

## Einzelmolekülspektroskopie

# Struktur und Dynamik von Biomolekülen mit *high precision*-FRET

THOMAS-O. PEULEN, CLAUS A. M. SEIDEL  
LEHRSTUHL FÜR MOLEKULARE PHYSIKALISCHE CHEMIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**High-precision FRET erlaubt eine quantitative Charakterisierung der Strukturen heterogener Biomoleküle. Es können gleichzeitig die Strukturen mehrerer Zustände und die Austauschdynamik (ns- bis s-Zeitbereich) zwischen ihnen untersucht werden.**

*High-precision FRET allows a quantitative structural characterisation of heterogeneous biomolecules. It is possible to study simultaneously the structures of several species and the exchange dynamics between them within a ns- to s-time range.*

### Motivation

Die Funktionalität von Biomolekülen ist bestimmt durch ihre dreidimensionale Struktur und ihre dynamischen Eigenschaften. Aufgrund der Größe von Biomolekülen ist ihre Energielandschaft äußerst komplex und bei Raumtemperatur sind zahlreiche lokale Konformationsminima zugänglich. Dabei erstreckt sich die nötige Zeit für Übergänge zwischen diesen Konformationen über einen Bereich von Nanosekunden bis zu Sekunden [1].

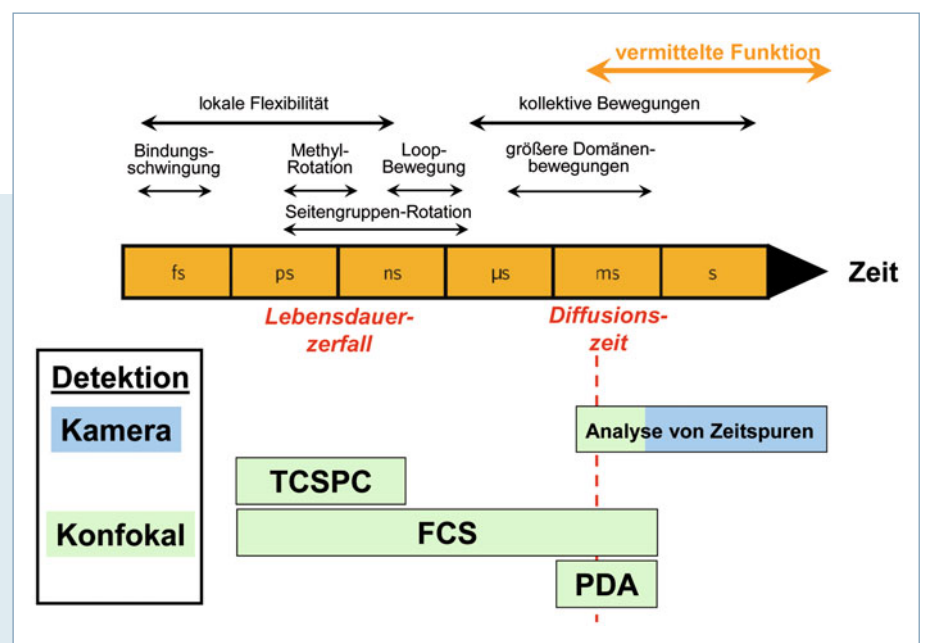
Im Gegensatz zu Experimenten mit einem Molekül-Ensemble sind bei einzelnen Molekülen Messungen dieser Übergänge ohne Gleichgewichtsauslenkungen möglich, da diese nicht synchronisiert werden müssen. Da

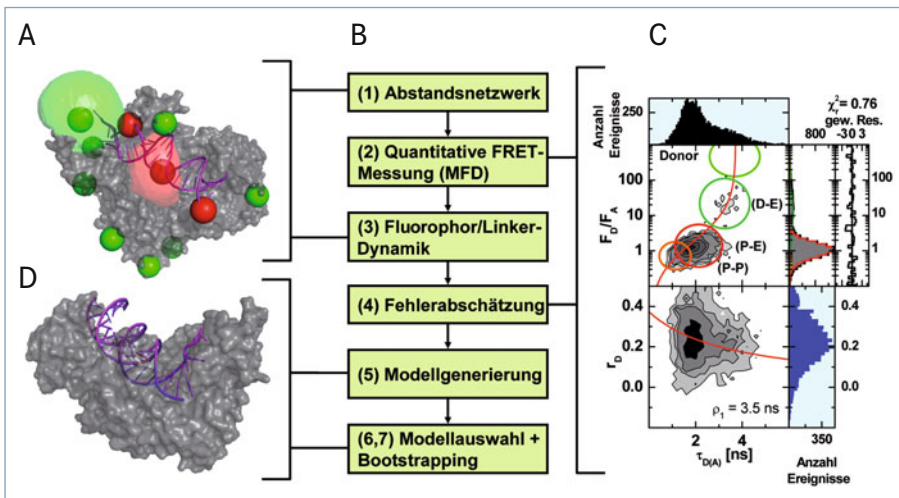
zu jeder Zeit der Messung nur ein Molekül beobachtet wird, ist es möglich, die Heterogenität von Populationen und die Kinetik von Übergängen zwischen verschiedenen Zuständen direkt unter Gleichgewichtsbedingungen zu untersuchen.

