

THOMAS PRISNER, INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE UND THEORETISCHE CHEMIE

Struktur und Funktion paramagnetischer Zentren in Enzymen – EPR-Spektroskopie

In der Arbeitsgruppe werden mit Methoden der Elektronenspin-Resonanzspektroskopie (EPR) paramagnetische Zentren in biologischen Makromolekülen untersucht. Mit dieser Methode können Atome oder Moleküle mit ungepaartem Elektronenspin, wie z. B. Übergangsmetalle oder Radikale, untersucht werden. Im Gegensatz zur NMR Spektroskopie ist das mit dem ungepaarten Elektron verbundene magnetische Moment jedoch um 3 Größenordnungen stärker; dies führt einerseits zu einer gesteigerten Empfindlichkeit, andererseits aber auch zu deutlich höheren technischen Anforderungen in Bezug auf Anregungsfrequenz (Mikrowellenbereich) und Zeitskala (ns) der Experimente. In der Arbeitsgruppe laufen deshalb die biophysikalischen Untersuchungen zu spezifischen Fragestellungen an Proteinen und Oligonucleotiden Hand in Hand mit methodischen und technischen Weiterentwicklungen. Ähnlich wie in der NMR-Spektroskopie geht der Trend dabei zu gepulsten Messverfahren, Mehrfachresonanz-Experimenten und zu höheren Magnetfeldern

Abbildung 1: EPR Signal von einem Mn^{II} in einem G-Protein-Komplex ($p21ras-Mn-GDP$) bei unterschiedlichen Messfrequenzen und Magnetfeldern. Bei hohen Feldstärken ist eine Verschmälerung der Linien des zentralen Übergangs des Hochspinsystems ($S=5/2, I=5/2$) festzustellen.

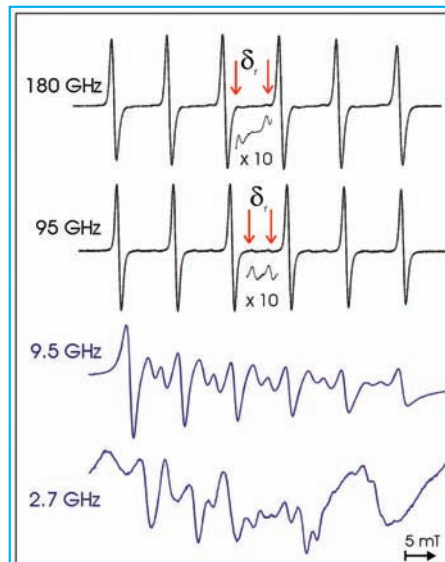


Figure 1: EPR signal of a Mn^{II} ion in a G protein-complex ($p21ras-Mn-GDP$) measured at different microwave frequencies and magnetic field strengths. A narrowing of the hyperfine lines of the central transition of the high spin Mn ion ($S=5/2, I=5/2$) can be observed at higher magnetic field strengths.

und dadurch auch höheren Anregungsfrequenzen. Die Hochfeld-EPR Spektroskopie (HF-EPR) liefert eine gesteigerte spektrale Auflösung, was besonders in biologischen Systemen mit mehreren beteiligten paramagnetischen Zentren von essentieller Bedeutung ist (Abbildung 1). Zusätzlich wird die Empfindlichkeit des Spektrometers um mehrere Größenordnungen gesteigert, was zu deutlich verringerten Probenmengen führt (beispielsweise 10pMol für Mn^{II} Ionen). In Frankfurt wurde deshalb ein Spektrometer bei einer Messfrequenz von 180 GHz (6.4 T Magnetfeld) selbst entwickelt, das einen Faktor 20 über den üblichen kommerziellen Geräten liegt und Puls- und Doppelresonanzexperimente ermöglicht (Abbildung 2). Mittels der Hyperfeinspektroskopie wird die Wechselwirkung des ungepaarten Elektronenspins mit den Kernspins der nahen Umgebung (<0.8 nm) detektiert. Sie liefert Information über die chemische Identität der Kerne, ihren Abstand und Bindungsverhältnisse zum ungepaarten Elektronenspin. Dadurch können die lokale Struktur des paramagnetischen Zentrums und seine Änderungen, beispielsweise bei Elektronentransfer-Reaktionen, mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Hierbei

THOMAS PRISNER, INSTITUTE OF PHYSICAL AND THEORETICAL CHEMISTRY

Structure and Function of paramagnetic centres in enzymes – EPR spectroscopy

Our research focus is the investigation of paramagnetic centres in biological macromolecules by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). Atoms or molecules with unpaired electron spins, like transition metal ions or radicals, can be detected by this method. The magnetic moment of the electron spin is 3 orders of magnitude stronger than the moments of nuclei, which can be observed by NMR spectroscopy. This leads to a strongly increased sensitivity but also to much higher technical requirements with respect to excitation frequency (microwave region) and time scale (ns).

