

Aus dem Institut für Physik der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. Christian G. Hübner

Die Energielandschaft von Proteinen: Von der Faltung zur Katalyse -Einzelmolekül-FRET-Studien an einem Zwei-Domänen-Protein

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von Dana Kahra aus Rochlitz

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. G. Hübner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Gutsmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2012

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 11. Januar 2013

Inhaltsverzeichnis

1.	. Einleitung						
2.	Grundlagen						
	2.1.	Die Energielandschaft					
	2.2.	SlyD - eine Zwei-Domänen-Prolylisomerase					
	2.3.	Grundlagen zur Fluoreszenz					
		2.3.1. Fluoreszenz als optischer Übergang					
		2.3.2. Sättigung, Bleichen und Löschung					
		2.3.3. Anisotropie					
		2.3.4. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer					
	2.4.	Einzelmolekülspektroskopie					
		2.4.1. Fluorophore im Einzelmolekülexperiment					
		2.4.2. Konfokales Prinzip					
		2.4.3. Verdünnung auf Einzelmolekülniveau					
		2.4.4. Signal-zu-Rausch-Verhältnis					
		2.4.5. Einzelmolekül-FRET					
		2.4.6. Korrelationsspektroskopie					
3.	Mat	terialien und Methoden					
	3.1.						
		3.1.1. Fluoreszente Markierung					
		3.1.2. Probenvorbereitung					
		3.1.3. Messkammer					
		3.1.4. Bindungspartner					
		3.1.5. Referenzproben					
	3.2.	Experimenteller Aufbau					
		3.2.1. Konfokales Einzelmolekülmikroskop					
		3.2.2. Anregungsschema					
		3.2.3. Probentisch					
		3.2.4. Zählkarte					
		3.2.5. Filter					
		3.2.6. Spektrometer					
	3.3.	Analyse der Daten					
		3.3.1. Analyse der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Daten					
		3.3.2. Analyse der Fluoreszenzlebensdauer					
		3.3.3. Analyse der Anisotropie-Daten					
	3.4.	Monte-Carlo-Simulation					
	J. 1.	3.4.1. Simulation von FRET-Daten					
		3.4.2 Simulation von Anisotropiedaten					

4.	\mathbf{Erg}	ebnisse	53				
	4.1.	Vorversuche am Konfokalmikroskop	54				
		4.1.1. Wahl der Referenzprobe	54				
		4.1.2. Charakterisierung des Beobachtungsvolumens					
		4.1.3. Limitierung durch Schrotrauschen					
		4.1.4. Einfluss des Immersionsmediums					
		4.1.5. Einfluss des Korrekturrings	61				
		4.1.6. Zusammenfassung	62				
	4.2.						
		4.2.1. Aktivität	65				
		4.2.2. Stabilität	67				
		4.2.3. Zusammenfassung	69				
	4.3.	Konformationsheterogenität eines Zwei-Domänen-Proteins					
		4.3.1. Verteilung der Energietransfereffizienzen					
		4.3.2. Abstandsunabhängige Einflüsse auf die Energietransfereffizienz					
		4.3.3. Interne Dynamik					
	4.4	4.3.4. Zusammenfassung					
	4.4.	0 01					
		4.4.1. Vorstellung der Bindungspartner4.4.2. Einzelmolekül-Experimente mit Bindungspartnern					
		4.4.2. Emzemolekul-Experimente init Bindungspartnern					
	4.5.						
	4.0.	4.5.1. Strukturelle Heterogenität oder lokale Entfaltung					
		4.5.2. Interne Dynamik					
		4.5.3. Zusammenfassung					
	4.6.	Faltung des Proteins					
	1.0.	4.6.1. Entfaltungsreihen					
		4.6.2. Interne Dynamik					
		4.6.3. Echtzeit-Rückfaltung					
		4.6.4. Zusammenfassung					
			131				
5 .	Zusammenfassung und Diskussion						
		Struktur, Funktion und Dynamik					
	5.2.	Stabilität und Faltung	138				
6.	. Ausblick						
Α.	Anh	nang - Zusätzliche Abbildungen	147				
в.	Lite	eraturverzeichnis	157				
\mathbf{C}	ል ዜ 1	züngun gayanga jahn is	169				
	C. Abkürzungsverzeichnis						
D.	D. Abbildungsverzeichnis						
Pι	Publikationen						
Da	Danksagung 1						

1. Einleitung

Proteine werden oft plakativ als die Bausteine des Lebens bezeichnet. Sie sind Bestandteil aller Zellen. Aber sie tragen nicht nur zu deren Struktur bei, sondern übernehmen auch Funktionen, zum Beispiel als Transportproteine oder als Ionenpumpen in der Zellmembran. Als Enzym wird ein Protein bezeichnet, wenn es biochemische Reaktionen katalysieren kann. Auf diesem Wege sind Enzyme für die Regulation fast aller biochemisch ablaufender Prozesse im Körper verantwortlich.

Damit ein Protein seine Funktion ausüben kann, muss es einen strukturierten Zustand einnehmen. Der Übergang von dem statistischen Zufallsknäuel der reinen Polypeptidkette zu diesem strukturierten nativen Zustand wird als Proteinfaltung bezeichnet. Das Paradigma, allein die Struktur würde die Funktion eines Proteins erklären, wurde jedoch in den letzten Jahrzehnten erweitert [1]. Zeitabhängige strukturelle Veränderungen beschreiben eine interne Dynamik, die sich auf einem weiten Zeitbereich über mehrere Größenordnungen von stark lokalisierten Atomschwingungen bis zu großskaligen Bewegungen ganzer Proteinuntereinheiten erstreckt. Somit muss ein Dreibein aus Struktur, Dynamik und Funktion aufgestellt werden, um ein Protein in seiner Komplexität und dessen Wirkungsweise verstehen zu können.

Der Konformationsraum, innerhalb dessen sich ein Protein bewegen kann, wird durch die Energielandschaft dieses Proteins beschrieben [2]. In dieser wird die Gibbs-Energie G gegenüber der Konformation aufgetragen. Sowohl der entfaltete als auch der gefaltete Zustand des Proteins nehmen lokale Minima an. Je tiefer das Tal, desto stärker wird dieses populiert. Die Höhe der Barriere bestimmt die Übergangsraten der Faltung und Entfaltung. Aber nicht nur die Physik der Proteinfaltung wird in der Energielandschaft erfasst. Jede auftretende Konformation bildet ein eigenes lokales Minimum innerhalb des nativen Zustands. Auch hier beschreiben die Energiehügel zwischen den Minima die Raten der Übergänge zwischen den Konformationen und somit die interne Dynamik des gefalteten Proteins. Wäre also die komplette Energielandschaft eines Proteins bekannt, würden alle Fragestellungen bezüglich der Struktur und Dynamik beantwortet werden können. Die komplette Energielandschaft ist jedoch eine von 3N Variablen abhängige Energiefunktion, da jeweils drei Ortskoordinaten aller N Atome die Konformation des Proteins beschreiben. Eine zeitabhängige Erfassung aller 3N Koordinaten, wie sie für eine solche Beschreibung nötig wäre, ist experimentell bislang nicht möglich.

Zwar ist es durch Röntgenkristallographie möglich, die Ortskoordinaten aller Atome eines Proteins mit einer Genauigkeit im Bereich weniger Ångström zu bestimmen. Durch die Präparation in einem Kristall ist jedoch die Konformation des Proteins festgelegt. Folglich sind mit einem einzelnen Proteinkristall nur Informationen über ein einzelnes lokales Minimum, nicht aber über die gesamte Energielandschaft zugänglich. Allerdings ist die Röntgenkristal-

lographie aufgrund ihrer sehr hohen Ortsauflösung die gängige Methode mit der die Konformation innerhalb der lokalen Minima atomgenau beschrieben werden kann.

Die NMR-Spektroskopie arbeitet im Gegensatz dazu mit Proteinen in Lösung, die den vollen Konformationsraum ausschöpfen und somit entlang der kompletten Energielandschaft wandern können. Bei adäquater spektraler Qualität können für Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu etwa 50 kDa Strukturen mit atomarer Auflösung bestimmt werden. Die Methode erlaubt auch die Messung dynamischer Prozesse über weite Zeitbereiche (Nanosekunden bis Stunden) [3]. Sie ist dabei besonders sensitiv gegenüber den am beobachteten Atom lokalisierten Wechselwirkungen mit der Umgebung. Aus diesem Grund kann vor allem die Rauheit innerhalb der lokalen Minima der Energielandschaft, die zum Beispiel durch Rückgratfluktuationen der Aminosäurekette hervorgerufen werden, beschrieben werden. Aber auch großskalige Bewegungen ganzer Proteinuntereinheiten können verfolgt werden, wenn auch erst durch aufwendige Markierungsverfahren.

Optische Methoden wie die Messung der Absorption, der Fluoreszenz oder des Circulardichroismus' an Proteinproben bieten zwar keine atomare Auflösung zur Bestimmung der
Proteinkonformation. Allerdings können unter unterschiedlichen Bedingungen Informationen über das Populationsverhältnis der einzelnen lokalen Minima der Energielandschaft im
Gleichgewicht gewonnen werden. Bei kinetischen optischen Experimenten sind zusätzlich die
Übergangsraten und somit dynamische Informationen zugänglich.

Diese unterschiedlichen experimentellen Methoden können genutzt werden, um Stück für Stück die Energielandschaft eines Proteins zu bestimmen. Jedoch arbeiten alle genannten Methoden mittels eines Ensembles von Proteinmolekülen, deren individuelle Information bei der Messung durch die Mittelung über das Ensemble verloren geht. Aber gerade die Komplexität der Energielandschaft mit mehreren populierten Minima erfordert die Betrachtung einzelner Moleküle. Im Ensemble werden sowohl die statische Heterogenität aufgrund unterschiedlicher Konformationen als auch die dynamische Heterogenität aufgrund individueller Übergänge eines jeden Proteins ausgemittelt. Die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie ermöglicht es, diese Heterogenitäten unter Gleichgewichtsbedingungen aufzulösen. Durch die beugungsbedingte Auflösungsgrenze im 100 nm-Bereich ist allerdings keine atomare Beobachtung möglich. Vielmehr wird durch gezielte fluoreszente Markierung der Proteine erreicht, den 3N-dimensionalen Konformationsraum abhängig von der Fragestellung auf eine verallgemeinerte Variable (zum Beispiel End-zu-End-Abstand, hydrodynamischer Radius, Winkel zwischen Proteinuntereinheiten) zu reduzieren.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht das Zwei-Domänen-Protein SlyD aus dem Organismus Thermus thermophilus (TtSlyD). TtSlyD ist ein Enzym, das die cis/trans-Isomerisierung von Prolylbindungen katalysiert. Auf diese Weise wird die Energiebarriere zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand des Substratproteins gesenkt und dessen Faltung aktiv beschleunigt. TtSlyD wirkt desweiteren als Chaperon, welches die Aggregation entfalteter oder teilweise gefalteter Proteinketten verhindert. So wird, bildhaft gesprochen, die Sackgasse der Aggregatbildung in der Energielandschaft auf dem Weg zur Faltung versperrt. Das Enzym TtSlyD übt somit einen erheblichen Einfluss auf die Energielandschaft seiner Substratproteine aus. In dieser Arbeit soll aber auf die Frage nach der Energielandschaft des

Enzyms selbst eingegangen werden. Ziel ist es, auf diese Weise das Dreibein aus Struktur, Dynamik und Funktion anhand das Zwei-Domänen-Proteins TtSlyD zu verstehen.

Aus der Röntgenkristallographie ist die strukturelle Gliederung von TtSlyD in zwei Domänen, in die FKBP- und die IF-Domäne, bekannt [4]. Das aktive Zentrum der Isomerisierung ist in der FKBP-Domäne lokalisiert, während die IF-Domäne als Chaperon wirkt [5, 6]. Erstaunlich ist, dass allein durch die Anwesenheit der IF-Domäne die Aktivität der FKBP-Domäne um zwei Größenordnungen ansteigt, verglichen zu der isolierten FKBP-Domäne [4]. Aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen weiß man, dass es keine definierte Orientierung der Domänen zueinander gibt [6]. Die Domänen sind durch einen unstrukturierten Bereich verbunden, der eine großskalige Dynamik zwischen den Domänen ermöglicht. Es stellt sich also die Frage, ob es eine solche Dynamik gibt und wie diese Dynamik die hohe katalytische Effizienz der Isomerisierung erklären kann. Geht man zurück zum Bild der Energielandschaft, sind also nicht nur die zwei Täler der entfalteten und gefalteten Konformation zu erwarten. Vielmehr können die verschiedenen nativen Konformationen der Domänen Teiltälern im nativen Minimum entsprechen.

Mit Hinblick auf die Beobachtung einer Domänenbewegung wurde das Protein TtSlyD an beiden Domänen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch den abstandsabhängigen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer sind Fluoreszenzänderungen zu erwarten, die aus dem unterschiedlichen Abstand der Domänen resultieren. Der Abstand der Farbstoffe bildet somit die reduzierte Variable für die Beschreibung der Proteinkonformation. Da die vermuteten Konformationsänderungen unter nativen Bedingungen im Gleichgewicht stattfinden und nicht durch äußere Einflüsse synchronisiert werden können, wie es bei Faltungsübergängen möglich ist, ist eine experimentelle Erfassung durch Ensemble-Methoden nicht möglich. Mit dieser Motivation werden in dieser Arbeit die vielfältigen Methoden der Einzelmolekülspektroskopie genutzt.

Die Ergebnisse, die aus diesen Einzelmolekül-Experimenten für das Protein TtSlyD folgen, werden im Kapitel 4 Ergebnisse der vorliegenden Arbeit detailliert vorgestellt. Dabei wird das Proteins sowohl hinsichtlich seiner Konformationsheterogenität im nativen Zustand als auch in Bezug auf seine Faltung und die Eigenschaften im denaturierten Zustand studiert. Was aus den Einzelmolekülergebnissen für die Energielandschaft des Proteins und den Zusammenhang zwischen Dynamik und Funktion von TtSlyD geschlussfolgert werden kann, wird im Kapitel 5 Zusammenfassung und Diskussion im Kontext der bisher über das System bekannten Informationen diskutiert. Bevor jedoch die Ergebnisse vorgestellt werden, sollen zunächst im Kapitel 2 Grundlagen noch einmal die Zusammenhänge innerhalb einer Protein-Energielandschaft näher erläutert, das Protein TtSlyD eingeführt und alle Informationen vorgestellt werden, die bereits über das Protein selbst bzw. über SlyD-Varianten aus anderen Organismen bekannt sind. Danach werden, ebenso in diesem Kapitel 2 Grundlagen, die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenz und der Einzelmolekülspektroskopie erklärt. Um überhaupt Informationen über den Domänenabstand aus dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer erhalten zu können, mussten beide Domänen von TtSlyD fluoreszent markiert werden. Dieses Markierungsverfahren und alle weiteren Präparationsschritte werden im Kapitel 3 Materialien und Methoden vorgestellt. In diesem Abschnitt werden des Weiteren der experimentelle Aufbau des Konfokalmikroskops, die Analyse der experimentell bestimmten Daten und die Simulationsverfahren zum Erzeugen vergleichbarer Datensätze erklärt.

2. Grundlagen

Das Ziel der Arbeit ist es, die Energielandschaft des Zwei-Domänen-Proteins TtSlyD zu erfassen und so das Zusammenspiel zwischen Struktur, Dynamik und Funktion dieses Enzyms zu verstehen. Im Kapitel Grundlagen wird zunächst der Begriff der Energielandschaft für ein Protein allgemein erläutert. Daraufhin wird das Protein TtSlyD vorgestellt. Dieses Zwei-Domänen-Protein steht im Zentrum dieser Arbeit. Es wird auf Einzelmolekülebene durch Fluoreszenzspektroskopie eingehend untersucht. Aus diesem Grund werden in den weiteren Abschnitten des Kapitels grundlegende Erläuterungen zum Thema der Fluoreszenz, deren Ursprung und Eigenschaften getroffen. Im Besonderen wird dabei auf die Anisotropie und den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer eingegangen, da dieses die Effekte sind, die in dieser Arbeit intensiv genutzt werden. Darüberhinaus wird die Methode der Einzelmolekülspektroskopie eingeführt. Es wird erörtert, welche besonderen Anforderungen sowohl an das Messsystem als auch an die Probe gestellt werden, um tatsächlich die Fluoreszenz einzelner Moleküle verfolgen zu können. Im Speziellen werden die Methoden des Einzelmolekül-Energietransfers und der Korrelationsspektroskopie vorgestellt.

2.1. Die Energielandschaft

Durch die wegweisenden Arbeiten am Protein Myoglobin konnten Frauenfelder et al. [2, 7, 8] zeigen, dass erst mehrere Konformationen und dynamische Übergänge zwischen diesen Konformationen die Funktion eines Proteins ermöglichen. Diese konformationelle Heterogenität wurde mit dem Modell einer Energielandschaft beschrieben.

Die Energielandschaft eines Proteins beschreibt die Gibbs-Energie G (auch freie Enthalpie) in Abhängigkeit der Konformation des Proteins. Diese Konformation wird durch die drei Ortskoordinaten aller N Atome im Protein definiert. In Abb. 2.1 ist das Modell einer Energielandschaft dargestellt. Der 3N-dimensionale Konformationsraum wurde vereinfacht auf eine Variable reduziert. Die Energielandschaft ist durch mehrere Täler und Hügel gekennzeichnet. Die Hügel entsprechen energetisch ungünstigeren Zuständen, die als Übergangszustände bezeichnet werden. Da alle Systeme bestrebt sind, ihre Energie zu minimieren, populieren sie die Täler, die lokalen Minima der Energielandschaft. Diese Täler geben Konformationen wieder, die entweder durch günstige Wechselwirkungen zwischen den Atomen oder durch einen hohen entropischen Gewinn charakterisiert sind. Je tiefer das Tal der Energielandschaft ist, desto mehr Moleküle befinden sich in dieser Konformation. Das Populationsverhältnis $\frac{N_A}{N_B}$

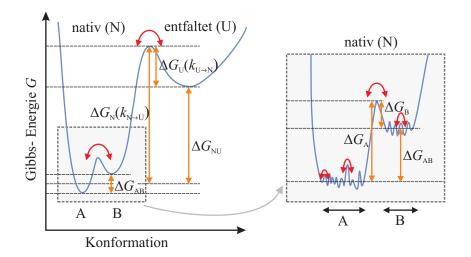


Abb. 2.1.:

Modellbild einer Energielandschaft. In Abhängigkeit einer verallgemeinerten Koordinate ist die Gibbs-Energie für ein Protein aufgetragen. Sowohl der native (N), als auch der denaturierte bzw. entfaltete (U) Zustand bilden ein Energieminimum. Das native Minimum zeigt zwei lokale Minima, die den unterschiedlichen Konformationen A und B entsprechen. Die Oberfläche der Energielandschaft ist innerhalb der Minima rau (siehe Vergrößerung im grauen Kasten), sodass eine Bewegung innerhalb dieser Konformation nur durch Sprünge zwischen den kleinen Subminima möglich ist. Die Raten der Übergänge (zum Beispiel $k_{N\to U}$ und $k_{\mathrm{U} \to \mathrm{N}}$) zwischen den einzelnen Zuständen sind durch die Höhe der Energiebarrieren ($\Delta G_{\mathrm{N}}, \Delta G_{\mathrm{U}}$) bestimmt. Die Zustände werden entsprechend der Energiedifferenz der Minima (ΔG_{NU}) nach dem Prinzip der Boltzmann-Verteilung populiert.

verschiedener Konformationen (A, B) wird über die Boltzmann-Verteilung beschrieben:

$$\frac{N_{\rm A}}{N_{\rm B}} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{\rm AB}}{k_{\rm B}T}\right),\tag{2.1}$$

$$= \exp\left(-\frac{\Delta G_{\rm AB}}{RT}\right). \tag{2.2}$$

wobei $k_{\rm B}$ die Boltzmann-Konstante, R die universelle Gaskonstante und T die absolute Temperatur sind. ΔG_{AB} beschreibt die Energiedifferenz zwischen den lokalen Minima A und B der Energielandschaft. Wird diese auf die Stoffmenge von einem Mol bezogen, gilt Gl. (2.2) statt Gl. (2.1). Die Übergangsraten von einem Tal A in das andere Tal B $(k_{A\to B})$ und umgekehrt $(k_{\rm B\to A})$ sind durch die Energiebarriere bzw. durch den Hügel zwischen den Tälern $(\Delta G_{\rm A}, \Delta G_{\rm B})$ bestimmt:

$$k_{\rm A\to B} \propto \exp\left(-\frac{\Delta G_{\rm A}}{k_{\rm B}T}\right),$$
 (2.3)
 $k_{\rm B\to A} \propto \exp\left(-\frac{\Delta G_{\rm B}}{k_{\rm B}T}\right).$

$$k_{\rm B\to A} \propto \exp\left(-\frac{\Delta G_{\rm B}}{k_{\rm B}T}\right).$$
 (2.4)

Die Berechnung der absoluten Größen erfordert einen Faktor vor dem Exponentialterm in Gl. (2.3) und Gl. (2.4). Für diesen Faktor wurden verschiedene Theorien aufgestellt. Während ein System in der Gasphase über die Eyring-Theorie beschrieben wird, in der das Probeteilchen innerhalb eines Energietals frei oszilliert [9], wird für Systeme in flüssiger Umgebung oft die Kramers-Theorie angewandt, bei welcher das Probeteilchen durch ständige Wechselwirkung mit anderen Teilchen diffundiert statt oszilliert [9, 10].

In Abb. 2.1 ist die Energielandschaft eines Proteins dargestellt, die durch zwei Hauptminima charakterisiert ist. Ein Tal entspricht dem nativen Zustand (N). Das zweite Tal entspricht dem entfalteten Zustand (U). Aufgrund der vielen Konformationsmöglichkeiten der entfalteten Peptidkette bildet der entfaltete Zustand verglichen zum nativen Zustand ein relativ breites Tal. Unter nativen Standardbedingungen ist der entfaltete Zustand energetisch ungünstig und entsprechend geringer populiert. Sehr stabile Proteine sind durch sehr hohe Energiedifferenzen zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand gekennzeichnet (zum Beispiel $\Delta G_{\rm NU} \approx 75\,{\rm kJ/mol}$ für das Protein Orf56 [11]). Das einfache Modell der Proteinfaltung mit nur zwei Zuständen ist für Proteine, die aus mehreren Einheiten aufgebaut sind, oft komplizierter. Die Energielandschaft kann durch weitere Teiltäler, die teilgefalteten Zuständen entsprechen, sehr komplex werden [12]. Wird die Interaktion eines einzelnen Moleküls mit weiteren Proteinmolekülen beachtet, können auch Täler in der Energielandschaft entstehen, die die Aggregation oder Fibrillenbildung entfalteter Aminosäureketten beschreiben [13]. Diese gelten als potentielle Sackgassen der Proteinfaltung, die eine Ausbildung des nativ gefalteten Zustands verhindern.

Die Energielandschaft in Abb. 2.1 zeigt zwei einzelne Teiltäler innerhalb des Tals des nativen Proteins. Diese Teiltäler entsprechen zwei räumlichen Konformationen des gefalteten Proteins. Übergänge zwischen den Konformationen, die die interne Dynamik im nativen Zustand darstellen, werden durch die Raten $k_{\rm A\to B}$ und $k_{\rm B\to A}$ beschrieben. Da die Energiebarriere zwischen den Konformationen im Bereich mehrerer $k_{\rm B}T$ -Einheiten liegt, wird diese Dynamik als langsame Dynamik im Mikrosekunden- bis Sekundenbereich beschrieben [14]. Nicht nur großskalige Domänenbewegungen, sondern auch geringe konformationelle Änderungen bis hin zur Verschiebung einzelner Atome haben einen Einfluss auf die Energielandschaft und vermögen kleine Täler in dieser Landschaft auszubilden. Auf diese Weise wird die Oberfläche der Energielandschaft vielfältig aufgeraut. Die Energiebarrieren bei diesen stark lokalisierten Veränderungen der Proteinkonformation liegen im Bereich der thermischen Energie ($RT = 2.5 \, {\rm kJ/mol}$). Deshalb fluktuiert das Protein auf einer schnellen Zeitskala im Pikosekunden- bis Nanosekundenbereich zwischen den einzelnen Unterzuständen [14].

Die Energielandschaft eines Proteins kann durch äußere Einflüsse (zum Beispiel durch das Lösungsmittel oder durch die Bindung eines Liganden) verändert werden. Denaturierungsmittel wie Guanidinhydrochlorid senken zum Beispiel das Minimum des entfalteten Zustands und verschieben so das Gleichgewicht hin zu diesem entfalteten Zustand. Für das Enzym Adenylatkinase konnte durch Einzelmolekülmessungen gezeigt werden, dass sich das Gleichgewicht der einzelnen nativen Konformationen nach Zugabe von Substraten verändert [3]. Dies kann durch ein Absenken und Anheben der Teiltäler der Energielandschaft innerhalb des nativen Zustands erklärt werden.

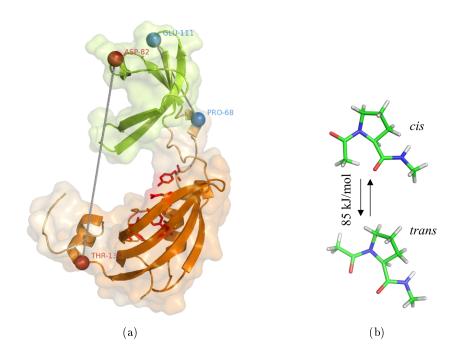


Abb. 2.2.:

Kristallstruktur und Prolyl-Bindung. (a) Dreidimensionale Kristallstruktur des Proteins TtSlyD, gelöst durch Röntgenkristallographie [4] (pdb-Schlüssel: 3CGN). Die IF-Domäne (V71-D116) ist in grün, die FKBP-Domäne (K2-E60, D125-H147) in orange dargestellt. Die Positionen für die Mutationen durch Cysteine (D82, P68, E111, T139) sind als rote und blaue Kugeln dargestellt mit den Abständen (graue Linien), die durch FRET zugänglich sind. Die Seitenketten derjenigen Aminosäuren, die dem aktiven Zentrum für die Katalyse zugeordnet werden [4], sind in rot hervorgehoben. (b) Peptidyl-Prolyl-Bindung (Acetyl-Prolyl-N-Methylamid) in cis- und trans-Konformation. Der Übergang wird durch eine Energiebarriere von $85 \, {}^{\rm kJ/mol}$ beschrieben. Die Struktur ist entsprechend der Atome farbig dargestellt (Sauerstoff: rot; Stickstoff: blau; Kohlenstoff: grün, Wasserstoff: grau).

2.2. SlyD - eine Zwei-Domänen-Prolylisomerase

Das Protein SlyD (engl. <u>sensitive to lysis D</u>) vom Organismus Thermus thermophilus (TtSlyD) gehört zur Gruppe der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen). Diese katalysieren den trans-zu-cis-Übergang einer Xaa-Pro-Peptidbindung innerhalb einer Peptidkette (s. Abb. 2.2(b)), welcher aufgrund seiner hohen Energiebarriere (85 kJ/mol) oft der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Faltung jener Peptidkette ist [15, 16]. So kann SlyD als aktiver Faltungshelfer verstanden werden. Die PPIasen werden in die drei Gruppen der Cyclophiline, Parvuline und FK506 bindenden Proteine (kurz: FKBP) aufgeteilt. Die drei Gruppen zeigen untereinander keinerlei Sequenzhomologie. Sie unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität und Sensitivität gegenüber Inhibitoren [17]. SlyD gehört zur Gruppe der FK506 bindenden Proteine (FKBP).

Aus den hochaufgelösten Strukturen von SlyD verschiedener Längen und aus unterschiedlichen Organismen [4, 6, 18, 19] geht hervor, dass SlyD ein Zwei-Domänen-Protein ist (s. Abb. 2.2 und Abb. 2.3). Beide Domänen haben unterschiedliche Funktionen [5]. In der zum humanen FKBP12 (hFKBP12) strukturell ähnlichen Domäne (FKBP-Domäne) ist das aktive

Zentrum für die Katalyse der Isomerisierung lokalisiert [6]. Die zweite Domäne ist sequentiell in die FKBP-Domäne integriert und wird als IF-Domäne bezeichnet (engl. <u>inserted-in-flap</u>) [20]. Diese bindet unspezifisch mit ihrer vorrangig hydrophoben Oberfläche entfaltete Proteinketten und zeigt Chaperonaktivität [5, 6]. Weiterhin konnte eine hohe Affinität der IF-Domäne zum Tat-Signalpeptid (engl. <u>twin arginine translocation</u>) nachgewiesen werden [4], sodass vermutet wird, dass SlyD am Tat-abhängigen Transportsystem im Cytosol beteiligt ist [21].

Neben den verschiedenen Funkionen zeigen beide Domänen Unterschiede in ihren Faltungskinetiken [22]. In Lösung war es nicht möglich, eine definierte Orientierung der beiden Domänen zueinander zu bestimmen [6, 18]. Allerdings zeigt die IF-Domäne eine unterstützende Wirkung auf die katalytische Effizienz der FKBP-Domäne. So ist zwar die PPIase-Aktivität der isolierten FKBP-Domäne von EcSlyD deutlich geringer als die von hFKBP12 [5, 23]. Durch Einfügen einer IF-Domäne in das hFKBP12 steigt aber die Aktivität auf einen 200fach erhöhten Wert [23, 24]. Für TtSlyD wurde ebenso gezeigt, dass die Volllängenvariante eine 100fach höhere Aktivität als die isolierte FKBP-Domäne hat [4].

Der Effekt, dass die volle Funktion erst durch das Zusammenspiel mehrerer Domänen ensteht, kann an weiteren Vertretern der FKBP-Gruppe beobachtet werden und führte sogar zur Einteilung in eine neue Untergruppe. Der Trigger-Faktor [25–28] besitzt neben seiner FKBP-Domäne eine Chaperondomäne und eine weitere Domäne, die mit dem Ribosom wechselwirkt. Die Proteine FkpA [29–31], SurA [32, 33] und MtFKBP17 [20] sind ebenso Vertreter dieser Familie der Mehr-Domänen-FKBP.

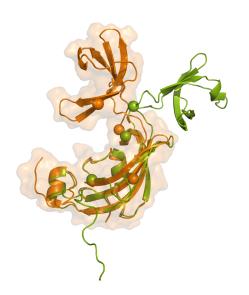


Abb. 2.3:

Dreidimensionale Strukturen von SlyD aus dem Organismus Thermus thermophilus (TtSlyD: orange,pdb-Schlüssel: 3CGN) und aus dem Organismus Escherichia coli (EcSlyD: grün,pdb-Schlüssel: 2K8I). Diese wurden durch Röntgenkristallograhie (TtSlyD) [4] und NMR-Spektroskopie (EcSlyD) [6] gewonnen. Die Strukturen wurden so ausgerichtet, dass das Rückgrat innerhalb der FKBP-Domäne maximale Übereinstimmung zeigt. Zusätzlich sind die C_{α} -Atome der Tyrosin-Aminosäuren als Kugeln hervorgehoben. Diese gelten im Fall von SlyD als natürliche Fluoreszenzsonden für Entfaltungsexperimente im Ensemble (s. Abschnitt 4.6).

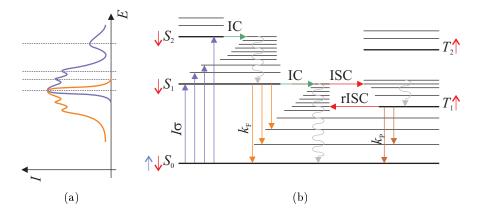


Abb. 2.4.:

Jablonski-Diagramm. (b) Aus dem Singulettgrundzustand S_0 wird der Fluorophor durch Absorption in höhere Schwingungsniveaus der Singulettzustände S_1 , S_2 angeregt. Eine schnelle Relaxation in den Grundzustand von S_1 erfolgt strahlungslos. Auch isoenergetische Übergänge in S_0 sind durch interne Konversion IC möglich. Aus S_1 relaxiert der Farbstoff durch Fluoreszenz in Schwingungsniveaus von S_0 . Durch Interkombination und reverse Interkombination (ISC, rISC) kann es zu Übergängen in den Triplettzustand (T_1) kommen, aus dem eine Relaxation in S_0 durch Phosphoreszenz möglich ist. Der Spin-Zustand des Elektrons ist in den elektronischen Niveaus durch rote und blaue Pfeile angedeutet. (a) Schematisches Absorptions- (blau) und Fluoreszenzspektrum (orange).

2.3. Grundlagen zur Fluoreszenz

2.3.1. Fluoreszenz als optischer Übergang

Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Licht aus elektronisch angeregten Singulettzuständen eines Fluorophors. Dieses grundlegende Prinzip kann anhand eines so genannten Jablonski-Diagramms (Abb. 2.4(b)) näher erläutert werden [34].

In diesem sind die verschiedenen Energieniveaus eines Fluorophors als horizontale Linien aufgetragen. Zusätzlich zu den elektronischen Anregungszuständen (Singulettzustände S_0 , S_1 , S_2 und Triplettzustände T_1 , T_2) werden auch die quantisierten Schwingungen der Kerne als einzelne Schwingungsniveaus eingetragen (Abb. 2.4(b): dünne horizontale Linien). Die Übergänge zwischen den Niveaus erfolgen entsprechend dem Franck-Condon-Prinzip. Dabei bleibt die Ortskoordinate der Atomrümpfe aufgrund der schnellen Übergänge in einer Zeit von nur etwa 10^{-15} s erhalten. Die Wahrscheinlichkeit, mit der der Übergang in ein bestimmtes Niveau erfolgt, wird durch die Größe des Franck-Condon-Faktors bestimmt, bei welchem die Überlappung der Wellenfunktionen des Ausgangs- und Endniveaus des Übergangs berechnet wird. Da bei Raumtemperatur die thermische Energie ($RT = 2.5 \, \mathrm{kJ/mol}$) nicht ausreicht, um die Energieabstände zwischen den Schwingungsniveaus zu überwinden, befindet sich ein Fluorophor meist im niedrigsten Schwingungszustand von S_0 . Durch Absorption von Lichtquanten ($I\sigma$) in Abhängigkeit der Anregungsleistung I und dem Absorptionsquerschnitt σ werden höhere Schwingungsniveaus in den elektronisch angeregten Zuständen S_1 oder S_2 bevölkert. Auf einer Zeitskala von 10^{-12} s relaxieren die Elektronen strahlungslos in den

Schwingungsgrundzustand von S_1 . Mit einer mittleren Fluoreszenzlebensdauer von 10^{-8} s erfolgen daher die radiativen Übergänge durch Emission von Fluoreszenzlicht (Fluoreszenzrate $k_{\rm F}$) in S_0 stets aus dem Grundniveau von S_1 . Damit ist das Fluoreszenzspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge (Kashas Regel) [35]. Die interne Konversion (IC, engl. internal conversion) beschreibt isoenergetische, strahlungslose Übergänge zwischen Singulettzuständen. Alternativ kann der Spin des Elektrons wechseln und somit ein Übergang in ein energetisch äquivalentes Niveau des angeregten Triplettzustands T_1 durch Interkombination stattfinden (ISC, engl. inter system crossing). Die Relaxation aus T_1 in S_0 erfolgt unter Emission von Phosphoreszenz (Phosphoreszenzrate $k_{\rm P}$), die typischerweise rotverschoben gegenüber der Fluoreszenz ist. Aufgrund des verbotenen Übergangs zwischen Singulett- und Triplettzuständen ist die Aufenthaltsdauer in T_1 ($\tau_{\rm T}$) um mehrere Größenordnungen länger als in S_1 .

Anhand des Jablonski-Diagramms lässt sich die grundsätzliche Form des Absorptions- und Fluoreszenzspektrums eines Fluorophors erklären (Abb. 2.4(a)). Die Anregung höherer Schwingungsniveaus von S_1 oder sogar höherer elektronischer Niveaus (S_2) spiegelt sich in den Banden des Absorptionsspektrums wider. Die Höhe der einzelnen Banden ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des entsprechenden Übergangs zwischen den Niveaus, die durch den Franck-Condon-Faktor beschrieben wird. Da das System durch Fluoreszenz auch in höhere Schwingungsniveaus von S_0 relaxiert, deren Abstände vergleichbar zu denen aus S_1 sind, ist das Fluoreszenzspektrum eine Art Spiegelbild des Absorptionsspektrums in den niederenergetischen Bereich. Eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums in den langwelligen Bereich gegenüber der Absorption wird allgemein als Stokes-Verschiebung bezeichnet, kann aber durch verschiedene Effekte begründet sein. So sind die bereits erläuterte vibronische Anregung und schnelle strahlungslose Relaxation nur eine Ursache. Zusätzlich spielen auch die Lösungsmittelrelaxation (vor Allem in polaren Lösungsmitteln), Komplexbildung oder Reaktionen im angeregten Zustand auf einer Zeitskala schneller als die Fluoreszenzlebensdauer eine Rolle. Die Stokes-Verschiebung ist essentiell für die spektroskopische Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen.

Ein Fluorophor wird über die Parameter Quanteneffizienz Q und Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\rm F}$ charakterisiert. Q beschreibt die Anzahl der emittierten Photonen relativ zur Anzahl der vom Fluorophor absorbierten Photonen. $\tau_{\rm F}$ beschreibt die mittlere Aufenthaltsdauer des Fluorophors im angeregten Zustand S_1 . Fasst man die Übergänge von S_1 in S_0 (Abb. 2.4(a)) als Summe von nichtradiativen Übergängen $(k_{\rm nr})$ und den fluoreszenten Übergang $(k_{\rm F})$ zusammen, so ergeben sich folgende Zusammenhänge:

$$\tau_{\rm F} = \frac{1}{k_{\rm nr} + k_{\rm F}},\tag{2.5}$$

$$Q = \frac{k_{\rm F}}{k_{\rm nr} + k_{\rm F}}. (2.6)$$

Die natürliche Lebensdauer τ_n beschreibt nur den radiativen, also fluoreszenten Ubergang, mit:

$$\tau_{\rm n} = \frac{1}{k_{\rm F}}.\tag{2.7}$$

Sie kann unter bestimmten Bedingungen nach [34] aus den Absorptions- $\varepsilon(\nu)$ und Emissionsspektren $F(\nu)$ in Abhängigkeit der Wellenzahl ν des Farbstoffes und dem Brechungsindex n bestimmt werden:

$$\frac{1}{\tau_{\rm n}} = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\nu) d\nu}{\int F(\nu) \nu^{-3} d\nu} \int \frac{\varepsilon(\nu) d\nu}{\nu}.$$
 (2.8)

Die drei Größen bilden den Zusammenhang:

$$Q = \frac{\tau_{\rm F}}{\tau_{\rm n}}.\tag{2.9}$$

Die Quantenausbeute kann folglich durch die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer, aber auch durch Einflüsse auf die nichtradiativen Relaxationswege (s. Gl. (2.6)) verändert werden.

2.3.2. Sättigung, Bleichen und Löschung

Die Fluoreszenzlöschung beschreibt alle Vorgänge, die durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen zur Erniedrigung der Fluoreszenzintensität führen. Dabei unterscheidet man das statische und dynamische Löschen. Im Fall des statischen Löschens wird bereits im Grundzustand mit einem Wechselwirkungspartner ein nichtfluoreszenter Komplex gebildet [36]. Das dynamische oder auch Kollisionslöschen tritt erst im angeregten Zustand auf. Durch räumliche Nähe oder direkten Kontakt mit dem Löschmolekül wird die Energie aus dem angeregten Zustand strahlungslos abgeführt. Dazu zählen u. a. der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) [37] und Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Im ersten Fall ist eine Überlappung der Molekülorbitale zwischen beiden Wechselwirkungspartnern erforderlich, im zweiten Fall handelt es sich um eine abstandsabhängige Dipol-Dipol-Wechselwirkung (s. Abschnitt 2.3.4).

Mit Photobleichen bezeichnet man die irreversible photochemische Zerstörung eines Fluorophors. Dieses Photobleichen ist durch den Farbstoff bestimmt, der nur eine maximale Anzahl an Anregungszyklen (Absorption \circlearrowright Emission) durchlaufen kann. Mit steigender Anregungsintensität werden die Zyklen schneller durchlaufen, sodass die Wahrscheinlichkeit des Photobleichens steigt. Die maximale Zahl an emittierten Photonen und somit Anregungszyklen liegt für die meisten Fluorophore in wässriger Umgebung bei Raumtemperatur bei 10^6 Photonen [38].

Die Emissionsrate k_{Em} kann mit steigender Anregungsintensität nicht beliebig erhöht werden, sie unterliegt einer Sättigung mit der maximale Emissionsrate $k_{\text{Em,max}}$:

$$k_{\rm Em, max} = \frac{k_{\rm F}}{1 + \frac{k_{\rm ISC}}{k_{\rm -ISC}}}.$$
 (2.10)

Für die Emissionsrate folgt:

$$k_{\rm Em} = k_{\rm Em, max} \frac{1}{1 + \frac{I_{\rm sat}}{I}}.$$
 (2.11)

 $I_{\rm sat}$ ist diejenige Anregungsintensität, bei der die Hälfte der maximalen Emissionsrate erreicht wird [39]. Ohne nichtradiative Übergänge ($k_{\rm ISC}=0$) ist die maximale Emissionsrate $k_{\rm Em}$ nach Gl. (2.10) durch die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\rm F}$ (Gl. (2.6)) bestimmt. Durch strahlungslose Übergänge in den "dunklen" Triplettzustand mit $k_{\rm ISC}$ kommt es zu einem zusätzlichen Sättigungseffekt. Die Elektronen sind bei Vernachlässigung der Phosphoreszenz mit einer Aufenthaltszeit $\tau_{\rm T}$ von

$$\tau_{\rm T} = \frac{1}{k_{\rm rISC}} \tag{2.12}$$

in diesem Zustand gefangen und stehen erst nach der reversen Interkombination wieder für den fluoreszenten Anregungszyklus zur Verfügung.

2.3.3. Anisotropie

Die Anisotropie ist eine Eigenschaft des Fluoreszenzlichtes, mit der vielfältige Informationen über Molekülgröße, -form, aber auch Lösungsmitteleigenschaften gewonnen werden können. Ein Fluorophor emittiert parallel zu seinem Emissionsdipolmoment linear polarisiertes Licht. Bezieht man die Polarisationsrichtung auf die Polarisation des Anregungslichts, so kann aus dem Anteil parallel (I_p) und demjenigen senkrecht (I_s) zur Anregungspolarisation die Gleichgewichtsanisotropie r berechnet werden:

$$r = \frac{I_{\rm p} - I_{\rm s}}{I_{\rm p} + 2I_{\rm s}}. (2.13)$$

Auch die Absorption ist ein polarisationsabhängiger Effekt. Der Fluorophor absorbiert vorrangig Licht, das parallel zu seinem Absorptionsdipolmoment polarisiert ist. Aus Gl. (2.13) gehen die theoretischen Grenzwerte -0.5 < r < 1 hervor, die nur in einer absolut homogen ausgerichteten Probe auftreten können. Für eine maximale Anisotropie von r=1 müssen die Übergangsdipolmomente für Absorption und Emission übereinander liegen, für r=-0.5 müssen sie um 90° versetzt sein.

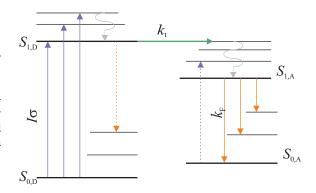
In dieser Arbeit sind die Fluorophore stets in wässriger Lösung und somit isotrop in ihrer Richtungsverteilung. Die Fluorophore werden durch linear polarisiertes Licht photoselektiv angeregt, wobei die Anregungswahrscheinlichkeit $P_{\rm exc}$ mit dem Winkel α zwischen der Polarisationsrichtung und dem auf die Probenebene projezierten Absorptionsdipolmoment nach Gl. (2.14) skaliert:

$$P_{\rm exc} \propto \cos^2 \alpha.$$
 (2.14)

Für eine Probe mit isotrop verteilten, aber ortsfesten Dipolmomenten ergibt sich eine maximale Anisotropie von $r_{\text{max}} = r_0 = 0,4$ [34]. Diese wird als Fundamentalanisotropie bezeichnet. Sie kann dadurch reduziert sein, dass Absorptions- und Emissionsdipolmoment des Fluorophors nicht übereinander liegen. Für den in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff AF488

Abb. 2.5:

Vereinfachtes Jablonski-Diagramm (Vgl. Abb. 2.4(b)). Der Donor (D) wird durch Absorption in den Singulettzustand $S_{1,D}$ angeregt. Die Energie wird nicht fluoreszent abgegeben, sondern strahlungslos durch FRET (Transferrate $k_{\rm t}$) auf den Akzeptor (A) übertragen (grüner Pfeil), der strahlungslos in den Grundzustand von $S_{1,\rm A}$ und schließlich fluoreszent mit $k_{\rm F}$ in $S_{0,\rm A}$ relaxiert.



wurde eine Fundamentalanisotropie von 0,38 bestimmt [40]. Einen wesentlichen Einfluss auf die gemessene Gleichgewichtsanisotropie hat die Rotationsdiffusion der Fluorophore. Rotieren diese auf einer Zeitskala der fluoreszenten Anregung, also mit einer Rotationszeit $\theta \leq \tau_{\rm F}$, dann kommt es zu einer Absenkung der Gleichgewichtsanisotropie, zu einer Depolarisation mit:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau_{\rm F}}{\theta}}.\tag{2.15}$$

Misst man die Anisotropie zeitabhängig auf der Zeitskala der Fluoreszenzlebensdauer τ_F (s. Abschnitt 3.3.3), dann gilt der Zusammenhang:

$$r(t) = r_0 \exp\left[-\frac{t}{\theta}\right]. \tag{2.16}$$

Aus der Rotationskorrelations oder -diffusionszeit θ kann über die Einstein-Stokes-Beziehung auf die Größe globulärer Proteine (Volumen V) geschlossen werden:

$$V = \frac{\theta RT}{n}. (2.17)$$

Dabei sind R die universelle Gaskonstante, T die Temperatur und η die Viskosität. Wie aus Gl. (2.17) hervorgeht, kann über θ auch die Temperatur kontrolliert werden. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der zeitabhängigen Anisotropie genutzt, um Aussagen zu treffen, inwiefern der am Protein gebundene Farbstoff ungehindert rotieren kann und somit keine Effekte auf den zu messenden FRET hat. Die Anisotropiedaten wurden nach Gl. (2.16) an

$$r(t) = r_0 y \exp\left[-\frac{t}{\theta}\right] + r_0 (1 - y) \exp\left[-\frac{t}{\theta_{\text{Prot}}}\right]$$
 (2.18)

angepasst, wobei θ die Rotationszeit des freien Farbstoffes und θ_{Prot} die des Proteins beschreibt. In diesem Modell geht man davon aus, dass der Farbstoff entweder ungehindert rotiert oder auf einer Zeitskala $t > \tau_{\text{F}}$ an der Proteinoberfläche klebt, sodass er mit dem Protein als Einheit rotiert. y gibt den relativen Anteil der ungehindert rotierenden Farbstoffe an.

2.3.4. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Zur Untersuchung von Abständen r zweier Fluorophore auf einer Längenskala von ca. 1 nm bis 10 nm dient der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Der strahlungslose Energietransfer basiert auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung der zwei Fluorophore. Die zugrunde liegende Theorie wurde von Theodor Förster 1948 vorgestellt [41]. Der erste quantitative Nachweis dieser Theorie gelang Stryer und Haugland 1967 mit Experimenten an fluoreszent markierten Polyprolinen verschiedener Länge [42]. Das Prinzip des FRET lässt sich an einem vereinfachten Jablonski-Diagramm (Abb. 2.5) erklären. In diesem sind die Singulettsysteme beider Fluorophore des FRET-Paares, des Donors und des Akzeptors, dargestellt. Der Donor wird durch Absorption (k_{abs}) in $S_{1,D}$ angeregt. Nach der schnellen Schwingungsrelaxation wird die Energie strahlungslos auf den Akzeptor übertragen (Transferrate k_t), der dadurch in $S_{1,A}$ angeregt wird. Der Akzeptor relaxiert schnell in den Grundzustand von $S_{1,A}$ und geht durch Emission von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand $S_{0,A}$ über.

Die Energieübertragung wird durch die Transferrate $k_{\rm t}$ bzw. die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$ quantitativ beschrieben (Abb. 2.7). Diese ist das Verhältnis von übertragenen Photonen zu absorbierten Photonen:

$$E_{\rm t} = \frac{k_{\rm t}}{I\sigma}.\tag{2.19}$$

Mit der Fluoreszenzlebensdauer des Donors $\tau_{\rm D}$ in Abwesenheit des Akzeptors und der Summe aus dem fluoreszenten und allen weiteren nicht radiativen Übergängen $k_{\rm F} + k_{\rm nr}$ folgt:

$$E_{\rm t} = \frac{k_{\rm t}}{k_{\rm t} + k_{\rm F} + k_{\rm nr}},\tag{2.20}$$

$$E_{\rm t} = \frac{k_{\rm t}}{k_{\rm t} + \tau_{\rm D}^{-1}}. (2.21)$$

Aufgrund des Dipol-Dipol-Wechselwirkungscharakters ist k_t und somit E_t in der sechsten Potenz vom Kehrwert des Abstandes der Farbstoffe r abhängig:

$$k_{\rm t}(r) = \frac{1}{\tau_{\rm D}} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6, \tag{2.22}$$

$$=\frac{1}{\tau_{\rm n}} \left(\frac{R_0'}{r}\right)^6,\tag{2.23}$$

$$E_{\rm t}(r) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}. (2.24)$$

Der Försterradius R_0 charakterisiert das Farbstoffpaar und gibt den Abstand an, bei dem die Hälfte der absorbierten Quanten auf den Akzeptor übertragen wird [34]:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_{\rm D}}{128\pi^5 N n^4} J(\lambda), \tag{2.25}$$

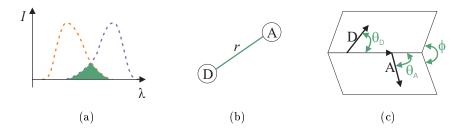


Abb. 2.6.:

Verschiedene Einflüsse auf die Energietransfereffizienz. Einfluss auf die Energietransfereffizienz haben (a) der spektrale Überlapp zwischen Fluoreszenzspektrum des Donors (orange) und Absorptionsspektrum des Akzeptors (blau), (b) der Abstand zwischen Donor und Akzeptor und (c) die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander im dreidimensionalen Raum, angegeben durch die drei Winkel θ_D , θ_A und ϕ .

$$R_0^{6} = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2}{128\pi^5 N n^4} J(\lambda), \tag{2.26}$$

mit κ^2 als Orientierungsfaktor, $Q_{\rm D}$ als Quantenausbeute des Donors, n als Brechungsindex des umgebenden Mediums und N als Avogadrozahl. $J(\lambda)$ beschreibt das spektrale Überlappungsintegral:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_{\rm D}(\lambda)\varepsilon_{\rm A}(\lambda)\lambda^4 d\lambda, \qquad (2.27)$$

mit $F_{\rm D}(\lambda)$ als Fluoreszenzspektrum des Donors und $\varepsilon_{\rm A}(\lambda)$ als Absorptionsspektrum des Akzeptors. Folglich haben nicht nur die räumliche Nähe der Farbstoffe, sondern auch die spektrale Nähe $(J(\lambda))$ und die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente (κ^2) zueinander einen Einfluss auf die Energietransfereffizienz (siehe Abb. 2.6).

