

Biopolymere

Relaxationskinetik in lebenden Zellen

STEFFEN BÜNING, SIMON EBBINGHAUS
LEHRSTUHL FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE II, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Fast kinetics of biochemical reactions can be measured *in vitro* using relaxation experiments. Recently, temperature jump techniques have been developed that can also be applied for *in-cell* studies. The high spatio-temporal resolution of such experiments leads to new insights of how the cellular environment modifies reaction kinetics.

DOI: 10.1007/s12268-014-
© Springer-Verlag 2014

Kinetik schneller biochemischer Reaktionen

Das Verständnis elementarer Schritte biochemischer Reaktionen ist oft essenziell für die Entschlüsselung des Reaktionsmechanismus. Beispiele sind die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes bei der Enzymkatalyse oder die Bildung von Sekundärstrukturen bei der Proteinfaltung. Sie laufen meist auf sehr schnellen Zeitskalen ab, die sich vom Pikosekunden- (1 Pikosekunde = 10^{-12} Sekunden) bis in den Sekundenbereich erstrecken. Eine entsprechend hohe Zeitauflösung ist erforderlich, um diese Reaktionen

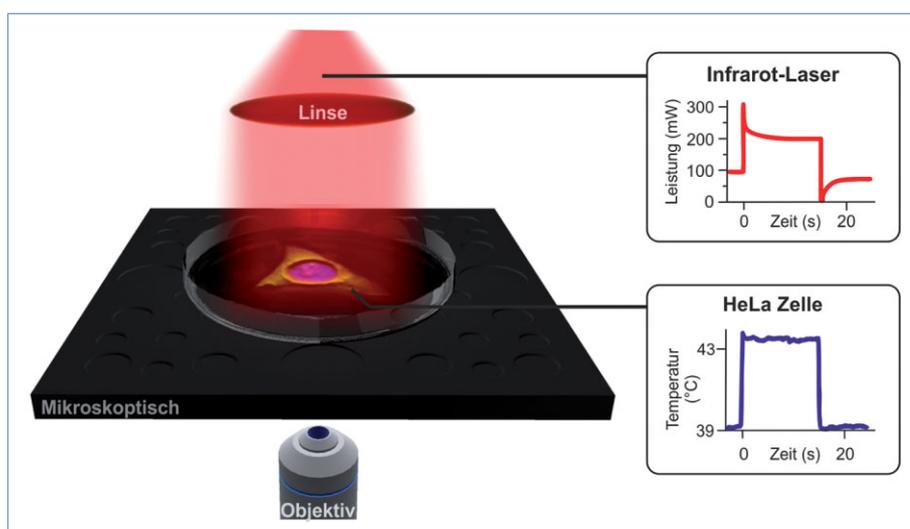
experimentell zu erfassen. Oft geschieht dies spektroskopisch, beispielsweise durch Bestimmung der Konzentration eines Reaktionspartners mittels Absorptions- oder Fluoreszenzspektroskopie. Des Weiteren müssen Triggermethoden verwendet werden, die die Reaktion initiieren und synchronisieren. Strömungsmethoden, wie z. B. die *stopped flow*-Technik, beruhen auf einer schnellen Mischung zweier in Lösung befindlicher Reaktionspartner durch pneumatisch betriebene Treibspritzen. Die Zeitauflösung des Experiments ist durch die aus dem Mischprozess resultierende Totzeit auf einige Milli-

sekunden begrenzt. Eine noch höhere zeitliche Auflösung lässt sich durch Relaxationsexperimente ohne Mischvorgang realisieren. Dabei wird das chemische Gleichgewicht einer Reaktion durch schockartige Änderung einer physikalischen Größe wie Temperatur oder Druck verschoben. Den veränderten Bedingungen folgend strebt die Reaktion einem neuen Gleichgewichtszustand entgegen.

