P. Williamson, and M. Sudol, *Faseb J.* **14**, 231 (2000).
- [33] J. Kodding, F. Killig, P. Polzer, S.P. Howard, K. Diederichs, and W. Welte, *J. Biol. Chem.* **280**, 3022 (2005).
- [34] V. Braun, S. Gaisser, C. Herrmann, K. Kampfenkel, H. Killmann, and I. Traub, *J. Bacteriol.* **178**, 2836 (1996).
- [35] P.I. Higgs, T.E. Letain, K.K. Merriam, N.S. Burke, H. Park, C. Kang, and K. Postle, *J. Bacteriol.* **184**, 1640 (2002).