Die Transferrate $k_{\rm t}$ kann nach Gl. (2.23) auch über den reduzierten Försterradius R_0' und die natürliche Lebensdauer $\tau_{\rm n}$ (Gl. (2.26)) beschrieben werden. Der Parameter der Fluoreszenzlebensdauer des Donors $\tau_{\rm D}$ taucht nicht länger in diesem Zusammenhang auf. Nicht radiative Übergänge des Donors, die einzig Einfluss auf $\tau_{\rm D}$ haben, zeigen folglich keinen Einfluss auf die Transferrate $k_{\rm t}$. In die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$ gehen jedoch die Transferrate $k_{\rm t}$ und die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\rm D}$ des Donors nach Gl. (2.21) ein, sodass nichtradiative Prozesse $E_{\rm t}$ verändern können.

Der Orientierungsfaktor κ^2 beschreibt die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor (Abb. 2.6(c)). Diese ist aufgrund des anisotropen elektrischen Feldes eines Dipols entscheidend für den Energietransfer. Steht zum Beispiel ein Dipol senkrecht auf den Feldlinien des anderen, ist eine Energieübertragung trotz geringen Abstands nicht möglich. Sind die Dipole kollinear angeordnet, ist die Energieübertragung maximal ($\kappa^2 = 4$). Für eine beliebige Orientierung zwischen dem Dipolmoment des Donors (D) und dem Dipolmoment des Akzeptors (A) gilt:

$$\kappa^2 = (\sin \theta_{\rm D} \sin \theta_{\rm A} \cos \phi - 2 \cos \theta_{\rm D} \cos \theta_{\rm A}) \cos^2 \phi, \tag{2.28}$$

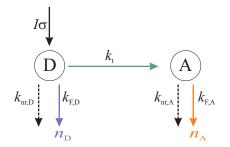


Abb. 2.7:

Ratenschema FRET. Ratenschema zur Berechnung der Energietransfereffizienz zwischen Donor (D) und Akzeptor (A). Diese wird durch das Verhältnis der übertragenen Photonen pro Zeit (k_t) zu den absorbierten Photonen pro Zeiteinheit $(I\sigma)$ bestimmt. Unter Vernachlässigung nicht radiativer Prozesse $k_{\rm nr,A}$, $k_{\rm nr,D}$ kann sie aus der Anzahl der emittierten Photonen pro Zeiteinheit $(n_{\rm A}$ und $n_{\rm D})$ berechnet werden.

wobei $\theta_{\rm D}$ und $\theta_{\rm A}$ die Winkel der jeweiligen Dipolmomente zur Verbindungsachse zwischen den Dipolmomenten beschreiben. Mit ϕ wird der Winkel zwischen den Ebenen, die durch die Dipolmomente aufgespannt werden, bezeichnet (siehe dazu auch Abb. 2.6(c)). Rotieren beide Farbstoffe des FRET-Paares mit einer Rotationskorrelationszeit, die deutlich kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer ist, kann man von einem mittleren $\kappa^2 = 2/3$ [43] ausgehen. Wenn nur ein Farbstoff frei rotiert, verschiebt sich $\kappa^2 = 0,635$ nur geringfügig [43]. Gibt es jedoch transiente Orientierungszustände beider Farbstoffe, die länger als die Fluoreszenzlebensdauer andauern, können diese einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die apparente Energietransfereffizienz haben.

Die apparente Energietransfereffizienz ist auf zwei Wegen experimentell zugänglich. Sie kann über die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in An- (τ_{DA}) und in Abwesenheit (τ_{D}) des Akzeptors bestimmt werden:

$$E_{\rm t} = 1 - \frac{\tau_{\rm DA}}{\tau_{\rm D}}.\tag{2.29}$$

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Verhältnis der detektierten Akzeptor- und Donorphotonen pro Zeiteinheit genutzt:

$$E_{\rm t} = \frac{n_{\rm A}}{n_{\rm A} + n_{\rm D}}. (2.30)$$

Dabei werden nicht radiative Prozesse des Donors und Akzeptors vernachlässigt bzw. als konstant betrachtet (Abb. 2.7). Änderungen in der Quanteneffizienz des Donors durch zusätzliche nicht radiative Prozesse werden nach Gl. (2.5) als Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\rm D}$ des Donors messbar. Sie haben jedoch keinen Einfluss auf die Transferrate $k_{\rm t}$ (Gl. (2.23)) und somit auch keinen Einfluss auf die apparente Energietransfereffizienz nach Gl. (2.30) [44]. In diesem Fall sinkt zwar die Gesamtanzahl der Fluoreszenzphotonen pro Zeiteinheit, das Verhältnis der Photonen pro Zeiteinheit zwischen Donor- und Akzeptorkanal bleibt aber aufgrund der konstanten Raten, $k_{\rm F,D}$, $k_{\rm F,A}$ und $k_{\rm t}$, erhalten (s. Abb. 2.7). Ändert sich jedoch die Quantenausbeute des Akzeptors, ändert sich nur die Zahl der emittierten Akzeptorphotonen pro Zeiteinheit bei einer konstanten Anzahl von Donorphotonen pro Zeiteinheit. Dies würde bei der Berechnung nach Gl. (2.30) zu einer Verschiebung von $E_{\rm t}$ führen.

Um nach Gl. (2.23) aus der apparenten Energietransfereffizienz Rückschlüsse auf den Abstand der Farbstoffe ziehen zu können, müssen deren Quanteneffizienzen Q_D und Q_A und die durch

den experimentellen Aufbau bedingte Korrekturen berücksichtigt werden mit

$$E_{\rm t,korr} = \frac{(n_{\rm A} - n_{\rm H,A} - \alpha n_{\rm D})}{(n_{\rm A} - n_{\rm H,A} - \alpha n_{\rm D}) + \frac{q_{\rm A}Q_{\rm A}}{q_{\rm D}Q_{\rm D}}(n_{\rm D} - n_{\rm H,D})}.$$
 (2.31)

Dabei sind $n_{\rm H,x}$ die Hintergrundphotonen und $q_{\rm x}$ die Detektionseffizienzen der beiden Kanäle (D, A). Die Wahrscheinlichkeit des Eindringens von Donorphotonen in den Akzeptorkanal wird durch α beschrieben. Bei Vernachlässigung von α kann aus den um den Hintergrund korrigierten Photonenzahlen $n'_{\rm x}$ mit dem Korrekturfaktor γ die korrigierte Transfereffizienz berechnet werden:

$$E_{\rm t,korr} = \frac{n_{\rm A}'}{n_{\rm A}' + \gamma n_{\rm D}'},\tag{2.32}$$

$$\gamma = \frac{q_{\rm A}Q_{\rm A}}{q_{\rm D}Q_{\rm D}}.\tag{2.33}$$

Bei den in dieser Arbeit aufgeführten Experimenten wurde weitestgehend auf eine Korrektur der Energietransfereffizienz verzichtet. Deshalb wird stets die apparente Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$, wie sie sich aus den detektieren Photonenraten $n_{\rm A}$ und $n_{\rm D}$ von Donor und Akzeptor nach Gl. (2.30) ergibt, aufgetragen und analysiert.

2.4. Einzelmolekülspektroskopie

Die experimentelle Beobachtung einzelner Moleküle durch sogenannte Einzelmolekültechniken hat in den letzten beiden Jahrzehnten einen enormen Aufschwung erfahren [45]. Neben der in dieser Arbeit vorrangig genutzten Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie existieren verschiedene Anwendungen der Kraftspektroskopie auf einzelne Moleküle [46].

Im Gegensatz zu konventionellen Ensemblemethoden werden Verteilungen von molekularen Eigenschaften erfasst. Das Ensemble aller Moleküle kann dabei sowohl statisch als auch dynamisch heterogen verteilt sein. Zum Beispiel können einzelne Konformere eines Enzyms aufgelöst werden. Konformationsänderungen oder Bindungsreaktionen können im thermodynamischen Gleichgewicht beobachtet werden, da eine Synchronisation durch äußere Einflüsse nicht nötig ist.

Das ergodische Prinzip eines Ensemble beschreibt die Tatsache, dass der zeitliche Mittelwert eines einzelnen Zustands dem Mittelwert über alle möglichen Zustände entspricht. Somit können aus den Einzelmolekülmessungen zusätzlich die Ergebnisse gewonnen werden, die aus Ensembleexperimenten resultieren.

Allerdings stellt die Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle eine enorme technische Herausforderung dar. Zwar konnten bereits 1976 Hirschfeld et al. [47] einzelne Protein-Polymer-Komplexe untersuchen. Diese waren aber mit bis zu 100 Fluorescein-Molekülen markiert.

Die wesentliche Fragestellung der Einzelmolekülspektroskopie ist diejenige nach der optischen Selektion einzelner Moleküle [48]. Während eine solche Selektion bei tiefen Temperaturen durch spektral selektive Anregung realisiert wird, ist diese Methode bei Raumtemperatur aufgrund der Verschmierung der elektronischen Übergänge nicht mehr anwendbar. Die Moleküle müssen räumlich selektiert werden. Dies wurde zum Beispiel von Shera et al. 1990 [49] so umgesetzt, dass in einem hydrodynamischen Fokus einzelne Rhodamin-Farbstoffmoleküle detektiert werden konnten, allerdings mit einem schwachen Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Damit sich die Fluoreszenzphotonen eines einzelnen Moleküls deutlich vom Hintergrundsignal abheben, muss das Hintergrund- bzw. Streulicht reduziert werden. Dies wurde durch die Minimierung des Beobachtungsvolumens erreicht. In einem konfokalen Mikroskop wird beugungsbegrenzt ein solches Beobachtungsvolumen von nur etwa 10^{-15} l erzeugt. Durch totale innere Reflexion können Moleküle in einer Schicht von nur 100 nm angeregt werden [38]. Erst diese technischen Neuerungen und die Entwicklung effizienter Detektoren und optimierter optischer Filter begründeten die rasch wachsende Zahl der Anwendungen der Einzelmolekülspektroskopie.

So wurde basierend auf den Arbeiten von Elson, Magde und Webb aus der 1970er Jahren [50, 51] die Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie in einem Konfokalmikroskop weiterentwickelt und verfeinert [52]. Aus den Fluoreszenzfluktuationen frei diffundierender Moleküle durch das Beobachtungsvolumen eines Konfokalmikroskops können so Diffusionskinetiken, photophysikalische Raten, aber auch Bindungskonstanten bestimmt werden [53]. Durch die spektrale Auftrennung des Fluoreszenzlichts können verschiedene Farbstoffe identifiziert werden. Auf diese Weise kann Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf Einzelmolekül-Ebene detektiert und zur Bestimmung des Abstandes zwischen den Fluoro-

phoren genutzt werden. Ha et al. dokumentierten 1996 [54] die ersten FRET-Experimente an einem DNA-Konstrukt, jedoch noch unter nicht physiologischen Bedingungen. Deniz et al. haben Einzelmolekül-FRET erstmals auf frei diffundierende Moleküle angewandt und konnten verschiedene Populationen in einer heterogenen Mischung von DNA-Proben verschiedener Länge nachweisen. Als Beispiele für ein weit gefächertes Spektrum von Anwendungen des Einzelmolekül-FRET sollen die Untersuchung von Bewegungen der F₁-ATPase [55], von Konformationsverteilungen von Polypeptiden [56] und der Entfaltung von Proteinen [57–59] genannt sein.

Durch die Kombination von FRET und der Analyse der Fluktuationen in der Energietransfereffizienz durch FCS können Informationen über die interne Dynamik von Biomolekülen gewonnen werden [60, 61].

Diesem kleinen historischen Abriss der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie folgend, werden in den folgenden Abschnitten zunächst die experimentellen Grundlagen, daraufhin die Einzelmolekül-FRET-Experimente und schließlich in einem größeren Absatz die Methode der Korrelationsspektroskopie dargelegt.

2.4.1. Fluorophore im Einzelmolekülexperiment

Für Einzelmolekülexperimente werden hohe Anforderungen an die Fluorophore gestellt. Diese bestehen in

- einer geringen ISC-Rate und somit geringen Triplettdynamik,
- einem hohen Absorptionskoeffizient,
- einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute,
- einer hohen Photostabilität und
- einer deutlichen Stokes-Verschiebung für eine spektrale Trennung zwischen Anregungsund Emissionslicht.

Für biologische Systeme wie DNA und Proteine werden hydrophile Farbstoffe bevorzugt. Unter diesen Maßgaben werden Fluoreszenzfarbstoffe synthetisch hergestellt. In dieser Arbeit kommen Farbstoffe aus der Atto-Familie (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) und der Alexa-Fluor-Familie (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zum Einsatz.

2.4.2. Konfokales Prinzip

In dieser Arbeit wird ein konfokales Mikroskop verwendet. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei dem die Probe im Weitfeld angeregt wird, beschreibt das konfokale Prinzip die Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle und eines punktförmigen Detektors in einen "Punkt" der Probenebene, auch Fokusebene (Abb. 2.10). Fluorophore, die außerhalb dieser Fokusebene liegen, werden zum einen selektiv weniger angeregt. Zum anderen wird deren Fluoreszenzlicht durch eine für die Konfokalmikroskopie typische Lochblende (engl. pinhole:

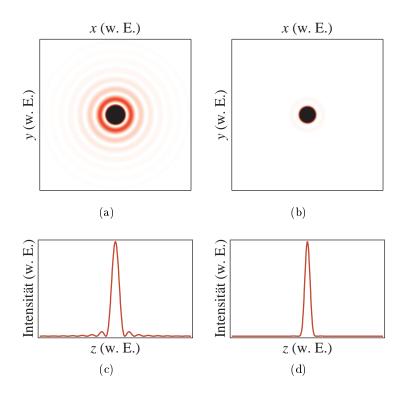


Abb. 2.8.:

Punktspreizfunktion. Darstellung der Punktspreizfunktion (PSF) an einer Lochblende (linke Spalte) bei gleichmäßiger Ausleuchtung in der xy-Ebene (obere Reihe) und entlang der optischen Achse (untere Reihe) nach [62]. Im Konfokalmikroskop werden die PSF der Anregung und Detektion multipliziert. Das Produkt ist in der rechten Spalte zu sehen.

Nadelöhr) in der Detektion blockiert (Abb. 2.10). Auf diese Weise wird das Auflösungsvermögen entlang der optischen Achse im Vergleich zur konventionellen Weitfeldbeleuchtung erhöht.

Das Bild oder Signal, das beugungsbedingt von einem punktförmigen Fluorophor an der Stelle \overrightarrow{r} in der Probe erzeugt wird, wird als Instrumentantwortfunktion $IRF(\overrightarrow{r})$ (engl. instrument response function) bezeichnet. Diese ist das Produkt der Emissionsrate $k_{\rm Em}$ und der Detektionseffizienz $E_{\rm det}$:

$$IRF(x) = k_{\rm Em} \left[I_{\rm exc}(\overrightarrow{r}) \right] \cdot E_{\rm det}(\overrightarrow{r}).$$
 (2.34)

Die Emissionsrate ist nach Gl. (2.11) von der Anregungsintensität $I_{\text{exc}}(\overrightarrow{r})$ abhängig. Ohne Sättigungseffekte ist $k_{\text{Em}}(\overrightarrow{r})$ direkt proportional zu $I_{\text{exc}}(\overrightarrow{r})$:

$$IRF(x) \propto I_{\rm exc}(\overrightarrow{r}) \cdot E_{\rm det}(\overrightarrow{r}).$$
 (2.35)

Die Verteilung der Anregungsintensität ist die Punktspreizfunktion $(PSF_{\text{exc}}(\overrightarrow{r}))$ der Anregung:

$$I_{\text{exc}}(\overrightarrow{r}) = PSF_{\text{exc}}(\overrightarrow{r}).$$
 (2.36)

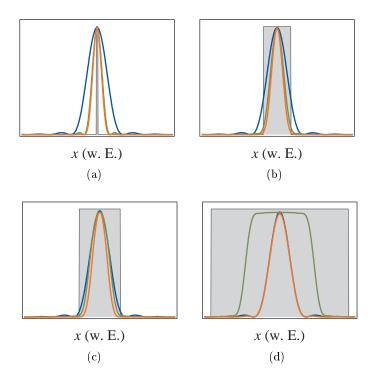


Abb. 2.9.:

Instrumentantwortfunktion mit Pinhole-Lochblende. Einfluss der Pinhole-Lochblende (grau) auf die Instrumentantwortfunktion IRF (orange). Die Punktspreizfunktionen (blau) der Anregung $PSF_{\rm exc}$ und Detektion $PSF_{\rm det}$ sind identisch als Beugungsfunktion an einer kreisförmigen Blende gewählt. Die Detektionseffizienz $E_{\rm det}$ (grün) wurde nach Gl. (2.37) berechnet. Zur prinzipiellen Betrachtung wurde das dreidimensionale Problem auf die Fokalebene beschränkt und aufgrund der Axialsymmetrie nur eine Achse dargestellt. $T_{\rm B}$ variiert in der Breite von (a) nach (d) relativ zur Breite der PSF.

Sie wird entweder durch die Beugungsfunktion an einer kreisförmigen Blende (entspricht der Objektivöffnung) beschrieben (Abb. 2.8(a) und 2.8(c)), wenn das Objektiv gleichmäßig ausgeleuchtet wird, oder durch eine dreidimensionale Gaußverteilung, wenn ein Laserstrahl mit gaußförmiger Verteilung in das Objektiv tritt [62]. Im ersten Fall entsteht in der Fokusebene eine Intensitätsverteilung mit einem Haupt- und mehreren Nebenmaxima, die als Airy-Scheibe (Abb. 2.8(a)) bezeichnet wird.

Die räumliche Verteilung der Detektionseffizienz $(E_{\text{det}}(\overrightarrow{r}))$ ergibt sich aus der Faltung der PSF der Detektion $(PSF_{\text{det}}(\overrightarrow{r}))$ und der Transmissionsfunktion der Lochblende $(T_{\text{B}}(\overrightarrow{r}))$ im Detektionsstrahlengang:

$$E_{\text{det}}(\overrightarrow{r}) = PSF_{\text{det}}(\overrightarrow{r}) \otimes T_{\text{B}}(\overrightarrow{r}). \tag{2.37}$$

 $PSF_{\text{det}}(\overrightarrow{r})$ wird wie in der Anregung beschrieben. Die Detektionseffizienz wird deutlich durch T_{B} beeinflusst (Abb. 2.9). Ist die in die Fokusebene projezierte Blendenöffnung deutlich größer als die Ausdehnung der $PSF_{\text{det}}(\overrightarrow{r})$, wird die Detektionseffizienz in der Größenordnung von T_{B} verschmiert (Abb. 2.9(d)). Im entgegengesetzten Grenzfall kann E_{det} nicht beliebig verkleinert werden (Abb. 2.9(a)). Eine zu kleine Blende führt schließlich nur noch zu

Signalverlust. Wie auch in Abb. 2.9 ersichtlich ist, sollte die Pinhole-Lochblende so gewählt sein, dass sie in der Größenordnung der PSF_{det} liegt. So wird unnötiger Signalverlust vermieden, dennoch aber die Nebenmaxima der PSF_{det} deutlich unterdrückt und so die Auflösung erhöht (s. Abb. 2.9(b) und 2.9(c)) [62].

Bei geeigneter Optik kann das Beobachtungsvolumen, das durch die IRF charakterisiert wird, in Näherung durch ein dreidimensionales Gaußprofil mit den Halbachsen w_0 und z_0 angepasst werden:

$$IRF(x,y,z) \propto \exp\left[-\frac{2(x^2+y^2)}{w_0^2}\right] \exp\left[-\frac{2z^2}{z_0^2}\right].$$
 (2.38)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Produktbildung nach Gl. (2.34) die Auflösung eines Konfokalmikroskops im Vergleich zu einem konventionellen Weitfeldmikroskop erhöht wird, bei welchem nur die einzelne PSF eingeht (Abb. 2.8). Die Auflösung wird nach dem Rayleigh-Kriterium bestimmt. Dabei muss die PSF eines Punktes mindestens um das erste Minimum der PSF eines weiteren Punktes entfernt liegen, um diese zwei Punkte als getrennt wahrnehmen zu können. Der Abstand r_{Weitfeld} des ersten Minimums zum Maximum der PSF ist in der konventionellen Weitfeldmikroskopie:

$$r_{\text{Weitfeld}} = 0.61 \frac{\lambda}{NA},\tag{2.39}$$

in der Konfokalmikrokopie wird er auf r_{konfokal} reduziert:

$$r_{\text{konfokal}} = \frac{1}{\sqrt{2}} 0.61 \frac{\lambda}{NA}.$$
 (2.40)

 λ beschreibt die Wellenlänge des Lichts im Vakuum. Nach dem Rayleigh-Kriterium kann auch die axiale Auflösung nach [62] verglichen werden, mit:

$$z_{\text{Weitfeld}} = 2 \frac{n\lambda}{NA^2},$$

$$z_{\text{konfokal}} = 1.5 \frac{n\lambda}{NA^2}.$$
 (2.41)

Dabei ist zu beachten, dass diese stark durch die Wahl der Pinhole-Lochblende beeinflusst werden kann (Abb. 2.9).

In den Gleichungen (2.39)-(2.41) wird das Objektiv über die numerische Apertur NA charakterisiert. Diese ist das Produkt aus Brechungsindex n und dem halben Öffnungswinkel ϑ des Objektivs:

$$NA = n\sin\theta,\tag{2.42}$$

Die experimentelle Umsetzung des konfokalen Prinzips ist in Abb. 2.10(a) dargestellt. Das Anregungslicht aus einer punktförmigen Lichtquelle wird über einen farbabhängigen Strahlteiler in das Objektiv gelenkt und so innerhalb der Probe fokussiert. Das Detektionslicht wird vom selben Objektiv gesammelt, durch den farbabhängigen Strahlteiler vom Anregungslicht

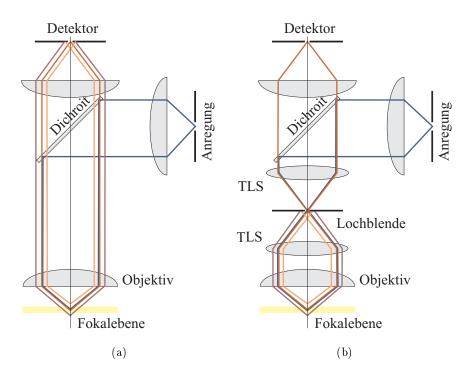


Abb. 2.10.:

Konfokales Prinzip. (a) Das Licht einer punktförmigen Lichtquelle wird über eine Linse parallel gebündelt, über einen dichroitischen Strahlteiler in das Objektiv gelenkt, welches das Licht im Brennpunkt fokussiert. Das dort emittierte Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv gesammelt, parallel gebündelt, am Dichroit transmittiert und schließlich auf einen punktförmigen Detektor fokussiert. Durch die punktförmige Dektektion und Anregung wird erreicht, dass nur Fluoreszenzlicht aus einer dünnen Schicht, der Fokusebene, gesammelt wird. Dadurch wird die Auflösung entlang der optischen Achse erhöht. (b) Experimentelle Umsetzung: Durch den Einbau eines telezentrischen Linsensystems wird eine zusätzliche konfokale Ebene erzeugt, in der eine Lochblende montiert wird, deren Öffnung, projeziert in die Probenebene, der Fokusgröße entspricht.

getrennt und durch eine Linsenoptik auf den Punktdetektor fokussiert. Zusätzlich kann dieser Aufbau mit einem telezentrischen Linsensystem im gemeinsamen Strahlengang der Anregung und Detektion erweitert werden (Abb. 2.10(b)). Dadurch steht eine zusätzliche konfokale Ebene zwischen den Linsen zur Verfügung, in der die Pinhole-Lochblende montiert werden kann. Die Erfassung eines kompletten Bildes der Probe wird durch ein punktweises Abtasten der Probe erreicht. Dafür kann entweder das Beobachtungsvolumen über eine galvano-gesteuerte Optik durch die Probe (engl. laser scanning), oder auch die Probe relativ zum Beobachtungsvolumen durch Piezoelemente bewegt werden (engl. sample scanning).

2.4.3. Verdünnung auf Einzelmolekülniveau

Aufgrund der konfokalen Abbildung, die im Abschnitt 2.4.2 vorgestellt wurde, kann ein sehr kleines Beobachtungsvolumen in der Größenordnung von nur 10^{-15} l erzeugt werden. So können bei immobilisierten Proben einzelne, ausgewählte Moleküle angeregt werden, indem die

$\langle N \rangle$	p(N=1)	$p(N \ge 2)$
1	$36,\!8\%$	$26,\!5\%$
0,5	$30,\!5\%$	$9{,}1\%$
0,1	$9{,}0\%$	$0,\!5\%$
0,01	$0{,}998\%$	$0,\!002\%$

Tab. 2.1.:

Poissonverteilung der Teilchen. Auflistung der Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten von Ereignissen, bei denen entweder genau ein Teilchen im Beobachtungsvolumen ist (p(N=1)) oder mindestens zwei Teilchen im Beobachtungsvolumen sind $(p(N\geq 2))$. Die mittlere Zahl der Teilchen im Beobachtungsvolumen ist durch $\langle N \rangle$ gegeben.

Probe entsprechend im Beobachtungsvolumen positioniert wird. Aber auch in Lösungsexperimenten unter freier Diffusion ist eine Beobachtung einzelner Moleküle möglich. In diesem Fall muss durch eine entsprechend geringe Konzentration der Probe sichergestellt sein, dass sich bei einem fluoreszenten Ereignis mit erhöhter Wahrscheinlichkeit nur ein Teilchen im Fokus befindet. Folgt die Teilchenzahl im Anregungsvolumen einer Poissonverteilung, können die Wahrscheinlichkeiten für ein Teilchen p(N=1) bzw. mind. zwei Teilchen $p(N\geq 2)$ im Beobachtungsvolumen bei einer vorgegebenen mittleren Teilchenzahl $\langle N \rangle$ berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 2.1 aufgeführt. $\langle N \rangle$ ist durch die Auswertung von Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals experimentell zugänglich (siehe Abschnitt 2.4.6). Bei einer mittleren Teilchenzahl von $\langle N \rangle = 0,1$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich nur um ein Teilchen handelt, bereits um den Faktor 10 höher als die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Teilchen beobachtet werden. Eine weitere Verdünnung betont zwar dieses Verhältnis stärker, führt aber auch zu deutlich längeren Messzeiten, da die Wahrscheinlichkeit für ein Fluoreszenzereignis insgesamt sinkt.

2.4.4. Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Die Zahl der emittierten Photonen pro Zeiteinheit der Fluorophore stellt das Messsignal der Einzelmolekülspektroskopie dar. Dabei handelt es sich um eine Poisson-verteilte Zufallsgröße mit einer geringen Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des Ereignisses der Detektion eines Photons. Die Wahrscheinlichkeit P(n) für die Detektion von n Photonen ist:

$$P(n) = \frac{\langle N \rangle^n}{n!} \exp\left[-\langle N \rangle\right]. \tag{2.43}$$

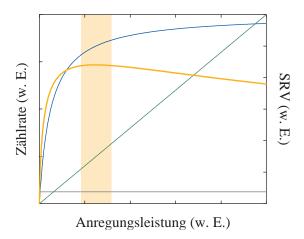
 $\langle N \rangle$ ist der Mittelwert der detektierten Photonen, der mit einer Standardabweichung $\Delta \langle N \rangle$ bestimmt ist:

$$\Delta \langle N \rangle = \sqrt{\langle N \rangle}. \tag{2.44}$$

Dieses poissonverteilte Rauschen der Zählrate um den Mittelwert $\langle N \rangle$ wird als Schrotrauschen bezeichnet.

Abb. 2.11:

Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (orange)[39] sind neben dem durch Sättigung begrenzten Fluoreszenzsignal (blau) die Dunkelzählrate des Detektors (grau) und das Streusignal (grün) zu berücksichtigen.



Zusätzlich zu diesem Fluoreszenzsignal wird ein Hintergrundsignal gemessen. Dieses setzt sich zusammen aus der anregungsunabhängigen Dunkelzählrate $N_{\rm d}$ des Detektors und dem Streusignal ($C_{\rm b}I_{\rm L}$) aus Rayleigh- und Ramanstreuung, das proportional zur Anregungsintensität $I_{\rm L}$ ist. Für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SRV) kann folgender Zusammenhang [39] aufgestellt werden:

$$SRV = \frac{\eta_{\text{Det}} k_{\text{Em}}}{\sqrt{\eta_{\text{Det}} k_{\text{Em}} + C_{\text{b}} I_{\text{L}} + N_{\text{d}}}} \sqrt{T_{\text{int}}}, \qquad (2.45)$$

mit η_{Det} als Detektionseffizienz, k_{Em} als Emissionsrate und T_{int} als Integrationszeit. Die Emissionsrate unterliegt dabei einer Sättigung (Gl. (2.11)). Wie aus Gl. (2.45) und Gl. (2.11) folgt, kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch Anpassung der Anregungsleistung optimiert werden (gelber Balken in Abb. 2.11).

2.4.5. Einzelmolekül-FRET

Die Energietransfereffizienz kann für einzelne Moleküle bestimmt werden. Dafür müssen die emittierten Fluoreszenzphotonen spektral in den Donor- und Akzeptorkanal (rote, blaue Linie in Abb. 2.12, Mitte) aufgetrennt werden. In Lösungsexperimenten diffundieren die Moleküle frei durch das Anregungsvolumen (Abb. 2.12, links) und emittieren dabei einen Schwall an Photonen. Diese Einzelmolekülereignisse werden im transienten Verlauf der detektierten Photonen pro Zeiteinheit durch Schwellwerte (gestrichelte Linie in Abb. 2.12, Mitte) selektiert. Für jedes dieser Ereignisse können aus den gezählten Photonen pro Zeiteinheit im Donor- und Akzeptorkanal die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$, aber auch weitere Parameter wie die Stöchiometrie SV berechnet werden (siehe Abschnitt 3.3.1). Um eine Aussage über die Verteilung der so ermittelten Energietransfereffizienzen zu erhalten, wird die Häufigkeit von $E_{\rm t}$ aller Ereignisse in einem Histogramm $H(E_{\rm t})$ aufgetragen (Abb. 2.12, rechts). Dieses grundlegende Prinzip ist in Abb. 2.12 schematisch zusammengefasst.

Aus der Form der E_t-Verteilung lassen sich Aussagen über das markierte Molekül ableiten.

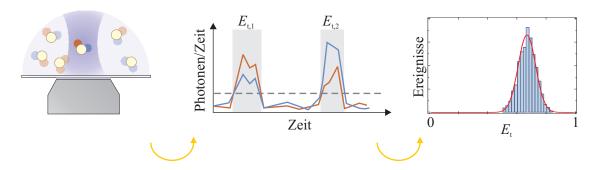


Abb. 2.12.:

Prinzip der Einzelmolekül-FRET-Experimente. Die doppelt markierten Moleküle diffundieren durch das Anregungsvolumen (links). Das transiente Fluoreszenzsignal wird in spektral getrennten Kanälen aufgezeichnet (Mitte). Durch das Setzen eines Schwellwertes (gestrichelte Linie) werden Ereignisse erkannt. Für jedes Ereignis wird $E_{\rm t}$ berechnet und im Histogramm aufsummiert (rechts).

Oft wird die Verteilung mit einer Gaußfunktion angepasst. Weist die Verteilung aufgrund ihrer Position im Randbereich des Histogramms mit $E_{\rm t} \geq 0$ oder $E_{\rm t} \leq 1$ eine Asymmetrie auf (Abb. 2.13), wird alternativ eine logarithmische Normal-Verteilung [57] benutzt:

$$H(E_{\rm t})_{\rm Gauß} = A \cdot \exp\left[-\frac{(E_{\rm t} - \langle E_{\rm t} \rangle)^2}{2\sigma^2}\right],$$
 (2.46)

$$H(E_{\rm t})_{\rm LogN} = A \cdot \exp\left[-\left(\frac{\ln\left(1 - E_{\rm t}\right)/\left(1 - \langle E_{\rm t}\rangle\right)}{width}\right)^{2}\right]. \tag{2.47}$$

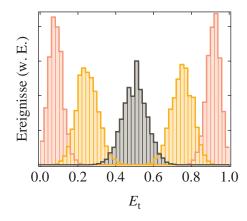
Aus dem Mittelwert $\langle E_{\rm t} \rangle$ der Verteilung kann bei richtiger Korrektur ein mittlerer Abstand der Farbstoffe berechnet werden. Die Breite der Verteilung ist durch das statistische Schrotrauschen der geringen Zählraten an Fluoreszenzphotonen bedingt (Abb. 2.13), welches bei einer gaußförmigen Verteilung wie folgt angegeben wird [63]:

$$\sigma_{\text{Stat}}^2 = \frac{\langle E_{\text{t}} \rangle (1 - \langle E_{\text{t}} \rangle)}{\langle n \rangle}.$$
 (2.48)

Ein Verbreiterung über σ_{Stat} hinaus kann sowohl als statische Abstandsverteilung interpretiert werden, kann aber auch durch weitere Einflüsse wie Dejustage des experimentellen Aufbaus, Photophysik und eingeschränkte Rotation der Farbstoffe oder auch interne Dynamik des Moleküls bedingt sein. Diese Effekte werden im Abschnitt 4 anhand des Proteins $Tt\mathrm{SlyD}$ und verschiedener Referenzproben ausführlich kontrolliert und diskutiert.

Abb. 2.13:

Schrotrauschen in der Energietransfereffizienz. Simulation von E_t -Verteilungen, die allein eine durch Schrotrauschen bedingte Breite aufweisen. Die Gesamtphotonenzahl ist $\langle n \rangle = 60$, dabei verteilen sich die Photonen im Verhältnis $1:11~({\rm rot}), 1:3~({\rm gelb})$ bzw. $1:1~({\rm braun})$ auf den Akzeptorund Donorkanal (und umgekehrt).



2.4.6. Korrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. <u>fluorescence correlation spectroscopy</u>, FCS) basiert auf der Auswertung von Fluktuationen im gemessenen Fluoreszenzsignal. Daraus können Informationen über die Dynamik bzw. Kinetik des Systems gewonnen werden. Im Gegensatz zu Einzelmolekülexperimenten an immobilisierten Molekülen wird die FCS in Lösung angewandt. So wird aufgrund der durch die Diffusion begrenzten Aufenthaltszeit der Fluorophore im Beobachtungsvolumen das Photobleichen minimiert. Die Theorie der FCS wurde in den 1970ern erstmals beschrieben [50, 51, 64]. Aber erst in den 1990ern, zum einen mit der Einführung hocheffizienter Detektoren, stabiler Laser und der konfokalen Optik, zum anderen mit der Synthese effizienter Farbstoffe, fand die FCS eine wachsende Zahl von Anwendungen [53].

Die Grundlage der FCS ist die Möglichkeit, nur wenige Teilchen zur gleichen Zeit in einem minimalen Volumen beobachten zu können (siehe Abschnitte 2.4.2 und 2.4.3). Deren Dynamik führt zu Fluktuationen $\delta F(t)$ im Signal F(t):

$$F(t) = \langle F \rangle + \delta F(t),$$

$$\langle \delta F(t) \rangle = 0.$$
 (2.49)

Aus diesen Fluktuationen kann die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ berechnet werden, welche die Selbstähnlichkeit des Signals in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2},$$

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}.$$
(2.50)

 $\langle \rangle$ beschreibt den Mittelwert gegenüber der Zeit t. Die Diffusion der Fluorophore durch das Beobachtungsvolumen, Photophysik, Rotation, Konformationsänderungen, Komplexbildung und viele weitere Phänomene, die zur zeitlichen Änderung des Fluoreszenzsignals führen, können in der Korrelationsfunktion durch einen Anstieg oder Abfall erfasst werden. Die freie Diffusion durch ein Beobachtungsvolumen, das mit einer dreidimensionalen Gaußverteilung I(x,y,z) mit den Halbachsen ω_0 und z_0 angepasst werden kann (siehe auch Gl. (2.38)):

$$I(x,y,z) = I_0 \exp\left[-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2}\right] \exp\left[-\frac{2z^2}{z_0^2}\right],$$
 (2.51)

führt zu einer Autokorrelation der Form [34]:

$$G(\tau) = 1 + G_{\text{diff}}(\tau),$$

$$G_{\text{diff}}(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D}}} \frac{1}{\sqrt{1 + S^{2} \frac{\tau}{\tau_{D}}}}.$$
(2.52)

N ist die mittlere Anzahl der Teilchen im Beobachtungsvolumen, S der Strukturfaktor mit $S = \frac{\omega_0}{z_0}$ und τ_D ist die mittlere Aufenthaltszeit der Teilchen im Beobachtungsvolumen (Abb. 2.14). τ_D ist nach Gl. (2.53) mit dem Diffusionskoeffizienten D verknüpft:

$$\tau_{\rm D} = \frac{\omega_0^2}{4D}.\tag{2.53}$$

Aus der mittleren Zählrate und der Teilchenzahl im Beobachtungsvolumen kann die molekulare Helligkeit MB (engl. $\underline{molecular}$ $\underline{brightness}$) bestimmt werden:

$$MB = \frac{\langle F(t) \rangle}{N}.\tag{2.54}$$

Zeigen die Fluorophore Photophysik mit Übergängen in den Triplettzustand, entsteht ein zusätzlicher exponentieller Abfall der Korrelationskurve $G_{\text{trip}}(\tau)$ mit:

$$G(\tau) = 1 + G_{\text{trip}}(\tau)G_{\text{diff}}(\tau),$$

$$G_{\text{trip}}(\tau) = 1 + \frac{T}{1 - T} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{T}}}\right).$$
(2.55)

Der relative Anteil der Moleküle, die sich im Triplettzustand befinden, wird mit T beschrieben. Die Zeit τ_T charakterisiert den exponentiellen Abfall. Der Kehrwert entspricht der Summe der Hin- und Rückrate (Interkombination) in den und aus dem Triplettzustand (siehe Abschnitt 2.3):

$$(\tau_{\rm T})^{-1} = k_{\rm ISC} + k_{\rm rISC}.$$
 (2.56)

Abweichungen sowohl von der freien Diffusion als auch von der dreidimensionalen Gaußform des Beobachtungsvolumens führen zur Einführung eines Streckungsfaktors β in der Korrelationsfunktion:

$$G_{\text{diff}}(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{\beta}}} \frac{1}{\sqrt{1 + S^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{\beta}}}.$$
 (2.57)

Wird das Fluoreszenzsignal spektral, polarisationsabhängig oder durch einen 50% igen Strahlteiler aufgetrennt und in verschiedenen Kanälen (1 und 2) detektiert, dann können die Fluoreszenzsignale F_1 und F_2 kreuzkorreliert werden, mit:

$$G_{12}(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_2(t+\tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle},$$

$$G_{12}(\tau) = \frac{\langle F_1(t) F_2(t+\tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle}.$$
(2.58)

Durch die Verwendung von zwei Detektoren lässt sich zum Beispiel das Artefakt des Nachimpulses (engl. Afterpulse, Anstieg bei 10^{-7} s in Abb. 2.14) unterdrücken, indem statt der Autokorrelation die Kreuzkorrelation nach einer 50%-Aufspaltung berechnet wird. Diese wird

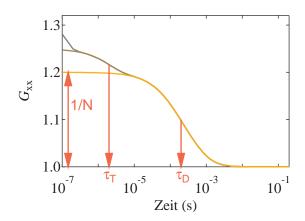


Abb. 2.14:

Autokorrelation. Verlauf einer Autokorrelationskurve G_{xx} des Fluoreszenzsignals von Fluorophor x. Die Moleküle von x diffundieren frei in einem dreidimensionalen gaußförmigen Anregungsvolumen mit $\tau_{\rm D}=200\,\mu{\rm s},~N=5$ und S=0,2 (orange). Zusätzlich zeigen sie eine Triplett-Photophysik mit $\tau_{\rm T}=2\,\mu{\rm s}$ (braun). Die Autokorrelation ist für kurze Zeiten im Bereich von $10^{-7}\,{\rm s}$ mit dem Nachimpuls-Artefakt (grau) überlagert.

als Pseudoautokorrelation bezeichnet.

Bei einer polarisationsabhängigen Auftrennung entstehen Änderungen in der Kreuzkorrelationsfunktion im Zeitbereich der Rotation der Fluorophore.

Die spektrale Auftrennung bietet die Möglichkeit, Informationen von verschiedenen Farbstoffen zu gewinnen. So kann zum Beispiel eine Komplexbildung nach unterschiedlicher Markierung der Bindungspartner in der Kreuzkorrelation nachvollzogen werden. In dieser Arbeit wurde die Dynamik innerhalb des Zwei-Domänen-Proteins TtSlyD auf diese Weise untersucht. Das Protein wurde mit zwei Farbstoffen fluoreszent markiert, zwischen denen FRET messbar ist (Abschnitt 2.3.4). Durch die intramolekulare Dynamik des Proteins ändert sich der Abstand zwischen den Farbstoffen. Dies resultiert in antikorrelierten Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, welche durch einen Anstieg in der Kreuzkorrelationsfunktion bzw. durch einen zusätzlichen Abfall in der Autokorrelationsfunktion im Zeitbereich der Dynamik $\tau_{\rm dyn}$ sichtbar werden. Diese Zusammenhänge werden detailliert in Abschnitt 4.3.3 erläutert und diskutiert.

3. Materialien und Methoden

Nach der Einführung in die theoretischen Grundlagen der Methoden, die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind und der Vorstellung des Proteins TtSlyD, sollen nun die benutzten Geräte, Materialien und Analysemethoden selbst vorgestellt werden. Zunächst werden die Fluoreszenzfarbstoffe und die sie charakterisierenden Parameter eingeführt und die fluoreszente Markierung des Proteins TtSlyD mit diesen Farbstoffen erläutert. Weiterhin werden alle weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien vorgestellt. Daraufhin wird auf den experimentellen Aufbau, das Konfokalmikroskop, eingegangen. Folgend werden die Verfahren erklärt, mit denen die gezählten Einzelphotonendaten analysiert wurden. Zum Abschluss wird die Simulation von experimentell zugänglichen Daten theoretisch eingeführt.

3.1. Materialien

3.1.1. Fluoreszente Markierung

3.1.1.1. Farbstoffe und deren Position

Mit Hinblick auf die Fragestellung nach einer möglichen Dynamik zwischen den Domänen und einem Zusammenhang zur enzymatischen Wirkung wurde TtSlyD mit einem FRET-Farbstoffpaar markiert, sodass Änderungen im Abstand der Farbstoffe als Änderung der Energietransfereffizienz messbar werden. Die Position der Farbstoffe wurde so gewählt, dass jeweils eine Domäne fluoreszent markiert ist, Funktion und Stabilität gegenüber dem Wildtyp aber nicht wesentlich geändert werden (siehe dazu auch Abschnitt 4.2). Durch Mutationen werden Cysteine in den Wildtyp eingebaut, an denen die Farbstoffe binden. Aus den Kristallstrukturen für den Wildtyp [4] kann für die Variante D82C/T139C ein mittlerer Abstand von $r=48\,\text{Å}$ zwischen den C_{α} -Atomen der beiden Farbstoff tragenden Aminosäuren ermittelt werden. In Bezug auf diesen Abstand wurden Alexa Fluor 488 (AF488) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) als Donorfarbstoff und Atto 647N (A647N) (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) als Akzeptorfarbstoff mit einem Försterradius $R_0 = 52 \,\text{Å}$ gewählt (Abb. 3.1(a)). Dieser ergibt sich nach Gl. (2.25) aus den Herstellerangaben für die Spektren der freien Farbstoffe in Lösung und die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors $Q_D = 0.93$, aus dem Brechnungsindex n = 1.33 und einem mittleren Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$. Die Extinktionskoeffizienten für die Farbstoffe sind $\varepsilon_{\rm AF488} = 72000\,{\rm M}^{-1}{\rm cm}^{-1}$ bei $\lambda = 494\,\mathrm{nm}$ und $\varepsilon_{\mathrm{A647N}} = 150000\,\mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}$ bei $\lambda = 644\,\mathrm{nm}$ (lt. Herstellerangaben). Die angegebenen Wellenlängen entsprechen jeweils der maximalen Absorption des Farbstoffes.

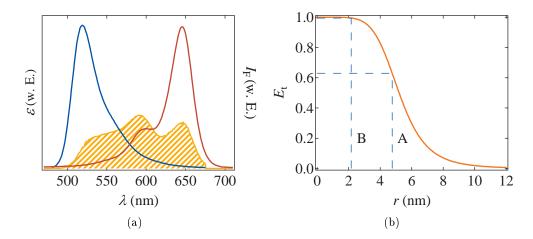


Abb. 3.1.:

Überlappungsintegral und Abstandsabhängigkeit. Das Farbstoffpaar AF488 und A647N am Protein $Tt\mathrm{SlyD}$. (a) Absorptionsspektrum von AF488 (blau), Fluoreszenzspektrum von A647N (rot) und Funktion des Überlappungsintegrals (orange schraffiert). (b) Energietransfereffizienz in Abhängigkeit des Abstandes r zw. AF488 und A647N mit $R_0 = 52\,\text{Å}$. Die Abstände für die Varianten D82C/T139C (A: 48 Å) und P68C/E111C (B: 22 Å) aus der Kristallstruktur des Wildtyps von $Tt\mathrm{SlyD}$ [4] sind als Fadenkreuz eingetragen.

Für Vergleichsexperimente wurden sowohl die Position des Cysteins mit der Doppelvariante D82C/E137C geändert als auch der Akzeptorfarbstoff mit Atto 655 (A655) (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) alternativ gewählt.

Für die separate Beobachtung der Faltung der IF-Domäne wurde die Variante P68C/E111C mit AF488 und A647N markiert. Beide Farbstoffe befinden sich in der IF-Domäne, mit einem Abstand von nur $r=22\,\text{Å}$ (Fadenkreuz in Abb. 3.1(b)) in der Kristallstruktur [4]. Die Farbstoffe haben aber mit 43 Aminosäuren einen ähnlichen sequentiellen Abstand wie bei der Variante D82C/T139C (sequentieller Abstand beträgt 57 Aminosäuren). Dies ermöglicht den Vergleich der entfalteten Proteinketten.

3.1.1.2. Verfahren zur Markierung des Proteins

Für die fluoreszente Markierung des Proteins TtSlyD müssen Mutationen durchgeführt und somit Cysteine in das Protein eingebaut werden. Deren reduzierte Thiolgruppen können mit den Maleimidgruppen der Farbstoffe Thioetherbindungen aufbauen (Abb. 3.2).

Die verschiedenen Doppelvarianten D82C/T139C, D82C/E137C und P68C/E111C sowie die entsprechenden Einzelvarianten von TtSlyD wurden nach Standardprotokollen [4] von Christian Löw expremiert, aufgereinigt und bereitgestellt. Für die fluoreszente Markierung wurden die mit Maleimid funktionalisierten Formen der Farbstoffe AF488, A647N und A655 verwendet. Die Standardchemikalien wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT) und Guanidinhydrochlorid (GdHCl) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Die fluoreszente Markierung der Proteine erfolgte innerhalb einer Glovebox (engl. für Hand-

Abb. 3.2:

Thioether-Bindung. Zwischen der Maleimidgruppe des Fluoreszenzfarbstoffs und der Thiolgruppe (SH) des Proteins wird eine Thioetherbindung (rot umrandet) aufgebaut und so der Farbstoff stabil am Protein gebunden. Aufgrund der für die Bindung notwendigen Thiolgruppe ist diese Form der fluoreszenten Markierung spezifisch, da die Farbstoffe nur an Cysteine des Proteins binden können.

