

Genetisch kodierte, spinmarkierte künstliche Aminosäuren für Abstandsmessungen mittels ESR-Spektroskopie

Moritz Schmidt, Daniel Summerer und Malte Drescher

Fachbereich Chemie, Graduiertenschule Chemische Biologie und Zukunftskolleg, Universität Konstanz

Elektronenspinresonanz- (ESR-) Spektroskopie kombiniert mit ortsspezifischer Spinmarkierung ist bestens geeignet, um Struktur, Dynamik und Wechselwirkungen von Proteinen zu untersuchen [1,2]. Besonders interessant sind Abstandsmessungen zwischen zwei identischen, verhältnismäßig kleinen Spinmarkern, beispielsweise Nitroxiden. Diese Abstandsmessungen beruhen auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den beiden Spinmarkern, die mit $1/r^3$ abfällt. Präzise Messungen von Abstandsverteilungen sind über einen großen Bereich, etwa 1 bis 10 Nanometer möglich [3-5]. Für die Messung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung verwendet man meist gepulste ESR-Methoden [6]. Für die traditionelle ortsspezifische Spinmarkierung eines Proteins wird über Mutagenese gezielt ein Cystein in die Aminosäuresequenz eingebaut [7]. Mit spezifischen Spinmarkern, wie z.B. MTSL (1-oxyl-2,2,5,5-tetra-methylpyrrolin-3-methyl-methanethiosulfonate), wird über eine Disulfidbindung eine Modifikation des Cysteins *in vitro* herbeigeführt. Dieser Ansatz benötigt also chemische Markierungsschritte, zugängliche Aminosäuren auf der Proteinoberfläche und die Entfernung der nativen Cysteine.

Genetisch kodierte, spinmarkierte künstliche Aminosäuren

Wir stellen einen Ansatz vor, der auf chemische Spinmarkierung von Proteinen verzichtet und auf der Biosynthese von spinmarkierten Proteinen *in vivo* beruht [8]. Zur Expression von spinmarkierten Proteinen wird eine spinmarkierte künstliche Aminosäure **SLK** (Abbildung 1) eingesetzt, die eine 2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolin-1-oxyl-Einheit enthält. Das Akronym weist darauf hin, dass es sich um eine spinmarkierte (spin labeled) Aminosäure auf Lysinbasis (**L** steht im one-letter-code für Lysin). Diese Aminosäure unterscheidet sich von den 20 sogenannten kanonischen Aminosäuren dadurch, dass sie natürlicherweise nicht durch Basentriplets, also dreistellige Basen-Codons in der DNA

und RNA codiert wird. Über eine Erweiterung des genetischen Codes kann aber auch **SLK** in Ribosomen in *E. coli* in Proteine eingebaut werden. Dabei wird anstelle des Amber-Stop-Codons TAG [9] in der mRNA der Einbau einer unnatürlichen Aminosäure durch eine spezielle Transfer-RNA (tRNA) im Ribosom gewährleistet. Die tRNA wird von ihrer zugehörigen Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit der nicht-kanonischen Aminosäure beladen und fungiert dann als Adaptermolekül, das den Einbau der Aminosäure an der richtigen Stelle vermittelt und in diesem speziellen Fall gezielt ein Stop-Codon erkennt [10-21].

Uns gelang der Einbau von **SLK** in verschiedene Mutanten des grün fluoreszierenden Protein GFP und Thioredoxin TRX. Mittels Wachstumstests, Chromatographie, Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie und Fluoreszenzspektroskopie konnten wir zeigen, dass der Einbau mit hoher Effizienz und Zuverlässigkeit erfolgt. Wir erzielen einen Markierungsgrad von mehr als 99% [8].

Lebensdauer

Für die Anwendbarkeit für Abstandsmessungen in der ESR-Spektroskopie ist jedoch nicht der Markierungsgrad ausschlaggebend, sondern der Anteil intakter Markierungen, wir nennen ihn Integritätsgrad. Denn eine besondere Schwierigkeit besteht in der Reduzierung des Nitroxids zum Hydroxylamin und der daraus resultierenden kurzen Lebensdauer von **SLK** *in vivo*, die unterhalb der typischen Expressionszeiten in *E. coli* liegt [22-25]. Zur Stabilität in *E. coli* selbst lagen keine Daten vor. Wir haben spinmarkiertes GFP (GFP-SLK) in zwei verschiedenen *E. coli*-Stämmen (Top10 und JX 33) exprimiert und eine zeitabhängige Untersuchung mit SDS-PAGE und ESR-Messungen durchgeführt. Bei einem Einsatz von **SLK** in einer Konzentration von 1 mM konnte nach acht Stunden ein Integritätsgrad von 49% nachgewiesen werden, der bei erhöhter Konzentration von **SLK** auf 68% erhöht werden konnte. Diese Daten zeigen, dass die Le-