Aufgrund der hohen Sensitivität sind Fluoreszenzmethoden ideal geeignet, um Einzelmolekülspektroskopie an Biomolekülen zur Beobachtung der Heterogenität in Raum und Zeit durchzuführen. Dabei ist die zeit-

liche Untergrenze für Dynamikuntersuchungen im Wesentlichen durch die Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore bestimmt. Deshalb lassen sich Prozesse von Pikosekunden bis zu Sekunden mit Fluoreszenz untersuchen (Abb. 1). Der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET, [2]) zwischen einem Donor- und einem Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff kann in Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimenten als „spektroskopisches Lineal“ zur Abstandsmessung zwischen den Farbstoffen genutzt werden [3]. Bei FRET wird durch Dipol-Dipol-Kopplung strahlungslos Energie von einem angeregten Donorfarbstoff auf einen Akzeptorfarbstoff übertragen und die Effizienz von FRET durch das Verhältnis der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz zur Donor- und Akzeptorfluoreszenz bestimmt. FRET lässt sich daher ähnlich wie andere labelbasierte Techniken wie EPR, NMR (PRE) zur Strukturaufklärung von Biomolekülen nutzen. Dabei ist FRET durch die große Anzahl der möglichen Fluorophore extrem variabel und insbesondere große makromolekulare Komplexe sind der Messung zugänglich, z. B. der offene Komplex des bakteriellen

► **Abb. 1:** Relevante Dynamiken in Biomolekülen und ihre Zugänglichkeit durch Fluoreszenzmessungen. Die Untergrenze für durch Fluoreszenzmessungen zugängliche Dynamiken ist gegeben durch die Fluoreszenzlebensdauer (Piko- bis Nanosekunden), in einem konfokalen Experiment mit frei diffundierenden Biomolekülen ist die Obergrenze durch die Diffusionszeit der Proteine innerhalb des Konfokalvolumens gegeben. Falls langsame Prozesse von Interesse sind, können diese durch die Analyse von Fluoreszenz-Zeitspuren immobilisierter Moleküle mittels einer CCD-Kamera untersucht werden. TCSPC: zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung; FCS: Fluoreszenzkorrelationspektroskopie; PDA: Photonverteilungsanalyse.





▲ **Abb. 2:** **A**, Abstandsnetzwerk zur Lokalisation einer doppelsträngigen DNA in einem HIV-1-Reverse-Transkriptase-Komplex [1ROA]. Die verwendeten Farbstoffpositionen sind durch grüne und rote Kugeln für Donor bzw. Akzeptor dargestellt. Die zwei farbigen Wolken zeigen den durch AV-Simulationen berechneten sterisch erlaubten Raum der Farbstoffpositionen. **B**, Flussdiagramm von hpFRET. **C**, Beispielmessung. Im oberen 2D-Histogramm der beobachteten Einzelmolekülereignisse ist das Verhältnis der Donor- ( $F_D$ ) zur Akzeptorfluoreszenz ( $F_A$ ) gegen die Donorlebensdauer ( $\tau_{D(A)}$ ) des Donorfluorophors aufgetragen. Bereits mit dem Auge lassen sich zwei verschiedene FRET-Populationen erkennen. Der höchstpopulierte Zustand (P-E, produktiver Komplex im Edukt-Zustand) ist der aus der Kristallstruktur bekannte Komplex, während der Zustand P-P der produktive Komplex im Produkt-Zustand ist. Die FRET-Population D-E (Dead-End-Komplex) ist ein Zustand mit einem anderen Bindungsmodus und bisher unbekannter Struktur. Im unteren 2D-Histogramm ist die Anisotropie ( $r$ ) der Einzelmolekülereignisse gegen die Donorlebensdauer aufgetragen. Der Verlauf der Anisotropie in Abhängigkeit der Donorlebensdauer ist durch die Perrin-Gleichung beschrieben (rote Kurve). **D**, Vergleich der bekannten Kristallstruktur einer doppelsträngigen DNA im Komplex mit HIV-RT – die DNA aus der Kristallstruktur ist in Magenta, die mit hpFRET gedockte DNA in Blau dargestellt. Weitere Erklärungen im Text.