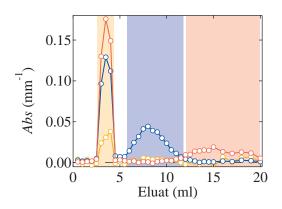
schuhkasten) unter Argon-Atmosphäre. So wird Sauerstoff ausgeschlossen, die reduzierten Thiolgruppen der Cysteine für die Bindung der Farbstoffe bleiben länger bestehen. Die Proben wurden für zwei Stunden in 6 M GdHCl und 1 mM DTT (50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH = 7.0) inkubiert, um mögliche Disulfidbrücken und Aggregate zu lösen. Die Rückfaltung erfolgte mit einem Pufferwechsel durch eine PD-10-Tropfsäule (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). In dieser Tropfsäule erfolgt die Auftrennung der Substanzen nach dem Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie. Unter nativen Bedingungen (50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH = 7,0) wurden die Proben für zwei Stunden mit einem ungefähr zweifachen Überschuss der Farbstoffe inkubiert. Diese wurden zuvor in DMSO gelöst, für 20 min im Ultraschallbad behandelt und vor der Zugabe zur Proteinlösung gemischt. Überschüssiger Farbstoff, der nicht an ein Cystein gebunden ist, wird durch Auftrennung über eine PD-10-Tropfsäule vom Protein getrennt. Dafür wurden Fraktionen von je $500\,\mu$ l aufgefangen und für jede Fraktion ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Nanodrop 1000 von Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). In Abb. 3.3 sind die Spekren für die Markierung der Variante D82C/T139C mit AF488 und A647N dargestellt. Das markierte Protein durchläuft die Säule am schnellsten (orange unterlegt), der Donorfarbstoff wird langsamer, aber scharf eluiert (blau unterlegt). Nur der Akzeptorfarbstoff zeigt eine sehr breite Bande (rot unterlegt) und kann nicht komplett von der Säule eluiert werden. Dies ist mit hydrophoben Wechselwirkungen zum Säulenmaterial zu begründen. Optional wurde möglicher freier Farbstoff durch einen Microcon-Filter (Grenzwert 3kDa, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) bei 14000 q von der Proteinlösung abzentrifugiert. Die Lösungen mit markiertem Protein wurden in 10 µl-Fraktionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Probenvorbereitung

Die markierten Proteinproben wurden in Probenpuffer ($50\,\mathrm{mM}$ Natriumphosphatpuffer bei pH = 7,5, $100\,\mathrm{mM}$ NaCl) verdünnt. Um Adhäsion an der Deckglasoberfläche zu vermeiden, enthielt dieser Puffer zusätzlich 0,001% ($\mathrm{v/v}$) des Detergens' Tween20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Für die Einzelmolekülmessungen wurden die Proben auf ca. $100\,\mathrm{pM}$ verdünnt. Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie wurden $1000\mathrm{fach}$ höhere Konzentrationen verwendet. Für die Entfaltung des Proteins wurde das Denaturie-

Abb. 3.3:

Kontrolle Markierungsverfahrens. des Lösung aus dem mit AF488 und A647N markierten Protein und den überschüssigen freien Farbstoffen wird über $_{
m eine}$ PD-10-Tropfsäule (Größenausschluss-Chromatographie) aufgetrennt und in $500 \,\mu$ l-Fraktionen aufgefangen. Aus den Absorptionsspektren jeder Fraktion wird die Absorption bei $\lambda = 280 \,\mathrm{nm}$ (orange), bei $\lambda = 488 \,\mathrm{nm}$ (blau) und bei $\lambda = 647 \,\mathrm{nm}$ (rot) für die Bestimmung der Protein-, der Donorfarbstoff- und der Akzeptorfarbstoffkonzentration bestimmt. Das markierte Protein wird aufgrund der höchsten molekularen Masse am schnellsten eluiert. Dann folgen die freien Donor- (blau unterlegt) und Akzeptorfarbstoffe (rot unterlegt).



rungsmittel GdHCl (BioUltra 8 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet, im Probenpuffer verdünnt und auf den pH = 7,5 eingestellt. Die genaue Konzentration c = [GdHCl] wurde aus dem Brechungsindexunterschied des Puffers Δn mit und ohne GdHCl bestimmt [65]:

$$c = 57,147\Delta n + 38,68 (\Delta n)^2 - 91,6 (\Delta n)^3.$$
(3.1)

3.1.3. Messkammer

Die Messungen im nativen Puffer wurden bei einem Probenvolumen von $(3...5)\,\mu$ l auf einem mit Polymethylmethacrylat (PMMA) beschichteten Deckglas in einer Feuchtkammer durchgeführt (Abb. 3.4(a)). Die Feuchtkammer ist mit einem Wasser getränkten Zellstofftuch präpariert worden. Dadurch entsteht eine hohe Luftfeuchte, die das Verdunsten des kleinen Probenvolumens verhindert. Durch einen Barrierefilm (RotiLab Liquid Barrier Marker, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) um den Probentropfen herum kann dieser nicht auf dem Deckglas verlaufen. Für Messungen mit dem Denaturierungsmittel GdHCl wurde eine Mikromesskammer verwendet (Abb. 3.4(b)). Die hohe Salzkonzentration in der Probe würde zu einem osmotischen Anschwellen des Probentropfens in der Feuchtkammer führen. In der Mikrokammer hingegen ist das Luftvolumen auf ein Minimum reduziert, die Messflüssigkeit verdunstet kaum, da schnell der Sättigungsdampfdruck in dem geringen Luftraum erreicht ist. Die Mikromesskammer besteht aus zwei mit PMMA beschichteten Deckgläsern, die durch einen Parafilm (Parafilm M, American National Can, Greewich, CT, USA) auf einen Abstand von ca. 120 μ m (lt. Herstellerangaben) gehalten werden. Die Probe wird in eine Aussparung vom Parafilm pipettiert.

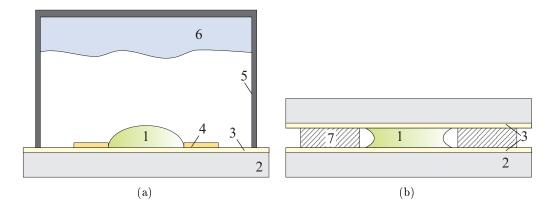


Abb. 3.4.:

Messkammer. Schematische Darstellung (nicht maßstabsgerecht) der Messkammern für Messungen im nativen Puffer (a) und im hochkonzentrierten Salzpuffer (b). Die Probe (1) befindet sich auf einem mit PMMA (3) beschichteten Deckglas (2). (a) Das Verlaufen des Tropfens (1) wird durch einen Barrierefilm (4) verhindert. Die Feuchtkammer (5) ist mit einem in H₂O bidest. getränkten Zellstofftuch (6) präpariert. (b) Mit einem Parafilm (7) wird ein zweites Deckglas auf Abstand gehalten und so eine luftdichte Mikrokammer erzeugt.

3.1.4. Bindungspartner

Als Enzyminhibitoren wurden Rapamycin (Sirolimus 99 %) von Tecoland Corp. (Edison, NJ, USA) und FK506 von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) bezogen. Diese wurden jeweils in DMSO gelöst und im Probenpuffer bis zu einer Konzentration von $c_{\text{Rapa}} = 70\,\mu\text{M}$ bzw. $c_{\text{FK506}} = 100\,\mu\text{M}$ verdünnt. Der verbleibende Anteil von weniger als 2 % DMSO in H_2O (v/v) ist vernachlässigbar. Mit einem $K_D \approx 1\,\mu\text{M}$ für beide Inhibitoren [66] kann bei Einzelmolekülkonzentration des Proteins ($c_{\text{Prot}} \approx 100\,\text{pM}$) und einer angenommenen Bindungsstöchiometrie von 1 : 1 [67] davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Proteine mit dem Inhibitor wechselwirken.

Als Modellsubstrat für die durch TtSlyD katalysierte Rückfaltung wurde die reduzierte und carboxymethylierte Form der Variante S54G/P55N der Ribonuklease T1 benutzt. RNase T1 wird im nativen Zustand durch zwei Disulfidbrücken stark stabilisiert [68]. Desweiteren besitzt der Wildtyp von RNase T1 vier Proline, von denen zwei (P39, P55) in der nativen Form in cis-Form vorliegen [69] (siehe Abb. 2.2(b)). Deren trans-zu-cis-Übergang ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Rückfaltung [70, 71]. Um den komplexen Faltungsvorgang zu vereinfachen, wurde die cis-S54-P55-Bindung durch eine trans-G54-N55-Bindung ersetzt [72]. Nach der Reduzierung und Carboxymethylierung der Thiolgruppen sind die Disulfidbrücken deaktiviert, das Protein derartig destabilisiert, dass es in der entfalteten Form vorliegt. Erst durch starke Erhöhung der Ionenstärke kann ein nativ ähnlicher Zustand erreicht werden [68, 73].

Die Variante S54G/P55N der RNase T1 wurde, wie für den Wildtyp beschrieben [74], von Carolin Haupt aufgereinigt, vorbereitet und bereitgestellt. Der Rückfaltungsansatz [5] wurde so angepasst, dass Ribonuklease T1 (RCM-T1) ausgehend von einem Ammoniumacetatpuffer (25 mM, pH = 5,0) auf 14 μ M in den nativen Probenpuffer mit einer TtSlyD-Konzentration

von $c_{\text{Prot}} \approx 100\,\text{pM}$ verdünnt wurde. Da im Einzelmolekülexperiment kein Salzsprung auf 2 M NaCl stattfand, bleibt RCM-T1 permanent entfaltet. Dennoch wird davon ausgegangen, dass trans-zu-cis-Isomerisierungen durch TtSlyD katalysiert werden.

Insulin wurde von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen und wie an anderer Stelle veröffentlicht [75] präpariert. Das Insulin wurde in einer Konzentration von $c=200\,\mu\mathrm{M}$ dem nativen Puffer von $Tt\mathrm{SlyD}$ hinzugefügt. Die Messungen fanden zum Teil unter reduzierenden Bedingungen mit DTT ($c_{\mathrm{DTT}}=20\,\mathrm{mM}$) statt.

Das TAT-Peptid (NH2-QRRDFLKYSVALGVASALPLWSRAVFA-OH) wurde von Activotec (Comberton, Cambridge, UK) bezogen und im nativen Puffer gelöst. Durch Ultrazentrifugieren wurden ausgefallene Anteile von der Lösung getrennt. Die Einzelmolekülmessungen fanden bei einer Konzentration von $c=40\,\mu\mathrm{M}$ statt.

3.1.5. Referenzproben

Für Referenzversuche wurde das Polyprolin Gly- $(Pro)_{20}$ -Cys (kurz: $(Pro)_{20}$) mit den Farbstoffen AF488 am C-terminalen Cystein und A647N am N-terminalen Glycin entsprechend Standardprotokollen [3] von Tobias Aumüller markiert und zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden im nativen Probenpuffer analog zu TtSlyD verdünnt.

Eine weitere Referenzprobe ist doppelsträngige DNA (dsDNA), die von der IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) synthetisiert wurde. Die dsDNA besteht aus 23 Basenpaaren mit folgender Sequenz

$$5' - \text{TAACACAGG}(\text{dT-AF488})\text{CCCATCTGAATCG} - 3'$$

 $3' - \text{ATTGTGTCCAGGGTAGAC}(\text{dT-A647N})\text{TAGC} - 5'.$ (3.2)

Dabei wurden die Thyminbasen in einem Abstand von neun Basen mit je einem Farbstoff des FRET-Paares, AF488 und A647N, markiert. Zur Kontrolle wurde ein Absorptionspektrum der dsDNA aufgenommen (Abb. A.1 im Anhang). Die Probe wurde in einem TE-Puffer (Tris $10\,\mathrm{mM}$, EDTA $1\,\mathrm{mM}$, pH = 8,0) auf ca. $c\approx 100\,\mathrm{pM}$ verdünnt und analog zu $Tt\mathrm{SlyD}$ gemessen und ausgewertet.

Die dritte Referenzprobe sind TetraSpeck (TS)-Kugeln (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Es handelt sich dabei um Kugeln mit einem Durchmesser von $d_{\rm TS}=100\,{\rm nm}$, die mit vier Farbstoffen hochgradig markiert sind. Die Absorptions-/Fluoreszenzmaxima der Farbstoffe liegen bei $360/430\,{\rm nm}$, $505/515\,{\rm nm}$, $560/580\,{\rm nm}$ und $660/680\,{\rm nm}$. Die Stammlösung oder -suspension der TS-Kugeln wurde direkt in H₂O bidest. auf 10% (v/v) verdünnt.

3.2. Experimenteller Aufbau

3.2.1. Konfokales Einzelmolekülmikroskop

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente erfolgten bis auf wenige Ausnahmen an einem in der Arbeitsgruppe konstruierten konfokalen Mikroskop (Abb. 3.5). Ein solches Konfokalmikroskop zeichnet sich dadurch aus, dass die punktförmige Lichtquelle direkt als beugungsbegrenzter Fokus in die Probenebene abgebildet wird. Das dort emittierte Licht wird wiederum beugungsbegrenzt auf die Detektionsfläche fokussiert. Anregungs- und Detektionsstrahlengang haben somit dieselbe fokale Ebene (konfokal). Licht, das außerhalb der fokalen Ebene emittiert wird, wird durch eine Pinhole-Lochblende (engl. Pinhole - Nadelöhr) mit einem Durchmesser im μ m-Bereich blockiert. Eine detaillierte Beschreibung und Diskussion der Verwendung einer Pinhole-Lochblende folgt in Abschnitt 4.1.2.

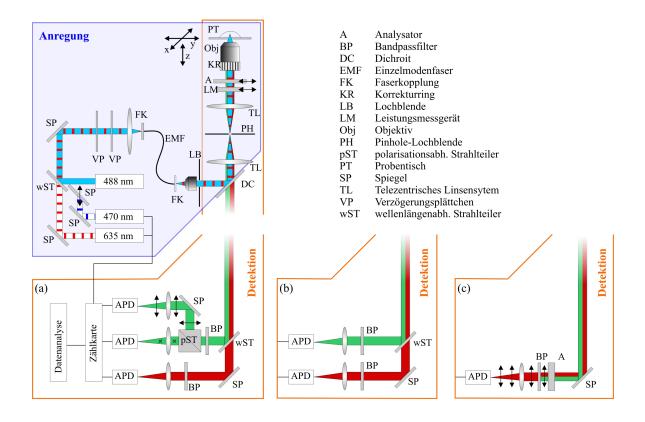


Abb. 3.5.:

Prinzipieller Aufbau der Messapparatur. Die einzelnen Bauelemente werden durch Abkürzungen benannt. Der Detektionsstrahlengang (orange) kann abhängig von der Fragestellung eingestellt werden (a,b bzw. c).

In dieser Arbeit erfolgt die Anregung mit verschiedenen Laserlinien, die über Spiegel und einen wellenlängenabhängigen Strahlteiler (BS520DCXR, AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) kombiniert und in eine gemeinsame Einzelmodenfaser (SMC-460, Schäf-

ter&Kirchhoff, Hamburg, Deutschland) eingekoppelt werden. Vor der Einkopplung wird die Polarisation des Anregungslichts mit einer Kombination aus einem $\sqrt{2}$ - und einem $\sqrt{4}$ -Verzögerungsplättchen (Melles Griot, Bensheim, Deutschland) angepasst. Am Ende der Faser tritt nur die erste Mode des Lichts mit einem gaußförmigen Intensitätsprofil aus. Wegen des geringen Faserdurchmessers (Modendurchmesser $d = (3,0...4,1) \, \mu \text{m}$ [76]) wird das Faserende als ideal punktförmige Lichtquelle angenommen. Durch ein apochromatisches Objektiv (Uplan-Apo 4x/0.16, Olympus, Tokio, Japan), dessen Brennpunkt auf diesem Faserende liegt, wird das divergente Anregungslicht zu einem Parallelstrahl kollimiert, dessen Durchmesser über eine Lochblende eingestellt werden kann. Das so kollimierte Anregungslicht wird an einem dichroitischen Strahlteiler (Z-405-470-633, AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) reflektiert und über ein telezentrisches Linsensystem (Tubuslinse mit der Brennweite 20 cm, Nikon, Japan) fokussiert. In der Fokusebene innerhalb des Linsensystems kann optional eine Pinhole-Lochblende (Thorlabs, Newton, NJ, USA) mit einem Durchmesser von $d=(10\dots 100)\,\mu\mathrm{m}$ montiert werden. Hinter dem telezentrischen Linsensystem befindet sich in einem Abstand der einfachen Brennweite einer Tubuslinse ein Wasserimmersionsobjektiv mit der numerischen Apertur NA = 1,2 (CFI Plan Apochromat 60x WI, Nikon, Japan), das das Anregungslicht in die Probe fokussiert. Vor dem Objektiv können Leistung und Polarisation des Anregungslichts mit einem Leistungsmessgerät (818-SL, Newport Corp., Irvine. USA) und einem Analysator (Melles Griot, Bensheim, Deutschland) kontrolliert werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und durchläuft das telezentrische Linsensystem erneut. Am dichroitischen Strahlteiler wird das Fluoreszenzlicht transmittiert und somit vom Strahlengang des Anregungslichts getrennt. Je nach Zielstellung des Versuchs wird der Strahlengang in der Detektion angepasst.

Abb. 3.5(a): Das Fluoreszenzlicht wird wellenlängenabhängig durch einen Langpass (BS640-DCXR, AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) aufgeteilt. In jedem der beiden Teilstrahlgänge befindet sich zusätzlich ein Bandpassfilter (Donorkanal: HQ525/50, Akzeptorkanal: HQ685/70, AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) zur Unterdrückung von Streulicht. Das Fluoreszenzlicht im Donorkanal wird zusätzlich durch einen polarisationsabhängigen Strahlteiler (PBS, Melles Griot, Bensheim, Deutschland) aufgeteilt. Alle drei Strahlgänge werden durch achromatische Linsen (Brennweite 50 cm) auf die Detektoren fokussiert. Diese werden aufgrund ihrer kleinen aktiven Detektionsfläche von $d=175\,\mu\mathrm{m}$ [77] als punktförmig angenommen.

Abb. 3.5(b): Der Aufbau ist analog zu (a), allerdings wird auf die Information der Polarisation im Donorkanal verzichtet. Dieser Aufbau wird meist zur Bestimmung der Transfereffizienz gewählt.

Abb. 3.5(c): Der einfachste Aufbau dient der Messung von Fluoreszenzlebensdauern und Anisotropien. Das Detektionslicht durchläuft einen Bandpassfilter und einen Analysator, der variabel auf eine bestimmte Polarisationsrichtung eingestellt werden kann. In diesem Fall wird optional mit einem Luftimmersionsobjektiv (Plan 10x/0.25, Nikon, Japan) statt mit einem Wasserimmersionsobjektiv gearbeitet.

Die Photonen werden von hochwertigen Avalanche-Photodioden (APD) (SPCM-AG 14, Perkin Elmer, Fremont, MA, USA) mit einer hohen Quanteneffizienz (50 % bis 70 %, siehe auch

Abb. 3.6) und einer geringen Totzeit (60 ns) detektiert und mit einer Zählkarte (TimeHarp 200, Picoquant GmbH, Berlin, Deutschland) gezählt. Die Pulse der Laserdioden steuern als Trigger die Zählkarte. Die komplette Analyse der Daten wurde mit der Software Igor Pro 6.12A (Wavemetrics) vorgenommen.

3.2.2. Anregungsschema

Für die Anregung des Donorfarbstoffs stehen ein Dauerstrichlaser der Wellenlänge $\lambda=488\,\mathrm{nm}$ (frequenzverdoppelter Diodenlaser von Spectra Physics Cyan, Newport Corp., Irvine, USA) und eine gepulste Laserdiode der Wellenlänge $\lambda=470\,\mathrm{nm}$ (LDH-P-C-470, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland) zur Verfügung. Die Anregung des Akzeptorfarbstoffes erfolgt über eine gepulste Laserdiode der Wellenlänge $\lambda=635\,\mathrm{nm}$ (LDH-P-C-635, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland). Die Frequenz der gepulsten Dioden wird über einen Treiber (Sepia-PDL-808, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland) gesteuert ($\nu=10\,\mathrm{MHz}$, 20 MHz, 40 MHz). Die Leistung der Laser wird rein mechanisch über das teilweise Abschatten des Strahlengangs durch eine Schraube vor der Einkopplung in die Einzelmodenfaser realisiert.

3.2.3. Probentisch

Die Versuche erfolgten auf Deckgläsern ($22\,\mathrm{mm} \times 22\,\mathrm{mm}$, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), die durch Magnete auf einem Probentisch fixiert wurden. Dieser Probentisch kann senkrecht zur optischen Achse (z-Achse) in der x-y-Ebene durch Piezoelemente bewegt werden (P-733.2CL, Physik-Instrumente, Karlsruhe, Deutschland). Zur Änderung der Fokusposition entlang der optischen Achse befindet sich das Objektiv auf einer von Piezokristallen gesteuerten Einheit (PiFoc, Physik-Instrumente, Karlsruhe, Deutschland), durch die das Objektiv und somit der Fokus in der Probe verschoben werden kann. Auf diese Weise kann die relative Position des Fokus' zur Probe in einem dreidimensionalen $(100 \times 100 \times 100) \mu \mathrm{m}^3$ -Raum festgelegt werden.

3.2.4. Zählkarte

Während einer Messung werden die Daten der detektierten Photonen im TTTR-Modus (engl. time-tagged-time-resolved) fortlaufend in eine Datei geschrieben. Dabei wird für jedes Photon ein Eintrag angelegt, in dem die Kanalnummer des Detektors, die Makrozeit und die Mikrozeit binär kodiert sind. Die Makrozeit gibt die Zeitspanne zwischen Beginn der Messung und der Detektion des Photons an. Sie wird mit einer Auflösung von $\Delta t = 100$ ns gespeichert. Die Mikrozeit hingegen beschreibt die Zeitspanne zwischen einem Laserpuls (Triggersignal) und der Detektion des Photons, welche mit einer Auflösung von $\Delta t = 35$ ps notiert wird. Dies wird durch die TCSPC-Technik (engl. time correlated single photon counting, zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung) realisiert. Aus den Mikrozeiten kann bei entsprechend häufigem

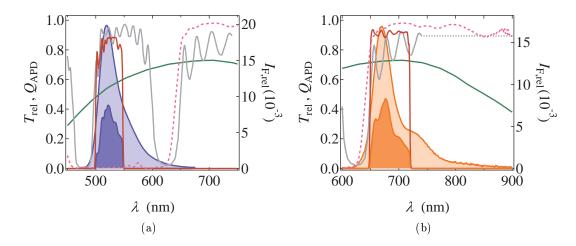


Abb. 3.6.:

Korrekturfaktor. Berechnung des Korrekturfaktors für AF488 (a) und A647N (b). Die Fluoreszenzphotonen, beschrieben durch die Spektren $I_{\rm F,rel}$ ((a) hellblau, (b) hellorange) passieren den Dichroit Z-405-470-633 (grau), werden am Strahlteiler BS640DCXR (pink gepunktet) reflekiert (a) bzw. transmittiert (b) und passieren dann einen Bandpassfilter (dunkelrot: HQ525-50 in (a) bzw. HQ685-70 in (b)). Neben den Transmissionskurven dieser optischen Elemente ($T_{\rm rel}$) ist die Effizienz $Q_{\rm APD}$ der APD (grün) zu berücksichtigen. Man erhält die korrigierten Spektren (dunkelblau (a) bzw. dunkelorange (b)).

Durchlaufen eines Anregungszyklus die Lebensdauer des Farbstoffes bestimmt werden. Um sicher zu stellen, dass ein Fluoreszenzphoton durch den direkt zuvor stattgefundenen Laserpuls ausgelöst wurde, also pro Pulszyklus immer nur maximal ein Photon emittiert wird (Vermeidung des Pile-Up-Effektes¹), sollte die mittlere Zählrate die Schwelle von 10 % der Wiederholungsrate das Laserpulses nicht übersteigen.

3.2.5. Filter

Die Fluoreszenzphotonen (Fluoreszenzspektrum $F(\lambda)$) werden wellenlängenabhängig vom Dichroit transmittiert ($g_{DC}(\lambda)$). Zur Berechnung der Energietransfereffizienz werden die Fluoreszenzphotonen durch wellenlängenabhängige Strahlteiler spektral aufgetrennt (Transmission der Akzeptorphotonen mit $g_{wST}(\lambda)$, Reflektion der Donorphotonen mit $(1-g_{wST}(\lambda))$). Zur Unterdrückung des Streulichts werden zusätzlich Bandpassfilter benutzt, deren Transmissionsbande mit dem Maximum des Fluoreszenzspektrums des jeweiligen Farbstoffes übereinstimmt ($g_{BP}(\lambda)$). Schließlich detektieren die APD mit einer spektral abhängigen Quanteneffizienz $Q_{APD}(\lambda)$. Durch den Einsatz dieser optischen Bauelemente kommt es zum Verlust von Fluoreszenzphotonen. Der Korrekturfaktor q beschreibt diese Verlusteffekte:

$$q = \frac{\int (F(\lambda) \cdot g_{\text{DC}}(\lambda) \cdot g_{\text{wST}}(\lambda) \cdot g_{\text{BP}}(\lambda) \cdot Q_{\text{APD}}(\lambda)) d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda}.$$
 (3.3)

¹Nach jedem Laserpuls (Triggersignal) kann nur die Mikrozeit eines einzelnen Photons bestimmt werden. Ein weiteres Photon würde nicht in den Zählprozess eingehen und somit verloren gehen. Die frühen Photonen werden bevorzugt. Dies wird als *Pile-Up-*Effekt bezeichnet.

Die Korrekturfaktoren für die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe AF488 (q_D) , A647N (q_A) und A655 (q_{A2}) sind:

$$q_{\rm D} = 0.28,$$

 $q_{\rm A} = 0.34,$
 $q_{\rm A2} = 0.33.$ (3.4)

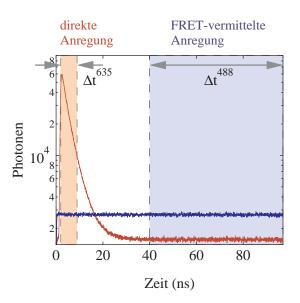
Die Fluoreszenzspektren und die in die Rechnung eingeflossenen Spektralfunktionen $g_{x}(\lambda)$ sind für die Farbstoffe AF488 und A647N in Abb. 3.6 dargestellt.

3.2.6. Spektrometer

Die Absorptionsspektren zur Bestimmung der Konzentration oder zur Qualitätskontrolle im Markierungsprozess der Proteinproben wurden entweder am Nanodrop 1000 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) mit einem Probenvolumen von $V=(2\dots3)\,\mu$ l oder alternativ am JASCO V-550 (Jasco, Tokio, Japan) mit $V=100\,\mu$ l gemessen. Die Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der Aktivität von TtSlyD wurden an einem Fluoreszenzspektrometer FP-6500 (Jasco, Tokio, Japan) aufgenommen. Für alle weiteren Fluoreszenzspektren wurde das Spektrometer LS50B (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) genutzt.

Abb. 3.7:

Prinzip der Aufteilung der Photonen im POE-Schema. Die Photonen im Akzeptor- (rot) und Donorkanal (blau) werden entsprechend ihrer Mikrozeiten aufsummiert. Farbig unterlegt sind die Fenster, nach denen die Photonen sortiert werden. Photonen im rot unterlegten Bereich resultieren hauptsächlich aus der direkten Anregung des Akzeptors, Photonen im blau unterlegten Bereich aus der Anregung des Donors und dem Energietransfer auf den Akzeptor. Die Photonen im Zwischenbereich (weiß) werden nicht in die Auswertung einbezogen.



3.3. Analyse der Daten

3.3.1. Analyse der FRET-Daten

In dieser Arbeit wurden die fluoreszenten Proben zur Bestimmung der Energietransfereffizienz stets im sogenannten POE-Schema angeregt (engl. pulsed overlaid excitation: pulsüberlagerte Anregung). Der Dauerstrichlaser ($\lambda=488\,\mathrm{nm}$) für die Anregung des Donors wird von einem gepulsten Laser ($\lambda=635\,\mathrm{nm}$) überlagert, mit dem der Akzeptor direkt angeregt wird. Da die hochfrequenten Pulse als Triggersignal in die Zählroutine der Photonen einfließen, können mit Hilfe der Mikrozeit, der Zeit relativ zum Laserpuls (s. Abschnitt 3.2), die Photonen so geordnet werden, dass sie entweder nach reiner Anregung des Donors oder nach zusätzlicher Anregung des Akzeptors emittiert wurden. In Abb. 3.7 werden die Photonen entsprechend ihrer Ankunftszeiten relativ zum Laserpuls aufsummiert. Die vom Donor emittierten Photonen sind vom Puls unbeeinflusst. Die Anzahl der Akzeptorphotonen steigt deutlich nach direkter Anregung und klingt mit der Fluoreszenzlebensdauer wieder auf das Niveau der FRET-vermittelten Anregung ab. Die Grenzen für die Fenster "direkte Akzeptoranregung" und "FRET-vermittelte Akzeptoranregung" werden individuell mit der Zielstellung einer deutlichen Trennung festgelegt. Die Photonen, die in den "Misch-Fenstern" detektiert werden, fließen nicht in die Auswertung ein.

Das Signal (Anzahl der Photonen) in den spektral aufgetrennten Kanälen ($S_{\rm don}$, $S_{\rm akz}$) kann somit zusätzlich nach der Anregung in $S_{\rm don}^{635}$, $S_{\rm don}^{488}$, $S_{\rm akz}^{635}$ und $S_{\rm akz}^{488}$ sortiert werden (Abb. 3.8(a)), wobei zu bemerken ist, dass im Fenster der "direkten Akzeptoranregung" zusätzlich der Donor angeregt wird. Das POE-Schema ist vergleichbar mit dem Anregungsschema ALEX [78] (engl. <u>alternating laser excitation</u>) bzw. PIE [79] (engl. <u>pulsed interleaved excitation</u>). Allerdings wird in beiden Fällen auch der Donor mit einem gepulsten Laser angeregt, sodass Donor- und Akzeptoranregung direkt getrennt werden können. PIE und ALEX bieten die

Möglichkeit, nicht nur die abstandsabhängige Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$ zu berechnen, sondern auch Informationen zum stöchiometrischen Verhältnis SV der gebundenen Farbstoffe der markierten Moleküle zu bekommen. Dies ermöglicht, die Proteinproben statistisch zu markieren (siehe Abschnitt 3.1.1.2):

$$E_{t} = \frac{S_{akz}^{488}}{S_{akz}^{488} + S_{don}^{488}},$$

$$SV = \frac{S_{akz}^{488} + S_{don}^{488}}{S_{akz}^{488} + S_{don}^{488} + S_{akz}^{635} + S_{don}^{635}}.$$
(3.5)

$$SV = \frac{S_{\text{akz}}^{488} + S_{\text{don}}^{488}}{S_{\text{akz}}^{488} + S_{\text{don}}^{488} + S_{\text{akz}}^{635} + S_{\text{don}}^{635}}.$$
(3.6)

Wird das System so justiert, dass die Gesamtsignalstärken während der Donoranregung und Akzeptoranregung übereinstimmen $S^{488} \approx S^{635}$, so können donormarkierte Moleküle mit $SV \approx 1$ und akzeptormarkierte Moleküle mit $SV \approx 0$ von den doppelt markierten Molekülen mit 0.3 < SV < 0.8 getrennt werden [78]. In einer zweidimensionalen FAMS-Grafik (engl. fluorescence-<u>aided molecule sorting</u>) wie in Abb. 3.8(b) wird diese Auftrennung der Subpopulationen erkennbar. Mit $E_{\rm t}$ können zusätzlich die doppelt markierten Moleküle hinsichtlich der Abstandsinformation analysiert werden. Da das POE-Schema nur eine überlagerte Akzeptoranregung bietet, ist eine exakte Bestimmung von SV aus den Rohdaten nicht möglich. Durch die Korrektur (⋆) der während der Akzeptoranregung gemessenen Signalstärken um die während der Donoranregung gemessenen Signalstärken mit den entsprechenden Fensterbreiten der Mikrozeit (Δt^{635} , Δt^{488}) lassen sich jedoch mit den Gl. (3.7) und (3.8) FAMS-Grafiken berechnen, die qualitativ eine Unterteilung in Subpopulationen zulassen:

$$S_{\rm akz}^{635 \star} = S_{\rm akz}^{635} - \frac{\Delta t^{635}}{\Delta t^{488}} S_{\rm akz}^{488}, \tag{3.7}$$

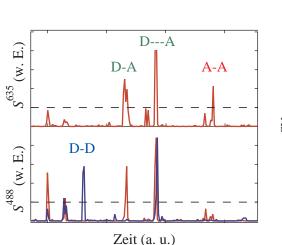
$$S_{\text{don}}^{635 \star} = S_{\text{don}}^{635} - \frac{\Delta t^{635}}{\Delta t^{488}} S_{\text{don}}^{488}. \tag{3.8}$$

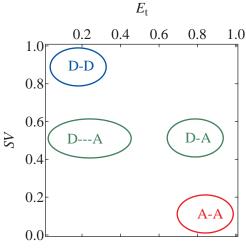
Auch ohne Berechnung von SV hat das POE-Schema den großen Vorteil, dass man auf relativ einfache Weise die doppelt markierten Moleküle erkennen kann. Die akzeptormarkierten Moleküle zeigen bei Donoranregung kein Signal, die donormarkierten Moleküle zeigen bei Akzeptoranregung im Akzeptorsignal kein Signal. Mit zwei Schwellwerten, der Akzeptorschwelle $\left(S_{
m akz}^{635}
ight)_{
m min}$ und der Summenschwelle $\left(S_{
m sum}^{488}
ight)_{
m min}$, können so die Moleküle gefunden werden, die bei Donor- und Akzeptoranregung ein Signal zeigen, somit doppelt markiert sind:

$$S_{\text{akz}}^{635} > \left(S_{\text{akz}}^{635}\right)_{\text{min}}$$

$$S_{\text{don}}^{488} + S_{\text{akz}}^{488} > \left(S_{\text{don}}^{488} + S_{\text{akz}}^{488}\right)_{\text{min}} = \left(S_{\text{sum}}^{488}\right)_{\text{min}}$$
(3.9)

Das grundsätzliche Vorgehen zur Auswertung der in dieser Arbeit vorgestellten Diffusionsexperimente ist also die Erkennung von Einzelmolekülereignissen durch die geeignete Wahl von Schwellwerten (Abb. 3.8(a)). Für jedes einzelne dieser Ereignisse werden die physikalischen Kenngrößen $E_{\rm t}$ und SV berechnet. Die Ergebnisse werden in Histogrammen aufsummiert und analysiert. Dieses Prinzip ist schematisch in Abb. 2.12 kurz zusammengefasst.





- (a) Signalverlauf nach spektraler Trennung und Sortierung mit Mikrozeit
- (b) Prinzip der Sortierung nach Markierungsverhältnis

Abb. 3.8.:

Sortieren der Moleküle nach Markierung mit Farbstoffen. (a) Durch das POE-Anregungsschema wird das Fluoreszenzsignal in S^{635} nach direkter Akzeptor- und S^{488} nach Donoranregung unterteilt. Mit der Wahl geeigneter Schwellen (gestrichelte Linien) könne Einzelmolekülereignisse erkannt werden. (b) Berechnung einer FAMS-Grafik aus den Intensitätsverhältnissen für jedes dieser Ereignisse nach Gl. (3.5). Damit können die Subpopulationen nur donormarkierter (blau), nur akzeptormarkierter (rot) und doppelt markierter (grün) Moleküle aufgetrennt werden. Im Fall der mit einem Akzeptor und Donor markierten Moleküle (grün) erfolgt eine zusätzliche Auftrennung des Abstandes zwischen den Farbstoffen (durch Striche angedeutet).

Werden $E_{\rm t}$ und SV durch direkte Analyse der experimentellen Photonen-Rohdaten gewonnen, handelt es sich um apparente Größen. Für die Berechnung der korrigierten Größen muss beachtet werden, dass die gemessenen Signalstärken um das Hintergrundsignal in beiden Kanälen $(I_{\rm H,A},I_{\rm H,D})$ reduziert werden müssen. Desweiteren müssen die Quanteneffizienzen, $Q_{\rm A}$ und $Q_{\rm D}$, der Farbstoffe, die Sammeleffizienzen und optischen Korrekturen aller optischen Elemente im Strahlengang $(q_{\rm A}, q_{\rm D})$ und die Wahrscheinlichkeit für das Eindringen von Donorphotonen in den Akzeptorkanal α (engl. $cross\ talk$) nach Gl. (2.31) berücksichtigt werden. Dieses ist im Fall von $E_{\rm t}$ essentiell, sollten aus $E_{\rm t}$ quantitative Rückschlüsse auf den Farbstoffabstand gezogen werden. Für relative Änderungen im Farbstoffabstand ist lediglich die Konstanz aller Korrekturparameter sicherzustellen.

3.3.2. Analyse der Fluoreszenzlebensdauer

Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer eines Farbstoffes wird dieser mit einem gepulsten Laser angeregt und die Photonen entsprechend ihrer Mikrozeit (s. Abschnitt 3.2) aufsummiert.

Das Histogramm N(t) in Abb.3.9 ergibt sich aus der Faltung der theoretischen Verteilung der Photonen F(t) mit der Instrumentantwort-Funktion (engl. <u>instrument response function</u>)

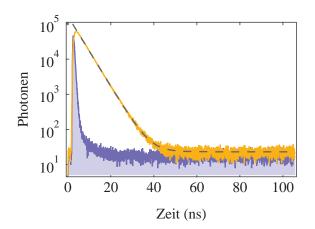


Abb. 3.9:

Beispiel einer experimentell bestimmten Verteilung über Photonenankunftszeiten. Die mit AF488 markierte Variante P68C des Proteins TtSlyD wurde mit einem gepulsten Laser (250 nW bei 470 nm, 10 MHz) angeregt. Im Histogramm werden die Ankunftszeiten relativ zum Anregungspuls gezählt (orange). Ab einer Zeit von t>23 ns wird die Gl. (3.15) an die Datenpunkte mit $\tau=(4,342\pm0,004)$ ns angepasst. Die IRF wurde mit dem identischen experimentellen Aufbau in bidest. Wasser bei einer Leistung von $3.9\,\mu\mathrm{W}$ gemessen. Der Verlauf wurde so skaliert, dass beide Kurven vergleichbar sind.

IRF(t):

$$N(t) = \int_{-\infty}^{t} F(t - t') \cdot IRF(t')dt'. \tag{3.10}$$

Geht man nun von einer IRF aus, die nur in einem zeitlich begrenzten Bereich $t_1 < t < t_2$ ungleich einem konstanten Hintergrundsignal c ist,

$$IRF(t) = \begin{cases} c & t < t_1, \\ f(t) & t_1 < t < t_2, \\ c & t > t_2, \end{cases}$$
 (3.11)

und betrachtet man nur Zeiten die deutlich größer als Zeiten innerhalb dieses Intervalls sind $t \gg t_2$, so kann das Faltungsintegral aus Gl. (3.10) in drei Komponenten aufgespaltet werden:

$$N(t) = c \int_{-\infty}^{t_1} F(t - t') \cdot dt' + \int_{t_1}^{t_2} F(t - t') \cdot f(t') dt' + c \int_{t_2}^{t} F(t - t') \cdot dt'.$$
 (3.12)

Die theoretische Verteilung der Photonenankunftszeiten eines Farbstoffs mit einer Fluoreszenzlebensdauer τ folgt einem exponentiellen Abfall:

$$F(t) = A \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right],$$

$$F(t - t') = A \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right] \cdot \exp\left[\frac{t'}{\tau}\right].$$
(3.13)

Setzt man Gl. (3.13) in Gl. (3.12) ein, so ergibt sich für das Signal N(t):

$$N(t) = B \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right] + D + \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right] \int_{t_1}^{t_2} \exp\left[\frac{t'}{\tau}\right] \cdot f(t')dt'. \tag{3.14}$$

Das Integral in Gl. (3.14) stellt einen zeitunabhängigen Skalierungsfaktor für den exponentiellen Abfall dar. Zusammenfassend ergibt sich für exponentielle Verteilungen F(t)

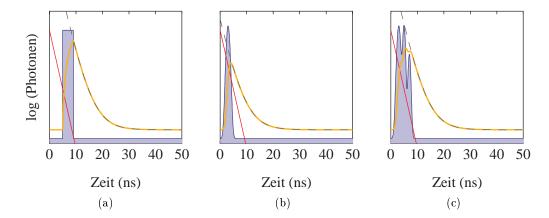


Abb. 3.10.:

Einfluss der IRF auf die Verteilung der Photonenankunftszeiten. Es wurde jeweils ein exponentieller Abfall mit einer Lebensdauer von $\tau=4\,\mathrm{ns}$ (rot) mit einer möglichen IRF (blau) gefaltet. Es ergeben sich die Signalverläufe (orange), die für Zeiten $t>12,5\,\mathrm{ns}$ durch einen exponentiellen Abfall mit Hintergrund (grau gestrichelt) mit einer Abfallszeit von $\tau=4\,\mathrm{ns}$ und einem vernachlässigbar kleinen Fehler angepasst werden konnten.

 $A \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right]$ im Bereich $t \gg t_2$, wobei t_2 die Zeit darstellt, ab der die IRF nur noch einen konstanten Hintergrundbeitrag liefert mit $IRF(t > t_2) \cong c$ (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.10: $t_2 \approx 10 \, \mathrm{ns}$):

$$N(t) \approx a \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right] + b.$$
 (3.15)

Für die Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern aus einem Histogramm von Photonenankunftszeiten folgt somit, dass für große Zeiten eine Anpassung an einen exponentiellen Abfall mit konstantem Hintergrund hinreichend ist im Vergleich zu einem komplizierten Variationsverfahren. Bei diesem würden die Parameter eines theoretisch rein exponentiellen Abfalls variiert werden. Dieser würde mit einer gemessenen IRF gefaltet werden, um das Ergebnis mit dem gemessenen Histogramm zu vergleichen. Die Variation läuft so lange, bis die Abweichungen zum gemessenen Histogramm minimiert sind.

Die vorangegangene Argumentation kann an simulierten Daten in Abb. 3.10 nachvollzogen werden. Trotz verschiedener IRF-Konstrukte, kann mit einer Anpassung nach Gl.(3.15) die Lebensdauer von $\tau=4\,\mathrm{ns}$ bestimmt werden.

3.3.3. Analyse der Anisotropie-Daten

Für die Bestimmung des zeitabhängigen Anisotropiezerfalls r(t) wurden höher konzentrierte Proben ($c \approx 100 \,\mathrm{nM}$) mit einem gepulsten Laser angeregt und die Histogramme der Mikrozeiten N(t) berechnet. Die Detektion erfolgte nach dem Schema in Abb. 3.5(c). Der Vorteil der Verwendung eines Analysators und somit nur einer APD, statt eines polarisationsabhängigen Strahlteilers und zwei APD, besteht darin, dass die Mikrozeithistogramme keinen zusätzli-

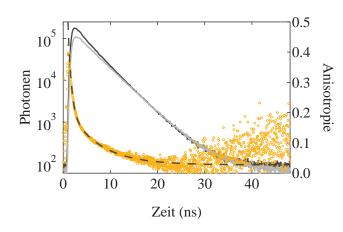


Abb. 3.11:

Zeitabhängiger Anisotropie-Abfall. Beispiel einer experimentell bestimmten Verteilung über Photonenankunftszeiten mit Betrachtung der Polarisationsrichtung (dunkelgrau: $N_{\rm p}$, hellgrau: $N_{\rm s}$). Berechnung von r(t) (orange) und Anpassung durch einen zwei-komponentigen exponentiellen Abfall (grau gestrichelt). Die mit AF488 markierte Variante T139C des Proteins TtSlyD wurde mit einem gepulsten Laser (1 μ W bei 470 nm, 20 MHz) angeregt.

chen Zeitversatz durch unterschiedlich lange Lichtwege zum Detektor aufweisen. Die Probe wurde jeweils einmal mit linear polarisiertem Licht senkrecht (Exc,0) und parallel (Exc,90) zum optischen Tisch angeregt. Für beide Anregungsrichtungen wurde der Analysator im Detektionsstrahlengang jeweils auf 0° (Det,0) und 90° (Det,90) gestellt. Die Anregungsleistung ist bei den Einzelmessungen konstant. Statt des Wasserimmersionsobjektivs mit hoher numerischer Apertur wurde ein Luftimmersionsobjektiv mit NA = 0.25 gewählt, um Depolarisationseffekte durch das Objektiv zu minimieren [80].

Die Histogramme N(t) der detektierten Photonen aus den vier Messungen wurden kreuzweise aufsummiert. So können unterschiedliche Transmissionseigenschaften und stellungsabhängige Strahlversätze des Analysators ausgeglichen werden. Dabei ist zu beachten, dass die absolute Zeitlänge der Einzelmessungen konstant ist.

$$N_{\rm p}(t) = N_{\rm Det,0}^{\rm Exc,90}(t) + N_{\rm Det,90}^{\rm Exc,0}(t)$$

$$N_{\rm s}(t) = N_{\rm Det,0}^{\rm Exc,0}(t) + N_{\rm Det,90}^{\rm Exc,90}(t)$$
(3.16)

 $N_{\rm p}(t)$ und $N_{\rm s}(t)$ beschreiben die Histogramme der Photonen, die parallel bzw. senkrecht zum Anregungslicht polarisiert sind. Aus diesen lässt sich die zeitabhängige Anisotropie r(t) berechnen:

$$r(t) = \frac{N_{\rm p}(t) - N_{\rm s}(t)}{N_{\rm p}(t) + 2N_{\rm s}(t)}.$$
 (3.17)

Durch eine Anpassung an einen exponentiellen Abfall lässt sich die Rotationskorrelationszeit θ bestimmen:

$$r(t) = A \exp\left[-\frac{t}{\theta}\right] + B. \tag{3.18}$$

Für Farbstoffe, die an ein Protein gebunden sind, wird dieses Modell um die globale Rotationskorrelationszeit des Proteins θ_{Prot} erweitert. Mit y wird der Anteil der vollkommen frei rotierenden Farbstoffe beschrieben.

$$r(t) = A\left(y\exp\left[-\frac{t}{\theta}\right] + (1-y)\exp\left[-\frac{t}{\theta_{\text{Prot}}}\right]\right) + B$$
 (3.19)

Für die Bestimmung der Gleichgewichtsanisotropien $r_{\rm GG}$ werden dieselben Messungen genutzt, nur Mittelwerte der Zählraten $\langle N \rangle$ bestimmt und schließlich analog zu Gl. (3.16)-(3.17) die Anisotropie $r_{\rm GG}$ berechnet. Analog wurde auch auf Einzelmolekülniveau für jedes Einzelmolekülereignis diese Gleichgewichtsanisotropie des Donorfarbstoffs bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Fall mit einem polarisationsabhängigen Strahlteiler gearbeitet wurde (Abb.3.5(b)). Somit kann eine Korrektur durch kreuzweises Aufsummieren nicht stattfinden. Die Anisotropie ergibt sich direkt aus den gezählten Photonen in den beiden APD für jedes Ereignis. Desweiteren ist zu bemerken, dass in diesem Fall mit dem Wasserimmersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur (NA=1,2) gemessen wurde. Wie in [80] aber argumentiert wird, ist der Fehler durch die vom Objektiv verursachte Depolarisation geringer als das Signalrauschen bei den geringen Photonenzahlen der Einzelmolekülereignisse.

3.4. Monte-Carlo-Simulation

3.4.1. Simulation von FRET-Daten

Vergleichsdatensätze, die keinerlei Störeinflüssen unterliegen, wurden mit Monte-Carlo-Methoden simuliert. Die nötige Software wurde von Johannes Hohlbein programmiert. Für jedes Molekül wurde ein dreidimensionaler Zufallsweg auf einem kartesischen Gitter innerhalb des vorgegebenen zylindrischen Volumens simuliert. Mit jedem Zeitschritt kann der Donorfarbstoff des Moleküls entsprechend seiner Position relativ zum dreidimensionalen gaußförmigen Fokus angeregt werden, wobei die Wahrscheinlichkeit der Anregung direkt proportional zur Leistung am Molekülort ist. Diese Anregung führt entweder zu einer direkten Emission oder zum Energietransfer zum Akzeptorfarbstoff und dessen Emission. Dies wird stochastisch durch die Energietransfereffizienz bestimmt. Ebenso können verschiedene FRET-Zustände simuliert werden, die sich in Et unterscheiden und durch Hin- und Rückraten untereinander austauschen. So findet in jedem Zeitschritt der Austausch zwischen den verschiedenen Zuständen mit einer Wahrscheinlichkeit statt, die sich aus jenen Raten ergibt. Das Simulationsverfahren liefert Datensätze, die dem Format der im TTTR-Modus gespeicherten experimentellen Daten entsprechen (s. Abschnitt 3.2.4). Für jedes detektierte Photon werden Makround Mikrozeit gespeichert. Die Auswertung läuft somit analog zu derjenigen der experimentellen Daten (s. Abschnitt 3.3). In Tab. 3.1 sind die Eingabeparameter zur Beschreibung des Systems aufgeführt. Die Austauschraten und $E_{\rm t}$ werden individuell angepasst.

3.4.2. Simulation von Anisotropiedaten

Für die Beurteilung der Anisotropiedaten von Einzelmolekülereignissen, die im Schema Abb. 3.5(b) gewonnen wurden, werden durch Schrotrauschen limitierte Anisotropiedaten simuliert. Grundlage sind die Gesamtzahl der Photonen S_{Ges} und die berechnete Energietransfereffizienz E_{t} für jedes Einzelmolekülereignis des experimentellen Datensatzes. Ausgehend von einer Fundamentalanisotropie von $r_0 = 0,38$, einer Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_D = 3,8$ ns des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und einer Rotationskorrelationszeit von $\theta = 1,1$ ns wird für jedes Ereignis mit E_{t} die theoretische Lebensdauer des Donors τ_{DA} (Gl. (2.29)) und der daraus resultierende Anisotropiewert r_D (Gl. (2.15)) berechnet. Mit E_{t} wird auch die theoretische Anzahl der Photonen im Donorkanal S_D berechnet. Zusammen mit r_D ergeben sich jeweils die Mittelwerte für die Photonenzahlen in den zwei Kanälen der Polarisationsrichtungen (N_D, N_s) :

$$N_{\rm p} = N_{\rm D} \frac{2r_{\rm D} + 1}{2 + r_{\rm D}},$$

$$N_{\rm s} = N_{\rm D} \frac{1 - r_{\rm D}}{2 + r_{\rm D}}.$$
(3.20)

Für jedes Ereignis werden jeweils 10000 Werte simuliert, die poissonverteilt um diese Mittelwerte aus Gl. (3.20) streuen. Daraus werden 10000 Werte für r_D nach Gl. (3.17) berechnet.