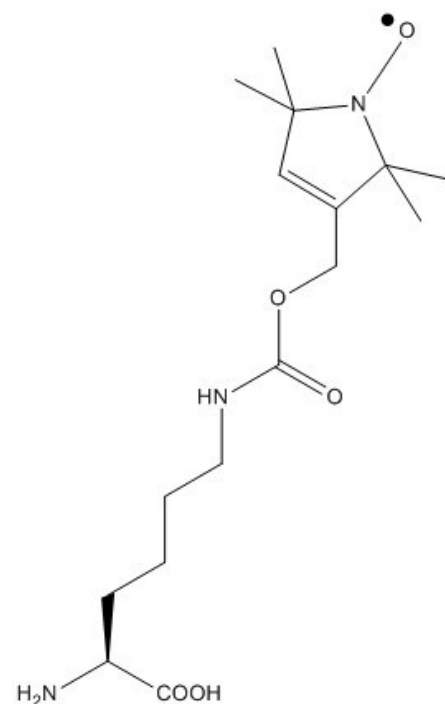


Abb. 1: Struktur der künstlichen, Lysin-basierten spinmarkierten Aminosäure **SLK**. Der ungepaarte Elektronenspin, der den Paramagnetismus bewirkt und **SLK** somit ESR-aktiv werden lässt, ist als schwarzer Kreis angedeutet.

bensdauer von **SLK** in *E. coli* deutlich höher liegt als diejenige, die bisher für Nitroxide in anderer zellulärer Umgebung angegeben wurde. Eventuell wurde deshalb das Anwendungspotential von Nitroxiden für *in vivo* Messungen unterschätzt.

Mit einem mit **SLK** spinmarkierten Protein sind nun durch ESR-Messungen folgende Parameter zugänglich:

- Umgebungscharakteristika wie Polarität, Lösemittel- oder Sauerstoffzugänglichkeit
- die Mobilität der Seitenkette von **SLK**
- Abstände zwischen zwei **SLK** innerhalb eines Proteins oder zu wechselwirkenden Makromolekülen

ESR-Abstandsmessungen

Über Abstandsmessungen zwischen zwei **SLK** innerhalb eines Proteins kann auf seine Konformation geschlossen werden. Abstände zwischen zwei spinmarkierten Aminosäuren können in der gepulsten ESR über die Technik DEER (Double Electron Electron Resonance) gemessen werden [26-29]. Es handelt sich dabei um ein gepulstes ESR-Experiment das bei zwei Mikrowellenfrequenzen durchgeführt wird. Eine schematische Darstellung der Vierpuls-DEER-Pulssequenz ist in Abbildung 2 zu sehen. **SLK** besitzen ein breites ESR-Spektrum, das es erlaubt, über eine spektrale Separation **SLK** voneinander zu unterscheiden. Auf der Beobachterfrequenz ν_{obs} folgt nach einer Hahn-Echo-Sequenz ein refokussierender Puls. Die Intensität des refokussierten Echos wird über ein Integrationsfenster als Funktion von t' aufgenommen. Auf der Pumpfrequenz ν_{pump} invertiert ein π -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.

Die zwei Frequenzen (Beobachterfrequenz und Pumpfrequenz) des DEER-Experiments adressieren unterschiedliche Bereiche des ESR-Spektrums und unterscheiden so das Signal chemisch identischer **SLK** voneinander. Gegenüber ähnlichen Methoden wie z.B. FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), die mit zwei unterschiedlichen Markermolekülen arbeiten, ist deshalb die Markierungsstrategie sehr viel einfacher.

