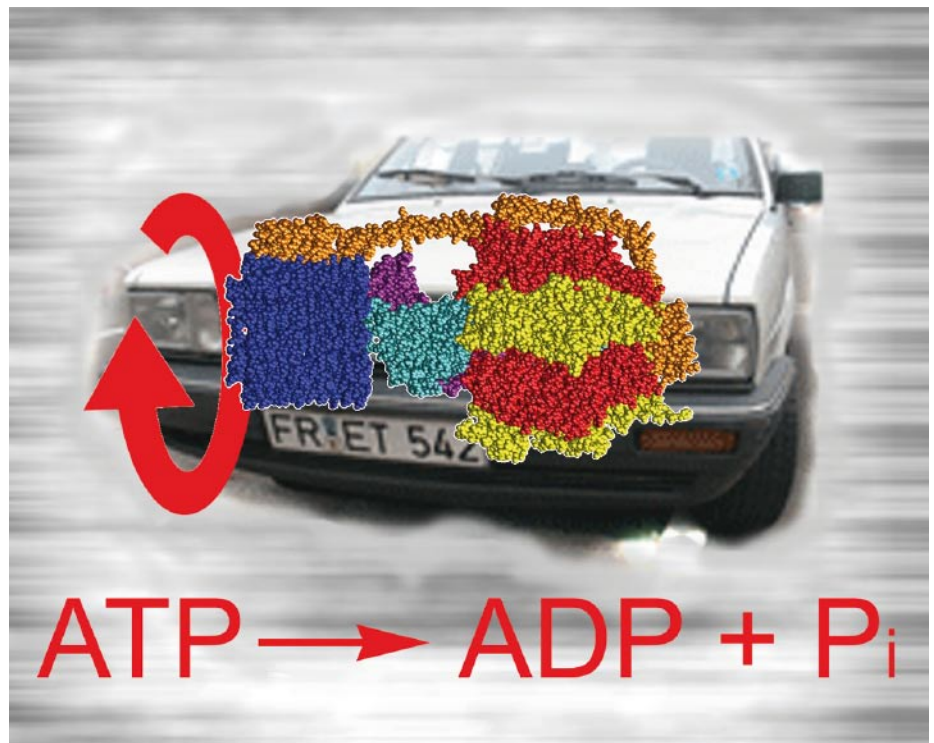


Membrantransporter im Fokus

Mit Förster-Resonanz-Energie-Transfer biologische Maschinen bei der Arbeit verfolgen



► Prof. Dr. Michael Börsch,
Leiter der AG Mikroskopie-Methodik,
Universitätsklinikum Jena
(Foto: M. Szabo / UKJ)



Biologische Nanomaschinen können im konfokalen Fluoreszenzmikroskop einzeln bei der Arbeit beobachtet werden. Geschwindigkeit, Direktionalität und Schrittweite von Rotationsmotoren wie der F_0F_1 -ATP Synthase werden über die interne Abstandsmessungen zwischen spezifisch angebrachten Farbstoffmolekülen verfolgt, basierend auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Eine elektrokinetische Falle kann die Brown'sche Bewegung in Lösung unterdrücken und genau ein Membranenzym im Fokus halten.

Einleitung

Biologische Motoren und Membrantransporter sind faszinierende Nanomaschinen in den Zellen, die durch die Hydrolyse von Adenosin-Triphosphat (ATP) als universeller Energiewährung angetrieben werden, oder durch Ionengradienten über die Membran. Während auf Carnot-Maschinen beruhende Automotoren im besten Fall mit Wirkungsgraden deutlich unter 40% arbeiten, sind biologische Rotationsmotoren wie die F_0F_1 -ATP Synthase in der Lage, die gesamte chemisch gespeicherte Energie in mechanische Bewegung umzusetzen [1]. Was sind die Prinzipien dieser mensch-

licher Ingenieurskunst so überlegenen Nanomaschinen, die sich selbst zusammenbauen und in der lebenden Zelle nach Bedarf geschaffen werden?