Therefore the biophysical investigations of specific questions on protein and oligonucleotide molecules go hand in hand with methodical and technical developments. Modern EPR spectroscopy uses pulsed methods, multiple resonances and higher magnetic fields to increase spectral resolution, similar to NMR spectroscopy. High-field (HF) EPR has an increased spectral resolution, which is of specific importance for biological molecules with several paramagnetic

centres. Additionally the sensitivity of the spectrometer is improved by several orders of magnitude, reducing the necessary amount of samples dramatically (for example only 10 pMol of Mn^{II}). In Frankfurt such a spectrometer has been developed at a frequency of 180 GHz (magnetic field of 6.4 T), a factor of 20 above the typical used commercial spectrometers, which allows pulsed as well as double frequency experiments to be performed.

Hyperfine spectroscopy enables to detect the interaction of the unpaired electron spin with nuclear spins of the local surrounding (<0.8 nm). This allows to get information about the kind of nuclei, their chemical nature, the distance and binding properties to the unpaired electron spin. This allows to determine the local structure of the paramagnetic center and structural changes upon electron transfer reactions with high precision. Especially two methods are useful to extract these informations in large biomolecules: 2D-spectroscopy (HYSCORE) at lower magnetic field values (figure 3) and double resonance experiments (ENDOR) at high field values (figure 4).

The same basic principle can be used to detect the interaction bet-



Abbildung 2: Hochfrequenz-(180 GHz) EPR Puls-Mikrowellen-Brücke und Doppelresonanz (ENDOR) Probenkopf für gleichzeitige Anregung der Elektronen- und Kernspins

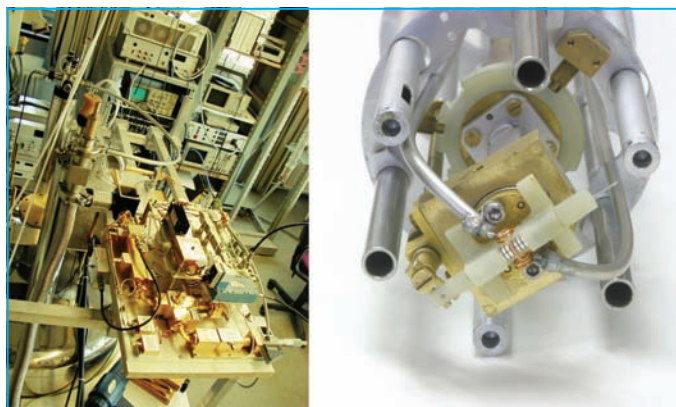


Figure 2: High-frequency (180 GHz) EPR Puls-Microwave Bridge and ENDOR Probehead for simultaneous excitation of electron and nuclear spins

haben sich zwei Methoden als besonders leistungsfähig erwiesen: zweidimensionale Puls-Spektroskopie (HYSCORE) bei kleinen Magnetfeldern (Abbildung 3) und Doppelresonanz-Experimente (ENDOR) bei hohen Magnetfeldern (Abbildung 4).

In der gleichen Weise ist es möglich die Wechselwirkung zwischen zwei ungepaarten paramagnetischen Zentren in großen Makromolekülen zu detektieren. Moderne gepulste Messmethoden (PELDOR) erlauben es in diesem Fall, Abstände bis zu 8 nm zu detektieren. Diese Abstandsmessungen ermöglichen es beispielsweise, die relative Lage von Untereinheiten in großen Proteinkomplexen oder große strukturelle Änderungen in

ween two unpaired electron spins in a biomacromolecule. Modern pulsed methods (PELDOR) make it possible to measure distances up to 8 nm between two paramagnetic centers. These distance measurements can be used to find the relative locations of subunits in large protein complexes or to determine long-range structural rearrangements in macromolecules induced by chemical reactions or substrate binding. For this method two paramagnetic centres are necessary. In diamagnetic biomolecules spin-labels can be attached to the molecule by site-directed spin labeling techniques (similar as in fluorescence-spectroscopy). The research group is part of the Center of Biomolecular Magnetic

Abbildung 3: HYSCORE Experiment eines Chinon-Radikals, das in einem Membranprotein (Quinol-Oxidase) gebunden ist. Die Signale zeigen die Kopplung an einen Stickstoff des Protein-Rückgrats