Parameter		Wert
Länge des Zylinders	$l_{ m Z}$	$5000\mathrm{nm}$
Radius des Zylinder	$r_{ m Z}$	$2500\mathrm{nm}$
Fokusposition	$z_{ m F}$	$2500\mathrm{nm}$
Anzahl der Kanäle	n	4096
Kanallänge (Mirozeit)	$\Delta t_{ m Mikro}$	$0{,}035\mathrm{ns}$
Zeitinkrement (Makrozeit)	$\Delta t_{ m Makro}$	$10^{-6} \mathrm{s}$
Hintergrundsignal	$S_{ m HG}$	$1000{\rm s}^{-1}$
Pulsrate	ν	$20\mathrm{MHz}$
Fokusradius (Donorlaser)	w_0	$600\mathrm{nm}$
Fokuslänge (Donorlaser)	z_0	$1200\mathrm{nm}$
Fokusradius (Akzeptorlaser)	w_0	$700\mathrm{nm}$
Fokuslänge (Akzeptorlaser)	z_0	$1400\mathrm{nm}$
Konzentration	c	$100\mathrm{pM}$
Molekulare Helligkeit (Donor)	$MB_{ m Don}$	$220 {\rm ms}^{-1}$
Molekulare Helligkeit (Akzeptor)	$MB_{ m Akz}$	$220 {\rm ms}^{-1}$
Fluoreszenzlebensdauer (Donor)	$ au_{ m F,Don}$	$3.8\mathrm{ns}$
Fluoreszenzlebensdauer (Akzeptor)	$ au_{ m F,Akz}$	$4.0\mathrm{ns}$
Quantenausbeute (Donor)	$Q_{ m Don}$	0,8
Quantenausbeute (Akzeptor)	$Q_{ m Akz}$	0,6
Försterradius	R_0	$5\mathrm{nm}$
Diffusionskoeffizient	D	$3.3 \cdot 10^8 \frac{\mathrm{nm}^2}{\mathrm{s}}$

Tab. 3.1.: Parameter für Simulation

Diese werden mit einer Auflösung von $\Delta r_{\rm D}=0.033$ für jedes Ereignis in einem Histogramm zusammengefasst. Jedes Histogramm wird auf eine Fläche von Eins normiert, da es nur einem Ereignis entspricht. Alle Histogramme werden schließlich aufsummiert und können mit den experimentell bestimmten Histogrammen verglichen werden.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen Funktion, Struktur und Dynamik des Proteins TtSlyD besser zu verstehen. Aufbauend auf Ergebnissen aus Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie wird dieses Protein hier auf Einzelmolekülebene spektroskopisch untersucht. Um die experimentellen Ergebnisse besser beurteilen zu können, werden zunächst zahlreiche Vorversuche erläutert, die den experimentellen Aufbau qualitativ beurteilen. Dabei werden verschiedene Referenzproben eingesetzt.

Nach diesen Vorversuchen gilt es, mit Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen zu überprüfen, ob auch nach der fluoreszenten Markierung das Protein $Tt\mathrm{SlyD}$ stabil den nativen Zustand populiert und seine katalytische Funktion als Faltungshelfer für andere Proteinketten ausübt. Erst nach dieser Kontrolle können die Einzelmolekül-FRET-Ergebnisse vorgestellt, analysiert und diskutiert werden. Zunächst wird die Energietransfereffizienz-Verteilung der Variante D82C/T139C unter nativen Bedingungen gezeigt. Die starke Verbreiterung der Verteilung im Vergleich zu simulierten Daten deutet strukturelle Heterogenitäten an. Bevor die Daten in diese Richtung interpretiert werden können, wird zunächst experimentell bestätigt, dass die Form der Energietransfereffizienz-Verteilung nicht durch abstandsunabhängige Artefakte, die durch die Fluoreszenzfarbstoffe verursacht sind, hervorgerufen wird. Als Artefakte werden spektrale Verschiebungen, die Photophysik, die Rotationsfreiheit, das Photobleichen und das unspezifische Binden der Farbstoffe kontrolliert.

Daraufhin wird ein Korrelationsanalyseverfahren eingeführt, das anhand der experimentellen Daten zeigt, dass es eine Bewegung zwischen den Domänen von TtSlyD gibt. Um diese Bewegung quantitativ besser beschreiben zu können, werden Datensätze simuliert, analog ausgewertet und die Ergebnisse mit denen aus dem Experiment verglichen.

In einem weiteren Abschnitt wird die Wechselwirkung von TtSlyD mit verschiedenen Bindungspartnern untersucht. Dabei wird sowohl die Verteilung der Energietransfereffizienzen als auch die interne Dynamik analysiert.

Um das Protein TtSlyD nicht nur auf die eine Variable des Abstandes zwischen den Aminosäuren D82C und T139C zu reduzieren, wurde eine weitere Variante P68C/E111C mit demselben FRET-Farbstoffpaar markiert. Bei dieser Variante sind beide Fluoreszenzfarbstoffe in der IF-Domäne lokalisiert. Analog zur Variante D82C/T139C wurden die Experimente unter nativen Bedingungen durchgeführt.

Nachdem durch die genannten Versuche Informationen über den nativen Zustand und somit über das energetische Tal dieses nativen Zustands in der Energielandschaft erhalten wurden, wird in einem weiteren Abschnitt versucht, den Übergang in den entfalteten Zustand zu verstehen. Um diesen zu populieren und das Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Zustand zu verschieben, werden beide Proteinvarianten (D82C/T139C und P68C/E111C) mit

Probe	$ au_{ m D} \; (\mu m s)$	β
$Tt\mathrm{SlyD} \; \mathrm{D82C/T139C}$	$181,7 \pm 1,5$	0,9
$Tt\mathrm{SlyD}$ D82C/T139C *	$352{,}7\pm2{,}2$	1,0
$(Pro)_{20}$	$185,3 \pm 1,6$	0,9
dsDNA	$222,8 \pm 2,7$	0,9
TS-Kugeln	4500 ± 100	0,9

Tab. 4.1.:

Diffusionszeiten $\tau_{\rm D}$ verschiedener Probenmoleküle bei Anregung ohne zusätzliche Pinhole-Lochblende mit 488 nm. Die Diffusionszeit wurde durch Anpassung der Gl. (2.57) an die Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals bestimmt. Dabei wurde der Streckungsfaktor β mit den angegebenen Werten festgehalten. \star : gemessen in einem vergrößerten Beobachtungsvolumen durch Unterfüllung des Objektivs mit einem Strahldurchmesser von $d^{\star}=3\,\mathrm{mm}$

einer Konzentrationsreihe des Denaturierungsmittels GdHCl hinsichtlich des FRETs und der Korrelationsdynamik untersucht. So kann schließlich der Zusammenhang zwischen der Dynamik und der Stabilität des Proteins studiert werden.

4.1. Vorversuche am Konfokalmikroskop

4.1.1. Wahl der Referenzprobe

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Untersuchung des mit Farbstoffen markierten Proteins TtSlyD. Für Vergleiche wurden verschiedene Referenzproben gewählt. Zielstellung war es, Proben zu finden, deren interne Dynamik, aber auch deren Photophysik, weitgehend bekannt sind. Wichtig ist aber auch, dass die molekularen Abmessungen in der Größenordnung von TtSlyD liegen, um ähnliche Diffusionszeiten und somit Beobachtungszeiten zu erhalten (Tab. 4.1). Polyprolin (Pro)₂₀ sowie dsDNA mit 23 Basenpaaren stellen jeweils solche Proben dar. Beide sind mit demselben Donor-Akzeptor-Paar, AF488 und A647N, wie TtSlyD markiert und zeigen vergleichbare Diffusionszeiten (Tab. 4.1). Für AF488 wurde sowohl bei (Pro)₂₀ [81] als auch bei dsDNA [44] eine ungehinderte Rotation nachgewiesen. Für A647N jedoch kann es sequenzabhängig zu Wechselwirkungen mit dsDNA kommen [44], im Zusammenhang mit (Pro)₂₀ sind keine Untersuchungen bekannt. Eine weitere Referenzprobe, die weniger zum Vergleich als zur Kontrolle experimenteller Einflüsse genutzt wird, sind die TetraSpeck (TS)-Kugeln. Diese sind rein synthetisch und haben keinen biologischen Bezug wie die anderen Proben. Mit einem Durchmesser von $d=100\,\mathrm{nm}$ diffundieren sie deutlich langsamer als TtSlyD (Tab. 4.1). Dennoch werden sie aufgrund der Reproduzierbarkeit ihrer Daten zur Kontrolle des experimentellen Aufbaus genutzt.

In Abb. 4.1 sind die E_t -Verteilungen der Vergleichsproben aufgeführt. Zum Vergleich sind durch Schrotrauschen limitierte, simulierte Datensätze (blau) dargestellt. Nach dem Selektieren der Moleküle mit einem aktiven Akzeptorfarbstoff (siehe Abschnitt 3.3.1) kommen die Verteilungen von $(Pro)_{20}$ und dsDNA dieser Simulation recht nahe. Die geringe, aber

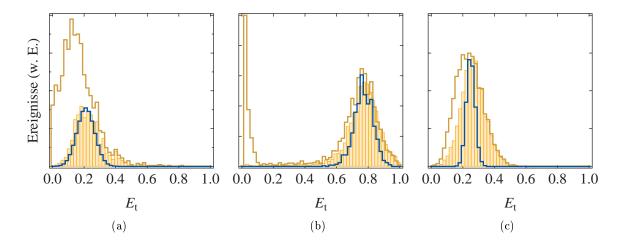


Abb. 4.1.:

Energietransfereffizienzverteilung verschiedener Referenzproben. Die Referenzproben (Pro) $_{20}$ (a), dsDNA (b) undTS-Kugeln (c) wurden im POE-Schema ($40\,\mu\mathrm{W}$ (a,b) bzw. $300\,\mathrm{nW}$ (c) bei $488\,\mathrm{nm}$, $15\,\mu\mathrm{W}$ (a,b) bzw. $300\,\mathrm{nW}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz}$) angeregt. Es werden die Ereignisse betrachtet, die entweder nur die Summenschwelle ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40\,\mathrm{s}^{-1}$) (braune Linie) oder zusätzlich die Akzeptorkontrollschwelle ($S_{\mathrm{akz}}^{635} > 10\,\mathrm{s}^{-1}$) (gelbe Balken) erfüllen. Aus den mittleren Zählraten wurden die entsprechenden durch Schrotrauschen limitierten Verteilungen simuliert (blaue Linien). (a) Die (Pro) $_{20}$ -Probe wurde in TFE gemessen.

doch nicht zu vernachlässigende zusätzliche Verbreiterung kann im Fall von (Pro)₂₀ mit einer Imhomogenität bezüglich der in der Kette vorkommenden cis-Bindungen [56] begründet werden, im Fall von dsDNA durch eventuelle Wechselwirkungen von A647N mit der dsDNA [44]. Aufgrund der hohen Fluoreszenzrate der TS-Kugeln, selbst bei geringen Laserleistungen, ist die theoretische Verteilung sehr schmal. Die zusätzliche Verbreiterung ist hier eindeutig durch die Inhomogenität der TS-Kugeln zu begründen. Diese Inhomogenität wird mit exemplarischen Energietransfereffizienz-Verteilungen einzelner immobilisierter TS-Kugeln in Abb. 4.4 bestätigt.

4.1.2. Charakterisierung des Beobachtungsvolumens

Im Abschnitt 2.4.2 wurde das konfokale Prinzip und die Abbildungsfunktion IRF eingeführt. Um diese zu visualisieren, wurden TS-Kugeln in Agarose (1,5% in H_2O bidest. (w/w)) immobilisiert und durch das Probenrasterverfahren (Abschnitt 3.2.3) in Abb. 4.2 dargestellt. Da die TS-Kugeln mit einem Durchmesser von $100\,\mathrm{nm}$ kleiner als das Beobachtungsvolumen sind, werden nicht die Kugeln selbst, sondern eine Faltung mit der IRF abgebildet. So kann das Beobachtungsvolumen in guter Näherung visualisiert werden. Da allerdings die TS-Kugeln nicht als punktförmige Elemente betrachtet werden können, ist eine genaue Abmessung des Beobachtungsvolumens anhand der Rasteraufnahmen in Abb. 4.2 nicht möglich. Die Form wird für diese quantitative Analyse zu stark durch die TS-Kugeln bestimmt.

Die Messung erfolgte sowohl ohne, als auch mit einer Pinhole-Lochblende ($d_{\rm PH}=50\,\mu{\rm m}$). Ohne zusätzliche Pinhole-Lochblende stellt die aktive Fläche der APD die Lochblende dar,

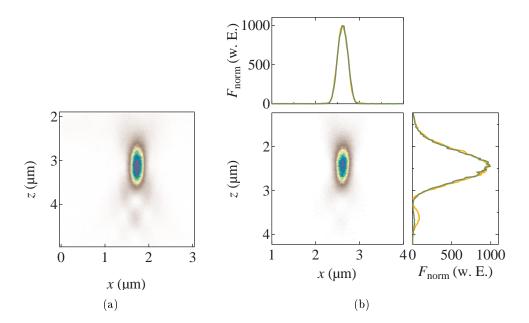


Abb. 4.2.:

Immobilisierte TS-Kugeln. Rasterbild entlang der optischen Achse von TS-Kugeln, die in 1,5 % Agarose immobilisiert wurden. Die Aufnahme erfolgte bei 488 nm mit 500 nW zum einen ohne eine Pinhole-Lochblende (a), zum anderen mit einer Pinhole-Lochblende mit dem Durchmesser $d_{\rm PH}=50\,\mu{\rm m}$ (b). In (b) sind zusätzlich die Profile mit 0,1 $\mu{\rm m}$ Breite durch das Maximum der Rasteraufnahmen dargestellt (ohne Blende: gelb, mit Blende: grün).

welche aber mit $d_{\rm APD}=175\,\mu{\rm m}$ [77] in die Probenebene mit $d'_{\rm APD}=1170\,{\rm nm}$ abgebildet wird. Dies entspricht dem 2,4-fachen der beugungsbedingten Airy-Schreibe $d_{\rm Airy}=496\,{\rm nm}$ bei 488 nm und NA=1,2 nach Gl. (2.39), ist also deutlich breiter als die PSF. Das Pinhole mit $d_{\rm PH}=50\,\mu{\rm m}$ hingegen wird auf nur $d'_{\rm PH}=833\,{\rm nm}$ abgebildet, dem 1,7-fachen der Airy-Scheibe. So können durch Verwendung dieser Pinhole-Lochblende vor allem die Nebenmaxima entlang der optischen Achse unterdrückt werden (s. Abb. 4.2).

Zur Abschätzung der Größe des Beobachtungsvolumens wurden Korrelationsexperimente mit TS-Kugeln in Lösung durchgeführt. Aus deren Durchmesser $(d = 100 \,\mathrm{nm})$ kann mit Gl. (4.1) deren Diffusionskoeffizient D berechnet werden:

$$D = \frac{k_{\rm B}T}{6\pi\eta R_{\rm H}},$$

$$D = (4.59 \pm 0.01) \cdot 10^{-12} \,\mathrm{m}^2/\mathrm{s},$$
(4.1)

mit $k_{\rm B}$ als Boltzmann-Konstante, $T=(295,4\pm0,2)\,{\rm K}$ als Temperatur, $\eta=(948\pm3)10^{-6}\,{\rm Pa}\,{\rm s}$ als Viskosität von Wasser und $R_{\rm H}=50\,{\rm nm}$ als hydrodynamischer Radius. Mit Gl. (2.53) lässt sich die Halbachse w_0 eines angenommenen dreidimensionalen gaußförmigen Beobachtungsvolumens unter verschiedenen Bedingungen berechnen. Mit der Annahme von S=0,2 gilt für die axiale Ausdehnung des Fokus' $z_0=5w_0$. So kann unter Annahme des dreidimensionalen gaußförmigen Beobachtungsvolumens nach Gl. (2.51) auch die Größe dieses Beobachtungs-

		$\lambda = 488 \mathrm{nm}$			$\lambda = 635 \mathrm{nm}$		
$d \pmod{mm}$	$d_{ m PH} \ (\mu m m)$	$ au_{ m D} \ m (ms)$	$w_0 \ (\mathrm{nm})$	V (fl)	$ au_{ m D} \ (m ms)$	$w_0 \ (\mathrm{nm})$	V (fl)
8	50	$3,\!38 \pm 0,\!02$	$249,1 \pm 1,0$	$0,\!13$	$5{,}10\pm0{,}05$	$306,0 \pm 1,8$	$0,\!25$
8	ohne	$4,5 \pm 0,1$	$287{,}4\pm3{,}5$	$0,\!20$	6.8 ± 0.3	$353,3 \pm 8,2$	$0,\!38$
3	ohne	$9,\!66 \pm 0,\!01$	$421,1\pm0,7$	$0,\!64$	17.9 ± 0.1	$573{,}7\pm2{,}2$	1,6

Tab. 4.2.:

Bestimmung der Diffusionszeit $\tau_{\rm D}$ durch das Beobachtungsvolumen für TS-Kugeln in wässriger Lösung. Daraus wird w_0 nach Gl. (2.53) berechnet. Die TS-Kugeln wurden entweder kontinuierlich bei $\lambda=488\,\mathrm{nm}$ mit 300 nW (1. und 2. Zeile) bzw. 100 nW (3. Zeile) angeregt. Alternativ wurde gepulst bei 40 MHz und $\lambda=635\,\mathrm{nm}$ mit denselben Leistungen gearbeitet. Das Fluoreszenzlicht wurde über einen 50/50-Strahlteiler aufgeteilt. Es wurde eine Pseudoautokorrelation berechnet und Gl. (2.53) (mit S=0,2) an die Korrelationskurven angepasst. Daraus kann mit $D=(4,59\pm0,01)\cdot10^{-12}\,\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ die Ausdehnung w_0 senkrecht zur optischen Achse bestimmt und das Beobachtungsvolumen V abgeschätzt werden. Der Anregungsstrahl wurde so kollimiert, dass er das Objektiv genau ausfüllt (Strahldurchmesser $d=8\,\mathrm{mm}$) bzw. dieses unterfüllt ($d=3\,\mathrm{mm}$). Für eine optimale Fokusform wurde eine zusätzliche Pinhole-Lochblende ($d_{\rm PH}=50\,\mu\mathrm{m}$) eingebaut.

volumens V abgeschätzt werden, innerhalb dessen die Intensität auf $\frac{1}{e^2}$ abfällt.

Aus Tab. 4.2 ist ersichtlich, dass mit einer Pinhole-Lochblende das kleinste Beobachtungsvolumen erzeugt wird. Bei Verzicht der zusätzlichen Lochblende wächst das Beobachtungsvolumen um 15% senkrecht zur optischen Achse. Eine Aussage entlang der optischen Achse lässt sich nur schwer treffen, da die Diffusion im wesentlichen durch die senkrechte Komponente beeinflusst wird. Desweiteren ist eine Veränderung der Fokusform zu verzeichnen. Eine Anpassung der experimentellen Daten ist nur noch mit einem Streckungsfaktor β (Gl. (2.57)) möglich. Wird das Objektiv unterfüllt, entsteht zwar wieder ein ideales Gaußvolumen, aber mit einer Vergrößerung von 70% in w_0 ist der Fokus stark vergrößert und weit entfernt vom beugungsbegrenzten Minimum nach Gl. (2.40) mit $r_{\min} = 175 \,\mathrm{nm}$, das in der Einzelmolekülspektroskopie das ideale Ziel darstellt. Dabei ist zu beachten, dass r_{\min} den Radius der Airy-Scheibe darstellt, w_0 den Wert, bei dem die IRF auf $\frac{1}{\mathrm{e}^2}$ des maximalen Wertes abgefallen ist.

Ob die Verwendung einer zusätzlichen Pinhole-Lochblende Einfluss auf die gemessene $E_{\rm t}$ -Verteilung hat, wurde ebenfalls mit verschiedenen Referenzproben kontrolliert. Aus Abb. 4.3 geht ein deutlicher Einfluss hervor. Dies ist nicht mit der Formveränderung des Beobachtungsvolumens an sich, sondern vielmehr durch einen Versatz der spektral aufgetrennten Beobachtungsvolumina entlang der optischen Achse zu begründen. Unter Verwendung einer Pinhole-Lochblende, die im gemeinsamen Strahlengang justiert ist, wird dieser Effekt weitestgehend unterdrückt. Man erhält eine vom stöchiometrischen Verhältnis unabhängige $E_{\rm t}$ -Verteilung.

Durch die Größe der TS-Kugeln von $d=100\,\mathrm{nm}$ wird diese minimale Dejustage deutlich überbetont (Abb. 4.3(a),4.3(c)). Bei Vergleichsmessungen mit dsDNA (Abb. 4.3(b),4.3(d)), deren molekulare Abmessungen im Bereich von $Tt\mathrm{SlyD}$ und deutlich unter denen des Beobachtungsvolumens liegen, wird deutlich, dass dieser Effekt zu vernachlässigen ist. Im Gegensatz zu TS-Kugeln verändert die Wahl der Akzeptorschwelle die Form und Lage der E_t -Verteilung

nur unwesentlich. Dies gilt als Kriterium für eine Unabhängigkeit von Effekten, die durch den experimentellen Aufbau bedingt sind.

Trotz der verbesserten Fokusform und der Unterdrückung von leichten Dejustierungen entlang der optischen Achsen wird für die folgenden FRET-Einzelmolekülexperimente zum großen Teil auf die zusätzliche Pinhole-Lochblende verzichtet, aber das Objektiv voll ausgefüllt, um einen minimalen Signalverlust zu gewährleisten. Gerade mit Hinblick auf langsame Dynamiken mit Zeitkonstanten deutlich größer als im ms-Bereich wäre eine Verkleinerung des Beobachtungsvolumens, wie sie aus Tab. 4.2 hervorgeht, nicht empfehlenswert, da nur Dynamiken innerhalb der Diffusion durch das Beobachtungsvolumen detektiert und analysiert werden können.

Im Fall von Korrelations-Experimenten an höher konzentrierten Proben im nM-Bereich wurde jedoch mit dieser Pinhole-Lochblende gearbeitet, um eine ideale dreidimensionale Fokusform zu erreichen, die eine Anpassung der Gl. (2.52) und Gl. (2.55) an die Messergebnisse erlaubt.

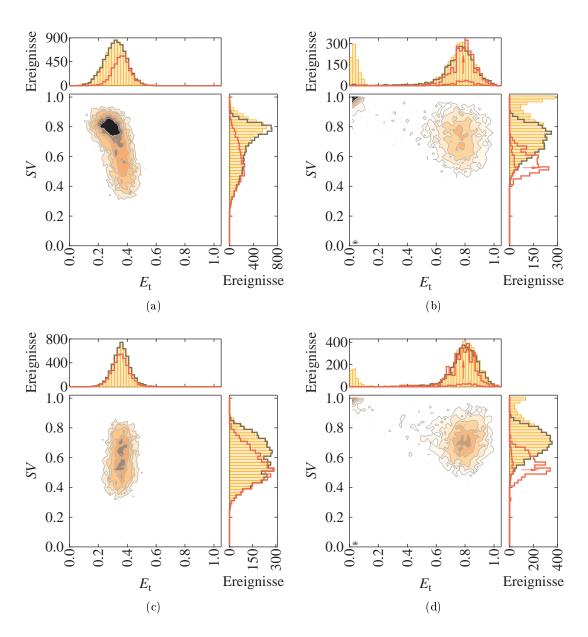


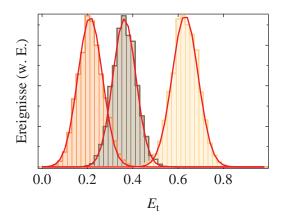
Abb. 4.3.:

Einfluss der Pinhole-Lochblende. Einfluss der Pinhole-Lochblende auf das stöchiometrische Verhältnis SV und die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$. TS-Kugeln (a,c) und dsDNA (b,d) wurden im POE-Schema angeregt (300 nW (a,c) bzw. 40 μ W (b,d) bei 488 nm, 300 nW (a,c) bzw. 15 μ W (b,d) bei 635 nm und 10 MHz). Die Messung erfolgte ohne (erste Zeile) bzw. mit einer Pinhole-Lochblende ($d=50\,\mu$ m) (zweite Zeile). Im 2D-Histogramm wurden alle Ereignisse betrachtet, die die Summenschwelle $S_{\rm sum}^{488} > 40\,{\rm s}^{-1}$ erfüllen (in 1D-Projektion: gelbe Balken). In den 1D-Projektionen sind ebenso die Auswertungen für Ereignisse, die zusätzlich die Akzeptorschwellen $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$ (braune Linie) bzw. $S_{\rm akz}^{635} > 40\,{\rm s}^{-1}$ (rote Linie) erfüllen. (b,d): Die Daten für $S_{\rm akz}^{635} > 40\,{\rm s}^{-1}$ (rote Linie) wurden zusätzlich auf die anderen Histogramme normiert (roter Pfeil), sodass ein besserer Vergleich möglich ist.

4.1.3. Limitierung durch Schrotrauschen

Abb. 4.4:

Limitierung durch Schrotrauschen. TS-Kugeln wurden in Agarose-Gel (1,5 %) immobilisiert. Das Beobachtungsvolumen (488 nm) wurde auf jeweils eine TS-Kugel in einem Abstand von ca. 40 μ m vom Deckglas positioniert und eine Zeitspur ($t=10\,\mathrm{s}$) aufgenommen. Die TS-Kugeln wurden ohne Pinhole (rot), mit einem $50\,\mu$ m-Pinhole (braun) und mit einem $100\,\mu$ m-Pinhole (gelb) gemessen. Durch Schrotrauschen limitierte Kurven [63] sind als rote Linien aufgetragen.



Für die richtige Interpretation von E_t -Verteilungen ist es unerlässlich, störende Einflüsse ausschließen zu können. Die Breite der Verteilung kann zum Beispiel durch den experimentellen Aufbau verfälscht werden. Ob der in dieser Arbeit genutzte Aufbau wirklich durch Schrot rauschen limitierte E_{t} -Verteilungen liefert, wurde mit immobilisierten TS-Kugeln überprüft. Aufgrund der Inhomogenität der Probe selbst (die einzelnen TS-Kugeln variieren in Abb. 4.4 stark in ihrer mittleren Energietransfereffizienz) ist ein solches Prüfexperiment in Lösung nicht möglich. Einzelne TS-Kugeln wurden im Beobachtungsvolumen positioniert, mit $\lambda = 488\,\mathrm{nm}$ angeregt und deren Signal im Donor- und Akzeptorkanal aufgenommen. Das Objektiv wurde mit einem Strahldurchmesser von $d = 8 \,\mathrm{mm}$ gefüllt. Es wurden alternativ Pinhole-Lochblenden ($d_{\rm PH}=50\,\mu{\rm m},\,d_{\rm PH}=100\,\mu{\rm m}$) im Strahlengang justiert. Die Anregungsleistung wurde so gewählt, dass die mittleren Zählraten denen aus Experimenten mit dem Probenprotein nahe kommen. Aus jedem Zeitschritt $\Delta t = 1\,\mathrm{ms}$ der transienten Intensitäten wurde die Energietransfereffizienz Et ermittelt. Für die Anzahl der Zeitschritte mit einer entsprechenden Energietransfereffizienz wurde in Abb. 4.4 ein Histogramm erstellt. Nach Gl. (2.48) wurde aus den mittleren Zählraten $\langle n_{\text{Akz}} \rangle$ und $\langle n_{\text{Don}} \rangle$ die theoretische Breite berechnet und ebenso in Abb. 4.4 aufgetragen. Die Einzelergebnisse sind zusätzlich in Tab. 4.3 aufgeführt. Durch den Vergleich der experimentellen Daten mit den aus der Theorie hervorgehenden Verteilungen kann festgestellt werden, dass der experimentelle Aufbau ohne Zweifel durch Schrotrauschen limitierte Daten liefert.

$d_{\mathrm{PH}}~(\mu\mathrm{m})$	$\langle E_{ m t} angle$	$\langle n_{ m Akz} angle$	$\langle n_{\mathrm{Don}} \rangle$	$\sigma_{ m Stat}$
ohne	0,21	$12,8 \pm 2,9$	$44,0 \pm 5,5$	$0,\!054$
$50\mu\mathrm{m}$	$0,\!36$	$32,9 \pm 4,9$	$55{,}3\pm6{,}5$	$0,\!051$
$100\mu\mathrm{m}$	$0,\!63$	$45{,}2\pm5{,}6$	$25{,}5\pm4{,}2$	$0,\!057$

Tab. 4.3.:

Mittlere Energietransfereffizienzen $\langle E_{\rm t} \rangle$ und Zählraten im Donor- ($\langle n_{\rm Don} \rangle$) und Akzeptorkanal ($\langle n_{\rm Akz} \rangle$) der Daten in Abb. 4.4 bei unterschiedlicher Wahl der Pinhole-Lochblende. Nach Gl. (2.48) wurde die allein durch Schrotrauschen bedingte Breite der Verteilungen $\sigma_{\rm Stat}$ berechnet.

	$\lambda = 488 \mathrm{nm}$				$\lambda = 635\mathrm{nm}$	
	Donor Akzeptor		eptor	$\mathbf{Akzeptor}$		
	$MB (s^{-1})$	$ au_{ m D} \; (\mu m s)$	$MB \; ({\rm s}^{-1})$	$ au_{ m D} \; (\mu m s)$	$MB \; ({\rm s}^{-1})$	$\tau_{\rm D} \; (\mu {\rm s})$
Immersol-W	16700	4280 ± 20	1200	9200 ± 230	13400	6080 ± 40
${ m H_2O}$ bidest.	15700	4240 ± 20	4200	4750 ± 50	13000	6260 ± 40

Tab. 4.4.:

Immersionswasser oder Immersionsöl (Immersol W). Die Diffusionszeiten $\tau_{\rm D}$ wurden aus der Anpassung der Gl. (2.57) an die Autokorrelationskurven der Fluoreszenzintensitäten der TS-Kugeln im Donor- und Akzeptorkanal bestimmt. Die molekulare Helligkeit MB folgt aus der mittleren Zählrate im Kanal, die durch die mittlere Zahl der Teilchen $\langle N \rangle$ (Gl. (2.57)) geteilt wird.

4.1.4. Einfluss des Immersionsmediums

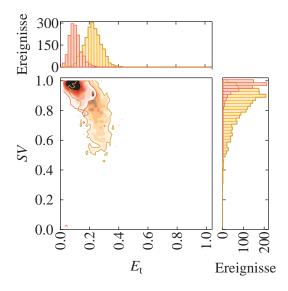
In dieser Arbeit wurde mit einem Wasserimmersionsobjektiv gearbeitet. Um Langzeitmessungen zu ermöglichen, bei denen die Verdunstung des Immersionswassers der limitierende Faktor ist, wurde ein Immersionsöl mit wassergleichen optischen Eigenschaften benutzt (Immersol W, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). In Abb. 4.5 wird bei einem Vergleichsversuch mit TS-Kugeln jedoch deutlich, dass mit Immersol-W die apparenten Parameter SVund $E_{\rm t}$ drastisch verschoben werden. Die Korrelationsanalyse liefert zwar sowohl für den Donor als auch für den Akzeptor bei jeweils direkter Anregung vergleichbare Diffusionszeiten, aber die Diffusionzeit des Akzeptors bei Anregung des Donors wird bei Verwendung von Immersol-W fast verdoppelt (Tab. 4.4). Folglich nimmt die molekulare Helligkeit (MB)drastisch im Akzeptorkanal ab. Aus Rasteraufnahmen (Daten nicht gezeigt) folgt, dass der Versatz entlang der optischen Achse durch Immersol-W zusätzlich betont wird. Die Überlappung zwischen den spektral aufgetrennten Beobachtungsvolumina wird geringer und stark verschmiert. Das deutet auf Dispersionseffekte hin. Vom Hersteller werden bei fünf Wellenlängen (435,8 nm, 480 nm, 546,1 nm, 589,3 nm, 643,8 nm) Angaben für den Brechungsindex des Immersionsöls gemacht, die zwar nur geringe Abweichungen von $\Delta n \approx 0,002$ zum Brechungsindex von Wasser aufweisen [82, 83]. Allerdings nimmt die Abweichung Δn zwischen Immersionsöl und Wasser systematisch mit der Wellenlänge ab (Abb. A.2 im Anhang). So kann angenommen werden, dass diese kleinen Unterschiede zwischen den Brechungsindizes eine wellenlängenabhängige Veränderung der optischen Abbildung hervorrufen mit der Folge, dass die Überlappung zwischen den spektral aufgetrennten Beobachtungsvolumina geringer wird. Da gerade dieses Volumen bestimmend für die Messung von $E_{\rm t}$ ist, wurde Immersol-W in dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

4.1.5. Einfluss des Korrekturrings

Das in dieser Arbeit verwendete Wasserimmersionsobjektiv besitzt einen Korrekturring, um die Dicke des Deckglases mit einem vom Wasser abweichenden Brechungsindex von n = 1,47 (Borsilikatglas) zu korrigieren. Dieser Ring ermöglicht die Korrektur von Deckglasdicken im

Abb. 4.5:

Einfluss des Immersionsmediums. TS-Kugeln wurden im POE-Schema angeregt (300 nW bei 488 nm, 300 nW bei 635 nm und 10 MHz). Es wurden nur Ereignisse ausgewertet, die die Summenschwelle ($S_{\rm sum}^{488} > 40\,{\rm s}^{-1}$) erfüllen. Die Messung erfolgte mit einem wasserähnlichen Immersionsöl Immersol-W (rot) bzw. mit reinem bidestilliertem Wasser (orange) als Immersionsmedium.



Bereich von $140 \,\mu\text{m}$ bis $190 \,\mu\text{m}$. Die Dicke der benutzten Deckgläser variiert mit der Chargennummer von $140 \,\mu\text{m}$ zu $150 \,\mu\text{m}$. Der Einfluss der richtigen Ringeinstellung wird mit den Vergleichsproben dsDNA und TS-Kugeln kontrolliert (Abb. 4.6). Die Position mit der größten molekularen Helligkeit (MB) und der kürzesten Diffusionszeit (τ_D) gibt die optimale Ringeinstellung mit $150 \,\mu\text{m}$ für dsDNA an. Die Breite der E_t -Verteilung ist dort minimal. Die Position $\langle E_t \rangle$ wird kaum beeinflusst. Der relative Anteil der Moleküle im Triplettzustand (T) nimmt mit der Ringeinstellung zu. Interessanter Weise kann für die Breite σ der Verteilung bei TS-Kugeln die entgegengesetzte Beobachtung gemacht werden. Dies ist mit der fehlerbehafteten Justierung entlang der optischen Achse zu erklären (Abschnitt 4.1.2).

Der Korrekturring kann ebenso genutzt werden, um einen von Wasser abweichenden Brechungsindex des Messmediums auszugleichen. Bei Verwendung hoher Konzentrationen des Denaturierungsmittels GdHCl wird der Brechungsindex bis zu n=1,438 ($c_{\rm GdHCl}=6\,\rm M$) erhöht. Bei Messungen in einer definierten Tiefe über dem Deckglas kann diese Abweichung mit einer größeren Ringeinstellung kompensiert werden. Dies ist im Fall von Korrelationsmessungen sehr wichtig, da der Einfluss auf die Fokusform und somit auf die apparenten Diffusionszeiten sehr hoch ist. Die Form der $E_{\rm t}$ -Verteilung hingegen wird nur unwesentlich verändert (Abb. 4.7).

Für eine Reproduzierbarkeit wurde in den folgenden Experimenten stets mit einer Ringeinstellung von $150\,\mu\mathrm{m}$ gearbeitet. Innerhalb einer Messreihe wurde entweder nur ein Deckglas oder Deckgläser ein und derselben Charge verwendet.

4.1.6. Zusammenfassung

Damit die Ergebnisse, die aus Einzelmolekül-FRET-Messungen an einem komplexen System wie dem des Proteins TtSlyD folgen, eindeutig interpretiert werden, musste zunächst sichergestellt werden, dass der experimentelle Aufbau, in diesem Fall das Konfokalmikro-

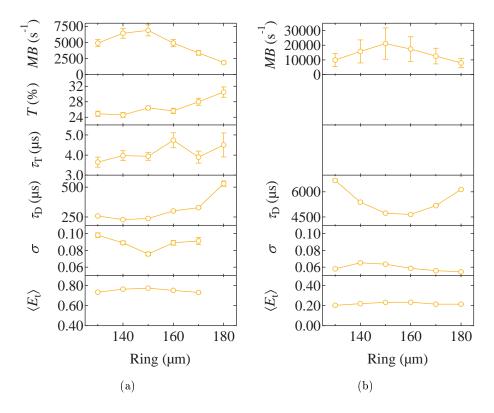
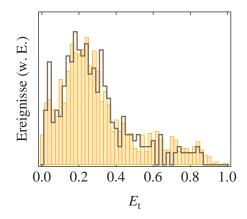


Abb. 4.6.: Einfluss des Korrekturrings. dsDNA (a) und TS-Kugeln (b) wurden im POE-Schema angeregt ($40 \,\mu\mathrm{W}$ (a) bzw. $300 \,\mathrm{nW}$ (b) bei $488 \,\mathrm{nm}$, $15 \,\mu\mathrm{W}$ (a) bzw. $300 \,\mathrm{nW}$ (b) bei $635 \,\mathrm{nm}$ und $10 \,\mathrm{MHz}$). Das Signal im Donorkanal während direkter Anregung wurde autokorreliert und die Gl. (2.55) und Gl. (2.57) (b = 0.9, S = 0.2) daran angepasst (TS-Kugeln: ohne Triplett). An die E_{t} -Verteilungen ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \,\mathrm{s}^{-1}$; dsDNA: $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 10 \,\mathrm{s}^{-1}$) wurde Gl. (2.46) mit $\langle E_{\mathrm{t}} \rangle$ und σ angepasst.

skop, störungsfreie und reproduzierbare Daten liefert. Aus diesem Grund wurde mit mehreren Referenzproben das hier genutzte Konfokalmikroskop charakterisiert. Als Referenzproben wurden fluoreszent markierte TS-Kugeln, dsDNA und (Pro)₂₀ genutzt. Die beiden letztgenannten Proben zeigen mit etwa $200\,\mu s$ vergleichbare Diffusionszeiten zum Protein TtSlyD. Mit den TS-Kugeln konnte aufgrund ihres bekannten Durchmessers und ihrer Kugelform die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens unter unterschiedlichen Bedingungen bestimmt werden. Ohne eine Pinhole-Lochblende ergab sich bei voller Ausleuchtung des Objektivs ein Beobachtungsvolumen mit einer Ausdehnung von $w_0 = 290\,\mathrm{nm}$ senkrecht zur optischen Achse, sodass ein Beobachtungsvolumen von $V = 0.5 \,\mathrm{fl}$ abgeschätzt werden konnte. Mit den TS-Kugeln konnte ebenso gezeigt werden, dass das genutzte Konfokalmikroskop durch Schrotrauschen limitierte Energietransfereffizienz-Verteilungen liefert. Desweiteren wurde als Immersionsmedium destilliertes Wasser und ein wasserähnliches Immersionsöl getestet. Das Immersionsöl führte jedoch zu einer spektral abhängigen Verschiebung des Beobachtungsvolumens, wodurch die FRET-Ergebnisse verfälscht werden. Aus diesem Grund wurde in allen weiteren Experimenten bidestilliertes Wasser verwendet. In einer Versuchsreihe mit variierenden Korrekturringeinstellungen am Wasserimmersionsobjektiv wurde festgestellt, dass eine

Abb. 4.7:

Korrekturring bei hoher GdHCl-Konzentration. Abhängigkeit der Energietransfereffizienz von der Einstellung des Korrekturrings für die denaturierte Form von TtSlyD. Die doppelt markierte Variante D82C/T139C wurde im POE-Schema (40 μ W bei 488 nm, 15 μ W bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Der Korrekturring wurde auf Ring 15 (braune Linie) und Ring 17 (gelbe Balken) gestellt. Ring 17 resultiert aus der Echtzeitkorrelation. Diese zeigte bei Ring 17 die maximale Amplitude. Es wurden nur Ereignisse betrachtet, die die Summenschwelle ($S_{\rm sum}^{488} > 30\,{\rm s}^{-1}$) und die Akzeptorkontrollschwelle ($S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$) erfüllen. Die Entfaltung erfolgte bei $c_{\rm GdHCl} = 6\,{\rm M}$.



Ringeinstellung von 15, die eine Deckglasdicke von $150\,\mu\mathrm{m}$ korrigiert, die besten Ergebnisse liefert. Dabei dienten die molekulare Helligkeit und die Diffusionszeit der Referenzprobe dsDNA als Kriterium. Es konnte auch festgestellt werden, dass die Ringeinstellung keinen signifikanten Einfluss auf die Energietransfereffizienz-Verteilung hat.

4.2. Stabilität und Aktivität des fluoreszent markierten Proteins

Durch die fluoreszente Markierung des Proteins mit Farbstoffen und die dafür nötige Variation einzelner Aminosäuren kann es zu immensen strukturellen Veränderungen des Proteins kommen, die mit einer stark reduzierten Stabilität und Aktivität verbunden sein können, oder sogar zur völligen Destabilisierung bzw. Entfaltung führen [84]. Um sicher zu stellen, dass die markierten Varianten den Wildtyp von TtSlyD bezüglich Stabilität, Aktivität und Funktion so gut wie möglich reproduzieren, wurden Kontrollmessungen an den verschiedenen Varianten durchgeführt.

4.2.1. Aktivität

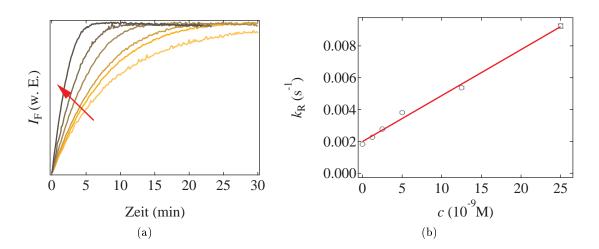


Abb. 4.8.:

Katalytische Effizienz. Bestimmung der Enzymaktivität von TtSlyD durch katalytische Rückfaltung von RCM-T1. (a) Transienter Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz von RCM-T1 nach Anregung mit $\lambda_{\rm Ex} = 280\,\mathrm{nm}$ bei steigender Konzentration (roter Pfeil) von TtSlyD. (b) Ergebnisse für die Rückfaltungsrate $k_{\rm R}$ durch Anpassung der Gl. (4.2) an Daten aus (a). An den kompletten Datensatz wird wiederum Gl. (4.3) angepasst (rote Linie).

Die Aktivität der jeweiligen Variante von $Tt\mathrm{SlyD}$ wird durch die Rückfaltung der reduzierten und carboxymethylierten Form der Variante S54G/P55N der RNase T1 (RCM-T1) bestimmt. Dafür wird RCM-T1 in 0,1 M Tris (pH 8,0) mit einer Inkubationszeit von mind. 60 min bei 15 °C entfaltet. Mit einem 40-fachen Verdünnungsschritt in 2 M NaCl, 0,1 M Tris (pH 8,0) wird ein Salzsprung erzeugt, der eine Rückfaltung von RCM-T1 in eine nativ-ähnliche Struktur auslöst [5]. Diese wird durch Ansteigen der Fluoreszenzintensität I_{F} (Abb. 4.8(a)) bei $\lambda_{\mathrm{Em}} = 320\,\mathrm{nm}$ nach einer Anregung bei $\lambda_{\mathrm{Ex}} = 280\,\mathrm{nm}$ im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Rückfaltung wird durch die enzymatische Wirkung von $Tt\mathrm{SlyD}$ beschleunigt. Für verschiedene Konzentrationen von $Tt\mathrm{SlyD}$ werden die Fluoreszenzverläufe an einen monoex-

	AF488	A647N
CF_{280}	$0,\!135$	0,0244
CF_{280}^{\star}	$0,\!11$	0,05

Tab. 4.5.:

Korrekturkoeffizient $CF_{280} = {}^{E(280 \text{ nm})}/{}_{E(\lambda_{\text{max}})}$. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis des Extinktionswertes bei 280 nm und demjenigen im Absorptionsmaximum des Farbstoffes. \star : Herstellerangaben

ponentiellen Anstieg angepasst:

$$I_{\rm F} = I_{\rm F,0} + A \exp(-k_{\rm R} \cdot t)$$
 (4.2)

Daraus ergibt sich die jeweilige Geschwindigkeitskonstante $k_{\rm R}$ der Rückfaltung. Nach dem Modell von Michaelis-Menten können diese grafisch gegen die Konzentration des Enzyms $Tt{\rm SlyD}$ aufgetragen werden (Abb. 4.8(b)). Durch lineare Regression der Daten nach

$$k_{\rm R} = k_{\rm R,0} + \frac{k_{\rm kat}}{K_{\rm M}} \cdot c_{Tt\rm SlyD} \tag{4.3}$$

wird die katalytische Effizienz $\frac{k_{\mathrm{kat}}}{K_{\mathrm{M}}}$ bestimmt.

Die Schwierigkeit besteht jedoch in der genauen Messung der Konzentration des Proteins $c_{Tt\mathrm{SlyD}}$. Die sonst standardisierte Bestimmung durch Absorptionsmessung bei $\lambda=280\,\mathrm{nm}$ mit einem zuvor ermittelten Extinktionskoeffizienten ist stark fehlerbehaftet, da die Fluoreszenzfarbstoffe die Absorption des Proteins stark überlagern. Die Absorptionswerte müssen also korrigiert werden. Dafür wurden die Absorptionsspektren der reinen Farbstoffe im Puffer gemessen und der Quotient CF_{280} bestimmt, der das Verhältnis aus der Absorption bei $\lambda=280\,\mathrm{nm}$ und derjenigen im Absorptionsmaximum des Farbstoffes angibt (Tab. 4.5).

Die Spektren der markierten Proteinvarianten wurden analog aufgenommen. Die Absorption bei $\lambda=280\,\mathrm{nm}$ wurde mit den experimentell ermittelten und vom Hersteller angegebenen Werten für CF_{280} korrigiert. Mit dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon=6000\,\mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}\pm10\%$ und der Länge der Küvette $d=10\,\mathrm{mm}$ wurde die Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz bestimmt:

$$c = \frac{E(280 \,\mathrm{nm})}{\varepsilon \cdot d}.\tag{4.4}$$

Daraus wurde schließlich die katalytische Effizienz $\frac{k_{\rm kat}}{K_{\rm M}}$ ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.6 aufgeführt. Die Spanne der Ergebnisse für $\frac{k_{\rm kat}}{K_{\rm M}}$ resultiert aus den unterschiedlichen Werten für CF_{280} . Die Fehler aus dem Ablesen der Absorptionswerte sowie die Unsicherheit in der Angabe von ϵ mit $\pm 10\%$ wurden nicht berücksichtigt. Die Werte sind somit eher als Richtwerte zu verstehen. Von Löw et al. wurde für die nicht markierte Wildtyp-Variante von TtSlyD eine Aktivität von $\frac{k_{\rm kat}}{K_{\rm M}}=0.29\cdot 10^6\,{\rm M}^{-1}{\rm s}^{-1}$ [4] bestimmt, die vergleichbar mit den in Tab. 4.6 aufgeführten Werten für die markierten Proteinvarianten ist. Auch nach der Mutation und Markierung von TtSlyD gilt immer noch, dass die katalytische Effizienz um zwei Größenordnung höher ist als die der isolierten FKBP-Domäne mit $\frac{k_{\rm kat}}{K_{\rm M}}=0.25\cdot 10^4\,{\rm M}^{-1}{\rm s}^{-1}$ [4].

Variante Markierung	$\mathrm{Wildtyp}^a$ ohne	D82C/T139C AF488 A647N	D82C/T139C AF488	D82C/T139C A647N	P68C/E111C AF488 A647N
c_0		2232	$19 \dots 29$	1729	47104
$\frac{(\mu M)}{\frac{k_{\text{kat}}}{K_{\text{M}}}} (10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	0,29	0,230,18	0,250,16	0,280,16	0,530,24

Tab. 4.6.:

Konzentration c_0 und katalytische Effizienz $\frac{k_{\text{kat}}}{K_{\text{M}}}$ für verschiedene fluoreszent markierte Varianten von $Tt\text{SlyD.}^a$: Angabe aus [4]

4.2.2. Stabilität

Die Kontrollmessungen zur Stabilität des Proteins wurden in Kooperation mit Caroline Haupt mittels Entfaltungsreihen mit dem Denaturierungsmittel GdHCl bei 25 °C im Gleichgewicht durchgeführt. Die intrinsische Fluoreszenz der vier Tyrosine (s. Abb. 2.3) wird bei $\lambda_{\rm Ex}=280\,{\rm nm}$ angeregt und bei $\lambda_{\rm Em}=308\,{\rm nm}$ detektiert. Die Entfaltung ist durch eine starke Änderung der Fluoreszenz gekennzeichnet. Daraus kann der Anteil an gefalteten Proteinen $y_{\rm N}$ berechnet werden [85]. Aus dessen Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturierungsmittels können die freie Entfaltungsenthalpie $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ als Maß für die Stabilität und die Kooperativität m des Übergangs, sowie dessen Mittelpunkt $c_{\rm GdHCl}^{1/2}$ ermittelt werden [85]. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.7 übersichtlich zusammengefasst.

Das Einbringen der Cysteine in den Wildtyp von TtSlyD reduziert die Stabilität zwar im Fall von T139C, scheint das Protein aber im Fall von D82C eher zu stabilisieren. Für die Doppelvarianten, D82C/T139C und P68C/E111C, sind die Parameter $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ und m innerhalb des Fehlerbereiches vergleichbar zu den Werten des Wildtyps. Im Gegenzug sind die Stabilitäten $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ sowohl der Einzelvariante E137C als auch der Doppelvariante D82C/E137C mit einer Abnahme auf fast ein Drittel der Wildtyp-Werte sehr kritisch zu betrachten. Die Glutaminsäure E137 scheint einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität des Wildtyp-Proteins zu liefern. Folglich wird die Variante ohne diese Glutaminsäure in dieser Arbeit nicht weiter genutzt.

Nach der Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen, A647N und AF488, werden generell erniedrigte Werte für $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ und m gemessen. Diese Ergebnisse können allerdings auch durch Wechselwirkungen der Tyrosine als intrinsische Fluoreszenzsonden mit den Farbstoffen verursacht werden. Es ist nicht klar, wie die Tyrosin-Fluoreszenz abhängig von der Konzentration des Denaturierungsmittels und abhängig von der Position und der Art des Farbstoffes systematisch beeinflusst wird. Durch eine solche Wechselwirkung der Tyrosine mit den Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich vielleicht die nicht intuitiven Ergebnisse begründen, dass zum Beispiel die Doppelvariante D82C/E137C mit den Fluoreszenzfarbstoffen deutlich höhere $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ - und m-Werte aufweist als die unmarkierte Doppelvariante.