Um die Arbeitsweise zu verstehen, benötigen wir eine nicht-invasive Beobachtungsmethode, die uns über die Bewegungen der Motorkomponenten auf deren Größenskala, d.h. im Bereich von 1 bis 10 nm, berichtet. Da die Motoren nicht in eine einzige Ausgangskonformation gebracht werden können, sind wir daran interessiert, einen vollständigen Motorzyklus zu verfolgen. Wir beginnen zu irgendeinem Zeitpunkt die Beobachtung und setzen sie solange fort, bis der Zyklus erneut bei dieser

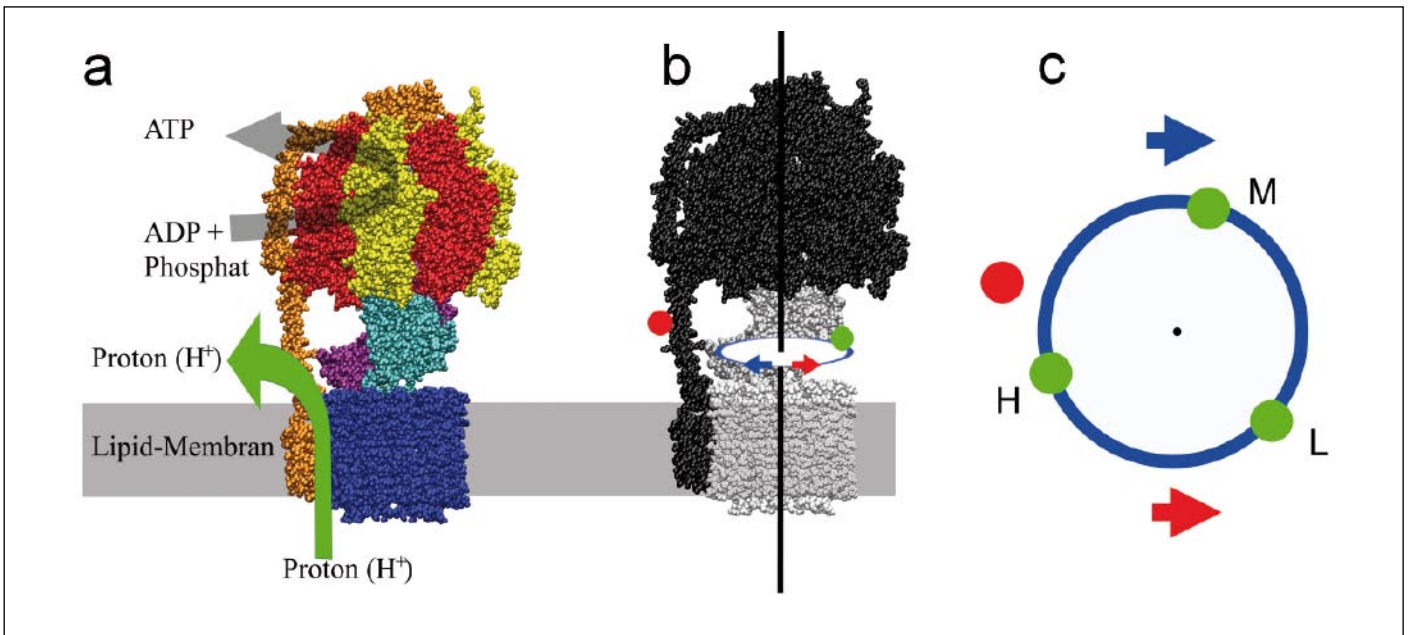


Abb. 1: Modell der F_0F_1 -ATP Synthase mit protonengetriebenem Rotationsmotor. (a) Angetrieben durch einen Protonengradienten und ein elektrisches Potential rotieren die blau (c -Untereinheiten), hellblau (γ) und lila (ϵ) gekennzeichneten Rotor-Komponenten, um in den Bindungstaschen zwischen den gelben und roten Untereinheiten ATP zu synthetisieren. (b) Für den Rotationsnachweis werden an einer rotierenden Untereinheit ein Farbstoff (grüner Punkt) und an einer statischen Untereinheit (roter Punkt) ein zweiter angebracht. (c) Durch Rotation ändert sich der Abstand zwischen den Farbstoffen. Die