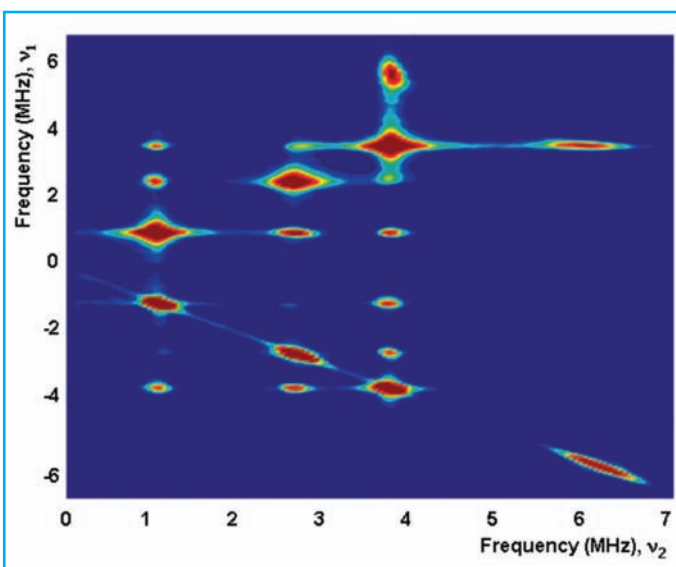


Figure 3: HYSCORE Experiment of a semiquinone radical bound to the membrane protein quinole oxidase. The observed peaks belong to the coupling to a backbone nitrogen

Abbildung 4: HF-ENDOR an dem p21ras-Mn-GDP Protein Komplex. Die Kopplung der beiden ¹³C Kohlenstoffkerne des gebundenen Serin zu dem Mn-Ion können beide getrennt nachgewiesen und mit Dichtefunktional-Rechnungen zugeordnet werden.

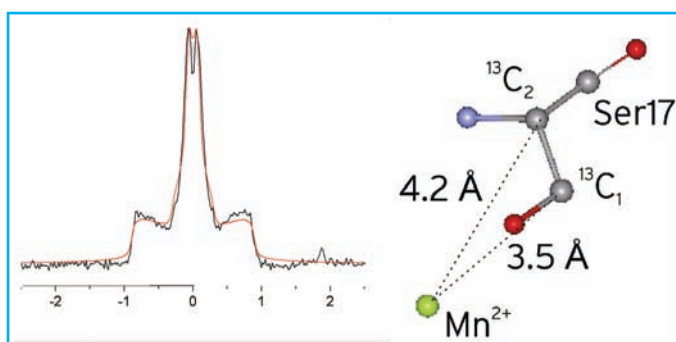


Figure 4: HF-ENDOR on the p21ras-Mn-GDP protein complex. The coupling of both ¹³C of the bound serin to the Mn ion can be detected and assigned by density functional calculations.

Makromolekülen bei chemischen Reaktionen oder Substratbindung zu messen. Für die Methode sind zwei paramagnetische Moleküle erforderlich; bei diamagnetischen Biomolekülen können jedoch, ähnlich wie in der Fluoreszenz-Spektroskopie, auch Spinsonden verwendet werden, die spezifisch an das Makromolekül gebunden werden (Abbildung 5).

Die Arbeitsgruppe ist Teil des Frankfurter Zentrums für Biologische Magnetische Resonanz (BMRZ) und mit Teilprojekten an den Sonderforschungsbereichen Molekulare Bioenergetik und RNA-Ligand-Wechselwirkungen beteiligt. In diesen Projekten wird die EPR-Spektroskopie eingesetzt, um strukturelle und funktionelle Aspekte von Proteinkomplexen der mitochondrialen Atmungskette und von Ribozymen und

Resonance in Frankfurt, and participates in the two Collaborative Research Centres of the DFG Molecular Bioenergetics and RNA-ligand interaction. In these projects EPR spectroscopy is used to investigate structural and functional aspects of protein complexes of the mitochondrial respiration chain and of ribozymes and RNA-ligand complexes. Members of the group join non-local research projects of the DFG (Priority Program High-field EPR in Biology, Chemistry and Physics and Radicals in enzymatic catalysis) and of the EU (COST Advanced EPR in Molecular Biophysics). The close collaboration with biochemists and chemists is essential for all these projects and is excellently established in Frankfurt. Another research field of the group, together with the NMR groups in Frankfurt and other