Desweiteren ist zu bedenken, dass es sich bei den Proben mit den Fluoreszenzfarbstoffen um heterogene Mischungen handelt. Es können einfach markierte, zweifach mit dem Donor-

Variante	Farbstoff	$\frac{\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})}{({\rm kJmol}^{-1})}$	$m \text{ (kJmol}^{-1}\text{M}^{-1}\text{)}$	$c_{ m GdHCl}^{1/2} \ m (M)$
Wildtyp	-	$35,1 \pm 3,0$	$11,4 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,1$
T139C	-	24.8 ± 3.4	$10,\!6\pm1,\!4$	$2,3 \pm 0,2$
T139C	A647N	$15{,}9\pm4{,}1$	4.6 ± 1.9	$3,5 \pm 0,4$
T139C	AF488	$18{,}1\pm2{,}9$	5.8 ± 0.9	$3{,}0\pm0{,}1$
D82C	-	$46,4 \pm 4,0$	$15,7 \pm 1,4$	$3,0 \pm 0,1$
D82C	A647N	17.6 ± 1.5	4.1 ± 0.5	$4,3 \pm 0,2$
D82C	AF488	$46,8\pm 8,1$	$12{,}3\pm2{,}3$	$3,\!8\pm0,\!3$
E137C	-	$13,5 \pm 2,7$	5.7 ± 1.0	$2,4 \pm 0,1$
E137C	AF488	8.1 ± 1.6	$2,3 \pm 0,4$	$3{,}5\pm0{,}2$
D82C/T139C	-	$32,8 \pm 2,5$	$13,2 \pm 1,0$	2.5 ± 0.1
$\mathrm{D82C}/\mathrm{T}139\mathrm{C}$	$\rm AF488+A647N$	$19,\!6\pm0,\!8$	$6,2 \pm 0,3$	$3{,}2\pm0{,}1$
P68C/E111C	-	$41,3 \pm 9,7$	17.0 ± 4.0	$2,4 \pm 1,1$
P68C/E111C	$\rm AF488+A647N$	$13{,}9\pm1{,}6$	$5,2 \pm 0,6$	2.7 ± 0.6
D82C E137C	-	$12,9 \pm 2,8$	$5,4 \pm 1,0$	$2,4 \pm 0,1$
D82C E137C	$\rm AF488+A647N$	44.9 ± 7.4	$13{,}4\pm2{,}2$	$3,4 \pm 0,2$

Tab. 4.7.: Freie Entfaltungsenthalpie $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$, Koorperativität m und Mittelpunkt des Übergangs $c_{\rm GdHCl}^{1/2}$ für Entfaltungsreihen verschiedener Varianten von TtSlyD mit dem Denaturierungsmittel GdHCl bei 25 °C.

farbstoff markierte, zweifach mit dem Akzeptorfarbstoff markierte und schließlich mit beiden Farbstoffen markierte Proteine in der Probe sein. Im letzteren Fall gibt es zusätzlich zwei Möglichkeiten, welcher Farbstoff an welchem Cystein gebunden ist. Auch völlig unmarkierte Proteine sind nicht auszuschließen. Es kann die Annahme gemacht werden, dass der apparente Übergang aus dem Experiment eine Überlagerung verschiedener Entfaltungskurven der einzelnen Komponenten der Probe ist. So lässt sich die starke Abnahme der Kooperativität m erklären. Dies kann ebenso eine Begründung für die erniedrigten Stabilitätswerte von $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ sein, da beide Größen, m und $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$, bei der Anpassung der Gl. (4.14) an die experimentellen Daten miteinander gekoppelt sind. Der Übergangsmittelpunkt $c_{\mathrm{GdHCl}}^{1/2}$ ist als Wendepunkt der Kurve ein von der Kooperativität unabhängiger Parameter. Betrachtet man diese Übergangsmittelpunkte $c_{\mathrm{GdHCl}}^{1/2}$, so werden die Werte des Wildtyps von den markierten Doppelvarianten, D82C/T139C und P68C/E111C, nahezu reproduziert. Die apparente Absenkung der Kooperativität und Stabilität sind demzufolge aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Heterogenität der Probe nach der Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen zurückzuführen. Werden die Doppelvarianten nicht fluoreszent markiert, sind die Stabilitätswerte vergleichbar mit denen des Wildtyps.

4.2.3. Zusammenfassung

Nachdem im ersten Abschnitt zunächst das Konfokalmikroskop mit Referenzproben charakterisiert wurde, lag in diesem Abschnitt das Augenmerk auf der Ensemble-Charakterisierung des Proteins TtSlyD. Sowohl die fluoreszent markierten Doppelvarianten, D82C/T139C und P68C/E111C, als auch die entsprechenden Einzelvarianten wurden hinsichtlich ihrer Aktivität und Stabilität überprüft. Die Aktivität der Enzymvarianten wurde durch die zeitabhängige Rückfaltung der RCM-T1 bei verschiedenen Konzentrationen von TtSlyD bestimmt. Für die fluoreszent markierten Doppelvarianten folgen Aktivitätswerte, die vergleichbar mit der Aktivität des nicht markierten Wildtyps sind ($\frac{k_{\rm kat}}{K_{\rm M}}=0.29\cdot 10^6\,{\rm M}^{-1}{\rm s}^{-1}$ [4]).

Die Stabilität wurde durch Entfaltungsreihen mit dem Denaturierungsmittel GdHCl bestimmt. Sowohl die Kooperativität m also auch die Gibbs-Energie der Entfaltung $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ sind für die nicht markierten Varianten vergleichbar mit dem Wert des Wildtyps ($\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ = 35 kJmol⁻¹ [4]). Allerdings werden durch Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen in beiden Fällen (D82C/T139C und P68C/E111C) die Gibbs-Energie auf 56 % bzw. 40 % und die Kooperativität auf 54 % bzw. 46 % verglichen zum Wildtyp reduziert. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Heterogenität der Probe bedingt. Der Übergangsmittelpunkt des Wildtyps ($c_{\rm GdHCl}^{1/2}=3,1\,{\rm M}$ [4]) wird unabhängig von der Markierung nahezu reproduziert.

Mit den vorgestellten Messungen konnte gezeigt werden, dass die fluoreszent markierten Varianten von TtSlyD aktiv sind und ihre Funktion als Faltungshelfer zeigen. Die Energielandschaften des Wildtyps und der fluoreszent markierten Varianten sind verbleichbar. Allerdings wurde nur die ausgewählte Eigenschaft der Energiedifferenz zwischen entfaltetem und nativem Zustand analytisch bestimmt.

4.3. Konformationsheterogenität des Zwei-Domänen-Proteins $Tt\mathrm{SlyD}$

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse auf Einzelmolekül- und Ensemble-Niveau für das doppelt fluoreszent markierte Protein TtSlyD vorgestellt. Es werden E_t -Verteilungen unter verschiedenen Bedingungen vorgestellt. Diese weisen eine deutliche Verbreiterung auf, die nachfolgend diskutiert wird. Dabei werden vielfältig Korrekturmessungen analysiert, die Einflüsse auf die Breite erklären oder ausschließen können.

4.3.1. Verteilung der Energietransfereffizienzen

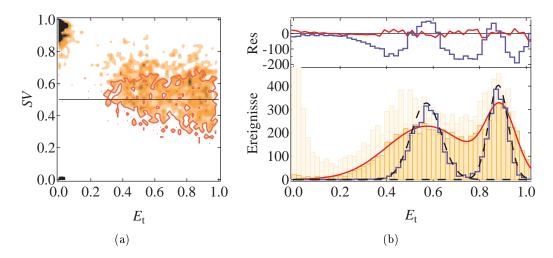


Abb. 4.9.:

Energietransfereffizienz und Stöchiometrie. Die Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde im POE-Schema ($40\,\mu\mathrm{W}$ bei $488\,\mathrm{nm}$, $15\,\mu\mathrm{W}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz}$) angeregt. Für alle Einzelmolekülereignisse wurden E_{t} und SV berechnet. Die Ereignisse wurden entweder nur mit der Summenschwelle $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40\,\mathrm{s^{-1}}$ ausgewählt (a: orange skalierte Verteilung; b: hellgelbe Balken) oder mit einer zusätzlichen Akzeptorschwelle $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 10\,\mathrm{s^{-1}}$ sortiert (a: rot umrandet; b: dunkelgelbe Balken). (b) Die experimentellen Daten wurden durch ein Zwei-Gauß-Modell (rote Linie) angepasst. Datensätze mit entsprechend zwei Farbstoffabständen wurden simuliert (blau durchgezogen) und analog ausgewertet. Die jeweiligen Abweichungen zu den experimentellen Daten sind unter Res dargestellt. Aus der mittleren Photonenzählrate und den Transfereffizienzen wurden theoretische Verteilungen nach dem Modell von Gopich [63] berechnet (blau gestrichtelt).

Für die doppelt markierte Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde im nativen Puffer die Verteilung der Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$ und des stöchiometrischen Verhältnisses SV experimentell bestimmt (Abb. 4.9). Die einzelnen Ereignisse, wenn sich ein Molekül im Beobachtungsvolumen befindet, werden durch Schwellwerte erkannt und sortiert (Gl. (3.9)). Wird nur ein Summenschwellwert $S_{\rm sum}^{488}$ zur Auswahl der Einzelmolekülereignisse genutzt, werden auch Ereignisse mit inaktivem Akzeptor gezählt. In Abb. 4.9 erscheint deshalb eine Population bei $E_{\rm t}\approx 0$ und $SV\approx 0.9$. Durch Anwendung der Akzeptorschwelle $S_{\rm akz}^{635}$ werden diese Ereignisse nicht gewertet. Man zählt nur noch die Moleküle, die in Abb. 4.9(a) eine

Zustand	$\langle E_{ m t} angle$	σ
1	$0,\!56 \pm 0,\!01$	$0,24 \pm 0,01$
2	$0,\!880 \pm 0,\!003$	$0,092 \pm 0,004$

Tab. 4.8.: Ergebnisse aus der Anpassung eines Zwei-Gauß-Modells an die Daten in Abb. 4.9(b) mit den Mittelwerten $\langle E_{\rm t} \rangle$ und den Breiten σ der Einzel-Gauß-Kurven.

Verteilung ergeben, die annähernd symmetrisch um SV = 0.5 verteilt ist (rot umrandet). In Abb. 4.9(b) zeigt die E_t -Verteilung eine bimodale Form (gelbe Balken). Diese weist auf zwei Zustände in der Abstandsverteilung und somit zwei Konformationen des Proteins hin. Die Verteilung kann durch ein Zwei-Gauß-Modell angepasst werden, aus welchem die mittleren Energietransfereffizienzen $\langle E_t \rangle$ und die Breite σ der Einzelverteilungen (1, 2) in Tab. 4.8 folgen.

Wird jedoch ein Zwei-Zustands-System simuliert, bei dem allein das Schrotrauschen der Photonendaten die Breite der Energietransfereffizienzverteilung bedingt (Abschnitt 3.4.1), entsteht eine viel schmalere bimodale Verteilung (blaue Linie in Abb. 4.9(b)). Die Simulation liefert dieselbe Verteilung, wie sie aus der Theorie von Gopich et al. [63] hervorgeht (graugestrichelte Linie in Abb. 4.9(b)).

Durch Autokorrelation des Signals und Anpassung an Gl. (2.57) erhält man eine mittlere Teilchenzahl im Beobachtungsvolumen von $N \leq 0,1$, womit nach den Erläuterung in Abschnitt 2.4.3 von Einzelmolekülereignissen ausgegangen werden kann. Höhere mittlere Teilchenzahlen $N \geq 0,2$ würden zu einem deutlichen Verschmieren der einzelnen Verteilungen führen. Diese Tendenz wurde durch simulierte Daten bei verschiedenen Konzentrationen bestätigt (Abb. A.6 im Anhang).

In Abb. 4.10 wird durch Variation sowohl der Summen- als auch der Akzeptorschwelle kontrolliert, ob deren Wahl die Form der $E_{\rm t}$ -Verteilung bestimmt. Durch Erhöhen der Summenschwelle werden vorrangig Moleküle gewählt, die durch das Zentrum des Detektionsvolumens diffundieren und somit eine hohe Fluoreszenzrate haben, wohingegen bei geringen Summenschwellen auch die Ereignisse im Randbereich ausgewertet werden. Wie aus Abb. 4.10(a) und Abb. 4.10(c) hervorgeht, verändert sich nur die Anzahl der ausgewählten Ereignisse, nicht aber die Form der Verteilung. Nach [44] können somit Sättigungseffekte ausgeschlossen werden, da diese eine starke Abhängigkeit zwischen dem Summenschwellwert und der mittleren Energietransfereffizienz zur Folge haben. Durch die zusätzliche Verwendung einer Akzeptorschwelle (Abb. 4.10(b),4.10(d)) können die Ereignisse mit einem aktiven Akzeptor aussortiert werden. Wird diese Schwelle jedoch zu hoch gewählt, wird die $E_{\rm t}$ -Verteilung im Bereich geringer Energietransfereffizienzen unterbetont, da schwach leuchtende Moleküle im Akzeptorschwelle von $(S_{\rm akz}^{635})_{\rm min} = 10\,{\rm s}^{-1}$ festgelegt.

Die $E_{\rm t}$ -Verteilung wird aus den gemessenen Signalintensitäten pro Zeitschritt bestimmt. Die Aufsummierung der Einzelphotonen in diese Zeitschritte findet rechnerunterstützt nach der Messung statt. So können verschiedene Zeitauflösungen für die Zeitspuren gewählt werden.

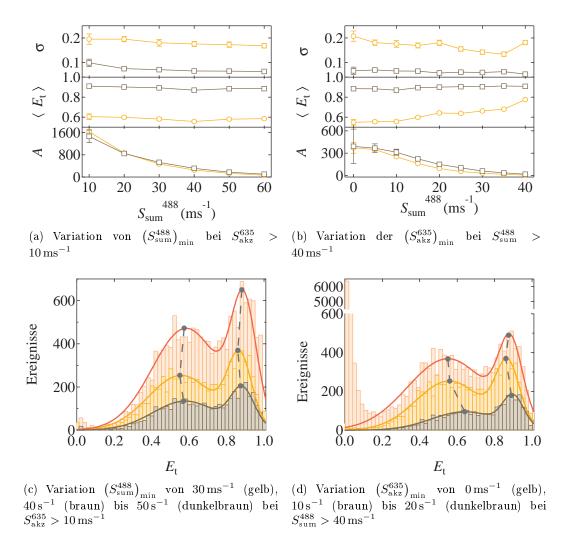


Abb. 4.10.:

Einfluss der Schwellwerte auf die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$. Variation der Summenschwelle $\left(S_{\rm sum}^{488}\right)_{\rm min}$ und der Akzeptorschwelle während direkter Akzeptoranregung $\left(S_{\rm akz}^{635}\right)_{\rm min}$. An die $E_{\rm t}$ -Verteilungen wurde die Gl. (2.46) angepasst (c,d: durchgezogene Linien). Die Ergebnisse aus dieser Anpassung sind für die zwei Subpopulationen (gelb, braun) in (a) und (b) aufgetragen.

Dynamische Informationen, die deutlich schneller als die Zeitauflösung sind, werden ausgemittelt. In Abb. 4.11 wird die Zeitauflösung variiert. Dieser Variation sind Grenzen gesetzt. Die Zeitschritte dürfen nicht zu kurz sein, um eine statistisch sinnvolle Zahl an detektierten Photonen pro Zeitschritt zu realisieren. Zu lange Zeitschritte verschmieren die Information aus verschiedenen Einzelmolekülereignissen. Innerhalb dieser Grenzen von $\Delta t = (0,5...2,0)$ ms ist die E_t -Verteilung unabhängig von der Wahl der Zeitauflösung.

Durch Unterfüllen des Objektivs kann das Beobachtungsvolumen vergrößert werden (Abschnitt 4.1.2). Die bimodale und über das Rauschen hinaus verbreiterte Form der E_t -Verteilung bleibt aber erhalten (Abb. 4.12). Die Verschiebung in einen Bereich mit höheren E_t -Werten

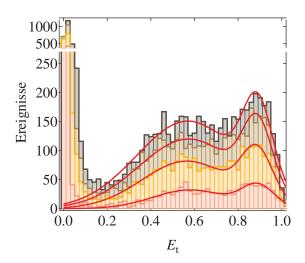
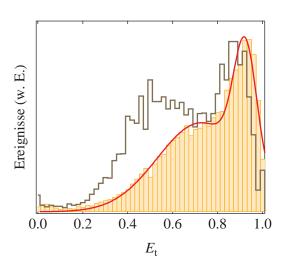


Abb. 4.11:

Einfluss des Zeitfensters auf die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$. Die Zeitfenster variieren von $\Delta t=0.5\,{\rm ms}$ (rot), $\Delta t=1.0\,{\rm ms}$ (orange), $\Delta t=1.5\,{\rm ms}$ (braun), bis $\Delta t=2.0\,{\rm ms}$ (schwarz). Die Variante D82C/T139C des Proteins $Tt{\rm SlyD}$ wurde in einem beugungsbegrenzten Fokus im POE-Schema (40 $\mu{\rm W}$ bei 488 nm, 15 $\mu{\rm W}$ bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Es wurden nur die Einzelmolekülereignisse betrachtet, die die Schwellen $S_{\rm sum}^{488}>40\,{\rm s}^{-1}$ und $S_{\rm akz}^{635}>0\,{\rm s}^{-1}$ erfüllen (gelb). Die Datensätze wurden jeweils mit einem Zwei-Gauß-Modell im Bereich $E_{\rm t}=0.1\dots 1,0$ angepasst.

ist vermutlich eine Folge der veränderten Optik und somit anderen Form der Überlappung zwischen den Detektionsvolumina im Akzeptor- und Donorkanal.



$\langle E_{ m t} angle$	σ
$0,72 \pm 0,02$	$0,\!27\pm0,\!02$
$0,913 \pm 0,003$	$0,072 \pm 0,007$

Abb. 4.12.:

Einfluss der Fokusgröße und -form auf die Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$. Die Variante D82C/T139C des Proteins $Tt{\rm SlyD}$ wurde in einem vergrößerten Beobachtungsvolumen durch Unterfüllung des Objektivs (Strahldurchmesser $d=3\,{\rm mm}$) im POE-Schema (40 $\mu{\rm W}$ bei 488 nm, 15 $\mu{\rm W}$ bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Es wurden nur die Einzelmolekülereignisse betrachtet, die die Schwellen $S_{\rm sum}^{488}>40\,{\rm s}^{-1}$ und $S_{\rm akz}^{635}>10\,{\rm s}^{-1}$ erfüllen (gelb). Zum Vergleich sind die Ergebnisse in einem beugungsbegrenzten Fokus gezeigt (schwarze Linie). Die Daten wurden an Gl. (2.46) angepasst.

4.3.2. Abstandsunabhängige Einflüsse auf die Energietransfereffizienz

In die Energietransfereffizienz fließen nicht nur Abstands-, sondern auch Orientierungs- und spektrale Informationen des Farbstoffepaares ein. Diese und weitere abstandsunabhängige Einflüsse werden in den folgenden Abschnitten in Bezug auf die apparente Energietransfereffizienz von TtSlyD diskutiert.

4.3.2.1. Spektrale Eigenschaften der Farbstoffe

Fluoreszenzlebensdauer Durch die Bindung der Farbstoffe an das Protein kann es zu veränderten Eigenschaften der Farbstoffe kommen. Treten Variationen in Abhängigkeit der Bindungsstelle auf, kann dies ein Grund für die Aufweitung der E_t -Verteilung sein. Zur Kontrolle wurde in TCSPC-Messungen die Fluoreszenzlebensdauer τ_F an markierten Einzelvarianten von TtSlyD bestimmt (Tab. 4.9). Für A647N konnte eine bindungsstellenunabhängige Lebensdauer in Bezug auf D82C und T139C bestimmt werden. Für AF488 variieren die Werte geringfügig. Diese Variation rührt wahrscheinlich aus einer Änderung der strahlungslosen Rate k_{nr} durch Wechselwirkung mit dem Protein her und führt somit zu einer proportionalen Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors (Gl. (2.6)). Diese Änderung geht jedoch nicht in die Transferrate k_t und die apparente Energietransfereffizienz E_t ein [44], wenn diese aus dem Verhältnis der detektierten Photonen berechnet wird (siehe Abschnitt 2.3.4). Eine Änderung von Q_D führt somit nicht zu einer Formveränderung oder -verbreiterung der Verteilung.

Für die Variante P68C/E111C, bei der beide Farbstoffe an der IF-Domäne gebunden sind, treten jedoch Änderungen der Quantenausbeute des Akzeptors auf (s. Tab. 4.9), die eine Verbreiterung der $E_{\rm t}$ -Verteilung begründen können. Dies gilt ebenso für die Variante D82C/T139C mit A655 als Akzeptorfarbstoff.

Absorption und Emission Ebenso wurden für die genannten Einzelvarianten im Vergleich zum freien Farbstoff sowohl Absorptions- $E(\lambda)$ als auch Fluoreszenzspektren $F(\lambda)$ aufgenommen (Abb. 4.13). Aufgrund der sinkenden Empfindlichkeit des Fluoreszenzspektrometers mit steigender Wellenlänge sind die Fluoreszenzspektren durch die Normierung apparent zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Desweiteren wird dadurch die Form stark verfälscht, was aus dem Vergleich mit den vom Hersteller gegebenen Daten hervorgeht. Der Donor AF488 zeigt bis auf P68C in seiner Absorption und Emission keine Abhängigkeiten gegenüber der Bindungsstelle. Das Absorptionsspektrum des Akzeptors wird für die verschiedenen Bindungsstellen um (3...5) nm verschoben, was mit lokalen Wechselwirkungen mit dem Protein zu begründen ist. Im angeregten Zustand werden diese offensichtlich aufgehoben, die Fluoreszenzspektren liegen wieder übereinander. Nur im Fall von P68C kommt es zu einer Verschiebung um ca. 3 nm.

Eine Änderung des Försterradius' R_0 , der die spektrale Information trägt, begründet im Gegensatz zur Quantenausbeute des Donors eine Änderung von k_t und E_t . Für dessen Berechnung sind das Fluoreszenzspektrum des Donors $F_D(\lambda)$ und das Absorptionsspektrum

Variante von Tt SlyD	Farbstoff	$ au_{ m F}~(m ns)$	Q	Q (Hersteller)
D82C	AF488	$3,9 \pm 0,1$	0,83	$0,\!92$
T139C		$4{,}0\pm0{,}1$	$0,\!85$	
P68C		$4{,}3\pm0{,}1$	0,92	
E111C		$4,\!4\pm0,\!1$	$0,\!94$	
D82C	A647N	$4,2 \pm 0,1$	0,78	0,65
T139C		$4{,}2\pm0{,}1$	0,78	
P68C		$4{,}3\pm0{,}1$	0,79	
E111C		$3,9 \pm 0,1$	0,72	
$\overline{\mathrm{D82C/T139C}}$	A655	$1,7 \pm 0,1$	0,33	0,30
		$2{,}7\pm0{,}1$	$0,\!52$	

Tab. 4.9.:

Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\rm F}$, bestimmt durch Anpassung der Histogramme der Photonenankunftszeiten mit einem exponentiellen Abfall mit Hintergrund. Die zeitlichen Grenzen, innerhalb derer die experimentellen Verläufe angepasst wurden, wurden manuell variiert. Aus der Variation der Ergebnisse für $\tau_{\rm F}$ folgt ein mittlerer Fehler von $\Delta \tau = 0.1$ ns. Zu beachten gilt, dass die Messung für A655 nur an der Doppelvariante möglich war. Deren Daten wurden mit einem Zweifach-Exponential-Modell angepasst, resultierend in zwei Lebensdauern mit vergleichbar hohen Amplituden. Aus den Spektren (lt. Herstellerangaben) und $\tau_{\rm F}$ wurde die Quantenausbeute Q nach Gl. (2.8)-(2.9) berechnet. Die Angaben des Herstellers sind ebenso aufgeführt, wobei A647N und A655 in Wasser und AF488 in Natriumphosphat-Puffer (50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, 22 °C) gelöst sind.

des Akzeptors $E_{\rm A}(\lambda)$ entscheidend. Da $F_{\rm D}(\lambda)$ unabhängig von der Bindungsstelle ist, die Form jedoch stark durch das Spektrometer verfälscht wird, ging in die Rechnung für alle Kombinationen stets das Herstellerspektrum ein. Im Fall des Akzeptors wurden die gemessenen Spektren bei $\lambda=644\,\mathrm{nm}$ auf den Absorptionskoeffizienten von $\varepsilon_{\rm A}=150000\,\mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}$ normiert und für die Rechnung genutzt.

Fluoreszenzquantenausbeute Neben dem spektralen Überlapp der Farbstoffe wird der Försterradius auch durch die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors bestimmt. Da deren Bestimmung sowohl bei einer absoluten Messung als auch bei einer indirekten Vergleichsmessung mit einem bekannten Farbstoff technisch schwer umzusetzen und stark fehlerbehaftet ist, kann für Q nur eine Abschätzung angegeben werden. Um im Vergleich zu den Herstellerangaben den experimentellen Bedingungen näher zu kommen, wurde Q für die am Protein gebundenen Farbstoffe aus deren Fluoreszenzlebensdauer τ_F (Tab. 4.9) und der natürlichen Lebensdauer $\tau_n = 5,41$ ns berechnet. τ_n wurde aus den Spektren (Herstellerangaben) nach Gl. (2.8) [34] bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.9 aufgeführt. Allerdings sind diese unter dem Aspekt zu betrachten, dass die Form der Berechnung viele Effekte wie Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel, Änderungen im Brechungsindex etc. vernachlässigt. Die Änderungen im Absorptionsspektrum des Akzeptors (Abb. 4.13(b)) wurden ebenfalls vernachlässigt.

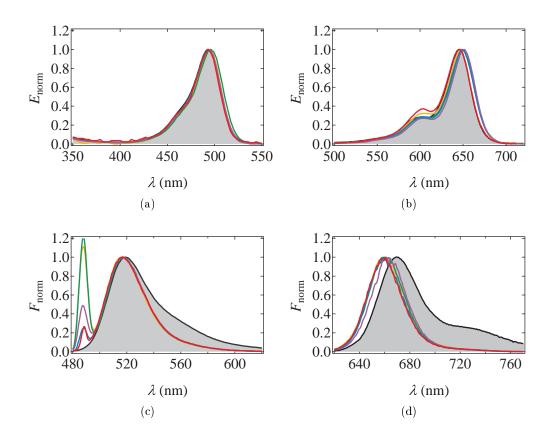


Abb. 4.13.:

Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe. Normierte Absorptions- (a,b) und Fluoreszenzspektren (b,d) der Einzelvarianten D82C (orange), T139C (grün), P68C (violett) und E111C (blau) von TtSlyD, markiert mit AF488 (a,c) bzw. A647N (b,d). Zum Vergleich sind die Spektren der freien Farbstoffe (rot) und die vom Hersteller gelieferten Kurven (grau gefüllt) angegeben. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer

mit AF488 (a,c) bzw. A647N (b,d). Zum Vergleich sind die Spektren der freien Farbstoffe (rot) und die vom Hersteller gelieferten Kurven (grau gefüllt) angegeben. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\rm Exc}=488\,{\rm nm}$ (c) bzw. $\lambda_{\rm Exc}=647\,{\rm nm}$ (d) aufgenommen. Daraus resultiert in (c) die hohe Verteilung bedingt durch Streulicht bei 488 nm.

Försterradius Werden nun mittlere Werte von $Q_{\text{AF488}} = 0.84$ und $Q_{\text{A647N}} = 0.78$ angenommen, ergeben sich die Försterradien wie in Tab. 4.10 angegeben. Die Werte in Klammern resultieren aus der zusätzlichen Änderung der Quanteneffizienz. Wie bereits diskutiert, kürzen sich für die Berechnung der Transferrate k_{T} die Effekte durch die Quanteneffizienz des Donors wieder heraus. Da eine maximale Variation von E_{t} bei einem Abstand in der Nähe des Försterradius entsteht, wurde die Aufweitung an dieser Stelle ebenso in Tab. 4.10 abgeschätzt. Es kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass zwar die spektralen Eigenschaften geringfügige Abhängigkeiten von der Bindungsstelle aufweisen, vor allem im Fall von A647N, aber diese nur eine Verbreiterung der Energietransfereffizienz in der Größenordnung von $\Delta E_{\text{t}} \approx 0.03$ erklären, nicht aber die Form der Verteilung für TtSlyD in Abb. 4.9(b) vollständig begründen können.

Korrekturfaktor Möchte man Rückschlüsse von $E_{\rm t}$ auf den Abstand der Farbstoffe ziehen, müssen die Daten nach Gl. (2.31)-(2.32) korrigiert werden. Das Hintergrundsignal $S_{\rm H}$

D82C	T139C	$R_0 \text{ (nm)}$	$E_{ m t}$ bei $r=5{ m nm}$
AF488	A647N	50,1 (51,0)	0,503 (0,530)
A647N	AF488	50,9 (50,0)	0,527 (0,500)
P68C	E111C		
AF488	A647N	49,9 (50,7)	0,497 (0,521)
A647N	AF488	48,9 (49,9)	0,467 (0,497)

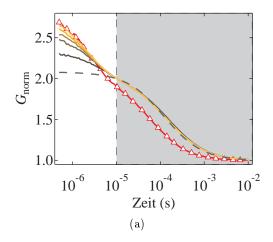
Tab. 4.10.:

Einfluss der Änderung der Spektren und der Fluoreszenzlebensdauer auf $E_{\rm t}$. Der Försterradius R_0 wurde aus dem Fluoreszenzspektrum des Donors (lt. Herstellerangaben) und dem experimentell bestimmten Absorptionsspektrum des Akzeptors berechnet. Die Quantenausbeute des Donors wurde mit $Q_{\rm D}=0.84$ konstant gehalten bzw. entsprechend Tab. 4.9 und Gl. (2.9) mit einer konstanten natürlichen Lebensdauer $\tau_{\rm n}=5.41\,\rm ns$ berechnet. Wird die Änderung der Quantenausbeute mit betrachtet, ergeben sich die Werte in Klammern. Bei einem Abstand von $r=5\,\rm nm$ wurde der Wert für $E_{\rm t}$ berechnet, um die Aufweitung der Verteilung einschätzen zu können.

in beiden Detektionskanälen (A, D) wurde durch Messungen im nativen Puffer ohne Protein bestimmt ($S_{\rm H,A}=94\,{\rm s}^{-1},\ S_{\rm H,D}=184\,{\rm s}^{-1}$). Die Detektionseffizienzen wurden bereits in Gl. (3.4) berechnet ($q_{\rm A}=0.34,\ q_{\rm D}=0.28$). Die Wahrscheinlichkeit α für das Eindringen von Donorphotonen in den Akzeptorkanal wurde in einer Messung mit freiem Donorfarbstoff durch Signalvergleich in beiden Kanälen zu $\alpha=0.74\,\%$ bestimmt. Mit den mittleren Quanteneffizienzen $Q_{\rm AF488}=0.84$ und $Q_{\rm A647N}=0.78$ und einem geschätzten Fehler von 10 % ergibt sich der Korrekturfaktor γ zur Berechnung der korrigierten Energietransfereffizenz nach Gl. (2.31):

$$\frac{q_{\rm A}Q_{\rm A}}{q_{\rm D}Q_{\rm D}} = 1.1 \pm 0.2. \tag{4.5}$$

Interessanterweise gleichen sich die unterschiedlichen Detektions- und Quanteneffizienzen nahezu aus. Da in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf relativen Änderungen, nicht aber auf der absoluten Bestimmung der Struktur, also des Abstandes liegt, wird auf eine quantitative Korrektur der Daten verzichtet.



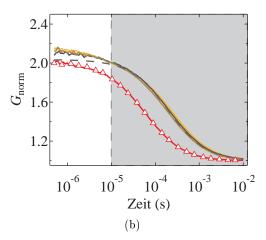


Abb. 4.14.:

Schnelle Photophysik. Die mit AF488 (a) bzw. A647N (b) markierte Variante T139C wurde in einem beugungsbegrenzten Fokus (Pinhole $d=50\,\mu\mathrm{m}$) mit zirkular polarisiertem Licht der Wellenlänge $\lambda=488\,\mathrm{nm}$ (cw) (a) bzw. $\lambda=635\,\mathrm{nm}$ (40 MHz) (b) bei verschiedenen Leistungen angeregt ((a):40 $\mu\mathrm{W}$ -250 $\mu\mathrm{W}$, (b):15 $\mu\mathrm{W}$ -80 $\mu\mathrm{W}$, jeweils von braun zu gelb). Die Fluoreszenz wurde mit einem 50/50-Strahlteiler aufgeteilt und so konnte eine Pseudoautokorrelation berechnet werden. Entsprechend wurden Messungen an den freien Farbstoffen (rot, Dreiecke) durchgeführt ((a): $100\,\mu\mathrm{W}$, (b): $20\,\mu\mathrm{W}$). Die Kurven für die gebundenen Farbstoffe wurden mit einem Triplett-Diffusions-Modell angepasst. Die Diffusionskomponente ist als gestrichelte Linie angedeutet. Die Kurven wurden alle auf eine Amplitude des Diffusionsanteils von Eins normiert. Grau hinterlegt ist das kritische Zeitfenster, innerhalb dessen dynamische Übergänge zum Verschmieren der Energietransfereffizienz führen.

4.3.2.2. Photophysik der Farbstoffe

Zeitabhängige photophysikalische Effekte der Farbstoffe können einen Einfluss auf die Form der $E_{\rm t}$ -Verteilung haben. Einflüsse auf die Photophysik der Farbstoffe durch Bindung an Proteine [86–89] und DNA [44, 90, 91] sind dokumentiert. Wie bei jeder dynamischen Änderung ist dabei die Zeitskala der Dynamik entscheidend. Auf diese Zusammenhänge wird im Abschnitt 4.3.3.2 genauer eingegangen. Zusammenfassend führen nur photophysikalische Effekte mit charakteristischen Zeiten größer als die inverse maximale Photonenzählrate $^{1}/k_{\rm phot} \approx 10 \,\mu \rm s$ zur Verbreiterung der $E_{\rm t}$ -Verteilung (grau hinterlegt in Abb. 4.14).

Ob im Fall des Proteins TtSlyD photophysikalische Effekte zu beachten sind, wurde durch Korrelationsmessungen [92] an markierten Einzelvarianten D82C und T139C des Proteins kontrolliert. Für verschiedene Anregungsleistungen wurden Pseudoautokorrelationen berechnet (Abschnitt 2.4.6) und an Gl. (2.52)-(2.55) angepasst. Beispielhaft sind in Abb. 4.14 Ergebnisse für die Variante T139C dargestellt. Offensichtlich kann an die experimentellen Kurven kein reines Diffusionsmodell (Gl. (2.52)) angepasst werden. Vielmehr ist ein zusätzlicher Anstieg im μ s-Bereich zu verzeichnen.

Die Parameter der Diffusionszeit τ_D , der Triplettzeit τ_T , des relativen Triplettanteils T und der molekularen Helligkeit MB sind leistungsabhängig in Abb. 4.15 aufgetragen.

Für AF488 wird eine typische Triplettkinetik mit einer charakteristischen Zeit von $\tau_T \approx (2...5) \mu s$ für beide Einzelvarianten beobachtet. Der relative Triplettanteil T zeigt eine deut-

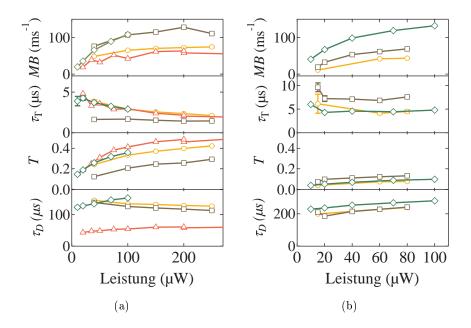


Abb. 4.15.:

Leistungsabhängigkeit der schnellen Photophysik. Die mit AF488 (a) bzw. A647N (b) markierten Varianten D82C (braun, Quadrate) und T139C (orange, Kreise), sowie dsDNA (grün, Diamanten) wurden in einem beugungsbegrenzten Fokus (mit Pinhole $d=50\,\mu\mathrm{m}$ mit zirkular polarisiertem Licht der Wellenlänge $\lambda=488\,\mathrm{nm}$ (cw) (a) bzw. $\lambda=635\,\mathrm{nm}$ (40 MHz) (b) bei verschiedenen Leistungen angeregt. Die resultierende Pseudoautokorrelation wurde an Gl. (2.52) bzw. Gl. (2.55) angepasst. Zum Vergleich sind Messungen an dem freien Farbstoff AF488 dargestellt (rot, Dreiecke).

liche Leistungsabhängigkeit und ist auch von der Bindungsstelle abhängig. Diese Triplettkinetik kann sowohl am freien als auch am dsDNA-gebundene Farbstoff beobachtet werden. Diese Daten liefern Ergebnisse, die vergleichbar zu den Daten an der Bindungstelle T139C sind. Triplettzeit und -anteil sind für D82C kleiner. Dies spricht für bindungstellenabhängige Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff und dem Protein und führt schließlich auch zu unterschiedlichen molekularen Helligkeiten.

Im Fall des Akzeptorfarbstoffes A647N kann nur für gebundenen Farbstoff, sowohl am Protein als auch an dsDNA, eine zusätzliche Kinetik beobachtet werden, die durch eine deutlich geringere Leistungsabhängigkeit gekennzeichnet ist. Die charakteristische Zeit ist $\tau_x \approx (5...10) \,\mu s$. Welcher photophysikalischer Prozess dieser Kinetik zugrunde liegt, ist nicht geklärt, wird aber auf jeden Fall durch Wechselwirkung mit dem Bindungspartner verursacht.

Für beide Farbstoffe des FRET-Paares kann jedoch argumentiert werden, dass die photophysikalischen Kinetiken auf einer Zeitskala außerhalb des kritischen Zeitfensters, beginnend bei $10 \,\mu\text{s}$, stattfinden und deshalb keine Aufweitung der E_{t} -Verteilung begründen können.

In Abb. 4.15 sind auch Sättigungseffekte ersichtlich. Die Kurven für die molekulare Helligkeit werden mit steigender Leistung flacher. Allerdings muss hier beachtet werden, dass die Abflachung der Kurven nicht allein durch die gesättigte Emissionsrate erklärt werden kann. Zusätzlich wird durch die sättigungsbedingte Formveränderung des Beobachtungsvolumens die mittlere Zahl der Moleküle im Fokus $\langle N \rangle$ apparent vergrößert. Da auf Einzelmolekülniveau

aber mit relativ niedrigen Leistungen ($40 \,\mu\text{W}$ bei $\lambda = 488 \,\text{nm}$ bzw. $15 \,\mu\text{W}$ bei $\lambda = 635 \,\text{nm}$) gearbeitet wird, sind diese Sättigungseffekte zu vernachlässigen.

4.3.2.3. Rotationsfreiheit der Farbstoffe

Zeitabhängige Messungen Bei der Berechnung des Försterradius nach Gl. (2.25) wird oft ein Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = 2/3$ angenommen [43]. Dies ist gerechtfertigt, solange die Fluorophore frei rotieren ($\theta < \tau_{\rm F}$) und somit die Information über deren relative Orientierung zueinander während der Zeit im angeregten Zustand verloren geht. Die Rotationskorrelationszeit θ kann mit zeitabhängigen Anisotropiemessungen bestimmt werden (Abschnitt 3.3.3). Durch die Bindung der Farbstoffe an das Protein kann die freie Rotation eingeschränkt sein. In dieser Arbeit wird dies mit einem Zwei-Komponenten-Modell nach Gl. (3.19) beschrieben, das mit der freien Rotationszeit der Farbstoffe θ und der globalen Rotationszeit des Proteins $\theta_{\rm Prot}$ arbeitet. Man geht dabei von einer attraktiven Wechselwirkung aus, die zum transienten Kleben des Farbstoffes am Protein führt. Über den relativen Anteil y wird der Anteil frei rotierender Farbstoffe bestimmt. Alternativ gibt es ein Modell, dass die Rotation in einem räumlich begrenzten Kegel an der Proteinoberfläche beschreibt [40, 93]. Die Ergebnisse für y und θ sind in Tab. 4.11 aufgeführt. Die globale Rotationszeit wurde mit $\theta_{\rm Prot} = 10\,{\rm ns}$ festgehalten. Dies ist mit dem Wert von $\theta_{\rm Prot} = 14,5\,{\rm ns}$ aus NMR-Experimenten vergleichbar [94].

Der Donorfarbstoff AF488 zeigt an fast allen Bindungsstellen eine nahezu ungehinderte Rotation. Die prozentualen Anteile für klebende Farbstoffe sind mit (1-y) < 20% sehr gering. Nur an der Bindungsstelle T139C kommt es zu transienten Wechselwirkungen, die in einer Gleichverteilung von freier Rotation und klebenden Farbstoffen münden. Der Akzeptor A647N wird an allen Bindungsstellen stärker beeinflusst, sodass der Anteil klebender Farbstoffe zum Teil überwiegt. Die Ergebnisse für die Gleichgewichtsanisotropie $r_{\rm GG}$ liefern dieselbe Interpretation. Damit kann nicht von einer freien Rotation beider Farbstoffe des FRET-Paares ausgegangen werden. Allerdings ist auch die freie Rotation nur eines Farbstoffes hinreichend für eine Ausmittelung der Orientierungsinformation. Der Wert verschiebt sich mit $\kappa^2 = 0,635$ nur geringfügig [43]. Da AF488 weitgehend frei und deutlich schneller als seine mittlere Aufenthaltszeit im angeregten Zustand mit $\tau_{\rm F} \approx 4,0\,{\rm ns}$ rotiert, ist diese Annahme im Fall von TtSlyD begründet [44].

Einzel-Ereignis-Messungen Die Werte aus Tab. 4.11 resultieren aus Ensemblemessungen, stellen also nur Mittelwerte über das gesamte Ensemble an Molekülen dar. Es stellt sich die Frage, ob diese Mittelung hinreichend genaue Aussagen für die Einzelmolekül-FRET-Experimente zulässt. Mittelt sich die Orientierung zwischen den Farbstoffen während der Anregung nicht aus, wie es aus einem langsamen Anisotropiezerfall im Ensemble geschlussfolgert wird, würde der Försterradius mit jedem FRET-Ereignis variieren. Dies würde die Verschmierung der Transfereffizienzen trotz konstantem Abstand erklären. Aus den Ensemblemessungen folgt jedoch nicht eindeutig, in welcher Anzahl und ob überhaupt diejenigen

Variante von Tt SlyD	Farbstoff	$r_{ m GG}$	y	θ (ns)
D82C	AF488	$0,080 \pm 0,008$	$80\% \pm 2\%$	$1,2 \pm 0,1$
T139C	AF488	$0,125 \pm 0,010$	$53\% \pm 2\%$	0.9 ± 0.1
P68C	AF488	$0,052 \pm 0,004$	$80\% \pm 2\%$	0.9 ± 0.1
E111C	AF488	$0,017 \pm 0,005$	$86\% \pm 2\%$	$1,2 \pm 0,1$
-	AF488	$0,022 \pm 0,002$	$100\% \pm 1\%$	$0,\!68 \pm 0,\!03$
D82C	A647N	$0,235 \pm 0,007$	$33\% \pm 2\%$	0.6 ± 0.1
T139C	A647N	$0,179 \pm 0,004$	$59\% \pm 2\%$	0.9 ± 0.1
P68C	A647N	$0,155 \pm 0,002$	$29\% \pm 2\%$	0.6 ± 0.1
E111C	A647N	0.124 ± 0.002	$65\% \pm 2\%$	$1{,}1\pm0{,}1$
-	A647N	$0,036 \pm 0,003$	$99,9\% \pm 0,1\%$	$0,72 \pm 0,02$
$\overline{\mathrm{D82C}/\mathrm{T139C}}$	A655	0.127 ± 0.005	$70\% \pm 2\%$	0.9 ± 0.1

Tab. 4.11.:

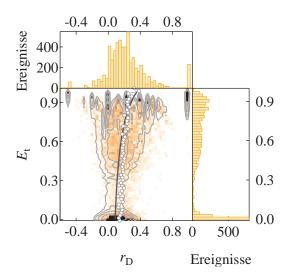
Rotationskorrelationszeiten durch Anpassung der Gl. (3.19) an den zeitabhängigen Anisotropiezerfall. Dabei wurde die globale Rotationskorrelationzeit des Proteins mit $\theta_{\rm Prot}=10\,\rm ns$ und die Amplitude auf A=0,38 (für AF488) bzw. A=0,4 (für A647N und A655) festgehalten. Die Fehler ergeben sich aus den Abweichungen, wenn der Zeitbereich für die Anpassung der Kurven variiert wird. Die Gleichgewichtsanisotropien wurden aus den mittleren Intensitäten nach Gl. (3.17) berechnet, wobei eine Zeitauflösung von $\Delta t=1\,\rm s$ gewählt wurde. Die Fehler ergeben sich aus der Fehlerfortpflanzung der statistischen Schwankungen in den einzelnen Detektionskanälen. Zu beachten ist, dass für A655 nur eine Messung an der mit zusätzlich AF488 markierten Doppelvariante möglich war. Für die Farbstoffe AF488 und A647N sind zum Vergleich die Daten der freien Farbstoffe angegeben.

Moleküle, die zur Komponente des langsamen Anisotropiezerfalls beitragen und somit eine Wechselwirkung zwischen Protein und Farbstoff aufweisen, durch die Sortierung der Einzelmolekülereignisse nach dem POE-Schema in die Betrachtung einfließen. Um diese Frage zu klären, inwiefern eine eventuelle Wechselwirkung des Donorfarbstoffes AF488 mit dem Protein die Energietransfereffizienz einzelner doppelt fluoreszent markierter TtSlyD-Moleküle beeinflusst und somit die Form und Breite der Energietransfereffizienz-Verteilung verändern kann, wird eine zusätzliche Anisotropiebestimmung auf Einzelmolekül-Niveau durchgeführt. Mit einem angepassten Detektionsstrahlengang (Abb. 3.5(a)) wird das Donorfluoreszenzlicht polarisationsabhängig aufgetrennt. So kann für jedes Einzelmolekül-Ereignis neben der Energietransfereffizienz $E_{\rm t}$ die Gleichgewichtsanisotropie des Donors $r_{\rm D}$ bestimmt werden. Hohe Anisotropiewerte spiegeln Ereignisse wider, die durch klebende Farbstoffe erzeugt werden. Würde nun die eingeschränkte Rotation oder das Kleben des Donorfarbstoffes die Transfereffizienz beeinflussen, müssten diese beiden Größen miteinander korreliert sein. Dies würde in einer zweidimensionalen Darstellung (Abb. 4.16) entweder zur Auftrennung in einzelne Gruppen oder mindestens zu einer Asymmetrie der Verteilung führen, sodass zum Beispiel kleine Anisotropiewerte zu hohen Transfereffizienzen gehören und andersherum.

Diese Korrelation ist in Abb. 4.16 nicht zu sehen. Die Anisotropiewerte sind symmetrisch verteilt. Die leichte Verschiebung zu höheren Anisotropiewerten mit steigender Transfereffizienz ist durch das FRET-Löschen des Donors zu begründen. Dessen Fluoreszenzlebensdauer verkürzt sich nach Gl. (2.29). Der theoretische Verlauf nach Gl. (2.15) und Gl. (2.29) bei einer

Abb. 4.16:

Einzelmolekül-Anisotropie-Analyse. Für jedes Einzelmolekülereignis $(S_{\text{sum}}^{488} > 40 \,\text{s}^{-1})$ wird aus den Photonen die Anisotropie des Donors r_D und die Energietransfereffizienz berechnet (Falschfarbendiagramm in zweidimensionaler, Balkendiagramme in eindimensionaler Darstellung). Für alle Ereignisse innerhalb eines Intervalls mit $\Delta E_{\rm t} = 0.02$ werden die Mittelwerte von r_D berechnet (graue Kreise). Zum Vergleich werden Daten simuliert (Konturen im zweidimensionalen Histogramm), die sich aus den Photonenzählraten und $E_{\rm t}$ ergeben, wobei $r_0 = 0.38$, $\tau_{\rm D}=3.8\,{\rm ns}$ (ohne Akzeptor) und $\theta_{\rm dye}=1.1\,{\rm ns}$ sind. Für jedes Ereignis wird $\tau_{\rm D}$ entsprechend $E_{\rm t}$ nach Gl. (2.29) angepasst. Diese Abhängigkeit nach Gl. (2.29) ist als schwarze Linie dargestellt. Für die experimentellen Daten wurde die doppelt markierte Variante $\mathrm{D82C}/\mathrm{T139C}$ des Proteins $\mathit{Tt}\mathrm{SlyD}$ im POE-Schema $(40\,\mu\mathrm{W}$ bei $488\,\mathrm{nm},\ 15\,\mu\mathrm{W}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz})$ angeregt.



vorgegebenen Rotationskorrelationszeit von $\theta=1,1$ ns und einer Fundamentalanisotropie von $r_0=0,38$ ist in Abb. 4.16 als schwarze Linie dargestellt. Die experimentelle Verteilung folgt in ihrem Mittelwert (graue Kreise) diesem Verlauf. Zusätzlich wurde eine Verteilung ausgehend von den experimentell bestimmten $E_{\rm t}$ - und den sich daraus ergebenden Anisotropiewerten simuliert (Abschnitt 3.4.2), die nur durch das Schrotrauschen aufgeweitet ist. Die simulierte Verteilung (graue Konturen) gibt die experimentelle Verteilung sehr gut wieder. Selbst die Singularitäten für $E_{\rm t}\approx 0,9$, bedingt durch die geringe Anzahl der detektierten Donorphotonen, sind reproduzierbar. Sowohl aus dem Vergleich mit dem theoretischen Verlauf als auch mit dem simulierten Datensatz geht hervor, dass es keinen korrelierten Zusammenhang zwischen der Donoranisotropie und der Energietransfereffizienz gibt. Somit ist die Annahme einer freien Rotation des Donors gerechtfertigt.