Distanzen werden je nach Effizienz des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) als „H“ (high FRET), „M“ (medium FRET), oder „L“ (low FRET) bezeichnet. Aus deren Abfolge kann die Drehrichtung ermittelt werden: der blaue Pfeil entspricht ATP-Hydrolyse, der rote ATP-Synthese.

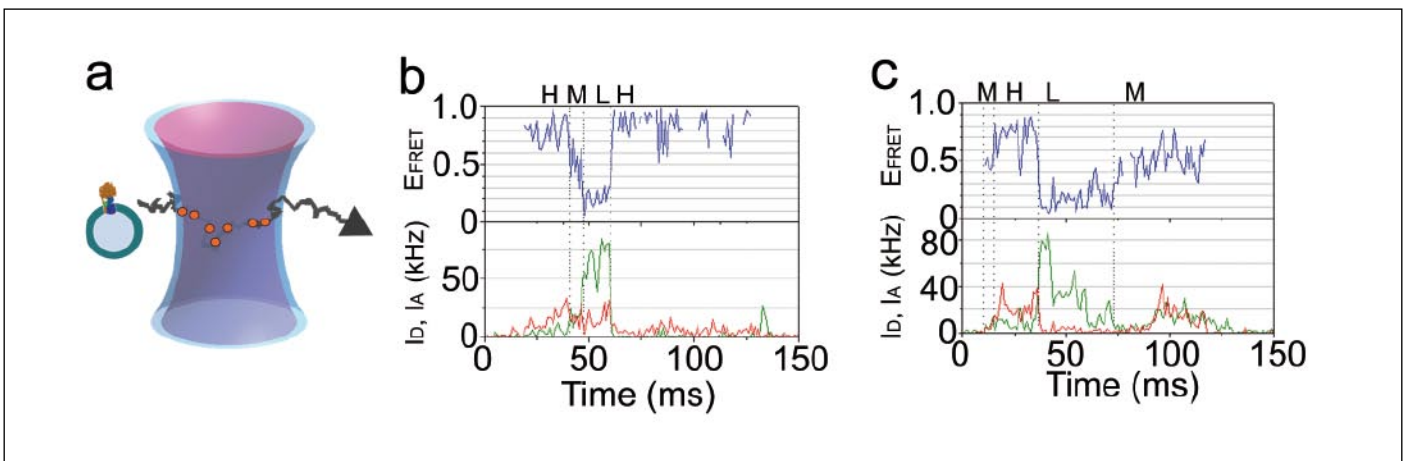


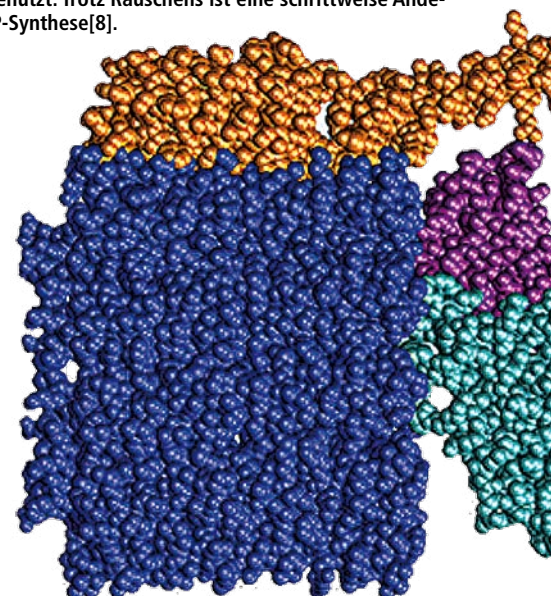
Abb. 2: Konfokale Einzelmolekül-FRET Messungen der F_0F_1 -ATP Synthase. (a) Eine einzelne, FRET-markierte F_0F_1 -ATP Synthase ist in ein Lipidvesikel eingebaut und diffundiert durch den Laserfokus - hier mit zwei verschiedenen Lasern, um beide Fluorophore getrennt nachzuweisen. Dabei wird eine hohe Photonenzahl detektiert. (b) und (c): Die Einzelmolekül-FRET-Signale bestehen aus der Fluoreszenzintensitätspur des Donor-Farbstoffs (grün) und des Akzeptor-Farbstoffs (rot). Deren relative Verhältnisse werden für die Berechnung der FRET-Effizienz (blau, obere Spur) benutzt. Trotz Rauschens ist eine schrittweise Änderung und eine eindeutige Abfolge der FRET Stufen erkennbar: HML entspricht ATP-Hydrolyse und LMH ATP-Synthese[8].