RNA-Polymerase-Promotors [4] oder der Synaptotagmin-1-SNARE-Fusionskomplex [5].

### High precision-FRET

Fluoreszenzmessungen werden schon lange zur qualitativen bzw. (semi-)quantitativen Untersuchung und Validierung biomolekularer Strukturen und Dynamiken genutzt [1]. Vor diesem Hintergrund hat sich die Arbeitsgruppe Seidel zum Ziel gesetzt, Fluoreszenzmessungen mit FRET zu einem vollständig quantitativen strukturmodellgebenden Verfahren zu entwickeln und gleichzeitig die große Zeitauflösung der Fluoreszenz zu nutzen. Hierfür müssen Proben strategisch geplant werden, und es werden höhere Anforderungen an Mess- und Auswertungsmethodik gestellt. Die nötigen Schritte zur Nutzung von Fluoreszenzmessungen für die Strukturgebung sind in **Abbildung 2B** in einem Flussdiagramm mit sieben Schritten zusammengefasst und werden im Folgenden als *high precision-FRET* (hpFRET) bezeichnet und erläutert.

Schritt 1: Aufgrund der hohen Anzahl an Freiheitsgraden in Biomolekülen wird ein geeignetes Netzwerk von Abstandsmessun-

gen zur Multilateration (**Abb. 2A**) geplant und in einem iterativen Verfahren gezielt abgefragt. Dazu werden künstliche, meist organische Fluorophore mit hoher Photostabilität und Fluoreszenzquantenausbeute in das Biomolekül durch Kopplung an Cysteine und/oder nicht-natürliche Aminosäuren eingebracht.

Schritt 2: Die gemessenen Abstände müssen zuverlässig und mit möglichst kleinen Fehlern behaftet sein. Zur Reduzierung von Messartefakten wurde in den letzten Jahren die Anzahl der experimentell zugänglichen Fluoreszenzparameter Schritt für Schritt erhöht. Inzwischen sind fünf intrinsische Eigenschaften der Chromophore in Bezug auf die Fluoreszenz, wie Anregungs- und Fluoreszenzspektren, Quantenausbeuten ( $\Phi_F$ ), Lebensdauern ( $\tau$ ) und Anisotropie ( $r$ ) mittels MFD (Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion) in einem Experiment gleichzeitig zugänglich und können aus zeitaufgelösten Messungen abgeleitet werden. Aus diesen Größen lassen sich Informationen zur lokalen Umgebung der Fluorophore gewinnen [6]. Durch Messungen mit mehreren Fluorophoren können Informationen zum Gesamtsystem mittels

FRET, Helligkeiten sowie zur zeitlichen Entwicklung aller genannten Parameter abgeleitet werden. Die Nützlichkeit dieser Messmethodik wurde bereits mehrfach an komplexeren Proben gezeigt [7, 8]. Mit Einzelmolekül-FRET und MFD können bekannte Probleme von klassischen Ensemble-Experimenten in Bezug auf die Qualität der Probe (Verunreinigungen, Aggregate, unvollständige Markierung) und unsichere Fluorophoreigenschaften (lokale Löschung bzw. Unsicherheiten bezüglich der Orientierung der Farbstoffübergangsdipolmomente – beschrieben durch den FRET-Orientierungsfaktor  $\kappa^2$ ) deutlich reduziert werden. Allerdings ist es erst durch neuere verbesserte Analysemethoden, wie z. B. *photon distribution analysis* (PDA) [9], dynamische PDA [10], *lifetime filtered species cross-correlation* [11] und einem Paradigmenwechsel bezüglich der Interpretation des Fluorophor/Linker-Verhaltens [12], in den letzten Jahren möglich geworden, dynamische Systeme strukturell quantitativ zu erfassen (**Abb. 2C**).