RNA-Ligand-Komplexen zu untersuchen. Des Weiteren forschen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe in überregionalen Verbundprojekten der DFG (Schwerpunktprogramme Hochfeld-EPR in Biologie, Chemie und Physik und Radikale in der enzymatischen Katalyse) und der EU (COST Advanced EPR in Molecular Biophysics). In allen diesen Projekten ist die enge Zusammenarbeit mit Biochemikern und Chemikern essentiell, die in Frankfurt in hervorragender Weise gegeben und etabliert ist. Das jüngste Arbeitsgebiet der Gruppe ist, in Zusammenarbeit mit den NMR Arbeitsgruppen des Fachbereichs und weiteren europäischen Partnern, die Entwicklung eines hochauflösenden NMR-Spektrometers mit stark verbesserter Empfindlichkeit. Dies soll durch Polarisationsübertrag von paramagnetischen Zentren auf die Kernspins (DNP: Dynamic Nuclear Polarization) erreicht werden. Des Weiteren bestehen enge Zusammenarbeiten mit quantentheoretischen Gruppen, um die spektroskopischen Daten in strukturelle und molekulardynamische Informationen zu übersetzen.

European partners, is the development of a new type of high-resolution NMR spectrometer with strongly increased sensitivity due to polarization transfer from paramagnetic centers to the nuclei (DNP). Other close collaborations exist to quantum theoretical groups to link spectroscopical data to structural information.

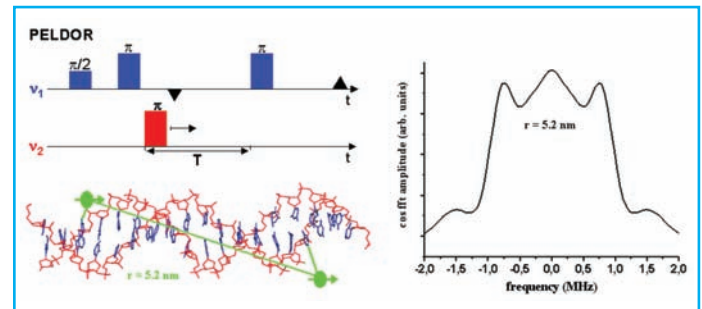


Abbildung 5: PELDOR Experiment an einem spinlabelten Doppelstrang-DNA Molekül. Gezeigt ist die Pulssequenz und das Fourierspektrum, das eine direkte Bestimmung des Abstandes der beiden Spinlabel (in Grün) erlaubt.

Figure 5: PELDOR experiment performed on a spinlabeled double-helix DNA. Shown are the microwave pulse sequence of the experiment and the Fourier spectra which contains directly the distance between the two spinlabels (shown in green).

LITERATUR / REFERENCES

M. Bennati and T. F. Prisner New development in high field EPR with potential applications in structural biology, **Reports on Progress in Physics**, **68**, 411-448 (2005)

Schiemann, T. F. Prisner Long Range Distance Determinations in Biomacromolecules by EPR Spectroscopy **O. Quart.Rev. Biophys.**, **40**, 1-53 (2007)

O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B.E. Bode, T.F. Prisner & J.W. Engels; Spin labeling of oligonucleotides with the nitroxide TPA and use of PELDOR, a pulse EPR method, to measure intramolecular distances **Nat. Protoc.**, **2**, 904-923 (2007)

V. Denysenkov, T. F. Prisner, J. Stubbe, M. Bennati, High-Field PELDOR for structure determination in protein complexes: the relative orientation of the tyrosyl in the homodimer of the E.coli R2 ribonucleotide reductase **Proc. Nat. Acad. Sci.** **103**, 13386-13390 (2006)

V.P. Denysenkov, D. Biglino, W. Lubitz, T.F. Prisner & M. Bennati; Structure of the Tyrosyl Biradical in Mouse R2 Ribonucleotide Reductase from High-Field PELDOR **Angew. Chem., Int. Ed.**, **47**, 1224-1227 (2008).

T. Maly, K. Zwicker, A. Cernescu, U. Brandt & T. Prisner New pulsed EPR methods and their application to characterize mitochondrial complex I **Biochim. Biophys. Acta**, **1787**, 584-592 (2009)

M.J. Prandolini, V.P. Denysenkov, M. Gafurov, S. Lyubanova, B. Endeward & T.F. Prisner; High-Field Dynamic Nuclear Polarization in Aqueous Solutions **J. Am. Chem. Soc.** **131**, 6090-6092 (2009)

O. Schiemann, P. Cekan, D. Margraf, T. F. Prisner, S.T. Sigurdsson; Relative Orientation of Rigid Nitroxides by PELDOR Spectroscopy: Beyond Distance Measurements in Nucleic Acids **Angew. Chemie Int. Ed.** **18**, 3292-3295 (2009)

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Thomas Prisner

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie und
Max-von-Laue-Str. 7
D-60438 Frankfurt am Main

Tel.: ++49 (0)69 798-29449
Fax: ++49 (0)69 798-29404
E-Mail: Prisner@chemie.uni-frankfurt.de
<http://www.prisner.de/>