Konformation angekommen ist. Für das Verständnis der Motoren sind Anzahl, Richtung und Geschwindigkeit der verschiedenen Teilschritte wesentlich, und falls die biologischen Maschinen durch Störungen im Ablauf Krankheiten verursachen, führt die Identifizierung des jeweiligen Teilschritts möglicherweise zur Entwicklung effizienter Medikamente.

Einzelmolekül-FRET: perfekte Orts- und Zeitaufklärung für Konformationsänderungen

Die Beobachtung einzelner Moleküle hat vor mehr als 20 Jahren mit einer Absorptionsmes-

sung des Farbstoffmoleküls Pentacene in einem Kristall aus *p*-Terphenyl begonnen [2]. Diese Methode des Einzelmolekülnachweises wurde kurz danach vom Fluoreszenznachweis eines einzelnen Fluorophors in einem Gastkristall abgelöst, und damit die Tür zur heutigen Einzelmoleküldetektion bei Raumtemperatur und in wässrigen Lösungen oder lebenden Zellen aufgestoßen. Die Abstandsmessung zweier verschiedener Fluorophore an einer einzelnen Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Taekjip Ha und anderen [3] im Jahr 1996 kann als Startpunkt eines Revivals der von Theodor Förster 1946 formulierten Theorie [4] eines Resonanz-Energie-Transfers (FRET) gesehen werden. Heute werden beispielsweise Abstands-



änderungen in einzelnen DNA-bearbeitenden Proteinmaschinen und Prozesse der Proteinfaltung mit Einzelmolekül-FRET verfolgt.

Als Postdoc am Physikalisch-Chemischen Institut von Peter Gräber (Universität Freiburg) konnte ich im September 1997 die Pioniere der Einzelmoleküldetektion auf dem „3rd single-molecule spectroscopy workshop“ in Berlin kennen lernen; dabei entstand die Idee zur Untersuchung des Rotationsmotors F_0F_1 -ATP Synthase mittels FRET, um die Drehrichtungen des Motors für die entgegengesetzten chemischen Reaktionen der ATP-Hydrolyse und ATP-Synthese nachzuweisen (Abb. 1).

F_0F_1 -ATP Synthase: ein Rotationsdoppelmotor mit ATP oder Protonenantrieb

Im selben Jahr veröffentlichten Hiroyuki Noji und Kollegen in der Zeitschrift *Nature* [5] den direkten experimentellen Nachweis, daß einzelne F_1 -ATPasen (d.h. Fragmente des Gesamtzyms) eine rotierende zentrale Untereinheit γ besitzen, die durch ATP-Hydrolyse angetrieben wird. Der videomikroskopische Film mit unidirektional drehenden fluoreszenzmarkierten Mikrometer-langen Aktinfilamenten als Zeiger der γ Rotation markiert den Durchbruch in eine neue Ära der Bioenergetik: die einzelnen Teilschritte des Motors - ATP-Bindung, Bindungspaltung, Freisetzung der Produkte ADP und Phosphat - konnten jeweils Drehwinkeln zugeordnet werden.