Schritt 3: In Fluoreszenzexperimenten werden die Farbstoffe in der Regel über flexible Linker mit einer Länge von etwa 20 Angström an die Biomoleküle angekoppelt, wodurch Fluoreszenzlöschung und Adsorption der Farbstoffe minimiert werden. Allerdings erschwerte bisher die Unsicherheit in Bezug auf die tatsächliche Farbstoffposition die Auswertung von FRET-Abständen in Bezug auf die Struktur der Biomoleküle. Um aus quantitativen Abstandsmessungen mittels MFD strukturrelevante Informationen zu gewinnen, ist es unabdingbar, die Farbstoff/Linker-Eigenschaften zu berücksichtigen. In früheren Untersuchungen wurden Linkereffekte als Messunsicherheiten betrachtet [7] oder eine fixe Position und Ausrichtung der Dipolmomente angenommen [13]. Wie allerdings Moleküldynamik-Simulationen und experimentelle Befunde zeigen, durchlaufen die Fluorophore/Linker innerhalb der Beobachtungszeit der Moleküle (Millisekunden) ihren gesamten möglichen Konfigurationsraum. Daher lässt sich das Verhalten der Fluorophore an Biomolekülen in guter erster Näherung mit einfachen und schnellen Zugänglichkeitsrechnungen (*accessible volume*, AV-Simulationen) beschreiben. Zudem ist es mittels zeitaufgelöster Anisotropie möglich, die Annahmen der AV-Simulationen experimentell zu überprüfen und die Fehlergrenzen aufgrund der Unsicherheiten im FRET-Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  zu bestimmen [14].

Schritt 4: Innerhalb gegebener Modellparameter für das Biomolekül (z. B. starrer Körper im Falle von DNA, **Abb. 2A**) werden innerhalb der Fehlergrenzen alle möglichen Lösungen mit PDA und Fluoreszenzanisotropie bestimmt.

Schritt 5: Darauf basierend werden alle FRET-erlaubten Strukturmodelle mit neuem Algorithmus generiert.

Schritt 6: Die Lösungen werden anschließend gemäß ihrer Modellgüte sortiert, in Klassen verwandter Strukturen eingeteilt und die Eindeutigkeit der FRET-basierten Strukturmodelle bestimmt.

Schritt 7: Die Genauigkeit der gewonnenen Strukturmodelle lässt sich mittels Bootstrapping bestimmen.

Der hpFRET-Ansatz für Einzelmolekülexperimente integriert alle oben diskutierten leistungsfähigen Mess- und Analysemethoden in einer Arbeitssequenz und ermöglicht es somit, quantitative Strukturmodelle zu generieren und Fehlergrenzen für diese zu ermitteln.

Die Stärke dieses Ansatzes zeigt sich durch den Vergleich einer durch hpFRET-gedockten Primer/Template-DNA in die offene Struktur der HIV-1-Reversen-Transkriptase (RT) mit der bekannten Kristallstruktur dieses Komplexes. Zur Lokalisation der Primer/Template-DNA wurden 20 Abstandsmessungen von dieser zum Protein durchgeführt und ein Abstandsnetzwerk gespannt (**Abb. 2A**). Die statistische Analyse der mit hpFRET-Methode erzeugten Strukturmodelle ergab eine eindeutige Lösung, die in **Abbildung 2D** im Vergleich zur Kristallstruktur dargestellt ist. Die exzellente Übereinstimmung für die DNA-Position zeigt sich an einem RMSD-Wert von 0,6 Angström gegenüber der Kristallstruktur.

## Ausblick

Ausgehend von den ersten Einzelmolekül-FRET-Messungen [15] ist in den letzten Jahren die Mess- und Auswertemethodik signifikant verbessert worden, sodass hpFRET

auf dem Weg ist, eine ergänzende Methode zur quantitativen Strukturcharakterisierung für heterogene Proben zu werden. Durch den Einzelmolekülansatz gibt hpFRET nicht nur Strukturinformationen für mehrere Zustände, sondern auch direkte Informationen zur Aufklärung der Dynamik zwischen diesen in einem durchgehenden Zeitbereich von Nanosekunden bis Sekunden. Auf diese Weise ist die Strukturuntersuchung von schwach bevölkerten (angeregten) Zuständen möglich, welche mit konventionellen Methoden wie Röntgenstrukturanalyse von kristallisierten Proben und NMR nur schwer und oft auch gar nicht zugänglich sind. Die Kombination von hpFRET mit bioinformatischen Methoden zur Strukturvorhersage von Biomolekülen ermöglicht die Bearbeitung komplexer Systeme auch dann, wenn nur eine begrenzte Anzahl von gut gewählten FRET-Abständen gemessen wurde. Des Weiteren hat FRET als optische Methode mit ultimativer Empfindlichkeit den großen Vorteil, dass sie unter *in vivo*-Bedingungen bei der Mikro- bzw. Nanoskopie eingesetzt werden kann, um die Strukturen von Biomolekülen im zellulären Kontext zu charakterisieren [16].