Bisher war der Einsatz solcher Strömungs- oder Relaxationsmethoden meist auf *in vitro*-Experimente begrenzt. Oftmals stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die zellulären Bedingungen im Vergleich zu verdünnten Pufferlösungen die Kinetik beeinflussen. Beispielsweise ist bekannt, dass die Viskosität des zellulären Mediums deutlich höher ist [1]. Die entsprechend verringerte Diffusionsgeschwindigkeit kann zu einer Verlangsamung der Reaktion führen. Dagegen kann die hohe Konzentration an Makromolekülen in der Zelle (bis zu 400 Milligramm pro Milliliter) [2] Reaktionen aufgrund sterischer Effekte beschleunigen [3, 4]. Die Verwendung des zellulären Milieus als Reaktionsmedium kann weiterhin zu neuen Erkenntnissen über die Rolle von zellulären Bindungspartnern oder Kofaktoren während der Reaktion führen. Beispielsweise kann so eine Proteinfaltungsreaktion in Gegenwart molekularer Chaperone untersucht werden.

Temperatursprung-Experimente in Zellen

Zur kinetischen Studie biochemischer Reaktionen wird häufig die 1959 von M. Eigen entwickelte Temperatursprungmethode verwendet [5]. Oft genügt eine Temperaturänderung um wenige Grad Celsius, um eine ausreichende Verschiebung des Gleichgewichts zu bewirken [6]. Somit ist die Temperatursprungmethode auch zur Untersuchung von Reaktionen in zellulärer Umgebung unter physiologischen Bedingungen geeignet. Derartige Temperatursprünge können mit Infrarot-Lasern realisiert werden [7, 8]. Die Zelle und das umgebende Medium werden gleich-

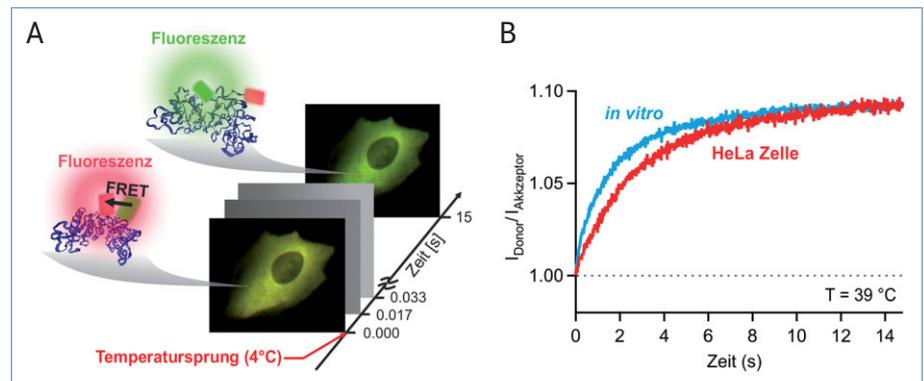


▲ **Abb. 1:** Aufbau eines in-cell-Temperatursprung-Experiments. Die Temperatur der zu untersuchenden zellulären Umgebung wird mit einem Infrarot-Laser kontrolliert. Ein invertiertes Mikroskop ermöglicht die räumliche und zeitliche Messung der Relaxationskinetik. Beispielhaft werden hier experimentelle Daten eines Temperatursprung-Experiments aus [8] gezeigt. Die Graphen zeigen die maßgeschneiderte Ausgangsleistung des Infrarot-Lasers (rot) und den entsprechend induzierten Temperaturverlauf in der HeLa-Zelle (blau).

mäßig unter mikroskopischer Beobachtung aufgeheizt (**Abb. 1**). Dabei wird eine anfangs hohe Laserleistung verwendet, um einen rapiden Temperatursprung (unter einer Millisekunde) zu induzieren. Die anschließend maßgeschneiderte Senkung der Heizleistung führt zu einer schnellen Äquilibration der Temperatur. Die Messung der Temperatur und die Kalibrierung der Temperatursprünge erfolgt durch intrazelluläre temperatursensitive Fluoreszenzfarbstoffe. Die Relaxationskinetik in der Zelle kann sowohl zeitlich als auch räumlich aufgelöst werden, etwa durch Fluoreszenzmikroskopie.