Wie aber funktioniert dieser Teilmotor im Gesamtzym F_0F_1 -ATP Synthase, und worin unterscheidet sich die Protonengetriebene ATP-Synthase von der ATP-Hydrolyse? Mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET wollten wir in Zusammenarbeit mit Claus A. M. Seidel (Universität Düsseldorf) zunächst die Drehrichtung bestimmen. Dazu wurden zwei Farbstoffe spezifisch an genetisch eingeführte Cysteine angebracht, und deren Abstand kontinuierlich gemessen. Bei Rotation der γ -Untereinheit traten drei unterscheidbare FRET-Effizienzen auf. Die unidirektionale Sequenz erlaubte die Entschlüsselung der Drehrichtung bei ATP-Hydrolyse [6]. Nach Erzeugung eines Protonen-Gradienten über die Lipidmembran der 150 nm kleinen Vesikel konnte auch ATP-Synthese beobachtet werden - mit der umgekehrten unidirektionalen Sequenz der FRET-Effizienzen [7] (Abb. 2).

Daß die drei verschiedenen FRET-Effizienzen tatsächlich den drei möglichen Orientierungen der γ -Untereinheit entsprachen, wurde aus der mittleren Verweilzeit geschlossen, die ATP anhängig war und genau der mittleren Hydrolyse-rate entsprach. Inhibitoren verlangsamten die schrittweise Rotation, und Zugabe von ADP statt ATP führte zu konstanten FRET-Effizienzen und nicht zu den sequentiellen FRET-Effizienzänderungen. So konnten wir auch die Schrittweite des Protonengetriebenen F_0 -Motors der ATP Synthase in 10 Einzelschritten nachweisen [8].

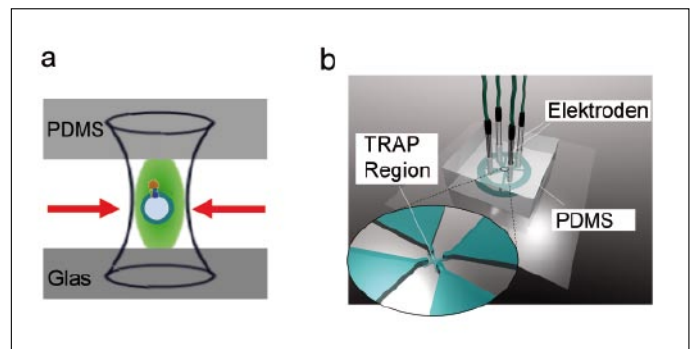


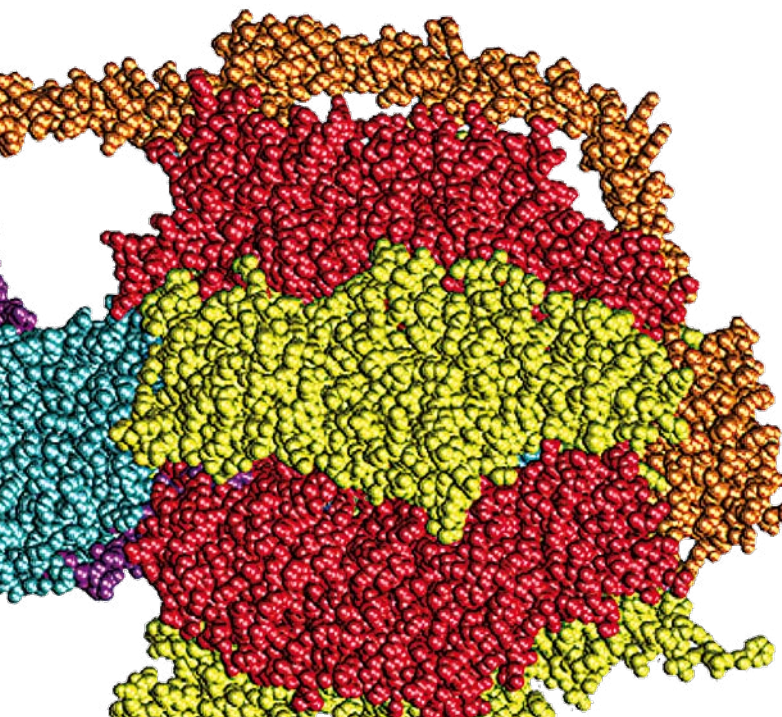
Abb. 3: Prinzip und Aufbau des „ABELtrap“ für stabile Einzelmolekül-FRET Messungen in Lösung. (a) Die Brown'sche Molekularbewegung wird in der PDMS Struktur auf zwei Dimensionen eingeschränkt. Mit Hilfe von feedback-gesteuerten elektrischen Feldern wird das Enzym im Fokus des Lasers für die FRET Messung gehalten. (b) Die flache TRAP-Region ist kreuzförmig, und die Elektroden befinden sich in den deutlich höheren Reservoirs - hier in hellblau gezeichnet [10].