Einfluss auf die Rotationsfreiheit des Donors Die eingeschränkte freie Rotation des Donorfarbstoffes AF488 kann durch die Titration mit dem Denaturierungsmittel GdHCl beeinflusst werden, wie durch zeitabhängige Messungen der Anisotropie an der Doppelvariante D82C/T139C gezeigt werden konnte (Abb. 4.17(b) und 4.17(e)). Mit steigender GdHCl-Konzentration sinkt der Anteil klebender Farbstoffe (1-y) deutlich. Dies deutet auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Proteinoberfläche und dem Farbstoff hin, welche durch das Denaturierungsmittel aufgehoben werden können. Nach Rückfaltung des Proteins durch Verdünnung im nativen Probenpuffer kommt es wieder zu einer messbaren Wechselwirkung mit AF488 (Abb. 4.17(c)). Elektrostatische Wechselwirkungen, die auch durch ein alternatives Salz wie NaCl abgeschirmt werden könnten [95], können ausgeschlossen werden, da eine Titration mit NaCl keinen systematischen Effekt zeigt (Abb. 4.17(a) und 4.17(d)). Desweiteren folgt aus den Messungen an der Doppelvariante selbst ohne Denaturierungsmittel ein relativ hoher Anteil frei rotierender Farbstoffe mit $y = (77 \pm 2)\%$. Daraus kann durch

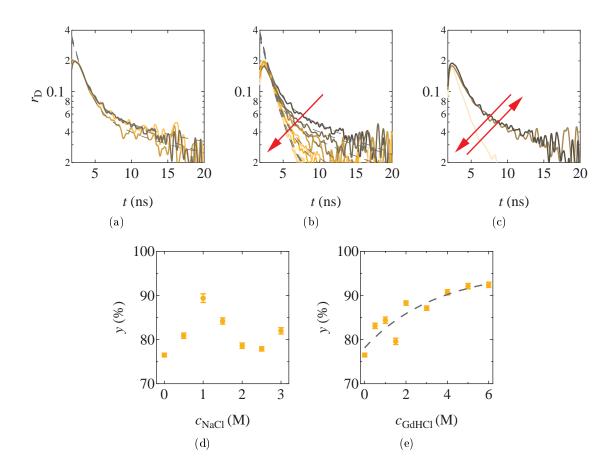


Abb. 4.17.:
Einfluss des Probenpuffers auf die Rotationsfreiheit des Donorfarbstoffes AF488. Eine erhöhte NaCl-Konzentration (grau: 0,1 M, braun: 1,5 M, orange: 3,0 M) hat wenig Einfluss auf den Anisotropie-

NaCl-Konzentration (grau: 0,1 M, braun: 1,5 M, orange: 3,0 M) hat wenig Einfluss auf den Anisotropie-zerfall (a,d), wohingegen das Denaturierungsmittel GdHCl die Rotationsfreiheit deutlich erhöht (b,e). Der Anteil freier Farbstoffe nimmt mit steigender Konzentration an GdHCl (grau zu gelb: 0 M-6 M in 1 M-Schritten) zu (roter Pfeil in (b)). Eine Rückfaltung durch Verdünnung von $c_{\rm GdHCl} = 5 \, \rm M$ (gelb) auf $c_{\rm GdHCl} = 0.5 \, \rm M$ (braun) führt jedoch wieder zur eingeschränkten Rotation (c). Die doppelt markierte Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde mit einem gepulsten Laser (470 nm, 10 MHz) angeregt.

additive Zusammensetzung der Angaben für die Einzelvarianten (Tab. 4.11) abgeschätzt werden, dass der Donorfarbstoff überwiegend, zu etwa (85-90)%, an der Bindungsstelle D82C statt an T139C bindet. Somit wird die Aussage gestützt, dass die Form des $E_{\rm t}$ -Histogramms der Doppelmutante nicht durch die Wechselwirkungen an der Stelle T139C begründet ist. Mit den relativen Anteilen $y\approx 92$ % für sehr hohe Denaturierungsmittelkonzentrationen (Abb. 4.17(e)) werden die Grenzen der Analyse-Methode ersichtlich. Denn auch im Fall freier Rotation läuft y nicht gegen 100%, sondern wird mit kleineren Werten angepasst. Dies ist für die Interpretation der Werte aus Tab. 4.11 zu beachten.

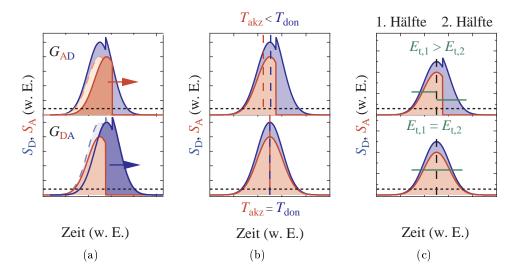


Abb. 4.18.:

Methoden zur Analyse des Photobleichens. Dargestellt sind idealisierte Einzelmolekülereignisse, die im Donorkanal (blau) und Akzeptorkanal (rot) detektiert und durch einen Schwellwert (schwarz gestrichelte Linie) sortiert werden. (a) Abhängig davon, ob das Donorsignal (blau) den Kern der Korrelation bildet und das Akzeptorsignal (rot) verschoben wird (oben) oder umgekehrt (unten), kommt es in den Kreuzkorrelationen ($G_{\rm AD}$, $G_{\rm DA}$) im Fall des Photobleichens vom Akzeptor zu einem zusätzlichen Anstieg bzw. Abfall. Dies äußert sich in einer apparenten Verschiebung der Kreuzkorrelationskurven gegeneinander. (b) Vergleich der mittleren Detektionszeiten von Donor- und Akzeptorphotonen innerhalb eines Einzelmolekülereignisses. Bleicht der Akzeptor, führt dies zu negativen Zeitdifferenzen $T_{\rm akz} - T_{\rm don}$ (oben), ohne Bleichen liegen die Zeiten übereinander (unten). (c) Durch Photobleichen des Akzeptors werden tendenziell in der zweiten Hälfte der Einzelmolekülereignisse weniger Akzeptorphotonen gezählt und $E_{\rm t}$ (grüne Linie) unterschätzt (oben), ohne Bleichen ist in beiden Hälften $E_{\rm t}$ gleich.

4.3.2.4. Photobleichen

Das Photobleichen der Farbstoffe während der Einzelmolekülereignisse kann zur Verfälschung der berechneten Energietransfereffizienzen führen. Bleicht der Donor zuerst, wird entweder vom Donor keine Energie mehr absorbiert oder keine Energie mehr übertragen. Sowohl Donor als auch Akzeptor sind dunkel. Das führt zu einer geringeren Photonenanzahl, aber nicht zu einer Verschiebung von E_t . Bleicht jedoch der Akzeptor zuerst, kann der Donor entweder heller werden aufgrund des fehlenden Energietransfers [96]. Oder der Donor leuchtet gleichbleibend oder sogar mit einer geringeren molekularen Helligkeit weiter, da auch Energietransfer zum geblichenen Akzeptor möglich ist [97]. In allen Fällen wird durch die unterschätzte Zahl der Akzeptorphotonen pro Ereignis die Energietransfereffizienz unterbewertet.

Ob das Photobleichen von A647N als Akzeptor bei den vorgestellten Experimenten mit TtSlyD eine Rolle spielt, kann durch verschiedene Kontrollexperimente festgestellt werden [98], die im Prinzipbild in Abb. 4.18 dargestellt sind.

Aufgrund des spontanen Photobleichens des Akzeptors ist der Signalverlauf im Donor- und Akzeptorkanal (F_D , F_A) asymmetrisch. Diese Asymmetrie kommt zum einen bei der Berechnung der Kreuzkorrelation der Signale zum Tragen. Je nachdem, welches Signal den Kern der Korrelationsfunktion bildet (G_{DA} , G_{DA}), kommt es zu einem zusätzlichen Anstieg bzw.

Abfall auf der Zeitskala des Bleichens. Neben der Kreuzkorrelation kann das Photobleichen auch über eine Verschiebung der Zeiten $T_{\rm akz}$ und $T_{\rm don}$, die die mittlere Detektionszeit der Photonen innerhalb eines jeden Einzelmolekülereignisses beschreiben, erkannt werden. Ohne Photobleichen liegen die Zeiten übereinander. Bleicht der Akzeptor, ist der Schwerpunkt im Akzeptorkanal zu kleineren Zeiten verschoben und die Differenz $T_{\rm akz} - T_{\rm don}$ negativ. Ein drittes Kontrollverfahren liefert das zeitliche Auftrennen der Einzelmolekülereignisse in deren Mitte. Aus den ersten und zweiten Hälften werden getrennt $E_{\rm t}$ -Verteilungen berechnet. Durch das Photobleichen des Akzeptors wird $E_{\rm t}$ in der zweiten Hälfte tendenziell unterschätzt, die Histogramme werden für geringe Werte von $E_{\rm t}$ überbetont. Alle drei Kontrollanalysen wurden auf die experimentellen Daten der doppelt markierten Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD angewendet und werden im Folgenden aufgeführt.

Kreuzkorrelation Zur Veranschaulichung der Effekte auf die Kreuzkorrelation wurde ein einfaches System in Abb. 4.19(a) simuliert. Innerhalb einer Box mit reflektierenden Wänden wurden dreidimensionale Zufallswege nach Monte-Carlo-Methoden zufällig ermittelt. Entsprechend einer gaußförmigen Intensitätsverteilung wurden transiente Intensitäten beider Kanäle berechnet, die mit einem Poissonrauschen als Hintergrund überlagert wurden. War die Intensität im Akzeptorkanal für eine Zeit $t_{\rm B}$ größer als ein gesetzter Grenzwert, wurde die Intensität im Akzeptorkanal auf das Hintegrundsignal gesetzt und so das Photobleichen simuliert. Findet das Bleichen sehr schnell statt, kommt es zu deutlichen Unterschieden in den Korrelationsfunktionen. Bei spätem Bleichen führen der zusätzliche Anstieg/ Abfall eher zu einem apparenten Versatz beider Kurven im Vergleich zu denjenigen ohne Bleichereignisse. Dieser Versatz kann als Verschiebung der apparenten Diffusionszeiten ($\tau_{\rm AD} - \tau_{\rm DA}$) durch Anpassen der Gl. (2.57) an die Korrelationskurven bestimmt werden.

Für TtSlyD wurde bei verschiedenen Anregungsleistungen ($\lambda=488\,\mathrm{nm}$) diese Verschiebung beider Korrelationsfunktionen berechnet und graphisch aufgetragen (Abb. 4.19(b)). Für die Anpassung der Kurven wurden die Parameter b=0,8 und S=0,2 festgehalten. Mit steigender Anregungsleistung nimmt die apparente Verschiebung der Korrelationskurven zu. Die Daten für $\tau_{\mathrm{AD}}-\tau_{\mathrm{DA}}$ können mit einer linearen Funktion beschrieben werden, die extrapoliert durch den Nullpunkt verläuft. Dieses Verhalten weist deutlich auf ein leistungsabhängiges Photobleichen des Akzeptors hin.

Analyse der mittleren Detektionszeiten Für jedes Einzelmolekülereignis, das die Summenschwelle $(S_{\text{sum}}^{488})_{\text{min}}$ erfüllt, wurden die mittleren Detektionszeiten der Photonen in beiden Kanälen berechnet und deren Differenz zusammen mit der Energietransfereffizienz in einem zweidimensionalen Histogramm aufgetragen (Abb. 4.19(c)). Die zweidimensionale Verteilung ist im Wesentlichen symmetrisch um $T_{\text{akz}} - T_{\text{don}} = 0$ ms verteilt. Allerdings werden im Bereich $0,1 < E_{\text{t}} < 0,4$ vermehrt Ereignisse mit negativen Zeitdifferenzen gezählt. Dies wird auch deutlich, wenn die eindimensionalen $(T_{\text{akz}} - T_{\text{don}})$ -Histogramme für bestimmte E_{t} -Bereiche berechnet werden (Abb. 4.19(d)). Das Photobleichen des Akzeptors führt folglich vor allem im Bereich zwischen den Ereignissen ohne aktiven Akzeptor $(E_{\text{t}} \approx 0)$ und denen des doppelt

markierten Proteins $(E_t > 0.4)$ zum Auffüllen und Verschmieren der Verteilung.

Auftrennen der Einzelmolekülereignisse Die separate Berechnung der $E_{\rm t}$ -Verteilung für die vordere und linke Hälfte der Einzelmolekülereignisse ist für $Tt{\rm SlyD}$ in Abb. 4.19(e) dargestellt. Für die zweite Hälfte der Ereignisse wird die Energietransfereffizienz im Bereich $0.1 < E_{\rm t} < 0.4$ stärker betont. Diese Verschiebung zu geringeren Werten ist ebenso ein Indiz für das Photobleichen des Akzeptors.

Vergleich der Kontrollverfahren Vergleicht man die Methoden in Abb. 4.19, stellen der Vergleich der Detektionszeiten (Abb. 4.19(c)) und die zeitliche Auftrennung der Einzelmolekülereignisse (Abb. 4.19(e)) gegenüber der Kreuzkorrelation die weniger sensitiven Methoden dar. Darüberhinaus ist die Auftrennung der Einzelmolekülereignisse in ihrer Anwendung durch die geringen Photonenzahlen und kurzen Diffusionszeiten der Moleküle durch das Anregungsvolumen begrenzt. Für eine schnelle und sensitive Kontrolle ist folglich die Berechnung der Korrelationsfunktionen in beiden Richtungen und deren Vergleich durchzuführen.

Sortieren des Photobleichens durch eine Akzeptorschwelle Das in dieser Arbeit verwendete POE-Schema bietet zum einen die Möglichkeit, Ereignisse verursacht durch Moleküle, die nur donormarkiert sind, herauszusortieren. Zum anderen können aber auch Ereignisse, die durch Photobleichen des Akzeptors geprägt sind, sortiert werden. Denn neben der Summenschwelle muss auch die Akzeptorschwelle erfüllt werden, was im Fall des Photobleichens nicht mehr gegeben ist. Die Zeitschritte nach dem Bleichen werden folglich heraussortiert. Die Effizienz dieses Sortierens wird in Abb. 4.20 mit allen drei Kontrollverfahren veranschaulicht. Die Unterschiede zwischen den beiden Korrelationsrichtungen werden mit steigender Akzeptorschwelle minimiert (Abb. 4.20(a)). Allerdings werden dadurch auch viele Photonen aus der Auswertung sortiert, sodass die Korrelationskurven stark verrauschen. Für die Variante P68C/E111C des Proteins TtSlyD wurden sowohl die Energietransfereffizienz als auch das logarithmische Intensitätsverhältnis bei der Anwendung verschiedener Akzeptorschwellen berechnet. Auch in diesem Fall konnte eine Minimierung der Unterschiede in den Korrelationsrichtungen bestätigt werden (Abb. A.3 im Anhang).

Bei der Analyse der Detektionszeiten in den unterschiedlichen Kanälen kann eine symmetrische Verteilung um $T_{\rm akz}-T_{\rm don}=0\,{\rm ms}$ festgestellt werden (Abb. 4.20(b)).

Auch die separat berechneten $E_{\rm t}$ -Verteilungen für die beiden Hälften der Einzelmolekülereignisse liefern keine systematischen Unterschiede mehr (Abb. 4.20(c)). Somit ist die Effizienz des POE-Schemas durch mehrere Kontrollversuche bestätigt wurden. Es kann zusammengefasst werden, dass es mit A647N als Akzeptor zwar zum Photobleichen kommt, diese Ereignisse aber durch die gezielte Ausnutzung des POE-Schemas von der Auswertung ausgeschlossen werden können.

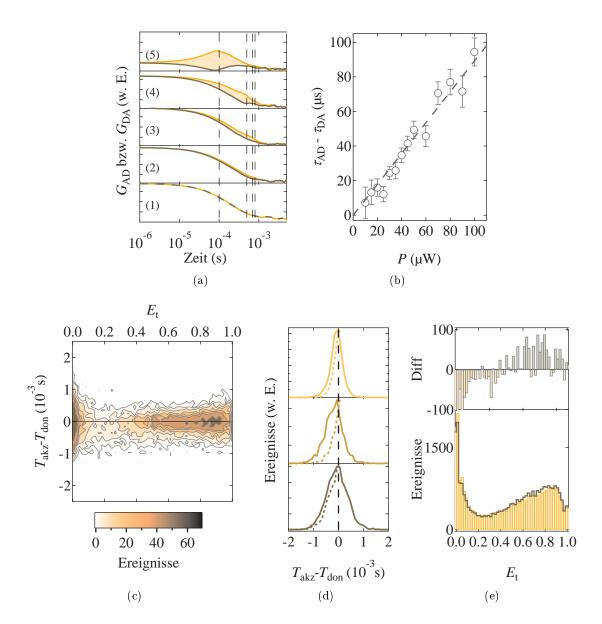


Abb. 4.19.:

Anwendung der Methoden zur Analyse des Photobleichens. (a) Kreuzkorrelation ($G_{\rm AD}$: orange, $G_{\rm DA}$: braun) simulierter transienter Intensitäten, wobei das Photobleichen des Akzeptors nach der Zeit $t_{\rm B}$ mit 100 $\mu{\rm s}$ (5), 500 $\mu{\rm s}$ (4), 700 $\mu{\rm s}$ (3), 800 $\mu{\rm s}$ (2) eintritt (1: ohne Photobleichen). Das Akzeptorsignal wird dann auf den Hintergrund reduziert, das Donorsignal nimmt um den fehlenden Energietransfer zu. (b) Absolute Differenzen zwischen den apparenten Diffusionszeiten der Kreuzkorrelationen $G_{\rm DA}$ und $G_{\rm DA}$. Die doppelt markierte Variante D82C/T139C des Proteins $Tt{\rm SlyD}$ wurde bei verschiedenen Leistungen kontinuierlich bei 488 nm angeregt. Alle Photonen, ohne Auswahl von Einzelmolekülereignissen, wurden korreliert. (c) 2D-Histogramm über die Differenzen in der mittleren Detektionszeit pro Kanal und die Energietransfereffizienzen für jedes Einzelmolekülereignis ($S_{\rm sum}^{488} > 40~{\rm s}^{-1}$). (d) Die Differenzen ($T_{\rm akz} - T_{\rm don}$) wurden separat für Ereignisse mit 0,0 < $E_{\rm t}$ < 0,1 (unten), 0,1 < $E_{\rm t}$ < 0,4 (Mitte) und 0,4 < $E_{\rm t}$ < 1,0 (oben) berechnet. Ohne Photobleichen des Akzeptors sollten die Verteilungen, durch Photonenrauschen bedingt, symmetrisch um $T_{\rm akz} - T_{\rm don} = 0~{\rm ms}$ verteilt sein (gestrichelte Linien). (e) Histogramm über die Energietransfereffizienz, separat berechnet für die erste Hälfte (braune Linie) und zweite Hälfte (gelbe Balken) der Einzelmolekülereignisse ($S_{\rm sum}^{488} > 20~{\rm s}^{-1}$) und deren Differenz (oben).

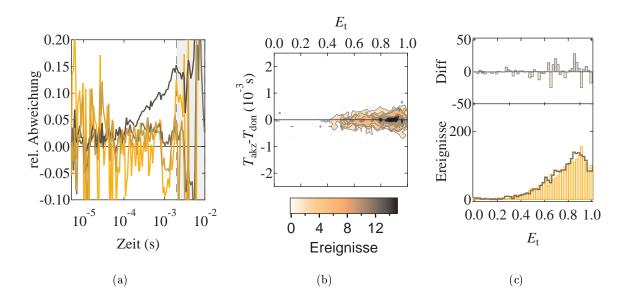


Abb. 4.20.:

Analyse des Photobleichens nach Anwendung der Akzeptorschwelle. (a) Differenzen der Kreuzkorrelation in beide Richtungen für verschiedenen Akzeptorschwellen ($S_{\rm akz}^{635} > 0\,{\rm s}^{-1}$ (dunkelbraun), $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$ (braun), $S_{\rm akz}^{635} > 20\,{\rm s}^{-1}$ (ockar), $S_{\rm akz}^{635} > 30\,{\rm s}^{-1}$ (orange)) bei konstanter Summenschwelle ($S_{\rm sum}^{488} > 20\,{\rm s}^{-1}$).(b) Zweidimensionale Darstellung über die Differenz der Detektionszeiten und die Energietransfereffizienz pro Einzelmolekülereignis ($S_{\rm sum}^{488} > 40\,{\rm s}^{-1}$, $S_{akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$). (c) $E_{\rm t}$ -Verteilung für die erste (braune Linie) und für die zweite Hälfte (gelbe Balken) der Einzelmolekülereignisse ($S_{\rm sum}^{488} > 20\,{\rm s}^{-1}$, $S_{\rm akz}^{635} > 30\,{\rm s}^{-1}$) und deren Differenz zueinander (oben). Die Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde in einem beugungsbegrenzten Fokus im POE-Anregungsschema ($100\,\mu{\rm W}$ (a) bzw. $40\,\mu{\rm W}$ (b+c) bei $488\,{\rm nm}$, $15\,\mu{\rm W}$ bei $635\,{\rm nm}$ und $10\,{\rm MHz}$) angeregt.

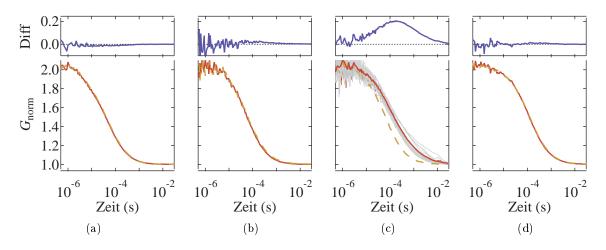


Abb. 4.21.:

Kontrolle von unspezifischen Farbstoffbindungen durch Korrelation. Test auf unspezifische Bindung der Farbstoffe an die nicht markierte Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD. Das Protein wurde in einem ungefähren Verhältnis von 1:1 mit AF488 (a), A655 (b) bzw. A647N (c) im Puffer gemischt und nach einer Inkubationszeit von t=2h im beugungsbegrenzten Fokus bei einer Konzentration von $c\approx 1$ nM angeregt und die Photonen korreliert (rote Linien). Zum Vergleich wurde der reine Farbstoff unter denselben Bedingungen gemessen (gelb gestrichelt). Die Messung erfolgte mit einem Pinhole ($d=50\,\mu\mathrm{m}$). Die Pseudoautokorrelation wurde normiert. Die Differenzen zwischen den Korrelationen der Kurven mit und ohne Protein sind aufgetragen (blaue Linie). In (c) sind die normierten Korrelationen für Zeitabschnitte von 30 s einzeln dargestellt (grau), um die Heterogenität der Probe zu verdeutlichen. (d) Die Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff A647N und dem Protein kann durch das Denaturierungsmittel GdHCl (6 M) aufgelöst werden. Dabei wird allerdings auch das Protein TtSlyD vollständig entfaltet.

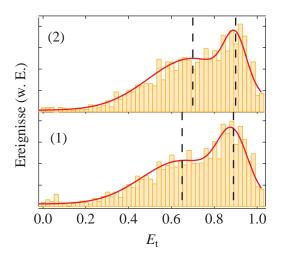
4.3.2.5. Unspezifische Bindung der Farbstoffe

Ursache für verfälschte E_t -Werte können auch unspezifisch gebundene Farbstoffe am Protein sein. Die Kontrolle auf die Möglichkeit solch einer Bindung der Farbstoffe erfolgte zum einen durch Korrelationsanalyse der nicht markierten Doppelvariante D82C/T139C des Proteins TtSlyD nach Zugabe der Farbstoffe AF488, A655 bzw. A647N (rote Linie in Abb. 4.21). Die Mischung von Protein und Farbstoff erfolgte in einem ungefähren Verhältnis von 1:1 und wurde für $t=2\,\mathrm{h}$ inkubiert. Zum Vergleich wurde jeweils für den freien Farbstoff eine Korrelationskurve aufgenommen (gelb gestrichelt in Abb. 4.21). Für die Farbstoffe AF488 und A655 können keine signifikanten Unterschiede (blaue Linien in Abb. 4.21) vor und nach der Mischung mit dem Protein festgestellt werden. Unspezifische Wechselwirkungen können somit ausgeschlossen werden. Für A647N jedoch wird nach Mischung mit dem Protein die Diffusionszeit deutlich zu längeren Zeiten hin verschoben. Desweiteren weisen die Korrelationskurven, wenn sie für einzelne Zeitabschnitte von 30s der Gesamtmessung berechnet werden, eine große Streuung auf (graue Linien in Abb. 4.21(c)). Dies deutet auf unspezifische Wechselwirkungen hin, die zur vielfältigen Aggregation des Proteins führen. Diese Bindungseffekte können durch die Zugabe des Denaturierungsmittels GdHCl aufgehoben werden (Abb. 4.21(d)).

Dieses Ergebnis würde die Schlussfolgerung erlauben, dass der Akzeptorfarbstoff A647N vielfältig und unkontrolliert an der Oberfläche des Proteins klebt. Eine Auswertung der $E_{\rm t}$ -

Abb. 4.22:

Kontrolle von unspezifischen Farbstoffbindungen durch Vergleich der Energietransfereffizienzen. Eventuell unspezifische gebundene A647N-Farbstoffe wurden durch GdHCl gelöst und durch Ultrazentrifugation bei 14000 g durch einen Filter mit dem Grenzwert von 3 kDa vom Protein getrennt. Dieses wurde durch Verdünnung im nativen Puffer zurückgefaltet. Aus den intensitätskorrigierten Ereignis- $\sin (S_{\text{sum}}^{488} > 100 \,\text{s}^{-1}, S_{\text{akz}}^{635} > 50 \,\text{s}^{-1})$ beider Proteinproben, vor (1) und nach (2) der Aufreinigung, wurde die E_t-Verteilung berechnet und mit einem Zwei-Gauß-Modell (rote Linie) angepasst. Die doppelt markierte Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde in einem beugungsbegrenzten Fokus im POE-Schema $(40 \,\mu\mathrm{W})$ bei $488 \,\mathrm{nm}$, $15 \,\mu\mathrm{W}$ bei $635 \,\mathrm{nm}$ und 10 MHz) angeregt.



Verteilung wäre nicht möglich.

Ein weiteres Kontrollexperiment mit der im Gegenzug bereits markierten Doppelvariante zeigte jedoch, dass die unspezifische Bindung während des Markierungsverfahrens der Cysteine keinen Einfluss hat. Eventuelle unspezifisch gebundene Farbstoffe wurden durch Verdünnung in einem hochkonzentrierten Denaturierungspuffer ($c_{\rm GdHCl}=6\,\rm M$) gelöst und durch Ultrazentrifugieren durch einen Filter vom Protein getrennt. Die aufgereinigte und rückgefaltete Probe zeigt jedoch keinen messbaren Unterschied in der $E_{\rm t}$ -Verteilung zur Probe vor der Aufreinigung. Wahrscheinlich ist die Reaktivität der reduzierten Thiolgruppen so hoch, dass die konkurrierende unspezifisch hydrophobe Bindung keinen Einfluss hat. Zusammenfassend können unspezifische Bindungen der benutzten Farbstoffe mit $Tt{\rm SlyD}$ ausgeschlossen werden.

4.3.2.6. Weitere Markierungsmöglichkeiten des Proteins TtSlyD

Alternativer Akzeptorfarbstoff Da der Akzeptorfarbstoff aufgrund seines hydrophoben Charakters zu Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche neigt (Abschnitt 4.3.2.3), wurde ein alternativer Farbstoff, Atto 655 (A655), eingeführt. Die verminderte Hydrophobizität geht jedoch mit einem Abfall der Quantenausbeute von $Q_{\rm A}=0.65$ für A647N auf $Q_{\rm A}=0.3$ für A655 einher (lt. Herstellerangaben). Dadurch können bei gleichen Anregungsleistungen nur geringere Zählraten und ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt werden. Zur Berechnung der Energietransfereffizienz wurde der Korrekturfaktor nach Gl. (2.32)-(2.33) mit den Filterkorrekturwerten ($q_{\rm D}=0.28,\ q_{\rm A}=0.34$) und den Herstellerangaben für die Fluoreszenzquantenausbeute ($Q_{\rm D}=0.8,\ Q_{\rm A}=0.3$) zu $\gamma=0.46$ bestimmt. Die korrigierten Verteilungen für verschiedene Schwellwerte nach direkter Akzeptoranregung sind in Abb. 4.23 dargestellt. Wegen der geringen Photonenzahl im Akzeptorkanal hat die Anwendung einer zusätzlichen Akzeptorschwelle deutlichen Einfluss auf die Form der Verteilung. Somit wurden die Daten ohne Akzeptorschwelle (gelbes Balkendiagramm in Abb. 4.23) durch ein

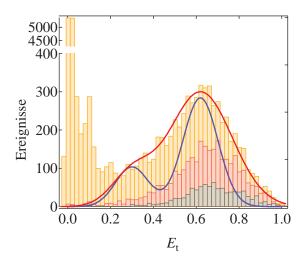


Abb. 4.23:

Atto 655 (A655) als Alternative zum Akzeptor A647N. Die doppelt markierte Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde in einem beugungsbegrenzten Fokus im POE-Schema $(40 \,\mu\text{W})$ bei $488 \,\text{nm}$, $10 \,\mu\text{W}$ bei $635 \,\text{nm}$ und 20 MHz) angeregt. Es wurden nur die Einzelmolekülereignisse betrachtet, die die Schwel- $\begin{array}{ll} {\rm len} \ S_{\rm sum}^{488} > 20 \, {\rm s}^{-1} \ {\rm und} \ S_{\rm akz}^{635} > 0 \, {\rm s}^{-1} \ ({\rm gelb}) \ {\rm bzw}. \\ S_{\rm akz}^{635} > 5 \, {\rm s}^{-1} \ ({\rm rot}) \ {\rm bzw}. \ S_{akz}^{635} > 10 \, {\rm s}^{-1} \ ({\rm braun}) \ {\rm er}. \end{array}$ füllen. Die Energietransfereffizienzen wurden korrigiert. Die Daten ohne Anwendung der Akzeptorschwelle wurden im Bereich $E_{\rm t}=0,2...1,0$ an ein Zwei-Gauß-Modell angepasst (rote Linie). Aus den mittleren Transfereffizienzen $\langle E_{t,1} \rangle =$ 0.30 ± 0.02 und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.62\pm0.01$ und der mittleren Photonenzahl pro Ereignis $(\langle n_D \rangle + \langle n_A \rangle = 35)$ wurde eine durch Schrotrauschen begrenzte Verteilung nach dem Modell in Gl. (2.48) berechnet (blaue Linie).

Zwei-Gauß-Modell angepasst (rote Linie). Zum Vergleich ist die durch Schrotrauschen begrenzte, simulierte Verteilung aufgeführt (blaue Linie).

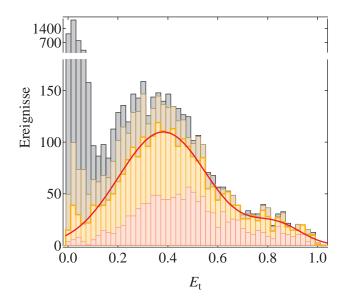
Auch mit A655 erhält man eine bimodale Verteilung, die allerdings stärker, und somit auch über das Schrotrauschen hinweg, verbreitert ist. Die Verteilung ist insgesamt zu niedrigeren E_t -Werten verschoben. Dies spricht gegen die Erwartung, da das Farbstoffpaar, AF488 und A647N, mit $R_0 = 65,5$ Å (mit $Q_D = 0,8$ und Spektren lt. Herstellerangaben) einen deutlich höheren Försterradius hat als AF488 und A647N (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Der Zustand mit geringeren Energietransfereffizienzen ($\langle E_{t,1} \rangle = 0,30 \pm 0,02$) ist vergleichsweise geringer populiert, als es in Abschnitt 4.3 diskutiert wurde. Folgende Aspekte müssen jedoch beachtet werden. Die Korrektur der Daten basiert auf Herstellerangaben und wurde nicht explizit für die gebundene Form der Farbstoffe am Protein bestimmt. Fehler in der Korrektur führen zu einer Verschiebung der Verteilung. Die Populationen können verfälscht werden, da die Aussortierung inaktiver oder fehlender Akzeptorfarbstoffe mit einer zusätzlichen Schwelle nicht möglich ist.

Aus Tab. 4.11 geht hervor, dass die Rotationsfreiheit von A655 vergleichbar mit derjenigen von A647N ist. Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute und der dennoch eingeschränkten Rotationsfreiheit wurde der Akzeptorfarbstoff A655 nicht weiter zum Einsatz gebracht.

Alternative Bindungsstelle Da der Donorfarbstoff AF488 vor allem Wechselwirkungen mit dem Protein gezeigt hat, wenn dieser Farbstoff an der Aminosäure T139C gebunden war, wurde eine alternative Doppelvariante D82C/E137C des Proteins TtSlyD mit dem FRET-Farbstoffpaar, AF488 und A647N, fluoreszent markiert. Die Bindungsstelle des Farbstoffes in der FKBP-Domäne ist also nur um 2 Aminosäuren verschoben. Trotz dieser scheinbar nur kleinen Variation konnten enorme Auswirkungen auf das Protein festgestellt werden.

Abb. 4.24:

Alternative Bindungsstelle mit $Tt \mathrm{SlyD}$ D82C/E137C. Die doppelt markierte Variante D82C/E137C des Proteins $Tt \mathrm{SlyD}$ wurde im POE-Schema (40 $\mu\mathrm{W}$ bei 488 nm, 15 $\mu\mathrm{W}$ bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Es wurden nur die Einzelmolekülereignisse betrachtet, die die Schwellen $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \, \mathrm{s}^{-1}$ und $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 0 \, \mathrm{s}^{-1}$ (schwarz) bzw. $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 5 \, \mathrm{s}^{-1}$ (braun) bzw. $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 10 \, \mathrm{s}^{-1}$ (orange) bzw. $S_{akz}^{635} > 20 \, \mathrm{s}^{-1}$ (rot) erfüllen. Die Daten wurden an ein Zwei-Gauß-Modell angepasst, mit den mittleren Transfereffizienzen $\langle E_{\mathrm{t},1} \rangle = 0.37 \pm 0.01$ und $\langle E_{\mathrm{t},2} \rangle = 0.82 \pm 0.02$.



Bereits mit den Ensemblemessungen (siehe Abschnitt 4.2) wurde eine reduzierte Stabilität dieser Proteinvariante bestimmt. Dieses Ergebnis kann eindeutig durch Einzelmolekül-FRET-Experimente bestätigt werden. In Abb. 4.24 ist die $E_{\rm t}$ -Verteilung bei verschiedenen Schwellwerten dargestellt. Die deutliche Population mit einem Mittelwert von $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.37 \pm 0.01$ deutet auf bereits entfaltete oder teilweise entfaltete Proteine hin. Dies geht aus einem Vergleich mit Entfaltungsexperimenten hervor, wie sie in Abschnitt 4.6 vorgestellt werden. Die Population nativer Proteine im Bereich höherer Energietransfereffizienzen ist fast vernachlässigbar. Die Mutation der Glutaminsäure zu einem Cystein (E137C) scheint die Stabilität des Proteins stark zu beeinflussen. Aus diesem Grund wird die Doppelvariante D82C/E137C für die weiteren Experimente nicht verwendet.

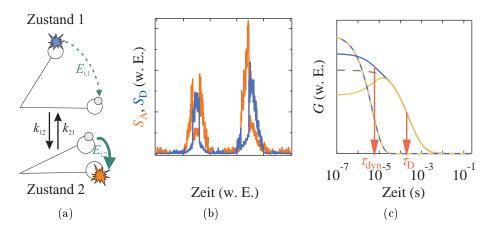


Abb. 4.25.:

Dynamik in einem FRET-System und Analyse dieses FRET-Experimentes. (a) Skizze eines Zwei-Zustands-Systems mit den Energietransfereffizienzen $E_{\rm t,1}$ und $E_{\rm t,2}$. Zwischen den Zuständen kommt es zum dynamischen Austausch mit den Raten k_{12} und k_{21} . (b) Die interne Dynamik führt zu entgegengesetzten, also antikorrelierten Fluktuationen im Donor- (blau) und Akzeptorsignal (rot). (c) Die Signalfluktuationen führen zu einem Abfall der Kreuzkorrelation von Donor und Akzeptor (gelb) und zu einem zusätzlichen Anstieg der Autokorrelation (blau). Durch Division der Korrelationskurven erhält man den diffusionsunabhängigen Quotienten $\frac{G_{\rm dyn,DD}}{G_{\rm dyn,DA}}$ (blau-gelb gestrichelt). Gezeigt sind Kurven mit $\tau_{\rm dyn}=6\,\mu{\rm s}$ bei $\tau_{\rm D}=200\,\mu{\rm s}$ für Donor und Akzeptor.

4.3.3. Interne Dynamik

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die experimentell, photophysikalisch, photochemisch und die durch eingeschränkte Rotation bedingten Einflüsse auf die gemessene Verteilung der Energietansfereffizienz (Abb. 4.9(b)) untersucht. Aus vielfältigen Kontrollmessungen ging hervor, dass die deutliche Verbreiterung der E_t -Verteilung über das Schrotrauschen hinaus nicht allein durch diese Effekte begründet werden kann. Vielmehr ist das Modell mit zwei festen Konformationszuständen und somit zwei festen Farbstoffabständen nicht hinreichend, um das Protein TtSlyD zu erklären. In diesem Kapitel werden dynamische Übergänge zwischen den Konformationen, deren experimenteller Nachweis und deren Einfluss auf die E_t -Verteilung diskutiert. Im ersten Abschnitt wird die Korrelationsanalyse der internen Dynamik nach Torres und Levitus [60] vorgestellt, danach werden diese Zusammenhänge anhand simulierter Daten erläutert. Im dritten Abschnitt werden analog zu den simulierten Datensätzen experimentelle Daten analysiert und mit der Simulation verglichen.

4.3.3.1. Interne Dynamik im Modell

Die experimentell bestimmte Energietransfereffizienz-Verteilung konnte (Abb. 4.9(b)) im einfachsten Fall mit zwei möglichen Zuständen (Zwei-Gauß-Modell) angepasst werden. Dies weist auf zwei Konformationen des Proteins TtSlyD mit zwei unterschiedlichen Farbstoffabständen hin. Dabei sind die IF- und FKBP-Domäne entweder zueinander geschlossen oder offen.

Treten in so einem Zwei-Zustands-System zusätzliche dynamische Änderungen des Abstandes der Farbstoffe eines FRET-Paares auf, führt dies zu entgegengesetzten Intensitätsänderungen im Donor- und Akzeptorkanal (Abb. 4.25(b)). Dieses Prinzip ist in Abb. 4.25 abgebildet. Dabei springt das Zwei-Zustands-System mit den Raten k_{12} und k_{21} zwischen den Energietransfereffizienzen $\langle E_{t,1} \rangle$ und $\langle E_{t,2} \rangle$. Die antikorrelierten Intensitätsänderungen gehen als Abfall in die Kreuzkorrelation und als zusätzlicher Anstieg in die Autokorrelation von Donor- und Akzeptorphotonen im Zeitbereich der internen Dynamik $\tau_{\rm dyn} = \frac{1}{k_{12}} + \frac{1}{k_{21}}$ ein (Abb. 4.25(c)). Torres und Levitus [60] haben folgendes analytische Modell aufgestellt, in dem der diffusive Anteil $G_{\rm diff}$ und der dynamische Anteil $G_{\rm dyn,xy}$ der Korrelationfunktion multiplikativ verknüpft sind. x und y stellen den verallgemeinerten Index dar und können mit A bzw. D für den Akzeptor bzw. den Donor besetzt werden:

$$G_{xy}(\tau) = 1 + G_{dyn,xy}(\tau)G_{diff}(\tau),$$

$$G_{dyn,DD}(\tau) = 1 + \frac{k_{12}k_{21}(\langle E_{t,1} \rangle - \langle E_{t,2} \rangle)^{2}}{[k_{21}(1 - \langle E_{t,1} \rangle) + k_{12}(1 - \langle E_{t,2} \rangle)]^{2}} \exp\left[-(k_{12} + k_{21})\tau\right],$$
(4.6)

$$G_{\text{dyn,AA}}(\tau) = 1 + \frac{k_{12}k_{21}(\langle E_{\text{t},1} \rangle - \langle E_{\text{t},2} \rangle)^2}{\left[k_{21}\langle E_{\text{t},1} \rangle + k_{12}\langle E_{\text{t},2} \rangle\right]^2} \exp\left[-(k_{12} + k_{21})\tau\right],\tag{4.7}$$

$$G_{\text{dyn,DA}}(\tau) = 1 - \frac{k_{12}k_{21}(\langle E_{\text{t},1} \rangle - \langle E_{\text{t},2} \rangle)^{2}}{[k_{21}(1 - \langle E_{\text{t},1} \rangle) + k_{12}(1 - E_{2}\langle E_{\text{t},2} \rangle)](k_{21}E_{1}\langle E_{\text{t},1} \rangle + k_{21}\langle E_{\text{t},2} \rangle)} \dots \\ \dots \exp[-(k_{12} + k_{21})\tau]. \tag{4.8}$$

Durch Division von Auto- und Kreuzkorrelation kann so der diffusive Anteil gekürzt werden, man erhält den allein durch interne Dynamik verursachten Anteil (Abb. 4.25(c), gestrichelte Linie):

$$\frac{G_{\text{DD}}(\tau) - 1}{G_{\text{DA}}(\tau) - 1} = \frac{G_{\text{dyn,DD}}(\tau)}{G_{\text{dyn,DA}}(\tau)},
= \frac{1 + A \exp\left[-(k_{12} + k_{21})\tau\right]}{1 - B \exp\left[-(k_{12} + k_{21})\tau\right]}.$$
(4.9)

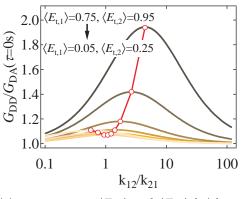
Die Abhängigkeit von der Zeitskala der internen Dynamik k_{12} , k_{21} tritt jedoch nicht nur in dem doppelt auftretenden Exponentialterm, sondern auch in den Amplituden A und B auf:

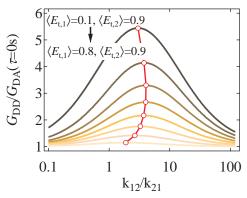
$$A = \frac{k_{12}k_{21}(\langle E_{t,1} \rangle - \langle E_{t,2} \rangle)^{2}}{[k_{21}(1 - \langle E_{t,1} \rangle) + k_{12}(1 - \langle E_{t,2} \rangle)]^{2}},$$

$$B = \frac{k_{12}k_{21}(\langle E_{t,1} \rangle - \langle E_{t,2} \rangle)^{2}}{[k_{21}(1 - \langle E_{t,1} \rangle) + k_{12}(1 - \langle E_{t,2} \rangle)](k_{21}\langle E_{t,1} \rangle + k_{21}\langle E_{t,2} \rangle)}.$$
(4.10)

In Abb. 4.26 ist die Amplitude des $\frac{G_{\text{dyn,DD}}}{G_{\text{dyn,DA}}}$ -Quotienten in Abhängigkeit vom Verhältnis der Raten $\frac{k_{12}}{k_{21}}$ für verschiedene Energietransfereffizienzen aufgetragen.

Der Abstand $\Delta \langle E_{\rm t} \rangle = \langle E_{\rm t,1} \rangle - \langle E_{\rm t,2} \rangle$ bestimmt zum einen die Sensitivität der Methode (Abb. 4.26(b)). Dynamische Übergänge zwischen Zuständen mit großem Unterschied $\Delta \langle E_{\rm t} \rangle$ führen zu großen Amplituden des $\frac{G_{\rm dyn,DD}}{G_{\rm dyn,DA}}$ -Quotienten (braune Kurven). Je dichter die Einzelzustän-





(a) Variation von $\langle E_{\rm t,1} \rangle$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle$ bei konstantem $\Delta \langle E_{\rm t} \rangle = 0.2$

(b) Variation von $\langle E_{\rm t,1} \rangle$ bei $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.9$

Abb. 4.26.:

Korrelationsamplitude bei verschiedenen Ausgangsparametern. Berechnung der Amplitude von $G_{\rm DD}/G_{\rm DA}$ nach dem Modell von Torres-Levitus. (a) Bei konstantem $\Delta\langle E_{\rm t}\rangle = \langle E_{\rm t,1}\rangle - \langle E_{\rm t,2}\rangle = 0,2$ werden die absoluten Werte beginnend mit $\langle E_{\rm t,1}\rangle = 0,75$ und $\langle E_{\rm t,2}\rangle = 0,95$ (dunkelbraun) in Schritten von $\Delta\langle E_{\rm t,1}\rangle = \Delta\langle E_{\rm t,2}\rangle = 0,1$ bis $\langle E_{\rm t,1}\rangle = 0,05$ und $\langle E_{\rm t,2}\rangle = 0,25$ (hellgelb) verkleinert. (b) Bei konstantem $\langle E_{\rm t,2}\rangle = 0,9$ wird $\langle E_{\rm t,1}\rangle$ beginnend bei $\langle E_{\rm t,1}\rangle = 0,1$ (dunkelbraun) in Schritten von $\Delta\langle E_{\rm t,1}\rangle = 0,1$ erhöht bis $\langle E_{\rm t,1}\rangle = 0,8$ (hellgelb). Die Summe der Raten ist $k_{12} + k_{21} = 1000\,{\rm Hz}$.

de auf der Achse der Energietransfereffizienz liegen, desto geringer fällt die Amplitude aus und desto weniger sensitiv ist die Torres-Levitus-Methode zum Nachweis der Dynamik zwischen den Einzelzuständen (gelbe Kurven). Dieses Verhalten wurde auch mit der Simulation eines Zwei-Zustands-Systems bestätigt (Abb. A.7 im Anhang).

Allerdings ist nicht allein der Abstand der beiden Zustände in der Energietransfereffizienz-Verteilung für die Amplitude bestimmend. Es ist leicht zu erkennen, dass bei konstantem $\Delta\langle E_{\rm t}\rangle = \langle E_{\rm t,1}\rangle - \langle E_{\rm t,2}\rangle$ das Ratenverhältnis $\frac{k_{12}}{k_{21}}$ ausschlaggebend ist, wobei diese Abhängigkeit mit den absoluten Werten $\langle E_{\rm t,1}\rangle$ und $\langle E_{\rm t,2}\rangle$ variiert (Abb. 4.26(a)). Für Übergänge im Bereich geringer Energietransfereffizienzen (gelb bis orange) ist die Empfindlichkeit des $\frac{G_{\rm dyn,DD}}{G_{\rm dyn,DA}}$ -Quotienten generell gering, für hohe Energietransfereffizienzen (braun) sind Ratenverhältnisse von $1 < \frac{k_{12}}{k_{21}} < 10$ durch einen deutlichen Anstieg in $\frac{G_{\rm dyn,DD}}{G_{\rm dyn,DA}}$ zu detektieren. Für $\frac{G_{\rm dyn,AA}}{G_{\rm dyn,DA}}$ sind die Tendenzen umgekehrt (Daten nicht gezeigt). Die Amplitude ist zwar wesentlich vom Ratenverhältnis $\frac{k_{12}}{k_{21}}$ bestimmt, sie ist aber unabhängig von der Ratensumme $k_{12} + k_{21}$.

Die Anpassung experimenteller Daten an das Modell von Torres und Levitus erweist sich als sehr schwierig. Die kritischen Punkte werden in den folgenden Abschnitten diskutiert. Aufgrund der komplexen Struktur der Gl. (4.9)-(4.10) ist selbst die Frage der Normierung experimentell bestimmter Korrelationskurven nicht einfach zu beantworten. Eine solche Normierung würde auch ohne analytische Anpassung den Vergleich verschiedener Daten bzgl. des Korrelationsabfalls und somit der Zeitskala der internen Dynamik ermöglichen. Da aber die Raten k_{12} , k_{21} selbst in der Amplitude von $\frac{G_{\rm dyn,DD}}{G_{\rm dyn,DA}}$ enthalten sind, kann eine Normierung diese Information verfälschen. Für den Fall konstanter Raten, aber geringfügig abweichender Energietransfereffizienzen, wie sie durch geringste Dejustage im Experiment schnell auftreten

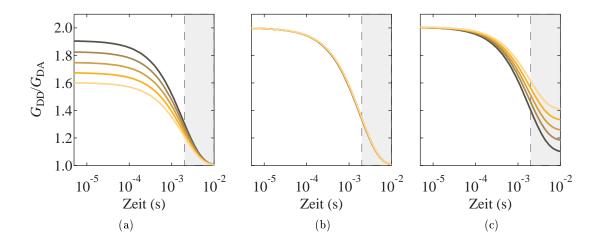


Abb. 4.27.:

Problem der Normierung. (a) Quotient $G_{\rm DD}/G_{\rm DA}$ nach dem Modell von Torres-Levitus. Die Raten sind $k_{12}=400\,{\rm Hz}$ und $k_{21}=100\,{\rm Hz}$, bei konstantem $\langle E_{\rm t,2}\rangle=0.9$ wird $\langle E_{\rm t,1}\rangle$ beginnend bei $\langle E_{\rm t,1}\rangle=0.56$ (dunkelbraun) in Schritten von $\Delta\langle E_{\rm t,1}\rangle=0.02$ bis zu $\langle E_{\rm t,1}\rangle=0.64$ (hellgelb) erhöht. (b) Normierung durch Skalierung der Amplituden auf den Wert $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}(\tau=0)=2.0$. (c) Normierung durch Verschiebung der Kurven auf eine gemeinsame maximale Amplitude.

können, kann jedoch durch das Beispiel in Abb. 4.27 gezeigt werden, dass eine Normierung durch Reskalierung der Datensätze erlaubt ist (Abb. 4.27(b)). Die alleinige Verschiebung der Korrelationskurven würde jedoch zur Fehlinterpretation des Zeitabfalls führen (Abb. 4.27(c)).

4.3.3.2. Interne Dynamik in der Simulation

Die experimentell bestimmte Verteilung der Energietransfereffizienz (Abb. 4.9(b)) kann nicht allein durch ein Zwei-Zustands-Modell erklärt werden. Eine zusätzliche Dynamik, wie sie im Modell von Torres und Levitus [60] erklärt wird, ist zu erwarten. Im folgenden Abschnitt wird jedoch an simulierten Daten gezeigt, dass aufgrund der Datenverarbeitung, wie sie in dieser Arbeit angewendet wird, eine Analyse der experimentell bestimmten Korrelationskurven an das Modell von Torres und Levitus nicht möglich ist. Um dennoch Aufschluss über die interne Dynamik zu erlangen, werden verschiedene Modellsysteme mit interner Dynamik simuliert. Die simulierten Daten werden hinsichtlich ihrer Korrelation und Energietransfereffizienz analysiert. Die Ergebnisse werden folgend vorgestellt und können mit den experimentellen Werten verglichen werden.

Verschmierung der Energietransfereffizienz - eine Frage der Zeitskala In Abb. 4.29 sind simulierte Daten für ein System mit den mittleren Energietransfereffizienzen $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.50$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.93$ und verschiedenen Austauschraten gezeigt. Die Diffusionszeit des Systems ist mit $\tau_{\rm D} = (210 \pm 10) \,\mu{\rm s}$ vergleichbar zu den Werten gemessen mit $Tt{\rm SlyD}$ in Tab. 4.1 (Abschnitt 4.1.1).