## Danksagung

Claus Seidel dankt allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe und Kooperationspartnern, die mit kontinuierlichem Einsatz geholfen haben, in den letzten 16 Jahren schrittweise alle notwendigen Methoden zu entwickeln, um quantitative FRET-Messungen und -Analysen zu etablieren. Beide Autoren sagen Simon Sindbert, Sylvia Berger sowie Paul J. Rothwell und Roger Goody (beide MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) Dank für die Messungen und Analysen, die in **Abbildung 2** gezeigt sind. Insbesondere möchten wir den Dank an Stanislav Kalinin hervorheben, der maßgeblich die Entwicklung von hpFRET mit vorangetrieben hat. ■

## Literatur

- [1] Henzler-Wildman K, Kern D (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature* 450:964–972
- [2] Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437:55–75
- [3] Stryer L, Haugland RP (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:719–726
- [4] Mekler V, Kortkhonja E, Mukhopadhyay J et al. (2002) Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell* 108:599–614
- [5] Choi UB, Strop P, Vrljic M et al. (2010) Single-molecule FRET-derived model of the synaptotagmin 1-SNARE fusion complex. *Nat Struct Mol Biol* 17:318–324
- [6] Widengren J, Kudryavtsev V, Antonik M et al. (2006) Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection. *Anal Chem* 78:2039–2050
- [7] Margittai M, Widengren J, Schweinberger E. et al. (2003) Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15516–15521
- [8] Rothwell PJ, Berger S, Kensch O et al. (2003) Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase:primer/template complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1655–1660
- [9] Antonik M, Felekyan S, Gaiduk A et al. (2006) Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. *J Phys Chem B* 110:6970–6978
- [10] Kalinin S, Valeri A, Antonik M et al. (2010) Detection of structural dynamics by FRET: a photon distribution and fluorescence lifetime analysis of systems with multiple states. *J Phys Chem B* 114:7983–7995
- [11] Felekyan S, Kalinin S, Valeri A et al. (2009) Filtered FCS and species cross correlation function. *Proc SPIE* 7183:71830-71844
- [12] Woźniak AK, Schröder G, Grubmüller H et al. (2008) Single molecule FRET measures bends and kinks in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18337–18342
- [13] Muschiolik A, Andrecka J, Jawhari A et al. (2008) A nano-positioning system for macromolecular structural analysis. *Nat Methods* 5:965–971
- [14] Sindbert S, Kalinin S, Nguyen DT et al. (2011) Implications of dye linker length and rigidity on accurate distance determination via FRET of labeled DNA and RNA. *J Am Chem Soc* 133:2463–2480
- [15] Ha T, Enderle T, Ogletree DF et al. (1996) Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6264–6268
- [16] Sakon JJ, Weninger KR (2010) Detecting the conformation of individual proteins in live cells. *Nat Methods* 7:203–208

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Claus A. M. Seidel  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Lehrstuhl für molekulare physikalische Chemie  
Gebäude 26.32.02  
Universitätsstraße 1  
D-40225 Düsseldorf  
Tel.: 0211-8115880  
Fax: 0211-8112803  
cseidel@hhu.de

## AUTOREN



### Thomas-Otávio Peulen

Jahrgang 1982. 2004–2009 Studium „Water Science: Chemie, Analytik, Mikrobiologie“, Universität Duisburg-Essen. 2007–2009 B. Sc.-Arbeit an der Universidade de São Paulo – São Carlos, Brasilien, und der Université de Montréal, Kanada. 2009 Young Scientist Award. Seit 2010 Doktorand am Institut für molekulare physikalische Chemie.



### Claus A. M. Seidel

Jahrgang 1961. 1980–1988 Chemiestudium an den Universitäten Stuttgart und Heidelberg. 1988–1992 Promotion am Physikalisch Chemischen Institut, Heidelberg. 1992–1993 Postdoc am Sandoz Forschungsinstitut Wien, Österreich. 1993–1998 Leiter einer unabhängigen Nachwuchsgruppe „Einzelmolekül-Fluoreszenz- und Kraftspektroskopie“ am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen. 1998 Habilitation im Fach Physikalische Chemie, Heidelberg. 1998–2002 Leiter einer BioFuture-Nachwuchsgruppe, Göttingen. 2002 Professor (C4) für Physikalische Chemie an der Universität Düsseldorf. Seit 2007 Sprecher der GBM-Studiengruppe „Biophysikalische Chemie“.