Neue Entwicklungen: vom ABELtrap zurück in die lebende Zelle

Wir nutzen ein selbstgebautes konfokales Mikroskop mit ortsfestem Fokus für die Einzelmolekül-FRET-Messungen von frei diffundierenden Membranproteinen, um Artefakte einer Oberflächenimmobilisierung zu vermeiden. Der Nachteil der Methode ist jedoch die kurze Beobachtungszeit von 30 bis maximal 1000 Millisekunden aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung durch den Laserfokus. Daher bauen wir eine neuartige elektrokinetische Falle auf, die von Adam Cohen und W. E. Moerner in Stanford entwickelt wurde. Der ABELtrap [9] („anti Brownian electrokinetic trap“) ist eine mikrofluidische Struktur aus Polydimethylsiloxan mit weniger als einem Mikrometer Höhe, in der mit Hilfe von vier Elektroden und einem optischen Feedback ein Lipidvesikel für mehr als 10 Sekunden an einem Ort festgehalten werden kann und FRET-Messungen erlaubt, bis die einzelnen Farbstoffe geblieben sind [10] (Abb. 3). Zukünftige FRET-Untersuchungen der Dynamik einzelner biologischer Motoren und Membrantransporter in lebenden Zellen werden zeigen, ob die bisherigen künstlichen Lipidvesikel (Lipidzusammensetzung, extrem niedrige Membranproteinkonzentrationen, unkontrollierte Membranpotentiale) uns zwar erste Verständnisse und faszinierende Einblicke in die Funktionsweise einzelner biologischer Maschinen erlaubt haben, aber wir jetzt deren ursprüngliche biologische Umgebung ebenfalls in den Fokus bringen müssen.

Literatur

- [1] Yoshida M. et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 669 (2001)
- [2] Moerner W. E. et al.: *Phys Rev Lett* 62, 2535 (1989)
- [3] Ha T. et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6264 (1996)
- [4] Förster T.: *Naturwissenschaften* 33, 166 (1946)
- [5] Noji, H. et al.: *Nature* 386, 299 (1997)
- [6] Börsch M. et al.: *FEBS Lett* 527, 147 (2002)
- [7] Diez M. et al.: *Nat Struct Mol Biol* 11, 135 (2004)
- [8] Düser M. G. et al.: *Embo J* 28, 2689 (2009)
- [9] Cohen A. E. et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4362 (2006)
- [10] Börsch M. et al.: *Chemphyschem* 12, 542 (2011)



Keywords:

Biologische Nanomaschinen, Einzelmoleküldetektion, Förster-Resonanz-Energie-Transfer FRET, ABELtrap

KONTAKT

Prof. Dr. Michael Börsch
 Universitätsklinikum Jena
 Friedrich Schiller Universität Jena
 Tel: 03641/933 745
 Fax: 03641/933 750
 michael.boersch@med.uni-jena.de
 www.m-boersch.org/