Stabilität und Entfaltung der Phosphoglycerat-Kinase in der Zelle

Die Entfaltung von Phosphoglycerat-Kinase (PGK) wird durch einen Temperatursprung von 39 °C auf 43 °C induziert und kann durch Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Mikroskopie gemessen werden (**Abb. 2**). Sukzessive Temperatursprünge erlauben weiterhin die Aufnahme einer thermischen Schmelzkurve des Proteins. So kann neben der Kinetik auch die Stabilität des Proteins bestimmt werden [9]. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die durchschnittliche Entfaltungszeit der PGK in einer Zelle im Vergleich zu einer verdünnten Pufferlösung um den Faktor 1,5 verlangsamt ist [8]. Weiterhin steigt die Schmelztemperatur (T_m) von 38,9 °C auf 41,5 °C [9]. Die beiden Substratbindedomänen für ADP und 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) sind in zellulärer Umgebung dichter beieinander, was zu einer effizienteren Katalyse führt [4]. Eine Pixelanalyse erlaubt die Bestimmung der Entfaltungszeit in verschiedenen Bereichen des Zytoplasmas oder in verschiedenen Organellen der Zelle (**Abb. 3**). Die Ergebnisse zeigen eine positionsabhängige Verteilung der Entfaltungszeiten in verschiedenen Mikroumgebungen innerhalb einer Zelle [10], zwischen verschiedenen Zellen [11] und während verschiedener Stadien des Zellzyklus [12]. Die Studien demonstrieren die verschiedenarti-



▲ **Abb. 2:** Entfaltungskinetik von Phosphoglycerat-Kinase (PGK). **A**, Temperatursprung-Experiment und Datenanalyse zur Entfaltung von PGK. Durch die Entfaltung des Proteins vergrößert sich der Abstand zwischen dem N-terminalen AcGFP1 (grünes Rechteck) und dem C-terminalen mCherry (rotes Rechteck). Somit wird eine zeitliche Abnahme des FRET-Signals nach dem Temperatursprung detektiert, welche anschließend per Pixelanalyse ausgewertet wird. **B**, Entfaltungskinetik von PGK infolge des Temperatursprungs von 39 °C auf 43 °C in der Zelle (rot) und *in vitro* (blau). Modifiziert aus [8].

gen zellbiologischen Einflüsse, welche die Kinetik biochemischer Reaktionen im Vergleich zu *in vitro*-Experimenten verändern.

Fazit und Zukunftsaussichten

Mithilfe von *in cellulo*-Temperatursprung-Experimenten kann die Kinetik von Biomolekülen in der „nativen“ zellulären Umgebung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung gemessen werden. Die Methode kann in einem Hochdurchsatzverfahren betrieben werden und bietet somit die Möglichkeit der Entwicklung neuartiger zellbasierter Assays. Weiterhin kann die Technik auch zur gezielten Stimulation einzelner Zellen in einem Organismus z. B. *Caenorhabditis elegans* verwendet werden.

Danksagung

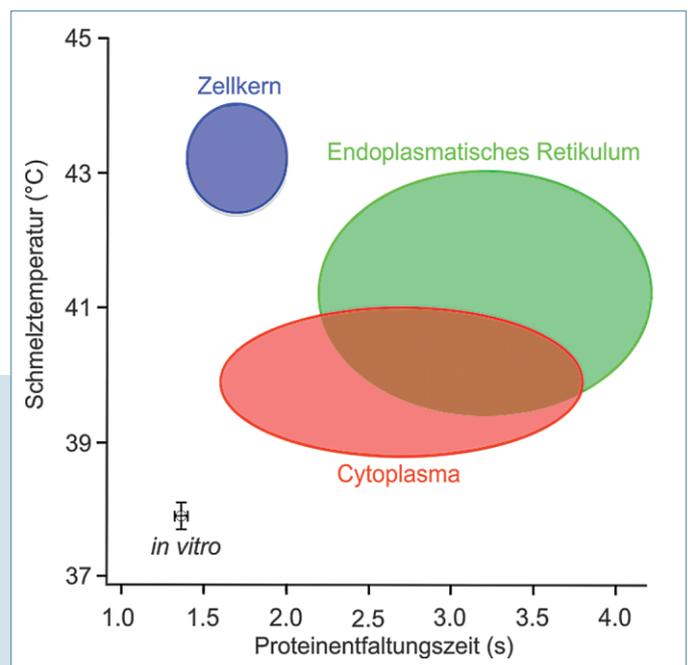
Die Autoren bedanken sich für die Förderung durch das Rückkehrerprogramm des Ministeriums für Innovation, Wissenschaft und

Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und den Exzellenzcluster RESOLV (EXC 1069).

Literatur

- [1] Verkman A (2002) Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem Sci* 27:27–33
- [2] Zimmerman S, Trach S (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 222:599–620
- [3] Minton AP (2005) Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophys J* 88:971–985
- [4] Dhar A, Samiotakis A, Ebbinghaus S et al. (2010) Structure, function, and folding of phosphoglycerate kinase are strongly perturbed by macromolecular crowding. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17586–17591

► **Abb. 3:** Stabilität und Entfaltungszeit von Phosphoglycerat-Kinase (PGK) in verschiedenen Zellorganellen und *in vitro*. Im Vergleich zu den *in vitro*-Messungen (schwarzer Punkt mit Fehlerbalken) wird PGK im Zytoplasma einer HeLa-Zelle stabilisiert und die Entfaltungszeit nimmt zu (rot). Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (grün) und im Zellkern (blau). Im Zellkern geht diese Stabilisierung mit einer verringerten Entfaltungszeit einher. Die breiten Verteilungen der Messwerte, welche hier durch die elliptischen Bereiche schematisch dargestellt werden, sind nicht auf experimentelle Messungenauigkeiten, sondern auf zelluläre Heterogenität zurückzuführen. Modifiziert aus [10].



- [5] Czerlinski G, Eigen M (1959) Eine Temperatursprungmethode zur Untersuchung chemischer Relaxation. *Z Elektrochem* 63:652–661
- [6] Winter R, Noll F, Czeslik C (2011) Methoden der Biophysikalischen Chemie. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden
- [7] Schoen I, Krammer H, Braun D (2009) Hybridization kinetics is different inside cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21649–21654
- [8] Ebbinghaus S, Dhar A, McDonald D et al. (2010) Protein folding stability and dynamics imaged in a living cell. *Nat Methods* 7:319–323
- [9] Guo M, Xu Y, Gruebele M (2012) Temperature dependence of protein folding kinetics in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:17863–17867
- [10] Dhar A, Girdhar K, Singh D et al. (2011) Protein stability and folding kinetics in the nucleus and endoplasmic reticulum of eucaryotic cells. *Biophys J* 101:421–430
- [11] Dhar A, Ebbinghaus S, Shen Z et al. (2010) The diffusion coefficient for PGK folding in eukaryotic cells. *Biophys J* 99:L69–L71
- [12] Wirth A, Platkov M, Gruebele M (2013) Temporal variation of a protein folding energy landscape in the cell. *J Am Chem Soc* 135:19215–19221

AUTOREN

**Steffen Büning**

Jahrgang 1986. Chemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum; dort seit 2011 Promotion.

**Simon Ebbinghaus**

Jahrgang 1980. Chemie- und Biochemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum. 2007 Promotion. 2008–2010 Postdoc University of Illinois, Urbana-Champaign, USA. Seit 2011 Juniorprofessor an der Ruhr-Universität Bochum.

Korrespondenzadresse:

Jun.-Prof. Dr. Simon Ebbinghaus
 Lehrstuhl für Physikalische Chemie II
 Fakultät für Chemie und Biochemie
 Ruhr-Universität Bochum
 Universitätsstraße 150
 D-44801 Bochum
 Tel.: 0234-32-25533
 Fax: 0234-32-14183
 Simon.Ebbinghaus@rub.de
 www.rub.de/pc2/ebbinghaus