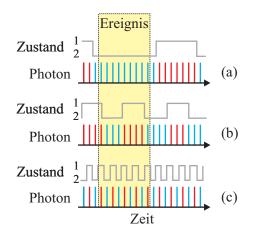


Abb. 4.28:

Zeitskala der Dynamik. Welchen Einfluss zwischen zwei Zuständen Dynamik auf Energietransfereffizienz-Verteilung hat, ist abhängig von der Zeitskala der Dynamik zwischen den Zuständen 1 und 2. Ist die Dynamik deutlich langsamer als das Beobachtungszeitfenster (gelb), werden die einzelnen Zustände getrennt aufgelöst (a). Sehr schnelle Dynamik, die dazu führt, dass jedes detektierte Photon (rot bzw. blau) bereits einem neuen Zustand entspricht, spiegelt sich in einer durch Schrotrauschen begrenzten mittleren Verteilung wider (c). Dynamik zwischen diesen Grenzfällen führt zu einem Verschmelzen der einzelnen Verteilungen (b). Bei dieser Darstellung wurde davon ausgegangen, dass die zwei Zustände 1 und 2 den Energietransfereffizienzen $E_{\rm t}=1$ und $E_{\rm t}=0$ entsprechen. Demzufolge werden nur Donor- (blau) bzw. nur Akzeptorphotonen (rot) detektiert.

Zwei getrennte Populationen (notiert mit 1 und 2) in einem E_t-Histogramm deuten auf zwei Zustände hin. Diese können zum einen von zwei Farbstoffabständen, aber auch von zwei Helligkeitzuständen der Farbstoffe durch chemische Isomerisierung oder deren Wechselwirkung mit dem Protein herrühren. Treten Übergänge zwischen den Zuständen auf, kommt es zur Verschmierung der zwei Populationen. Dabei ist die Zeitskala der Dynamik, also die Austauschraten k_{12} und k_{21} , entscheidend [99]. Sehr langsame Übergänge mit Austauschraten, die deutlich geringer als die inverse mittlere Zeit der Teilchen im Beobachtungsvolumen $1/t_{\text{Fokus}}$ sind, beeinflussen das Histogramm nicht (Abb. 4.29: Fall (1) und Abb. 4.28(a)). Je mehr sich die Austauschraten der inversen Beobachtungszeit annähern, desto höher wird der Bereich im Histogramm zwischen den Subpopulationen aufgefüllt, was schließlich zum Verschmelzen der einzelnen Populationen führt (Abb. 4.29: Fälle (2-4)). Mit größer werdenden Raten wird nur noch eine gaußförmige Verteilung gemessen, die mit wachsenden Austauschraten schmaler wird. Für sehr schnelle Dynamiken mit Austauschraten, die deutlich schneller als die Photonenzählrate k_{phot} sind, wird schließlich nur noch eine Verteilung gemessen, deren Breite durch das Schrotrauschen der Photonen begrenzt ist [100]. Dieser Grenzfall ist dann erreicht, wenn mit jedem detektierten Photon der Zustand des Systems zwischen 1 und 2 wechselt (Abb. 4.28(c)).

In dieser Arbeit kann für die experimentellen Daten von $Tt\mathrm{SlyD}$ somit ein kritisches Zeitfenster von $t_{\mathrm{U}} = 1/k_{\mathrm{phot,max}} \approx 10\,\mu\mathrm{s}$ bis $t_{\mathrm{O}} = 10 \times t_{\mathrm{Fokus}} \approx 10\,\mathrm{ms}$ aufgespannt werden, innerhalb dessen dynamische Übergänge mit der Ratensumme $(k_{12} + k_{21})$ zum Verschmieren des E_{t} -Histogramms führen (grau hinterlegt in Abb. 4.29(b)). Als obere Grenze t_{O} wurde dabei der zehnfache Wert der Zeitauflösung von $\Delta t = 1\,\mathrm{ms}$ gewählt. Da die größte Zahl der Einzelmolekülereignisse bei einer Diffusionzeit im Bereich von 200 μ s eine maximale Länge von 1 ms hat (Abb. A.4(b) im Anhang), wird mit der Wahl von t_{O} sichergestellt, dass die Bedingung $(k_{12} + k_{21})t_{\mathrm{Fokus}} \ll 1$ erfüllt wird. Die untere Grenze ergibt sich aus der maximalen Photonenzählrate innerhalb der ausgewählten Einzelmolekülereignisse $k_{\mathrm{phot,max}} = 100\,\mathrm{s}^{-1}$ (Abb. A.4(a) im Anhang). Die minimale Photonenzählrate wird durch den Schwellwert $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40\,\mathrm{s}^{-1}$ bestimmt. Die mittlere Zählrate entspricht $\langle k_{\mathrm{phot}} \rangle = 50\,\mathrm{s}^{-1}$. Zu beachten

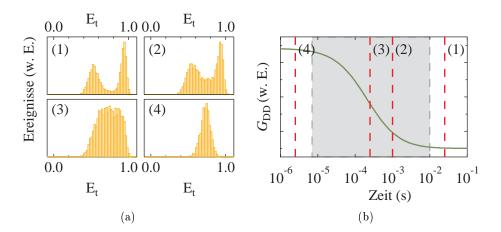


Abb. 4.29.:

Einfluss der Dynamik auf die Energietransfereffizienz in verschiedenen Zeitbereichen. Simulation eines Zwei-Zustands-Systems mit $\langle E_{t,1} \rangle = 0.50$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0.93$ und Austauschraten $k_{12} = k_{21}$ zwischen den Zuständen. Die Summe der Raten (rote Linien) variiert von $(k_{12} + k_{21}) = 40 \, \mathrm{s}^{-1}$ (1), $(k_{12} + k_{21}) = 1000 \, \mathrm{s}^{-1}$ (2), $(k_{12} + k_{21}) = 4 \cdot 10^3 \, \mathrm{s}^{-1}$ (3) bis $(k_{12} + k_{21}) = 4 \cdot 10^5 \, \mathrm{s}^{-1}$ (4). (a) Energietransferhistogramm für die Ereignisse mit $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \, \mathrm{s}^{-1}$. (b) Die Ratensumme ist jeweils als gestrichelte Linie der Donor-Autokorrelationskurve mit einer Diffusionszeit von $\tau_{\mathrm{D}} = (210 \pm 10) \, \mu \mathrm{s}$ (b) überlagert. Der graue Bereich symbolisiert das Zeitfenster, innerhalb dessen dynamische Prozesse zum Verschmieren der E_{t} -Verteilung führen. Die untere Grenze $t_{\mathrm{U}} = 7 \, \mu \mathrm{s}$ resultiert aus der maximalen Photonenzählrate von $k_{\mathrm{phot,max}} = 140 \, \mathrm{s}^{-1}$. Die obere Grenze entspricht mit $t_{\mathrm{O}} = 10 \, \mathrm{ms}$ dem zehnfachen Wert der Zeitauflösung. Sehr langsame Dynamik führt zu zwei getrennten Populationen (1), sehr schnelle Dynamik führt zu einer mittleren Population (4), die wie die Einzelpopulationen in (1) durch reines Schrotrauschen der Photonen begrenzt ist. Findet eine Austauschdynamik zwischen diesen Grenzfällen statt, führt dies zum Verschmieren der einzelnen Populationen (2,3).

ist, dass nur wenige Ereignisse überhaupt Zählraten aufweisen, die deutlich höher als dieser Mittelwert sind. So liegt zum Beispiel für nur 3% aller Ereignisse die Zählrate über $80 \,\mathrm{s}^{-1}$. Da die untere Grenze für das Zeitfenster mit $t_{\mathrm{U}} = 1/k_{\mathrm{phot,max}}$ angeben wird, ist also die Bedingung $(k_{12} + k_{21}) \gg k_{\mathrm{phot}}$ erfüllt.

Analyse der Kreuzkorrelation Das Prinzip der Korrelationsanalyse wurde bereits eingeführt. Ferner wurde auch das Modell von Torres und Levitus [60] beschrieben, mit dem es möglich ist, das Verhältnis aus Auto- und Kreuzkorrelation $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ analytisch anzupassen. Dieses Modell zeigt jedoch mehrere Schwachstellen.

So müsste zum Beispiel der Diffusionsanteil der Korrelationsfunktionen in beiden Detektionenskanälen (G_{AA}, G_{DD}) identisch sein. Dies ist aufgrund der von der Wellenlänge abhängigen Größe des Beobachtungsvolumens nicht gegeben.

Desweiteren ergibt sich im Fall der hier benutzten Farbstoffe das Problem des Photobleichens, sodass die Richtung der Kreuzkorrelation ($G_{\rm AD}$ oder $G_{\rm DA}$) entscheidend ist (siehe Abschnitt 4.3.2.4). Dies lässt sich erst durch das Sortieren der Ereignisse mit den Schwellwerten $S_{\rm sum}^{488}$ und $S_{\rm akz}^{635}$ verhindern. Diese Sortierung basiert jedoch auf den pro Zeiteinheit gezählten Photonen. Somit erzeugt die Wahl der Zeitauflösung ein Artefakt in der Kor-

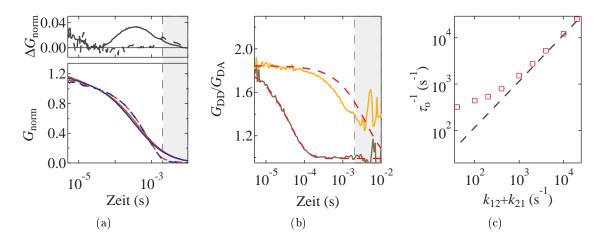


Abb. 4.30.:

Einfluss der Datenbearbeitung auf die Korrelationsanalyse. (a) Autokorrelation der Photonen im Donor- (blau) und Akzeptorkanal (rot) ohne (durchgezogen) bzw. nach (gestrichelt) Sortierung der Einzelmolekülereignisse mit Schwellwerten. Zusätzlich sind oben die Differenzen der Korrelationskurven zwischen den Kanälen aufgeführt. (b+c) Simulation eines Zwei-Zustands-Systems mit $\langle E_{t,1} \rangle = 0,50$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,93$. Zwischen den Zuständen wird eine zusätzliche Dynamik für $k_{12} = k_{21} = 20 \,\mathrm{s}^{-1}$ bis $k_{12} = k_{21} = 10 \cdot 10^3 \,\mathrm{s}^{-1}$ simuliert. (b) Verhältnis $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ für Photonen aus Einzelmolekülereignisse ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \,\mathrm{s}^{-1}$), wobei $k_{12} = k_{21} = 0,1 \cdot 10^3 \,\mathrm{s}^{-1}$ (orange) und $k_{12} = k_{21} = 10 \cdot 10^3 \,\mathrm{s}^{-1}$ (braun) sind. Zusätzlich sind die theoretischen Kurven [60] (rot gestrichelt) aufgetragen. Der graue Balken markiert den durch die Datenaufarbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2 \,\mathrm{ms}$. (c) Sowohl die simulierten (rot) als auch theoretischen (grau gestrichelt) Korrelationskurven wurden mit einem exponentiellen Abfall $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}(\tau) = 1 + \exp\left(\tau_0^{-1}\tau\right)$ angepasst. Die charakteristische inverse Zeit τ_0^{-1} wurde gegen die simulierte Summenrate aufgetragen.

relationsberechnung der sortierten Photonen. Werden zum Beispiel die Photonenraten mit $\Delta t = 1 \,\mathrm{ms}$ gezählt, entsteht ein Knick in allen Korrelationsfunktionen ($G_{\mathrm{AD}}, G_{\mathrm{DA}}, G_{\mathrm{AA}}$ $G_{\rm DD}$) bei $\tau = 2 \times \Delta t = 2\,\mathrm{ms}$ (Abb. 4.30(a)). Deshalb wird der Zeitbereich $\tau > 2\,\mathrm{ms}$ stets grau in den Abbildungen unterlegt, da dieser Bereich durch die Auswertung, nicht aber durch das Experiment bedingt ist. Allein durch dieses Artefakt werden dynamische Prozesse, die den Zeitbereich der Diffusion überlagern, verfälscht wiedergegeben (Abb. 4.30). Um dies zu verdeutlichen, wurden Photonendaten mit verschiedenen Austauschraten simuliert. Die Photonen der simulierten Einzelmolekülereignisse wurden analog zu den experimentellen Daten mit Schwellwerten ausgewählt (bei einer Zeitauflösung von $\Delta t = 1\,\mathrm{ms}$) und schließlich korreliert. Zum Vergleich wurden die theoretischen Kurven nach Torres und Levitus berechnet [60]. Simulierte und theoretische Datensätze wurden mit einem einfachen exponentiellen Abfall angepasst und die inversen charakteristischen Zeiten (τ^{-1}) gegen die simulierte Ratensumme $(k_{12}+k_{21})$ aufgetragen (Abb. 4.30(c)). Die relative Abweichung nimmt für langsame dynamische Prozesse zu. Die Abweichung zwischen simulierten Daten und den theoretischen Kurven wird beispielhaft für die Ratensummen $k_{12} = k_{21} = 10 \cdot 10^3 \,\mathrm{s}^{-1}$ und $k_{12} = k_{21} = 0.1 \cdot 10^3 \,\mathrm{s}^{-1}$ in Abb. 4.30(b) gezeigt. Die Auswahl der Einzelmolekülereignisse mit Schwellwerten führt zwar zu einer Verzerrung der Korrelationskurven. Allerdings hat sie gleichzeitig den Effekt, dass in beiden Detektionskanälen die Start- und Endpunkte der Ereignisse auf gleiche Weise künstlich festgelegt werden, sodass die Korrelationsfunktionen wieder übereinander liegen und somit die Abhängigkeit des Diffusionsterms vom Beobachtungsvolumen nicht mehr gegeben ist (Abb. 4.30(a)).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die schwellwertabhängige Auswahl der Einzelmolekülereignisse sowohl Effekte durch Photobleichen als auch Effekte durch die unterschiedliche Größe des Beobachtungsvolumens behoben wurden. Die Idee, durch Division der Korrelationskurven $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ den Diffusionsterm zu entfernen, konnte somit umgesetzt werden. Gleichzeitig wurde aber eine analytische Diskussion der Daten nach Torres und Levitus aufgrund der Verzerrung der Korrelationskurven verhindert. Um die Methode der $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ -Analyse dennoch auf die experimentellen Daten anwenden zu können, wurden Datensätze simuliert und entsprechend den experimentellen Daten ausgewertet. Durch Vergleich können Rückschlüsse auf die zu Grunde liegenden Parameter wie k_{12} , k_{21} , $\langle E_{\rm t,1} \rangle$ oder $\langle E_{\rm t,2} \rangle$ gezogen werden.

Simulationsbespiel 1: Variation der mittleren Energietransfereffizienzen In Abb. 4.31 (oben) sind Zwei-Zustands-Systeme mit den Raten $k_{12} = k_{21} = 1000 \, \mathrm{s}^{-1}$, aber unterschiedlichen Werten für $\langle E_{\mathrm{t,1}} \rangle$ und $\langle E_{\mathrm{t,2}} \rangle$ simuliert. Sowohl der Quotient $\frac{G_{\mathrm{AA}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ mit der Akzeptor-Autokorrelation, als auch der Quotient $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ mit der Donor-Autokorrelation sind dargestellt. Für Übergänge im Bereich höherer Transfereffizienzen, wie sie im Fall von $Tt\mathrm{SlyD}$ vermutet werden, ist aufgrund der höheren Amplitude und somit höheren Sensitivität der Quotient $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ zur Diskussion heranzuziehen. Für Übergänge im mittleren Bereich mit $\langle E_{\mathrm{t,1}} \rangle$, $\langle E_{\mathrm{t,2}} \rangle \approx 0.5$ besteht die Gefahr, Dynamiken in der Kreuzkorrelation nicht zu erkennen.

Simulationsbeispiel 2: Variation der Austauschraten Mit der Konzentration auf Zwei-Zustands-Systeme mit höheren Energietransfereffizienzen $0.50 = \langle E_{t,1} \rangle < \langle E_{t,2} \rangle = 0.93$ wurden auch die Einzelraten k_{12} und k_{21} variiert, wobei die Summe $k_{12} + k_{21} = 1000 \,\mathrm{s}^{-1}$ konstant ist (Abb. 4.31 (unten)). Die zwei Zustände in der E_t -Verteilung werden folglich unterschiedlich populiert. Erstaunlich ist, dass neben der Gleichverteilung $k_{12} = k_{21} = 500 \,\mathrm{s}^{-1}$ vor allem asymmetrische Verteilungen mit einem Gewicht zum erhöhten Energietransfer ((5),(6)) eine deutliche Amplitude in $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ aufweisen, wohingegen dynamische Prozesse mit einer erhöhten Population des Zustandes $E_{t,1}$ ((1)-(3)) kaum detektiert werden können. Aber auch im entgegengesetzten Fall dürfen die Ratenunterschiede nicht zu groß werden. Wird E_1 nur noch vernachlässigbar populiert ((7)), kann auch keine Dynamik mehr zwischen den Zuständen analysiert werden.

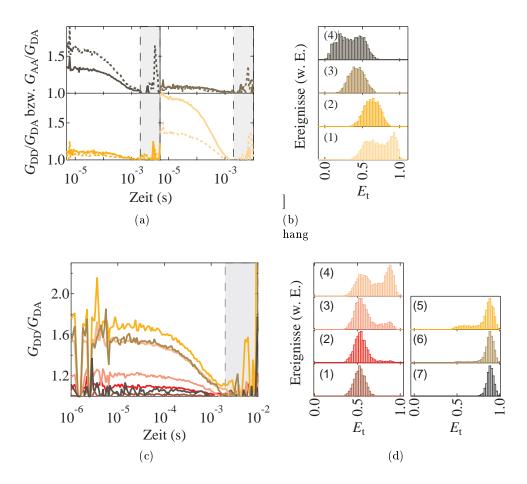


Abb. 4.31.:

Simulations bespiele: Variation der mittleren Energietransfereffizienzen und Variation der Austauschraten. (a+b) Simulation eines Zwei-Zustands-Systems mit $\langle E_{t,1} \rangle = 0,50$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,93$ (1), $\langle E_{t,2} \rangle = 0,71$ (2), $\langle E_{t,2} \rangle = 0,30$ (3) bzw. $\langle E_{t,2} \rangle = 0,10$ (4) und den Austauschraten $k_{12} = k_{21} = 1000 \, \mathrm{s}^{-1}$ simuliert. Für die Einzelmolekülereignisse $(S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \, \mathrm{s}^{-1})$ werden in (b) die E_{t} -Histogramme und in (a) die Quotienten aus Autokorrelation des Donors (durchgezogene Linien) bzw. des Akzeptors (gestrichelte Linien) und der Kreuzkorrelation berechnet. Die Kurven in (a) und (b) sind äquivalent farbig kodiert. (c+d) Simulation eines Zwei-Zustands-Systems mit $\langle E_{t,1} \rangle = 0,50$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,88$. Die Summe der Austauschraten ist $k_{12} + k_{21} = 1000 \, \mathrm{s}^{-1}$, die Raten der Hin- und Rückreaktion variieren mit $k_{12} = 10 \, \mathrm{s}^{-1}$ (1), $100 \, \mathrm{s}^{-1}$ (2), $200 \, \mathrm{s}^{-1}$ (3), $500 \, \mathrm{s}^{-1}$ (4), $800 \, \mathrm{s}^{-1}$ (5), $900 \, \mathrm{s}^{-1}$ (6) und $990 \, \mathrm{s}^{-1}$ (7), wobei $k_{21} = 1000 \, \mathrm{s}^{-1} - k_{12}$ ist. Für die Einzelmolekülereignisse $(S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \, \mathrm{s}^{-1})$ werden in (d) die E_{t} -Histogramme und in (c) die Quotienten aus Donorautokorrelation und Kreuzkorrelation berechnet. Die Kurven in (c) und (d) sind äquivalent farbig kodiert. Der graue Balken (a, c) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2 \, \mathrm{ms}$.

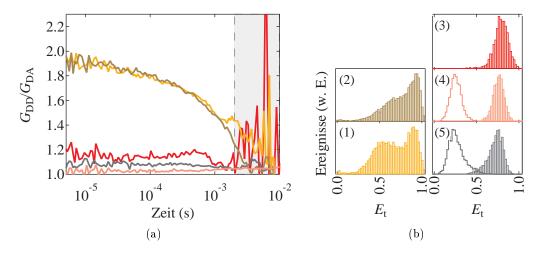


Abb. 4.32.:

Korrelationsanalyse der internen Dynamik an TtSlyD und verschiedenen Referenzproben. (a) Quotient $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ für die doppelt markierte Variante D82C/T139C von TtSlyD im beugungsbegrenzten Fokus (1), im vergrößerten (durch Unterfüllung des Objektivs) Fokus (2) und für die Referenzproben: dsDNA (3), TS-Kugeln (4) und (Pro)₂₀ in TFE (5). Es wurden nur Photonen aus Einzelmolekülereignissen korreliert ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40\,\mathrm{s}^{-1}$, $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 10\,\mathrm{s}^{-1}$ (1,2,4) bzw. $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 20\,\mathrm{s}^{-1}$ (3) und $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 30\,\mathrm{s}^{-1}$, $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 30\,\mathrm{s}^{-1}$ (5)). Der graue Balken (a) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2\,\mathrm{ms}$. (b) Für dieselben Daten wurden die E_{t} -Verteilungen berechnet. In den Fällen (4,5) wurden statt der Originaldaten (rosa, graue Linie) die Daten nach Vertauschen der Detektionskanäle (gefüllte Balken) genutzt. Die Farbkodierung ist in (a) und (b) äquivalent.

4.3.3.3. Interne Dynamik im Experiment

Die vorgestellte Kreuzkorrelationsanalyse nach Torres und Levitus [60] wurde auf die experimentellen Daten angewendet. Dabei wurden nur die Photonen berücksichtigt, die aus Einzelmolekülereignissen stammen, die die Auswahlschwellen $S_{\rm sum}^{488}$ und $S_{\rm akz}^{635}$ bei einer Zeitauflösung von $\Delta t=1$ ms erfüllen. Aufgrund der Populationen im Bereich mit höheren Energietransfereffizienzen $E_{\rm t}>0.5$ wird zur Analyse nur das Verhältnis der Donorautokorrelation zur Kreuzkorrelation $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ herangezogen, da dieses eine höhere Sensitivität als das Verhältnis aus Akzeptorautokorrelation zur Kreuzkorrelation besitzt. Dies wurde durch Simulationsbeispiele belegt (Abb. 4.31 (oben)) .

Vergleich mit Referenzproben In Abb. 4.32 sind die Quotienten $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ für verschiedene Proben unter verschiedenen experimentellen Bedingungen aufgeführt. Gleichzeitig wurde aus den für die Korrelation ausgewählten Photonen auch jeweils das Histogramm über die Energietransfereffizienz berechnet. Die mit AF488 und A647N markierte Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD zeigt in einem Zeitbereich von 10^{-4} s $\leq \tau \leq 10^{-3}$ s einen signifikanten Abfall des Korrelationsquotienten, der für interne Dynamik spricht. Die Proteinprobe wurde sowohl in einem beugungsbegrenzten als auch in einem vergrößerten Beobachtungsvolumen (Unterfüllung des Objektivs) untersucht. Die Diffusionszeit ändert sich dadurch von $\tau_{\rm D} = (181.7 \pm 1.5) \,\mu{\rm s}$ auf $\tau_{\rm D} = (352.7 \pm 2.2) \,\mu{\rm s}$. Der durch Diffusion bedingte Abfall in den

Korrelationsfunktionen ist somit deutlich auf der Zeitachse verschoben. Dennoch liegen die Quotienten übereinander. Somit wurde bewiesen, dass der diffusive Anteil bei der Berechnung des Verhältnisses $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ gekürzt wird. Der Abfall in Abb. 4.32 ist eindeutig auf interne Dynamik zurückzuführen.

Zum Vergleich wurde die Analyse analog mit den Referenzproben durchgeführt. Da beide Proben, TS-Kugeln und $(Pro)_{20}$ Energietransfereffizienzen im Bereich $E_{\rm t} < 0.5$ aufweisen, wurden speziell für diese Analyse die Detektionskanäle vertauscht, sodass die $E_{\rm t}$ -Verteilungen nun im Bereich $E_{\rm t} > 0.5$ und somit vergleichbar zu derjenigen von TtSlyD liegen. Die Quotienten $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ zeigen für alle drei Referenzproben, TS-Kugeln, $(Pro)_{20}$ und dsDNA, keinen signifikanten Abfall im experimentell zugänglichen Bereich bis $\tau = (1 \dots 2)$ ms. Für diese Proben wird keine interne Dynamik erwartet. TS-Kugeln sind feste Kunststoff-Kugeln. Für $(Pro)_{20}$ wurde sowohl in Simulationen als auch im Experiment nachgewiesen, dass die Moleküle keine End-zu-End-Dynamik auf einer Zeitskala t > 10 ns zeigen [101]. Doppelsträngige DNA wird als Polymer mit einer Persistenzlänge $l_{\rm P} = (30 \dots 80)$ nm beschrieben [102]. Die Spanne der Daten resultiert aus unterschiedlichen Experimenten unter verschiedenen Salzbedingungen. Mit einer Länge von ca. l = 8 nm bei 23 Basenpaaren, die deutlich kürzer als die Persistenzlänge ist, ist die hier genutzte Referenzprobe somit als annähernd steif zu betrachten.

Einfluss der Datenverarbeitung Die Photonendaten für die Berechnung des Quotienten $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ werden so gewonnen, dass zuerst zeitabhängige Intensitäten berechnet werden. Mit den Schwellwerten S_{sum}^{488} und S_{akz}^{635} werden die Zeitabschnitte sortiert, in denen ein Einzelmolekül im Beobachtungsvolumen war. Alle Photonen, die in diesen Zeitabschnitten detektiert wurden, werden vom Detektionskanal abhängig korreliert. Sowohl die Wahl der Zeitauflösung als auch die der Schwellwerte kann folglich Einfluss auf das Verhältnis $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ haben.

In Abb. 4.33 wurde aus diesem Grund die Zeitauflösung mit den Werten $\Delta t = 0.5 \,\mathrm{ms}$, $\Delta t = 1.0 \,\mathrm{ms}, \,\Delta t = 2.0 \,\mathrm{ms}$ und $\Delta t = 5.0 \,\mathrm{ms}$ variiert. Die Quotienten für beide Kreuzkorrelationsrichtungen, $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ und $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm AD}}$, sind in Abb. 4.33(b) dargestellt und der Übersichtlichkeit halber absolut verschoben. Am Beispiel eines Einzelmolekülereignisses sind in Abb. 4.33(a) die transienten Intensitätsverläufe im Donor- und Akzeptorkanal für die verschiedenen Zeitauflösungen dargestellt. Das Einzelmolekülereignis ist durch eine Kontur, die die Farbkodierung aus Abb. 4.33(b) nutzt, hervorgehoben. Die Differenzen zwischen $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ und $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm AD}}$, die als schraffierte Flächen in Abb. 4.33(b) markiert sind, werden durch die Anwendung der Akzeptorschwelle $S_{
m akz}^{635}$ nahezu unterdrückt, d. h. Bleicheffekte des Akzeptors werden heraussortiert. Allerdings ist die Effizienz der Methode bei groben Zeitauflösungen ($\Delta t > 1\,\mathrm{ms}$) trotz Anpassung der Schwellwerte vermindert. Die Ursache dafür wird klar, wenn man den Einfluss der Zeitauflösung auf die transiente Intensität in Abb. 4.33(a) betrachtet. Mit einer groben Zeitauflösung von $\Delta t = 2 \,\mathrm{ms}$ wird die Fluoreszenzinformation eines kompletten Ereignisses in einem Zeitschritt gemittelt. Das Aussortieren von Teilzeitschritten, zum Beispiel ab dem Photobleichen des Akzeptors, ist nicht mehr möglich. Wird die Zeitauflösung mit $\Delta t = 5 \,\mathrm{ms}$ noch gröber gewählt, wird nicht nur über den Zeitverlauf eines kompletten

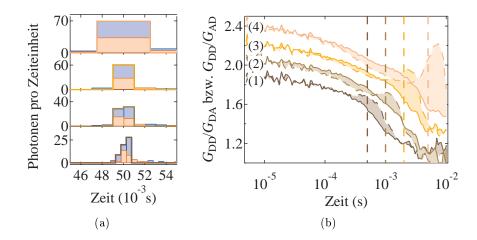


Abb. 4.33.:

Einfluss der Zeitauflösung auf die Korrelationsanalyse. Bei verschiedenen $\Delta t = 0.5\,\mathrm{ms}$ (1), 1,0 ms (2), 2,0 ms (3) und 5,0 ms (4) wurden in (a) die transienten Intensitäten im Akzeptor- (rot) und Donorkanal (blau) für ein Einzelmolekülereignis aufgetragen. Mit den Schwellwerten $S_{\mathrm{sum}}^{488}/S_{\mathrm{akz}}^{635}$ (20 s⁻¹/10 s⁻¹ (1), $40\,\mathrm{s}^{-1}/10\,\mathrm{s}^{-1}$ (2), $40\,\mathrm{s}^{-1}/20\,\mathrm{s}^{-1}$ (3), $70\,\mathrm{s}^{-1}/30\,\mathrm{s}^{-1}$ (4)) wurden diese Einzelmolekülereignisse sortiert (durch dicke farbige Konturlinien in (a) eingerahmt) und die Quotienten $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ (durchgezogen) und $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{AD}}}$ (gestrichelt) für beide Korrelationsrichtungen in (b) berechnet. Die senkrechten Linien markieren jeweils die Zeitauflösung der zugrunde liegenden Daten. Die Farbkodierung in (a) und (b) ist identisch. Das Protein $Tt\mathrm{SlyD}$ wurde in einem vergrößerten Fokus (durch Unterfüllung des Objektivs) im POE-Schema (40 $\mu\mathrm{W}$ bei 488 nm, 15 $\mu\mathrm{W}$ bei 635 nm und 10 MHz) angeregt.

Einzelmolekülereignisses, sondern auch über Zeitbereiche mit reiner Hintergrundinformation gemittelt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis nimmt ab. Aber auch eine zu hohe Zeitauflösung führt schließlich zu einem reduzierten Signal-zu-Rausch-Verhältnis, da die Anzahl der Photonen pro Zeiteinheit immer kleiner wird.

Liegt die Korrelationszeit τ im Bereich der Zeitauflösung $\tau = \Delta t$ (gestrichelte Linien in Abb. 4.33(b)), zeigen alle Kurven eine deutliche Auftrennung. Dies ist somit durch die Einteilung der Photonen in diskrete Zeitschritte, nicht aber durch das Bleichen bedingt. Abschließend kann aber festgestellt werden, dass trotz der Bleich- und Zeitauflösungsartefakte in allen Fällen eine ähnliche Amplitude und ein charakteristischer Zeitabfall im Bereich von $10^{-4}\,\mathrm{s} \leq \tau \leq 10^{-3}\,\mathrm{s}$ zu beobachten ist.

Die Abhängigkeit von der Wahl der Schwellwerte $S_{\rm sum}^{488}$ und $S_{\rm akz}^{635}$ wird in Abb. 4.34 dargestellt (für Variante P68C/E111C von TtSlyD in Abb. A.8 im Anhang). Die Summenschwelle $S_{\rm sum}^4$ 88 ist generell nötig, um überhaupt getrennte Ereignisse zu erkennen. Je höher diese gewählt wird, desto weniger Photonen werden korreliert, desto schlechter ist die zugrunde liegende Statistik und desto verrauschter sind die Korrlationskurven (Abb. 4.34(b)). Dennoch ist für einen weiten Bereich der Summenschwelle von $20\,{\rm s}^{-1} \le S_{\rm sum}^{488} \le 60\,{\rm s}^{-1}$ der typische Abfall mit einer ähnlichen Amplitude der Korrelationskurven zu verzeichnen. Auch bei der Wahl der Akzeptorschwelle (Abb. 4.34(a)) ist die Unabhängigkeit der Kurven für den Bereich $10\,{\rm s}^{-1} \le S_{\rm akz}^{635} \le 30\,{\rm s}^{-1}$ zu erkennen. Zum Vergleich wurden ebenso die Daten ganz ohne Akzeptorschwelle berechnet. In diesem Fall ist die Amplitude deutlich erhöht. Der zeitliche Abfall ist zwar auch in dieser Kurve ersichtlich, aber nur mit Vorsicht zu genießen, denn ohne

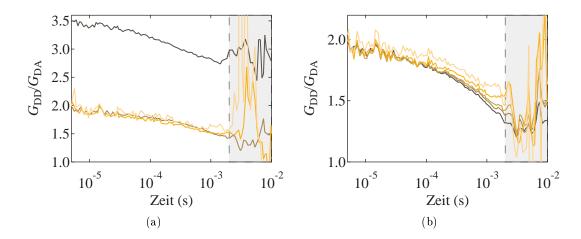
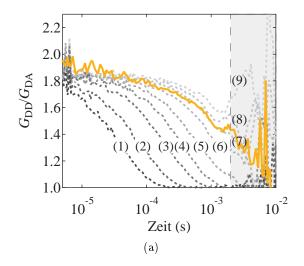


Abb. 4.34.:

Einfluss der Schwellwerte auf die Korrelationsanalyse. (a) Die Akzeptorschwelle wurde mit $S_{\rm akz}^{635} > 0\,{\rm s}^{-1}$ (dunkelbraun), $10\,{\rm s}^{-1}$ (braun), $20\,{\rm s}^{-1}$ (orange) und $30\,{\rm s}^{-1}$ (gelb) bei $S_{\rm sum}^{488} > 40\,{\rm s}^{-1}$ variiert. (b) Die Summenschwelle wurde mit $S_{\rm sum}^{488} > 20\,{\rm s}^{-1}$ (dunkelbraun), $30\,{\rm s}^{-1}$ (braun), $40\,{\rm s}^{-1}$ (orange), $50\,{\rm s}^{-1}$ (gelb) und $60\,{\rm s}^{-1}$ (hellgelb) bei $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$ variiert. Das Protein $Tt{\rm SlyD}$ wurde im POE-Schema ($40\,\mu{\rm W}$ bei $488\,{\rm nm}$, $15\,\mu{\rm W}$ bei $635\,{\rm nm}$ und $10\,{\rm MHz}$) angeregt. Der graue Balken markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau=2\,{\rm ms}$.

Akzeptorschwelle gehen deutlich Effekte durch das Photobleichen des Akzeptors ein, die in den anderen Kurven vernachlässigt werden können.

Vergleich zwischen Experiment und Simulation Da die experimentell bestimmten Kurven aufgrund der vorlaufenden Datenbearbeitung nicht analytisch an das Modell von Torres und Levitus angepasst werden können, werden die Daten mit simulierten Ergebnissen verglichen. So können aus den Simulationsparametern Rückschlüsse auf die experimentellen Parameter gezogen werden. Aus diesem Grund wurde ein Zwei-Zustands-Sytem mit verschiedenen Austauschraten simuliert. Die mittleren Energietranfereffizienzen wurden mit $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.50$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.93$ festgehalten. Diese Werte weichen geringfügig von den Anpassungsergebnissen der experimentellen Daten ($\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.56, \langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.88, {\rm s.~Tab.~4.8}$) ab, erzeugen aber bei einem Ratenverhältnis von $\frac{k_{12}}{k_{21}} = 1$ dieselbe Amplitude in $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$, wie sie das Experiment liefert (Abb. 4.35(a)). Das Ratenverhältnis $\frac{k_{12}}{k_{21}}=1$ ist als Annahme gerechtfertigt, da so auch die Populationsverhältnisse in der Energietransfereffizienz-Verteilung reproduziert werden (Abb. 4.35(b)). Zum Vergleich wurde auch eine Simulation durchgeführt, in die die reinen Ergebnisse aus der Anpassung der experimentellen Daten mit einem Zwei-Gauß-Modell einfließen. Dies sind die mittleren Energietransfereffizienzen $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.56$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.88$, sowie das Populationsverhältnis $\frac{2.25}{1}$ zwischen offener und geschlossener Konformation, das sich aus den Flächen der einzelnen Gaußkurven ergibt. Das Ratenverhältnis wurde dementsprechend $\frac{k_{12}}{k_{21}}=\frac{1}{2,25}$ gesetzt. Allerdings mussten unter diesen Annahmen deutliche Abweichungen zwischen simulierten und experimentellen Daten sowohl in der Energietransfereffizienz-Verteilung als auch in der Korrelationsanalyse festgestellt werden (siehe Abb. A.5 im Anhang). Aus diesem Grund wurden die Simulationsparameter, wie sie



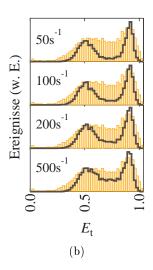


Abb. 4.35.:

Vergleich des Experimentes mit der Simulation. Die Daten aus Abb. 4.9(b) für TtSlyD D82C/T139C ((a): orange; (b): gefüllte Balken) werden mit simulierten Daten verglichen. Das simulierte Zwei-Zustands-System ($\langle E_{t,1} \rangle = 0,50$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,93$) hat verschiedene Austauschraten $k_{12} = k_{21}$ (10000 s⁻¹ (1), $5000 \, \mathrm{s}^{-1}$ (2), $2000 \, \mathrm{s}^{-1}$ (3), $1000 \, \mathrm{s}^{-1}$ (4), $500 \, \mathrm{s}^{-1}$ (5), $200 \, \mathrm{s}^{-1}$ (6), $100 \, \mathrm{s}^{-1}$ (7), $50 \, \mathrm{s}^{-1}$ (8) und $20 \, \mathrm{s}^{-1}$ (9)). Aus den sortierten Einzelmolekülereignissen ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40 \, \mathrm{s}^{-1}$) wurden die Quotienten $\frac{G_{DD}}{G_{DA}}$ (a) und die E_{t} -Verteilungen ((b): schwarze Linien) berechnet. Der graue Balken (a) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2 \, \mathrm{ms}$.

im ersten Fall ($\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.50$, $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.93$, $\frac{k_{12}}{k_{21}} = 1$) beschrieben wurden, in allen weiteren Simulationen als Grundlage verwendet.

In Abb. 4.35 wurden die Einzelraten von $k_{12}=k_{21}=20\,\mathrm{s}^{-1}$ bis $k_{12}=k_{21}=10000\,\mathrm{s}^{-1}$ variiert. Die entsprechenden Kurven für $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ sind im Vergleich zu der experimentellen Kurve von D82C/T139C $Tt\mathrm{SlyD}$ in Abb. 4.35(a) dargestellt. Das experimentelle Ergebnis wird sehr gut auf einem weiten Zeitbereich durch die simulierte Kurven mit den Raten $k_{12}=k_{21}=100\,\mathrm{s}^{-1}$ reproduziert. Aufgrund der Unsicherheit der Daten wird aber eine mögliche Ergebnisspanne von $50\,\mathrm{s}^{-1} \leq k_{12}=k_{21} \leq 200\,\mathrm{s}^{-1}$ angegeben. Für solch geringe Austauschraten wurden zusätzlich in Abb. 4.35(b) die simulierten E_{t} -Verteilungen (schwarze Linien) im Vergleich zum Experiment (gefüllte Balken) dargestellt. Durch die Dynamik zwischen den Zuständen wird zwar das Minimum zwischen den Verteilungen zunehmend aufgefüllt, jedoch reichen diese Effekte nicht aus, um die Breite des experimentell bestimmten Histogramms zu erklären.

Aufweitung des Modells auf drei Zustände Durch die Korrelationsanalyse konnte eindeutig eine Dynamik zwischen Zuständen mit verschiedenen Energietransfereffizienzen nachgewiesen werden. Somit ist eine rein statische Heterogenität als Ursache für die Verbreiterung der E_t -Verteilung ausgeschlossen. Jedoch muss das Zwei-Zustands-System kritisch betrachtet werden. Das E_t -Histogramm kann ebenso mit einem Dreifach-Gauß-Modell angepasst werden (Abb. 4.36). Auch in diesem Fall sind die Einzelpopulationen deutlich breiter als die simulierten, durch Schrotrauschen begrenzten Verteilungen. Aufgrund der geringen Populierung

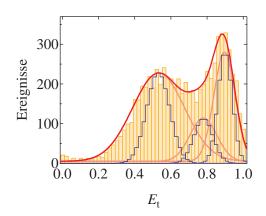


Abb. 4.36:

Drei-Zustands-System. Die Energietransfereffizienz-Verteilung aus Abb. 4.9(b) (gelbe Balken) wurde durch ein Drei-Gauß-Modell (rote Linie) angepasst. Die einzelnen Gauß-Funktionen wurden in rosa separat gezeichnet. Zum Vergleich wurden durch Schrotrauschen begrenzte theoretische Verteilungen als blaue Histogramme aufgetragen.

des Zwischenzustandes muss von einem Ungleichgewicht der Raten ausgegangen werden. Der mittlere Zustand wird durch eine Dynamik schneller entvölkert als bevölkert.

Ob eine solche schnelle Zusatzdynamik in einen dritten Zustand durch die Korrelationsanalyse detektierbar ist, wird mit der Simulation des folgenden Systems kontrolliert. Das Zwei-Zustands-System ($\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.61$, $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.93$, $k_{12} = k_{21} = 100\,{\rm s}^{-1}$) wurde durch einen dritten Zustand $\langle E_{\rm t,3} \rangle = 0.75$ ergänzt. Dieses neue Drei-Zustands-System soll im Experiment einen geschlossenen und zwei offene Zustände symbolisieren (Abb. 4.37(a)). Die Raten zwischen den offenen Zuständen sind mit $k_{23} = k_{32} = 1000\,{\rm s}^{-1}$ vergleichsweise hoch gegenüber den Übergängen zum bzw. vom geschlossenen Zustand ($(50...200)\,{\rm s}^{-1}$). Obwohl die Form der $E_{\rm t}$ -Verteilung deutlich von der Wahl der einzelnen Raten abhängt, kann die schnelle Dynamik zwischen den offenen Zuständen nicht eindeutig durch die Korrelationsanalyse nachgewiesen werden. Zwar verändert sich die Amplitude von $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$, aber der zeitabhängige Abfall der Kurven findet in einem Zeitbereich statt, der auch vergleichbar mit dem reinen Zwei-Zustands-System ist. Die schnelle Dynamik bzw. die Ausweitung auf ein Modell mit mehr als zwei Zuständen kann somit nicht eindeutig durch die Korrelationsanalyse festgestellt werden.

4.3.4. Zusammenfassung

Mit Einzelmolekül-FRET-Messungen an der fluoreszent markierten Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD konnte eine bimodale Verteilung von Energietransfereffizienzen bestimmt werden, die auf zwei mögliche Konformationen zwischen den Domänen von TtSlyD hindeutet, die als geschlossene und offene Konformation interpretiert werden. Die Verteilung ist deutlich breiter als die Verteilung simulierter Daten, die allein durch das Schrotrauschen der Photonen limitiert sind. Mit mehreren Kontrollexperimenten konnte bestätigt werden, dass diese Aufweitung durch das Protein bedingt ist und Artefakte durch die Farbstoffe ausgeschlossen werden können. Als mögliche Artefakte wurden unter anderem das Photobleichen und die Rotationsfreiheit der Fluoreszenzfarbstoffe überprüft. Die Form der Energietransfereffizienz-Verteilung ist also mit einer strukturellen Heterogenität zu begründen, die über das vereinfachende Zwei-Zustands-System hinausgeht. Es stellt sich nun die

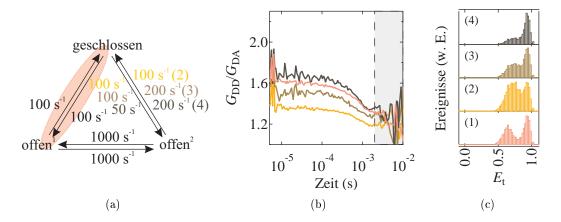


Abb. 4.37.:

Drei-Zustands-System in der Simulation. Simulation eines Drei-Zustands-Systems mit $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.61$ (offen¹), $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.93$ (geschlossen) und $\langle E_{\rm t,3} \rangle = 0.75$ (offen²). Die Austauschraten sind für die drei Fälle (2)-(4) in einer Skizze (a) aufgeführt. Der Fall (1) beschreibt das reine Zwei-Zustands-System mit $\langle E_{\rm t,1} \rangle$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle$ zum Vergleich (rosa). Für die Einzelmolekülereignisse ($S_{\rm sum}^{488} > 40 \, {\rm s}^{-1}$) werden in (c) die $E_{\rm t-1}$ Histogramme und in (b) die Quotienten aus Donorautokorrelation und Kreuzkorrelation berechnet. Die Farbkodierung ist in (a)-(c) äquivalent. Der graue Balken (b) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2 \, {\rm ms}$.

Frage, ob diese Heterogenität rein statisch ist oder dynamische Übergänge zwischen den einzelnen Konformationen die Verschmierung der Energietransfereffizienzen begründen. Durch die Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion konnten Fluktuationen im FRET nach der Methode von Torres und Levitus [60] analysiert werden. Da nur die Photonen aus den Einzelmolekülereignissen korreliert wurden, kommt es zu einer artifiziellen Verformung der Korrelationskurven, sodass eine analytische Anpassung nicht mehr möglich ist. Um dennoch quantitative Aussagen treffen zu können, wurden mit Monte-Carlo-Methoden vergleichbare Photonen-Datensätze simuliert und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Auf diese Weise konnte eine Austauschdynamik zwischen der offenen und geschlossenen Konformation im Zeitbereich von $50\,\mathrm{s}^{-1} \le k_{12} = k_{21} \le 200\,\mathrm{s}^{-1}$ festgestellt werden. Allerdings ist diese Dynamik nicht ausreichend, um die Form der Energietransfereffizienz-Verteilung zu erklären. Es müssen weitere konformationelle Zustände existieren. So ist es denkbar, dass zwar die zwei Hauptkonformationen existieren, aber es innerhalb des geschlossenen und offenen Zustands mehrere Möglichkeiten der Domänenorientierung zueinander gibt, die auf einer schnelleren Zeitskala miteinander austauschen. Wird im einfachsten Modell nur eine dritte Population angenommen, kann diese zwar durch ein Drei-Gauß-Modell in der Verteilung der Energietransfereffizienzen angepasst werden, aber eine schnelle Austauschdynamik zu dieser dritten Population wird durch die langsame Dynamik zwischen der offenen und geschlossenen Hauptkonformation in der Korrelationsanalyse unterdrückt. Die schnelle Dynamik kann also weder bestätigt noch widerlegt werden.

Mit den Erkenntnissen können nun zwei mögliche Bilder für die Energielandschaft von TtSlyD im nativen Zustand konstruiert werden. In beiden Fällen ist das native Tal durch zwei Haupttäler gekennzeichnet, die die offene und geschlossene Konformation darstellen. Die Barriere

zwischen diesen Haupttälern lässt bei Raumtemperatur eine Dynamik im Bereich von $100 \, \mathrm{s}^{-1}$ zu. Die beiden Haupttäler selbst sind wiederum in einzelne Täler strukturiert, die kleineren Variationen in der offenen bzw. geschlossenen Konformation entsprechen. Da keine eindeutige Aussage über die Austauschdynamik zwischen diesen Teilkonformationen möglich ist, sind nun verschiedene Modelle möglich. Zum einen können die kleinen Teiltäler durch deutlich höhere Energiebarrieren voneinander getrennt sein, als es die beiden Hauptkonformationen sind. Dies hätte zur Folge, dass keine oder eine nur sehr langsame Austauschdynamik (mit Raten deutlich kleiner 1 s⁻¹) zwischen diesen Teiltälern stattfindet. Vielmehr springt das Protein in diesem Modell von einer beliebigen geschlossenen Konformation in eine der möglichen offenen Konformationen, dann wieder in eine andere geschlossene Konformation und so fort. Die Verbreiterung der Energietransfereffizienz-Verteilung ist in diesem Fall durch die statische strukturelle Heterogenität der Hauptkonformationen zu erklären. Allerdings spricht die komplizierte Topologie der Energielandschaft gegen dieses Modell. Ein anderes Bild der Energielandschaft ergibt sich, wenn angenommen wird, dass die Energiebarrieren zwischen den Teiltälern niedriger sind als die Energiebarriere zwischen den beiden Haupttälern. Dieses Bild führt zu dem Modell, dass TtSlyD im $100 s^{-1}$ -Bereich zwischen den beiden Hauptkonformationen austauscht. Innerhalb der offenen bzw. geschlossenen Konformation durchläuft das Protein aufgrund geringerer Energiebarrieren schneller diese kleineren konformationellen Anderungen. In diesem Modell würde die Verbreiterung der Energietransfereffizienz-Verteilung durch eine dynamische Heterogenität innerhalb der Hauptkonformationen erklärt werden, wobei die dynamischen Raten einerseits deutlich größer als $200 \,\mathrm{s}^{-1}$ sein müssen, um schneller als der Austausch zwischen den Hauptkonformationen zu sein. Andererseits müssen die Raten unter $10^5 \,\mathrm{s}^{-1}$ liegen, um eine Mittelung auszuschließen (Abb. 4.29). Dies würde wieder zu einer schmalen Energietransfereffizienz-Verteilung führen. Welchen Einfluss diese zwei vorgestellten Modelle auf den zeitabhängigen Verlauf der Energietranfereffizienz für ein einzelnes Molekül hätten, wird in der Abb. A.9 im Anhang skizziert.

4.4. Wechselwirkung mit verschiedenen Bindungspartnern

Im folgenden Abschnitt werden Einzelmolekülmessungen von TtSlyD in Anwesenheit verschiedener Bindungspartner (FK506, Rapamycin, RCM-T1, Insulin und TAT-Peptid) vorgestellt, um deren Einfluss auf die Struktur und die Dynamik und somit auf die Energielandschaft von TtSlyD zu erfassen.

4.4.1. Vorstellung der Bindungspartner

Die Immunosuppresiva FK506 und Rapamycin gelten als Inhibitoren der PPIase-Aktivität der Proteine aus der Klasse der FKBP [5, 103, 104]. Kovermann et al. [94] haben in NMR-Experimenten für SlyD gezeigt, dass diese Moleküle hauptsächlich mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums in der FKBP-Domäne wechselwirken.