Abstandsmessungen an Thioredoxin

Zum ersten Nachweis einer Abstandsmessung zwischen genetisch kodierten, spinmarkierten künstlichen Aminosäuren haben wir an zwei Stellen **SLK** in das Protein Thioredoxin (TRX) inkorporiert. Wir haben das doppelt spinmarkierte Protein TRX-D14/R74→SLK exprimiert, aufgereinigt und in einem Wasser-Glycerol-Gemisch schockgefroren, um einen Schnappschuss der Proteinkonformation(en) zu erhalten. Die ESR-Abstandsmessung wurde bei 50 Kelvin durchgeführt, als Kontrolle wurde das einfach spinmarkierte Protein TRX-D14→SLK verwendet.

Die DEER-Kurve für TRX-D14→SLK (Abbildung 3, schwarz) entspricht der einer homogenen, dreidimensionalen Verteilung (Simulation Abbildung 3, rot) der Spinmarker, wie man es für ein einfach markiertes Protein in Lösung erwarten würde.

Die DEER-Kurve für TRX-D14/R74→SLK weicht deutlich davon ab (Abbildung 3, blau). Für TRX-D14/R74→SLK wurde die um

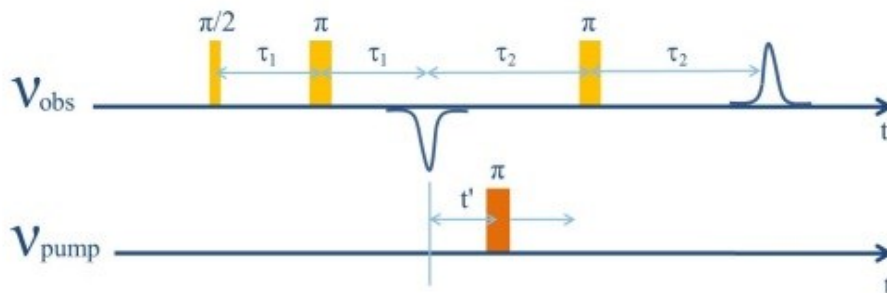


Abb. 2: Vierpuls-DEER-Pulssequenz. Die Frequenz für die Beobachtersequenz ist mit ν_{obs} bezeichnet, die der Pumpsequenz mit ν_{pump} [30].

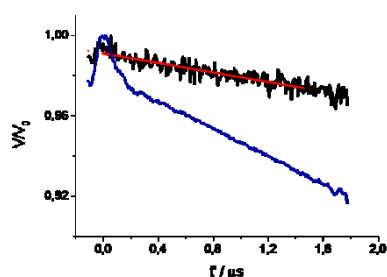


Abb. 3: DEER-Kurve für einfach markiertes TRX-D14→SLK (schwarz) und doppelt spinmarkiertes TRX-D14/R74→SLK (blau). Der Fit (rot) basiert auf der Annahme, dass das Protein in Lösung homogen verteilt ist [8].

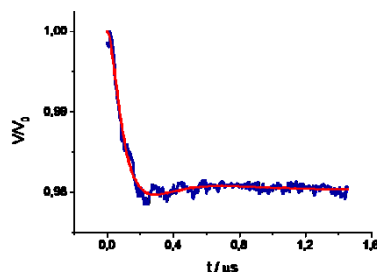


Abb. 4: DEER-Kurve von TRX-D14/R74→SLK nach Korrektur bezüglich der intermolekularen Wechselwirkungen (blau). Der Fit (rot) entspricht der Abstandsverteilung in Abbildung 5 [8].

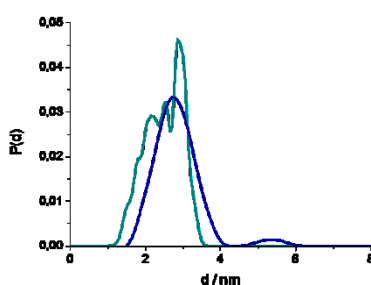


Abb. 5: Experimentelle Abstandsverteilung für TRX-D14/R74→SLK (blau) sowie theoretisch vorhergesagte Abstandsverteilung zwischen konventionellen MTSL-Spinmarkern (grün) [8].

intermolekulare Beiträge korrigierte DEER-Kurve (Abbildung 4, blau) einer modellfreien Analyse mittels Tikhonov-Regularisierung unterzogen. Die aus dem Fit (Abbildung 4, rot) resultierende Abstandsverteilung ist in Abbildung 5 (blau) gezeigt.

Die Breite der Abstandsverteilung (Abbildung 5, blau) spiegelt sowohl die Flexibilität des Proteins als auch die Freiheitsgrade der **SLK**-Seitenkette wider. Der Einfluss der flexiblen Seitenkette eines Spinmarkers kann über einen Rotamer-Ansatz simuliert werden (Abbildung 6). Die experimentelle Abstandsverteilung für TRX-D14/R74→SLK stimmt gut mit der theoretisch vorhergesagten Abstandsverteilung zwischen konventionellen MTSL-Spinmarkern (Abbildung 5, grün) überein und trifft den Abstand, der aufgrund der veröffentlichten Kristallstruktur [31] zu erwarten war. Dies zeigt, dass **SLK** eine nützliche Nanostruktursonde mit MTSL-ähnlichen Eigenschaften ist.

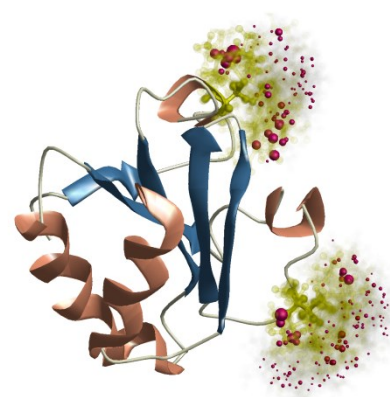


Abb. 6: Doppelt spinmarkiertes Thioredoxin und mittels einer Rotamerbibliothek theoretisch vorhergesagte räumliche Positionen einer konventionellen Spinsonde. Die Größe der magenta Kugeln gibt die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Position wieder. Die auf Grundlage dieses Rotameransatzes prognostizierte Abstandsverteilung ist in Abbildung 5 gezeigt (grün).

Intrazelluläre ESR

Da **SLK** die Möglichkeit eröffnet, spinmarkierte Proteine *in vivo* durch Biosynthese zu exprimieren, stellt sich die Frage, ob endogene, spinmarkierte Proteine selektiv in der Zelle detektiert werden können. Bisherige Arbeiten zu intrazellulärer ESR in Kombination mit ortsspezifischer Spinmarkierung basierten auf der Mikroinjektion von *in vitro* markierten Proteinen in die Oozyten von *Xenopus laevis* [32]. Unser Ansatz hat das Potential, Proteine direkt in ihrer natürlichen Umgebung, wo sie biosynthetisiert und prozessiert werden, zu untersuchen.

Wir haben in *E.coli* TRX-R74→SLK exprimiert und nach einem kurzen Waschprotokoll das Zellpellet für die ESR-Messung genutzt. Kontrollexperimente beinhalteten ESR-Messungen an Zellen ohne ein Amber Stop-Codon in TRX oder ohne zugehörige Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Diese Messungen zeigten, dass in Zellen, die kein spinmarkiertes Zielprotein enthalten, das ESR-Signal nahezu ausschließlich freiem **SLK** zuzuordnen ist. In Zellen jedoch, die TRX-R74→SLK exprimieren, steigt das ESR-Signal um den Faktor zwei an. Daraus folgt, dass unser Ansatz ein ausreichendes Expressionsniveau erreicht, um endogene, spinmarkierte Proteine in der Zelle zu untersuchen und unser Waschprotokoll ermöglicht, freies **SLK** selektiv aus den Zellen zu entfernen und gleichzeitig spinmarkierte Proteine intakt und in der Zelle lokalisiert zu behalten.

Zusammenfassung

Wir haben erstmals die intrazelluläre Biosynthese spinmarkierter Proteine demonstriert, indem wir die nicht-kanonische, Lysin-basierte Aminosäure **SLK** zum genetischen Kode von *E. coli* hinzugefügt haben. Dieser Ansatz macht *in vitro* Spinmarkierung überflüssig und hebt bisherige Einschränkungen von ortsspezifischer Spinmarkierung auf, wie beispielsweise die Entfernung nativer Cysteine oder komplizierte Spinmarkierungsprotokolle. Wir haben Abstände im Nanometerbereich zwischen zwei **SLK** in einem Protein gemessen. Der Nachweis spinmarkierter Proteine in der Zelle, in der sie exprimiert wurden, mittels ESR öffnet den elegantesten Weg zu intrazellulären ESR-Abstandsmessungen in Kombination mit ortsspezifischer Spinmarkierung und damit zur Proteinstrukturbestimmung direkt in der Zelle.

Literatur

- [1] Jeschke, G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012, 63, 419.
- [2] Hubbell, W. L.; Cafiso, D. S.; Altenbach, C. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7, 735.
- [3] Jeschke, G.; Bender, A.; Paulsen, H.; Zimmermann, H.; Godt, A. *J. Magn. Reson.* 2004, 169, 1.
- [4] Jeschke, G.; Abbott, R. J. M.; Lea, S. M.; Timmel, C. R.; Banham, J. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 1058.
- [5] Jeschke, G. *Chemphyschem* 2002, 3, 927.
- [6] Schweiger, A.; Jeschke, G. *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*; Oxford University Press: Oxford, 2005.
- [7] Todd, A.P.; Cong, J.; Levinthal, F.; Levinthal, C.; Hubbell, W.L. *Proteins* 1989, 6, 294.
- [8] Schmidt, M.; Borbas, J.; Drescher, M.; Summerer, D. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 1238.
- [9] Liu, C. C.; Schultz, P. G. *Annu. Rev. Biochem.* 2010, 79, 413.
- [10] Blight, S. K.; Larue, R. C.; Mahapatra, A.; Longstaff, D. G.; Chang, E.; Zhao, G.; Kang, P. T.; Church-Church, K. B.; Chan, M. K.; Krzycki, J. A. *Nature* 2004, 431, 333.
- [11] Wan, W.; Huang, Y.; Wang, Z. Y.; Russell, W. K.; Pai, P. J.; Russell, D. H.; Liu, W. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2010, 49, 3211.
- [12] Gautier, A.; Nguyen, D. P.; Lusic, H.; An, W. A.; Deiters, A.; Chin, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 4086.
- [13] Fekner, T.; Li, X.; Lee, M. M.; Chan, M. K. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009, 48, 1633.
- [14] Chen, P. R.; Groff, D.; Guo, J. T.; Ou, W. J.; Cellitti, S.; Geierstanger, B. H.; Schultz, P. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009, 48, 4052.
- [15] Yanagisawa, T.; Ishii, R.; Fukunaga, R.; Kobayashi, T.; Sakamoto, K.; Yokoyama, S. *Chem. Biol.* 2008, 15, 1187.
- [16] Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W. *Nat. Chem. Biol.* 2008, 4, 232.
- [17] Polycarpo, C. R.; Herring, S.; Berube, A.; Wood, J. L.; Soll, D.; Ambrogelly, A. *FEBS Lett.* 2006, 580, 6695.
- [18] Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C.; Schultz, C.; Lemke, E. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2011, 50, 3878.
- [19] Schmidt, M. J.; Summerer, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2013, 52, 4690.
- [20] Yu, Z.; Ohulchanskyy, T. Y.; An, P.; Prasad, P. N.; Lin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 6766.
- [21] Li, F.; Zhang, H.; Sun, Y.; Pan, Y.; Zhou, J.; Wang, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2013, 52, 9700.
- [22] Azarkh, M.; Okle, O.; Dietrich, D.; Drescher, M. *J. Magn. Reson.* 2011, 212, 450.
- [23] Krstic, I.; Hansel, R.; Romainczyk, O.; Engels, J. W.; Dotsch, V.; Prisner, T. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2011, 50, 5070.
- [24] Couet, W. R.; Brasch, R. C.; Sosnovsky, G.; Tozer, T. N. *Magn. Reson. Imag.* 1985, 3, 83.
- [25] Belkin, S.; Mehlhorn, R. J.; Hideg, K.; Hankovskyy, O.; Packer, L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 256, 232.
- [26] G. Jeschke, *Chem. Phys. Chem.* 2002, 3, 927.
- [27] A.D. Milov, A.B. Ponomarev, and Y.D. Tsvetkov, *Chem. Phys. Lett.* 1984, 110, 67.
- [28] G. Jeschke, *Macromol. Rapid Comm.* 2002, 23, 227.
- [29] G. Jeschke, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012, 63, 419.
- [30] S. Domingo Köhler, M. Drescher, *News Analytik* 2014
- [31] Katti, S. K.; LeMaster, D. M.; Eklund, H. *J. Mol. Biol.* 1990, 212, 167
- [32] Azarkh, M.; Singh, V.; Okle, O.; Seemann, I. T.; Dietrich, D. R.; Hartig, J. S.; Drescher, M. *Nat. Protoc.* 2013, 8, 131.