Als Modellsubstrat für die PPIase-Aktivität dient die reduzierte und carboxymethylierte Form der Variante S54G/P55N der RCM-T1. Deren Rückfaltung bei hohen Salzkonzentrationen (2 M NaCl) in einen nativ-ähnlichen Zustand ist durch die cis-zu-trans-Isomerisierung des Prolins P39 limitiert [16]. Diese Reaktion wird jedoch durch den Faltungshelfer TtSlyD beschleunigt [4]. Die Einzelmolekülexperimente von TtSlyD mit RCM-T1 fanden bei geringen Salzkonzentrationen (100 mM NaCl) statt, sodass ein stabiler nativ-ähnlicher Zustand nicht erreicht werden kann. Dennoch wird von transienten Isomerisierungsreaktionen, katalysiert durch die FKBP-Domäne von TtSlyD, ausgegangen. Für eine um wenige Aminosäuren gekürzte Form von EcSlyD wurde durch Weininger et al. [6] gezeigt, dass RCM-T1 an mehreren Stellen des Proteins bindet, die sowohl in der IF- als auch in der FKBP-Domäne lokalisiert sind. EcSlyD zeigt eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit TtSlyD (Abb. 2.3).

Die Chaperon-Aktivität wird mit einem standardisierten Insulin-Verfahren [75] überprüft. Insulin neigt nach Zugabe von reduzierendem DTT zur Aggregation. Durch Streulichtmessungen konnte gezeigt werden, dass diese Aggregation durch SlyD reduziert wird, wobei diese Funktion allein die IF-Domäne trägt [85]. In den hier vorgestellten Experimenten dient Insulin als Beispiel für die unspezifische Bindung an die IF-Domäne [6]. Die Versuche fanden sowohl mit als auch ohne das Reduktionsmittel DTT statt.

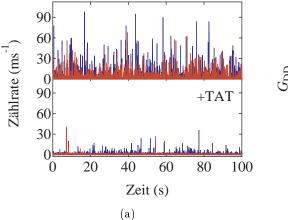
Neben Chaperon- und PPIase-Aktivität wurden für SlyD weitere zelluläre Funktionen festgestellt. So greift SlyD vermutlich in das TAT-abhängige Transportsystem der Zelle ein [21], indem SlyD an die TAT-Peptidsequenzen gefalteter Proteine bindet und diese somit vor proteolytischem Abbau schützt. Durch NMR-Messungen konnte aminosäurespezifisch festgestellt werden, dass das TAT-Signalpeptid beinahe ausschließlich mit Aminosäuren der IF-Domäne wechselwirkt [94].

Alle vorgestellten Substanzen wurden in Konzentrationen, die deutlich größer als die $K_{\rm D}$ -Werte sind, verwendet, sodass sichergestellt ist, dass die beobachteten $Tt{\rm SlyD}$ -Moleküle in Wechselwirkung mit dem jeweiligen Bindungspartner treten.

4.4.2. Einzelmolekül-Experimente mit Bindungspartnern

Das TAT-Signalpeptid führte zu einer starken Löschung der Fluoreszenz, sodass keine detaillierte Auswertung stattfinden konnte. Die Löschung kann auf einen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen und dem Tryptophan innerhalb des Peptids zurückgeführt werden (s. Abschnitt 3.1.4) [37]. In Abb. 4.38(a) ist der deutliche Signalverlust nach Zugabe des Peptids zu erkennen. In Abschnitt 4.3.2.3 wurde bereits durch Analyse der Rotationskorrelationszeiten die Vermutung aufgestellt, dass der Donorfarbstoff in der Doppelvariante D82C/T139C zu (85 % - 90 %) an die Bindungsstelle D82C in der IF-Domäne bindet. Das erklärt die starke Löschung nahezu aller Ereignisse in beiden Kanälen. Die Löschung des Akzeptors würde nur Effekte auf den Akzeptorkanal haben. Durch Anpassung der Gl. (2.57) an die Autokorrelation der Donorfluoreszenz wurde die Diffusionszeit von $\tau_{\rm D} = (57 \pm 5) \,\mu{\rm s}$ in Anwesenheit des Peptids bestimmt. Dieser Wert ist deutlich langsamer als die Diffusionszeit des Proteins $(\tau_D = (185 \pm 5) \,\mu s)$ ohne das TAT-Peptid, allerdings vergleichbar mit der Diffusionszeit freier Farbstoffe. Es stellt sich also die Frage, ob freier Farbstoff in der Lösung ist, der nicht gelöscht wird. In diesem Fall müsste es sich um Restfarbstoffe handeln, die aus dem Markierungsprozess resultieren. Die hier untersuchte Proteinprobe wurde nach der Fluoreszenzmarkierung nicht durch ein gesondertes Ultrazentrifugieren aufgereinigt, sodass freier Farbstoff denkbar wäre. Der Wert, der als Diffusionszeit gemessen wurde, kann aber auch vom Assoziations- und Dissoziationsverhalten des TAT-Peptids herrühren. Im Moment des Dissoziierens wird der Farbstoff nicht länger gelöscht, er zeigt wieder Fluoreszenz. Auf der Zeitskala der Bindungskinetik kommt es somit zu Fluoreszenzfluktuationen, die in der Autokorrelation messbar wären. Vergleichswerte für die bindungskinetischen Raten existieren nicht. Die These dieser Bindungskinetik kann somit nicht eindeutig bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Fluoreszenzfluktuationen im Bereich von $\tau_{\rm D}=(57\pm5)\,\mu{\rm s}$ von einer schnellen internen Dynamik des Proteins TtSlyD herrühren, durch die das gebundene TAT-Peptid an die Position des Fluoreszenzfarbstoffes heran- und wieder weggeführt wird. Die Fluoreszenz würde entsprechend abstands- und somit zeitabhängig gelöscht werden.

Für alle weiteren Substrate wurden neben den Energietransfereffizienzverteilungen (Abb. 4.39(a)) auch die Korrelationsanalyse mit dem Quotienten $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ (Abb. 4.39(b)) durchgeführt. Es können jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Form der $E_{\rm t}$ -Verteilung festgestellt werden. Die Verteilungen sind weiterhin stark verbreitert und können durch ein Zwei-Zustands-Modell (rote Linie) angepasst werden. Nur kleine Verschiebungen in der relativen Population der Einzelzustände sind zu erkennen. So wird der Zustand, der der geschlossenen Konformation zugeordnet wird, im Fall von Insulin stärker bevölkert (5), im Fall des Inhibitors FK506 weniger bevölkert (3). Erstaunlich ist, dass die interne Dynamik, messbar durch den Abfall von $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$, nicht wesentlich verändert ist verglichen zu derjenigen im freien Zustand des Proteins. Zwar variieren die Kurven leicht in ihrer Amplitude. Dies kann jedoch bereits durch geringe Verschiebungen der Energietransfereffizienzen begründet sein. Der Abfall findet allerdings stets in einem Zeitbereich 10^{-4} s $\leq \tau \leq 10^{-3}$ s statt. Nach einer Normierung, wie sie in Abschnitt 4.3.3.1 diskutiert wurde, liegen alle Kurven übereinander. Folglich ist ein Einfluss der Bindungspartner auf die interne Dynamik nicht nachweisbar.



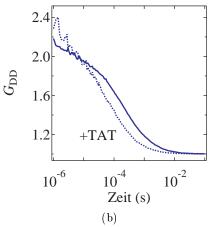


Abb. 4.38.:

Wechselwirkung mit dem TAT-Peptid. Die Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde vor (a. oben; b. durchgezogen)) bzw. nach (a. unten; b. gestrichelt) Zugabe des TAT-Peptids im POE-Schema (40 μ W bei 488 nm, 15 μ W bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Dargestellt sind die Zeitspuren (a) sowie die normierte Autokorrelation des Donorsignals (b) während direkter Anregung. Die Diffusionszeit wird nach Gl. (2.57) zu $\tau_D = (185 \pm 5) \, \mu$ s ohne TAT und $\tau_D = (57 \pm 5) \, \mu$ s mit TAT bestimmt.

Die geringfügige Verschiebung der E_t-Verteilung kann auch durch einen möglichen Einfluss der Bindungspartner auf die Farbstoffe begründet sein. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenzlebensdauer für die an den Einzelvarianten des Proteins (D82C bzw. T139C) gebundenen Farbstoffe in Anwesenheit der Inhibitoren FK506 und Rapamycin bestimmt. Die zeitabhängigen Fluoreszenzabklingkurven stimmen für AF488 (Abb. A.10(a) im Anhang) an beiden Bindungsstellen überein, für A647N (Abb. A.10(b) im Anhang) kommt es nur an der Bindungsstelle D82C zu leichten Veränderungen mit der Tendenz zu längeren Fluoreszenzlebensdauern. Dies wurde nicht erwartet, da die Wechselwirkung der Inhibitoren im Wesentlichen mit der FKBP-Domäne stattfindet, der Farbstoff jedoch in der IF-Domäne lokalisiert ist. In Abschnitt 4.3.2.3 wurde herausgefunden, dass an der Bindungsstelle D82C hauptsächlich der Donor AF488 bindet und somit der Einfluss auf A647N kaum messbar sein kann. Für Insulin und RCM-T1 war eine solche Kontrollmessung nicht möglich, da entsprechend hohe Konzentrationen der Substanzen für diese Ensemblemethode nicht verfügbar waren.

4.4.3. Zusammenfassung

Moleküle, die an Proteine binden, können deren Energielandschaft beeinflussen. Dabei werden Konformationen energetisch ungünstiger oder zusätzlich begünstigt. In der Energielandschaft können demzufolge einzelne Täler in der Höhe verschoben und die Barrieren gesenkt oder gehoben werden. Für die Adenylatkinase konnte dieser Effekt durch Bindung der Substrate in Einzelmolekül-FRET-Messungen nachgewiesen werden [14]. Aus diesem Grund wurden für TtSlyD mit verschiedenen Bindungspartnern sowohl die Energietransfereffizienz-Verteilung bestimmt als auch die Korrelationsanalyse auf interne Dynamik durchgeführt. Es musste je-

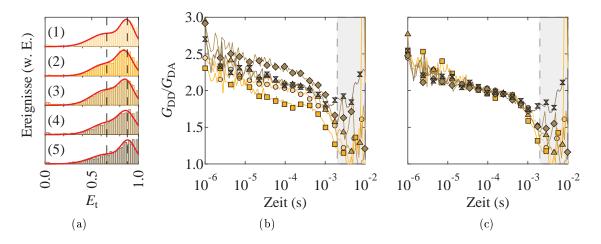


Abb. 4.39.:

Wechselwirkung mit verschiedenen Bindungspartnern. Die Variante D82C/T139C des Proteins $Tt\mathrm{SlyD}$ ($c_{Tt\mathrm{SlyD}} < 1\,\mathrm{nM}$) wurde mit $70\,\mu\mathrm{M}$ Rapamycin (2, Quadrat), $100\,\mu\mathrm{M}$ FK506 (3, Dreieck), $14\,\mu\mathrm{M}$ RCM-T1 (4, Diamant) und mit $200\,\mu\mathrm{M}$ Insulin (5, Doppeldreieck) im POE-Schema ($40\,\mu\mathrm{W}$ bei $488\,\mathrm{nm}$, $15\,\mu\mathrm{W}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz}$) angeregt. Für jedes Einzelmolekülereignis ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 40\,\mathrm{s}^{-1}$, $S_{\mathrm{akz}}^{635} > 10\,\mathrm{s}^{-1}$) wurde E_{t} berechnet. Die resultierenden Verteilungen wurden mit einem Zwei-Gauß-Modell angepasst (rote Linien). Die Mittelwerte der zwei Gauß-verteilungen für das Protein ohne Bindungspartner (1, Kreis) sind als gestrichelte Linie angedeutet. Aus den ausgewählten Photonen wurde das Korrelationsverhältnis $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ berechnet (b) und auf eine gemeinsame Amplitude normiert (c). Der graue Balken (b, c) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2\,\mathrm{ms}$.

doch festgestellt werden, dass weder die RCM-T1 als Substrat für die FKBP-Domäne, die Inhibitoren Rapamycin und FK506, noch Insulin als Chaperon-Substrat einen signifikanten Einfluss auf die Energietransfereffizienz-Verteilung und die interne Dynamik in der Korrelationsanalyse haben. Daraus lässt sich ableiten, dass das Populationsverhältnis der beiden Haupttäler der offenen (A) und geschlossenen (B) Konformation in der Energielandschaft von TtSlyD erhalten bleibt. Dies bedeutet, dass der Unterschied in der Gibbs-Energie zwischen diesen Tälern ($\Delta G_{A,B}$) erhalten bleibt. Da auch keine Änderungen in der internen Dynamik, also im Austausch zwischen diesen Haupttälern, messbar waren, folgt daraus, dass die Energiebarriere zwischen den Haupttälern ebenso durch die Bindungspartner nicht beeinflusst wird. Dies kann zum einen bedeuten, dass der Unterschied in der Gibbs-Energie zwischen der mit dem Bindungspartner (*) gebundenen und der freien Enzymform ($\Delta G_{\text{A},\text{A}^*}$ bzw. $\Delta G_{\text{B},\text{B}^*}$) sehr klein gegenüber dem Unterschied in der Gibbs-Energie $\Delta G_{\mathrm{A,B}}$ ist. Dafür würden auch die nur moderaten Affinitäten im μ M-Bereich sprechen [5]. Die Änderungen, die in diesem Fall durch die Bindungspartner hervorgerufen würden, wären mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden einfach nicht messbar. Zum anderen könnte durch die Bindungspartner auch die gesamte Energielandschaft abgesenkt werden, sodass nicht nur tiefere Täler für die energetisch günstigeren Bindungszustände (A*, B*) entstünden, sondern auch die Barriere zwischen diesen Zuständen im gleichen Maße sinken würde. Sowohl das Populationsverhältnis als auch die interne Austauschdynamik blieben in diesem Fall unverändert.

4.5. Separate Markierung der IF-Domäne

Neben den umfangreichen Experimenten an der Variante D82C/T139C wurde ebenso die Variante P68C/E111C des Proteins TtSlyD bezüglich der Energietransfereffizienz zwischen den Farbstoffen AF488 und A647N untersucht. Im Vergleich zur Variante D82C/T139C, bei der beide Domänen markiert sind und somit Abstandsänderungen zwischen den Domänen zugänglich werden, sind in diesem Fall beide Farbstoffe in der IF-Domäne lokalisiert (Abb. 2.2). Auf diesem Weg kann die interne Stabilität bzw. Flexibilität der IF-Domäne separat untersucht werden. Anhand von eindimensionalen NMR-Spektren (Abb. A.14 im Abhang) wurde bestätigt, dass die fluoreszent markierte Variante P68C/E111C dieselbe Rückgratstruktur zeigt wie der Wildtyp von TtSlyD. Ausgehend von der Kristallstruktur [4] ist der Abstand zwischen den markierten Aminosäuren mit $(22,0\pm0,5)$ Å sehr gering. Somit wurde erwartet, dass man sehr hohe Energietransfereffizienzen $(E_{\rm t}=0,99)$ erhält.

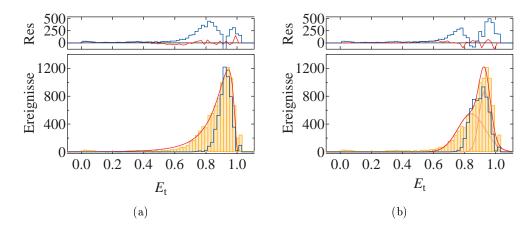


Abb. 4.40.:

Energietransfereffizienz bei TtSlyD P68C/E111C. Analyse der IF-Domäne: Die doppelt markierte Variante P68C/E111C wurde im POE-Schema ($40\,\mu\mathrm{W}$ bei $488\,\mathrm{nm}$, $15\,\mu\mathrm{W}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz}$) angeregt. Für alle Einzelmolekülereignisse ($S_\mathrm{sum}^{488} > 40\,\mathrm{s}^{-1}$, $S_\mathrm{akz}^{635} > 10\,\mathrm{s}^{-1}$) wurden die Werte E_t bestimmt und nachfolgend im Histogramm aufsummiert. Die experimentellen Daten (gelbe Balken) wurden mit einer reinen logarithmischen Normalverteilung (a) oder mit einem Zwei-Gauß-Modell (b) angepasst (rote Linien). Die Einzelanteile sind in (b) extra eingetragen (rosa Linien). Für beide Fälle der Anpassung wurden entsprechend der Ergebnisse für die mittleren Transfereffizienzen $\langle E_{\mathrm{t,1}} \rangle = 0.92 \pm 0.01$ (a,b) und $\langle E_{\mathrm{t,2}} \rangle = 0.84 \pm 0.03$ (b) durch Schrotrauschen simulierte Daten zum Vergleich aufgeführt (blaue Linienhistogramme). Die Differenzen zwischen Experiment und Simulation sowie die Residuen der graphischen Anpassung sind in entsprechender Farbkodierung unter Res aufgetragen.

4.5.1. Strukturelle Heterogenität oder lokale Entfaltung

Unter identischen experimentellen Bedingungen verglichen zu der Variante D82C/T139C wurde die Energietransfereffizienzverteilung für die Variante P68C/E111C von TtSlyD in Abb. 4.40 bestimmt. Aufgrund der Lage dicht am Grenzwert $E_{\rm t}=1,0$ wurden die Daten mit einer asymmetrischen logarithmischen Normalverteilung angepasst (Abb. 4.40(a)) [57].

Allerdings kann die Breite nicht durch das Schrotrauschen der Photonen erklärt werden, was aus einem Vergleich mit simulierten Daten hervorgeht. So wurden die Daten alternativ mit einem Zwei-Gauß-Modell angepasst (Abb. 4.40(b)).

Die Ursache für eine zweite Population könnte in der lokalen Entfaltung der IF-Domäne liegen. Während die FKBP-Domäne stabil gefaltet vorliegt, müsste man den Verbindungsund IF-Domänen-Bereich als geschlossenes Zufallsknäuel mit einer Länge von insgesamt 65
Aminosäuren betrachten (Abb. 5.2 (oben)). Nach dem WLC-Modell (engl. <u>Wormlike Chain</u>)
berechnet sich der mittlere Abstand zweier Aminosäuren (1, 2) in einem offenen Zufallsknäuel
zu:

$$\sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle_{\text{offen}}} = \sqrt{2l_{\text{p}}L},$$
(4.11)

wobei l_p die Persistenzlänge und L die Konturlänge zwischen beiden Aminosäuren ist. Wird die Peptidkette als Ring geschlossen, wie es durch die Bindung der IF-Domäne an die FKBP-Domäne der Fall ist, wird der Wert des mittleren Abstandes nach Vollmert et al. [105] reduziert auf:

$$\sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle_{\text{Ring}}} = 0.79 \cdot \sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle_{\text{offen}}}.$$
 (4.12)

Mit einer Persistenzlänge von $l_{\rm p}=3.7\,{\rm \mathring{A}}$ ohne Denaturierungsmittel [106] können der mittlere Abstand und somit die erwartete mittlere Energietransfereffizienz abgeschätzt werden. Die Konturlänge zwischen den Aminosäuren kann in der ringförmigen Sequenz mit 43 Aminosäuren bzw. 22 Aminosäuren zu $L=172\,{\rm \mathring{A}}$ bzw. $L=88\,{\rm \mathring{A}}$ [107] berechnet werden. Mit den Gl. (4.11) und (4.12) werden $\sqrt{\langle R_{1,2}^2\rangle_{\rm Ring}}=28\,{\rm \mathring{A}}$ bzw. $\sqrt{\langle R_{1,2}^2\rangle_{\rm Ring}}=20\,{\rm \mathring{A}}$ berechnet. Nach Gl. (2.24) folgen bei einem Försterradius von $R_0=50\,{\rm \mathring{A}}$ die Werte $E_{\rm t}=0.97$ bzw. $E_{\rm t}=0.99$. Eine lokale Entfaltung würde somit ähnliche Energietransfereffizienzen liefern wie die nativ gefaltete IF-Domäne, wie sie aus der Röntgenstruktur hervorgeht. Zieht man in Betracht, dass durch die fixe Bindung an die FKBP-Domäne das Modell des Zufallsknäuels nur bedingt richtig ist, und Kettenabschnitte vielleicht in gestreckterer Form vorliegen, können auch geringere Energietransfereffizienzen erwartet werden. Somit kann eine lokale Entfaltung auf Grundlage der Einzelmolekülexperimente nicht ausgeschlossen werden.

Hierbei muss beachtet werden, dass die Ursache für die zweite Population auch in den unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern für den Akzeptorfarbstoff A647N an den beiden Bindungstellen, P68C und E111C, begründet liegen könnte. In Abschnitt 4.3.2.1 wurden an den Einzelvarianten von TtSlyD die Fluoreszenzlebensdauern von $\tau_F = (3.9\pm0.1)$ ns an P68C und $\tau_F = (4.3\pm0.1)$ ns an E111C bestimmt. Bei einer proportionalen Abhängigkeit zwischen τ_F und der Fluoreszenzquantenausbeute Q (Gl. (2.9)), ergibt sich in Q ein relativer Unterschied von 9% zwischen den Bindungsstellen. Dieser Unterschied resultiert in einer Verschiebung der Energietransfereffizienz von lediglich $\Delta \langle E_{\rm t} \rangle = 0.02$. Die vollständige Breite und die Aufspaltung in zwei Populationen mit einer Differenz in den mittleren Energietransfereffizienzen von $\Delta \langle E_{\rm t} \rangle = 0.08$ (s. Abb. 4.40) ist jedoch deutlich größer und kann folglich nicht allein durch die Effekte auf die Fluoreszenzlebensdauer erklärt werden.

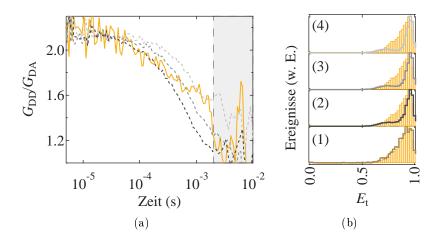


Abb. 4.41.:

Analyse der internen Dynamik für TtSlyD P68C/E111C. Vergleich von experimentellen Daten (a: gelbe Linie; b: Balkendiagramme; b (1): Linie) und simulierten Daten (a: gestrichelte Linien; b (2)-(4): Liniendiagramme). Die Photonen wurden entsprechend der Schwellwerte $S_{\rm sum}^{488} > 40\,{\rm s}^{-1}$, $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$ (b (2)-(4) und b (1): Balkendiagramm) bzw. $S_{\rm sum}^{488} > 20\,{\rm s}^{-1}$, $S_{\rm akz}^{635} > 40\,{\rm s}^{-1}$ (a und b (1): Linie) ausgewählt. Der Einfluss der unterschiedlichen Akzeptorschwellen auf die Form der $E_{\rm t}$ -Verteilung ist vernachlässigbar (b (1)). Es wurde ein Zwei-Zustands-System mit $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.68$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.96$ simuliert. Zwischen den Zuständen wurde eine zusätzliche Dynamik mit den Raten $k_{12} = 800\,{\rm s}^{-1}$ (2), $400\,{\rm s}^{-1}$ (3) bzw. $k_{12} = 160\,{\rm s}^{-1}$ (4) simuliert, wobei die Raten im Verhältnis $\frac{k_{12}}{k_{21}} = \frac{4}{1}\,{\rm stehen}$. Die Daten wurden hinsichtlich ihrer Korrelation (a) und ihrer Histogrammform (b) analysiert. Der graue Balken (a) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2\,{\rm ms}$.

4.5.2. Interne Dynamik

Unabhängig von der Ursache einer weiteren Population, ob also eine zweite Konformation vorliegt oder eine lokale Entfaltung stattfindet, musste festgestellt werden, dass auch eine Beschreibung als Zwei-Zustands-System, charakterisiert durch die zwei gaußförmigen Verteilungen, nicht hinreichend ist, um die Breite der Verteilung zu erklären. Da für die Variante P68C/E111C dieselben Kontrollmessungen wie für die Variante D82C/T139C durchgeführt und analysiert wurden, muss der Grund in der Verbreiterung ebenso ein dynamisches Wechselspiel zwischen den verschiedenen Populationen sein.

Aus diesem Grund wurde die Korrelations-Analyse nach Torres und Levitus durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.41 dargestellt. Interessanterweise folgt aus der Betrachtung der Kreuzkorrelation der verschiedenen Richtungen $(G_{\text{DA}}, G_{\text{AD}})$, dass das Photobleichen des Akzeptors erst mit höheren Akzeptorschwellen $(S_{\text{akz}}^{635} > 40\,\text{s}^{-1})$ eindeutig ausgeschlossen werden kann (Abb. A.3 im Anhang). Da allerdings die Form der E_{t} -Verteilung nur vernachlässigbar beeinflusst wird (Abb. 4.41(b) (1)), werden für die Histogramme geringe Akzeptorschwellen angesetzt, um die Güte der Statistik zu wahren. Für die Korrelationsanalyse müssen die Verluste vieler Photonen hingenommen und höhere Schwellwerte genutzt werden.

Obwohl die angenommenen Einzelkonformationen auf der E_t -Achse relativ dicht zueinander liegen, kann am Quotienten $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ ein deutlicher Abfall im Zeitbereich $10^{-4}\,{\rm s} \le \tau \le 10^{-3}\,{\rm s}$ festgestellt werden. Der Einfluss der Akzeptor- und Summenschwelle zur Auswahl der Ein-

zelmolekülereignisse auf diesen Abfall wurde in Abb. A.8 (im Anhang) kontrolliert.

Für einen Vergleich wurde ein Zwei-Zustands-System simuliert, dessen mittlere Energietransfereffizienzen mit $\langle E_{\rm t,1} \rangle = 0.68$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.96$ angepasst wurden, sodass die experimentell bestimmte Amplitude in $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ reproduziert wird, die $E_{\rm t}$ -Verteilung (Abb. 4.41(b)) aber dennoch nahe an der experimentell bestimmten Verteilung liegt. Die Asymmetrie der $E_{\rm t}$ -Verteilung wird durch ein Ratenverhältnis von $\frac{k_{12}}{k_{21}} = \frac{4}{1}$ angepasst. Es folgt, dass der Abfall des Verhältnisses $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ durch eine Dynamik mit den Raten im Bereich $k_{12} = 800\,{\rm s}^{-1}$ bis $k_{12} = 160\,{\rm s}^{-1}$ erklärt werden kann (Abb. 4.41(a), grau gestrichelt). Der weite Bereich folgt aus dem stark verrauschten Charakter der experimentellen Kurve (orange).

Wie bereits erläutert, kann eine lokale Entfaltung der IF-Domäne allein durch die Einzelmolekülexperimente nicht ausgeschlossen werden. Durch die Bestimmung der Dynamikraten wurde aber bekannt, dass der entfaltete Zustand auf einer Zeitskala im ms-Bereich stabil wäre. Die Entfaltung würde zur Änderung der chemischen Verschiebung einzelner Aminosäuren führen. Dies kann durch NMR-Experimente jedoch nicht bestätigt werden [67]. Desweiteren konnten Zoldak et al. [22] durch Ensemble-Fluoreszenzmessungen feststellen, dass die IF-Domäne zwar in isolierter Form keinen stabil gefalteten Zustand besitzt, jedoch durch Bindung an die FKBP-Domäne deutlich stabilisiert wird und im Gleichgewicht kooperativ mit der FKBP-Domäne entfaltet. Diese Erkenntnisse führen in der Summe zu der begründeten Annahme, dass die IF-Domäne stabil vorliegt und die zusätzliche Population in der $E_{\rm t}$ -Verteilung durch eine Konformationsänderung erklärt werden muss.

Ähnlich zur Variante D82C/T139C ist allerdings ein dynamischer Austausch zwischen zwei definierten Abständen nicht hinreichend, um die Form und Breite der gemessenen E_t -Verteilung zu erklären (Abb. 4.41(b)). Das Modell zweier möglicher Konformationen muss also durch eine zusätzliche strukturelle Heterogenität erweitert werden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Wahl der Bindungsstellen der Farbstoffe nicht nur die Stabilität der IF-Domäne kontrolliert wird. Zusätzlich hat auch die globale Dynamik zwischen den Domänen, wie sie durch die Messungen an der Variante D82C/T139C bestimmt wurde, einen Einfluss auf den Energietransfer zwischen den Farbstoffen. Die Aminosäure an der Position 68 zählt zum Verbindungsbereich zwischen FKBP- und IF-Domäne, ist somit Bestandteil eines unstrukturierten Proteinbereichs. Da die globale Dynamik vermutlich hauptsächlich durch diesen unstrukturierten Verbindungsbereich getragen wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Breite der E_t -Verteilung durch die globale Dynamik zwischen FKBP- und IF-Domäne begründet werden kann. So ist auch zu erklären, dass die dynamischen Übergänge zwar in einem geringfügig schnelleren, aber dennoch in einem vergleichbaren Zeitfenster von 10^{-4} s $\leq \tau \leq 10^{-3}$ s stattfinden.

4.5.3. Zusammenfassung

Die Ergebnisse, die aus den Experimenten der Doppelvariante D82C/T139C des Proteins TtSlyD folgen, konnten genutzt werden, um ein Bild der Energielandschaft zu entwerfen. Allerdings handelt es sich dabei um eine eindimensionale Darstellung, die allein die Abhängigkeit vom Abstand zwischen den Domänen, charakterisiert durch die Aminosäuren D82C

und T139C, wiedergibt. Der gesamte Konformationsraum wurde auf diese Variable reduziert. Während die Domänenbewegung durch die Wahl dieser Variable gut beschrieben werden kann, sind weitere Aussagen über die einzelnen Domänen und deren Struktur nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine weitere Proteinvariante P68C/E111C fluoreszent markiert, bei der beide Farbstoffe des FRET-Paares in der IF-Domäne lokalisiert sind. So ist eine zweite Variable experimentell zugänglich, die den Konformationsraum des Proteins beschreibt. Aufgrund des geringen Abstandes der beiden Farbstoffe im nativen Zustand des Proteins wurde eine Verteilung mit hohen Energietransfereffizienzen gemessen. Die Verteilung kann jedoch nicht durch eine einzige Konformation mit einem festen Abstand beschrieben werden. Aus NMR-Experimenten lässt sich ableiten, dass die IF-Domäne nicht lokal entfaltet. Somit kann eine solche lokale Entfaltung als Ursache für die Verbreiterung der Verteilung ausgeschlossen werden. Die Energietransfereffizienz-Verteilung kann mit einem Zwei-Gauß-Modell angepasst werden. Aus dem Vergleich mit simulierten Daten geht jedoch hervor, dass es sich, wie im Fall der Variante D82C/T139C, um eine komplexere strukturelle Heterogenität handelt. Die Dynamikanalyse der Korrelationskurven liefert eine Austauschdynamik, die mit $k_{12}=800\,\mathrm{s^{-1}}$ bis $k_{12}=160\,\mathrm{s^{-1}}$ beschrieben werden kann, wobei $\frac{k_{12}}{k_{21}}=\frac{4}{1}$ gilt. Diese Dynamik ist vergleichbar mit den dynamischen Fluktuationen im Abstand von D82C und T139C, allerdings mit Werten von bis zu $k_{12} = 800 \,\mathrm{s}^{-1}$ geringfügig schneller. Das kann als ein Hinweis auf die schnellere Dynamik gesehen werden, die innerhalb der geschlossenen und offenen Konformation stattfindet. Da die Aminosäure P68C aber nur am Rand der IF-Domäne im unstrukturierten Verbindungsbereich zwischen den Domänen lokalisiert ist, ist die globale Dynamik der Domänen zueinander nicht völlig entkoppelt und spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Variante P68C/E111C wider. Eine Überlagerung von globaler Domänenbewegung und schnelleren Bewegungen mit geringeren Amplituden ist in diesem Falle denkbar. Die Abstände zwischen P68C und E111C und zwischen D82C und T139C bilden somit keine unabhängigen Variablen, wie sie für das Bild einer zweidimensionalen Energielandschaft nötig wären. Dennoch konnten die Ideen, wie sie aus der Betrachtung der Variante D82C/T139C hervorgehen, gefestigt werden.

4.6. Faltung des Proteins

In den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit wurden Struktur und Dynamik des Proteins TtSlyD unter nativen Bedingungen untersucht. Im folgenden wird das Protein mit dem Denaturierungsmittel Guanidinhydrochlorid (GdHCl) destabilisiert und schließlich komplett denaturiert. Diese Entfaltungsreihen wurden mit beiden Varianten, D82C/T139C und P68C/E111C, durchgeführt. In Abb. 4.42 werden beide Markierungen (rote, blaue Kugeln) schematisch dargestellt. Die grauen Linien stellen den Abstand im nativen Zustand, die grün gefärbte Struktur gibt den Sequenzabstand an. Obwohl die Mutationen für die Farbstoffbindungen sehr unterschiedlich gewählt wurden, ist der Sequenzabstand mit 57 bzw. 43 Aminosäuren in beiden Fällen grob vergleichbar. Dieser Abstand ist entscheidend für die komplett entfaltete Proteinkette, die sich wie ein statistisches Knäuel verhält. Zur Beschreibung eines solchen Zufallsknäuels können verschiedene Modelle herangezogen werden, deren Anwendbarkeit und Genauigkeit von O'Brien et al. [106] diskutiert worden sind. Für eine einfache Abschätzung wurde in dieser Arbeit das WLC-Modell (engl.: <u>Wormlike Chain</u>) genutzt. In diesem wird das entfaltete Protein als Zufallskette mit einer gewissen Steifigkeit, charakterisiert durch die Persistenzlänge l_p , beschrieben. Der effektive Abstand (RMS-Abstand) zweier Aminosäuren der Kette $\sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle}$ wird durch Gl. (4.13) beschrieben:

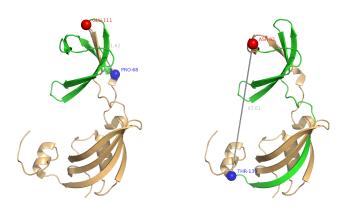
$$\sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle} = \sqrt{2l_{\rm p}L}.\tag{4.13}$$

Die Konturlänge L zwischen den Aminosäuren kann aus dem Sequenzabstand und dem mittleren Vorschub pro Aminosäure von $(4,0\pm0,3)$ Å [107] berechnet werden. Für die Variante D82C/T139C erhält man $L=(228\pm17)$ Å, für P68C/E111C $L=(172\pm13)$ Å.

4.6.1. Entfaltungsreihen

4.6.1.1. Energietransfereffizienz-Histogramme

Die Entfaltungsreihe für die Variante D82C/T139C, bei der der Abstand über beide Domänen experimentell zugänglich ist, ist in Abb. 4.43 für GdHCl-Konzentrationen von $c_{\rm GdHCl}=0.0\,{\rm M}$ bis $c_{\rm GdHCl}=6.0\,{\rm M}$ dargestellt. Die Verteilung der Energietransfereffizienz ist für kleine Konzentrationen bis $c_{\rm GdHCl}\approx 1.5\,{\rm M}$ nahezu konstant. Für höhere Konzentrationen tritt eine dritte Population mit geringeren Energietransfereffizienzen auf, deren relativer Anteil mit steigender Konzentration an GdHCl zunimmt, bis schließlich ab ungefähr $c_{\rm GdHCl}\approx 4.5\,{\rm M}$ kaum Ereignisse im Bereich $E_{\rm t}>0.5$ gezählt werden, die dem nativen Protein zugeordnet werden können. Die entstandene dritte Population wird der entfalteten Kette zugeordnet, d. h. immer mehr Proteine gehen ab $c_{\rm GdHCl}\geq 2.0\,{\rm M}$ in den entfalteten Zustand über. Die einzelnen Verteilungen wurden mit einem Mehrfach-Gauß-Modell angepasst, um quantitative Vergleiche anstellen zu können. Bis $0.9\,{\rm M}$ GdHCl wurde ein Zwei-Gauß-Modell (Indizes 2.3) genutzt, für höhere Konzentrationen wurde dieses auf ein Drei-Gauß-Modell erweitert, wobei die Breiten der beiden Gaußglocken des nativen Proteins ($w_2=0.25, w_3=0.08$)



(a) *Tt*SlyD P68C/E111C

(b) TtSlyD D82C/T139C

Abb. 4.42.:

Kristallstruktur des Proteins TtSlyD. Durch Kugeln sind die C_{α} -Atome derjenigen Aminosäuren markiert, die durch Cysteine für die Farbstoffmarkierung ersetzt wurden. Mit einer grauen Strichellinie wird der aus der nativen Kristallstruktur (pdb-Schlüssel: 3CGN) [4] bestimmte Abstand hervorgehoben und ist entsprechend in \mathring{A} angegeben. Der sequentielle Abstand zwischen den fluoreszent markierten Aminosäuren ist grün eingefärbt.

festgehalten wurden. Diese Werte resultieren aus den Mittelwerten der ersten Verteilungen. Ab $c_{\rm GdHCl}=3.6\,\rm M$ wurde zusätzlich die Position der dritten Gaußkurve ($\langle E_{\rm t,3}\rangle=0.85$) und ab $c=3.8\,\rm M$ die der zweiten Gaußkurve ($\langle E_{\rm t,2}\rangle=0.63$) festgehalten. Auch diese Werte folgen den Mittelwerten der vorangegangenen Messungen. Das Fixieren der einzelnen Anpassungsparameter wurde nötig, da eine zu geringe Anzahl an Ereignissen im nativen Bereich gemessen wurde. Das Anpassen der Verteilungen für Konzentrationen $c_{\rm GdHCl}<1.5\,\rm M$ mit einem Drei-Gauß-Modell ist nicht möglich. Ein solches Modell ist in diesem Fall für die experimentellen Daten überbestimmt, sodass erst für höhere Konzentrationen dieses Modell genutzt werden konnte.

Wird bei der Auswahl der Einzelmolekülereignisse auf die Akzeptorschwelle $S_{\rm akz}^{635}$ verzichtet, werden auch die Ereignisse ohne aktiven Akzeptor gezählt. Dabei fällt auf, dass der relative Anteil dieser Ereignisse mit der Konzentration an GdHCl steigt (Abb. A.15 im Anhang). Dies deutet auf eine höhere Wahrscheinlichkeit des Photobleichens hin, denn die Anzahl der nur mit Donorfarbstoff markierten Proteine ist unabhängig von der GdHCl-Konzentration.

Die Variante P68C/E111C als Referenz für die Entfaltung der IF-Domäne wurde analog bis zu einer Konzentration von 6,35 M GdHCl untersucht (Abb. 4.44(b)). Auch in diesem Fall ist ab einer bestimmten Konzentration ($c_{\rm GdHCl}=3,3\,\rm M$) das Auftreten einer zusätzlichen und stetig wachsenden Population durch entfaltete Proteinketten zu erkennen. Die Verteilung, die den nativen Zustand darstellt, wurde durch ein Zwei-Gauß-Modell angepasst und ab 3,3 M durch eine dritte Gaußkurve erweitert. Diese Erweiterung kann mit dem sprunghaften Anstieg der aufsummierten mittleren Abweichung (χ^2 -Wert ohne Wichtung) zwischen dem Zwei-Gauß-Modell und den experimentellen Daten auf den doppelten Wert begründet

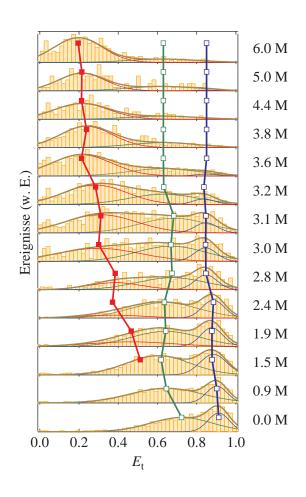


Abb. 4.43:

Entfaltung der Variante D82C/T139C von TtSlyD. Die Messung erfolgte in Lösung mit dem POE-Anregungsschema (40 μW bei $488 \,\mathrm{nm}$, $15 \,\mu\mathrm{W}$ bei $635 \,\mathrm{nm}$ und $10 \,\mathrm{MHz}$) bei verschiedenen Konzentration von GdHCl (rechte Spalte). Für alle Einzelmolekülereignisse $(S_{\text{sum}}^{488} > 40 \,\text{s}^{-1}, S_{\text{akz}}^{635} > 10 \,\text{s}^{-1})$ wurde E_{t} berechnet. Die Histogramme wurden mit einem Dreifach-Gauß-Modell angepasst (braune Linien). Zusätzlich sind die einzelnen Gaußglocken entsprechend ihrer Interpretation als entfaltete Konformation (rot), nativ offene Konformation (grün) und nativ geschlossene Konformation (blau) dargestellt. Deren Mittelwerte sind durch Kästchen hervorgehoben. Die Anpassung erfolgte bis $c_{\text{GdHCl}} = 1.9 \,\text{M}$ mit nur zwei Gaußglocken, ab $c_{\text{GdHCl}} = 2.4 \,\text{M}$ wurde eine dritte Gaußglocke für die entfaltete Fraktion eingeführt. Die Breite der zwei bestehenden Gaußglocken wurde festgehalten bei $w_2 = 0.25$ und $w_3 = 0.08$. Diese Werte ergeben sich aus den Mittelwerten der ersten drei Anpassungen. Ab $c_{\text{GdHCl}} = 3.6 \,\text{M}$ wurde zusätzlich die Position der dritten Gaußglocke mit $\langle E_{\rm t,3} \rangle = 0.85$ und ab $c_{\text{GdHCl}} = 3.8 \, \text{M}$ die der zweiten Gaußglocke mit $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.63$ festgehalten. Die Werte ergeben sich jeweils aus den Mittelwerten der zuvor angepassten Kurven.

werden. Die Position der nativen Subpopulation wurde ab $c_{\text{GdHCl}} = 3.3 \,\text{M}$ bei $\langle E_{\text{t,3}} \rangle = 0.87$ festgehalten. Für Konzentrationen $c_{\text{GdHCl}} > 4.1 \,\text{M}$ werden vermehrt Ereignisse im Bereich $E_{\text{t}} < 0.1$ gezählt, die mit dem Photobleichen des Akzeptors zu begründen sind. Da diese Ereignisse jedoch von der entfalteten Population getrennt liegen, wird auf ein vollständiges Aussortieren dieser Ereignisse mit folgendem Verlust der statistischen Güte des Histogramms verzichtet.

Da die Verteilung des nativen Zustands dicht an der Grenze der Energietransfereffizienz-Achse ($E_{\rm t}=1,0$) liegt und $E_{\rm t}$ dort wenig sensitiv gegenüber Verschiebungen ist, wurden zum Vergleich Histogramme über das logarithmische Signalverhältnis im Donor- und Akzeptorkanal lg $\left(\frac{S_{\rm don}}{S_{\rm akz}}\right)$ erstellt (Abb. 4.44(a)). Diese sind in ihrer horizontalen Achse nicht beschränkt. Die Anpassung erfolgt alternativ über ein Ein- bzw. Zwei-Gauß-Modell. Das bedeutet, dass die native Population mit einer alleinigen Gauß-Verteilung angepasst wird.

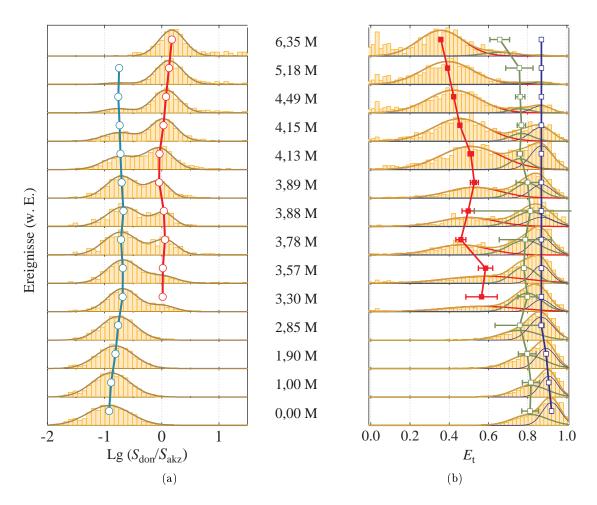


Abb. 4.44.:

Entfaltung der Variante P68C/E111C von TtSlyD. Die Messung erfolgte in Lösung mit dem POE-Anregungsschema (40 μ W bei 488 nm, 15 μ W bei 635 nm und 10 MHz) bei verschiedenen Konzentration von GdHCl (Spalte in der Mitte). Für alle Einzelmolekülereignisse ($S_{\rm sum}^{488} > 40 \, {\rm s}^{-1}$, $S_{\rm akz}^{635} > 10 \, {\rm s}^{-1}$) wurden das logarithmische Intensitätsverhältnis lg $\left(\frac{S_{\rm don}}{S_{\rm akz}}\right)$ und $E_{\rm t}$ berechnet. Die Histogramme wurden mit einem Doppel- bzw. Dreifach-Gaußmodell angepasst (braune Linien). In (b) sind die Einzelkurven der entfalteten Fraktion rot, die der nativen Fraktion blau und grün eingezeichnet. Die Mittelwerte der jeweiligen Verteilungen sind durch Kreise (a) bzw. Quadrate (b) hervorgehoben.

$c_{ m GdHCl}$	Variante	$\langle E_{ m t} angle$	$\sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle} \ (\mathring{A})$	L (\mathring{A})	l_{p} (\mathring{A})
$6,0\mathrm{M}$	$\mathrm{D82C}/\mathrm{T139C}$	$0,20 \pm 0,01$	$63,0 \pm 0,7$	228 ± 17	$8,7 \pm 0,8$
$6{,}0\mathrm{M}$	P68C/E111C	$0,\!36\pm0,\!01$	$55{,}0\pm0{,}4$	172 ± 13	$8,7 \pm 0,8$
$0,\!0\mathrm{M}$	$\mathrm{D82C}/\mathrm{T139C}$	0.83 ± 0.04	$38{,}4\pm1{,}8$	228 ± 17	$3,2\pm0,5$

Tab. 4.12.:

Bestimmung der Persistenzlänge l_p . Für beide Varianten des Proteins $Tt\mathrm{SlyD}$ wird bei $6,0\,\mathrm{M}$ bzw. $0,0\,\mathrm{M}$ GdHCl durch Interpolation bzw. Extrapolation die mittlere Energietransfereffizienz der entfalteten Population bestimmt, nach Gl. (2.24) der mittlere Abstand der Aminosäuren $\sqrt{\langle R_{1,2}^2 \rangle}$ berechnet. Mit der Konturlänge L, die sich aus einem mittleren Vorschub pro Aminosäure von $(4,0\pm0,3)\,\mathrm{\mathring{A}}$ [107] ergibt, wird nach Gl. (4.13) die Persistenzlänge berechnet.

4.6.1.2. Verschiebung der mittleren Energietransfereffizienzen

Für einen übersichtlichen Vergleich wurden die Ergebnisse für die mittleren Transfereffizienzen der Subpopulationen graphisch gegen die Konzentration von GdHCl in Abb. 4.45 aufgetragen. Die Farbkodierung wurde beibhalten. Für beide Varianten des Proteins verschieben sich die Energietransfereffizienzen der nativen Population zu geringeren Werten unter Anwendung von GdHCl. Aus der Messung der Fluoreszenzlebensdauer beider Farbstoffe, AF488 und A647N, in Lösung bei verschiedenen GdHCl-Konzentrationen (Abb. A.13 im Anhang) folgt, dass es keine signifikanten Veränderungen in der Fluoreszenzlebensdauer beider Farbstoffe gibt und somit die Verschiebungen und Formveränderungen in der $E_{\rm t}$ -Verteilung nicht durch farbstoffbedingte Einflüsse erklärt werden können.

Die Verschiebung der nativen Population kann vielmehr auf eine Art generelles, unspezifisches Aufquellen des nativen Zustands hindeuten. Allerdings müssen diese Verschiebungen mit Vorsicht betrachtet werden. Durch die hohen Salzkonzentrationen wird der Brechungsindex des Puffers gegenüber Wasser ($n(H_2O) = 1,33$) deutlich verändert (zum Beispiel n(Puffer) = 1,36 für $c_{GdHCl} = 2,0$ M, siehe Gl. (3.1)). Die Anpassung des Objektivs an wässrige Lösungen mit einem Brechnungsindex von n = 1,33 ist somit nicht mehr gegeben. Jedoch konnte für die Referenzprobe dsDNA eine stabile mittlere Transfereffizienz von $E_t = 0,81 \pm 0,01$ bis zu $c_{GdHCl} = 2,0$ M bestimmt werden (Anhang: Abb. A.11), sodass eine Interpretation der Daten hinsichtlich eines Aufquellen gerechtfertigt ist.

Die entfaltete Population beider Varianten zeigt ebenso diese Verschiebung zu geringeren Energietransfereffizienzen. Diese ist signifikant. Wäre sie durch optische Abberation hervorgerufen, müsste sich das gesamte Histogramm verschieben, was nicht der Fall ist. Die nativen Populationen nehmen zwar für höhere GdHCl-Konzentrationen ab, sind aber in ihrer Position weitestgehend stabil. Das Aufquellen des entfalteten Knäuels und die folgende Abnahme des Energietransfers zwischen zwei Farbstoffen wurde bereits für andere Proteine beobachtet [108]. Der Grund liegt in dem Wechsel zwischen einem schlechten Lösungsmittel (engl. poor solvent) zu einem guten Lösungsmittel (engl. good solvent) durch die Zugabe von GdHCl. In einem guten Lösungsmittel werden Wechselwirkungen zwischen den Ketteneinheiten und dem Lösungsmittel gegenüber Wechselwirkungen innerhalb der Kette favorisiert [109]. Folglich wird die Grenzfläche zwischen dem Protein und seinem Lösungsmittel vergrößert. Der

messbare Effekt dieses Aufquellens kann in der Theorie des Zufallsknäuels, beschrieben durch das WLC-Modell [110], durch ein stetiges Anwachsen der Persistenzlänge erfasst werden. Für beide Proteinvarianten können die Persistenzlängen somit bestimmt werden. Dafür wird aus den mittleren Energietransfereffizienzen der entfalteten Population der mittlere Abstand der Farbstoffe berechnet (Försterradius $R_0 = 50\,\text{Å}$) und mit der entsprechenden Konturlänge L nach Gl. (4.13) $l_{\rm p}$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 4.12 aufgeführt. Unabhängig von der Position der Farbstoffe erhält man eine Persistenzlänge von $l_{\rm p} = (8.7 \pm 0.8)\,\text{Å}$ für das vollständig entfaltete Protein bei 6,0 M GdHCl. Für den entgegengesetzten Grenzfall ohne Denaturierungsmittel kann die Persistenzlänge durch Extrapolation bestimmt werden. Dazu werden die mittleren Energietransfereffizienzen durch ein Polynom dritten Grades angepasst und $\langle E_{\rm t} \rangle = 0.83 \pm 0.04$ bei 0,0 M GdHCl für die Variante D82C/T139C bestimmt. Aus dieser folgt $l_{\rm p} = (3.2 \pm 0.5)\,\text{Å}$. Diese Extrapolierung ist für die Variante P68C/E111C nicht möglich, da erst für höhere Denaturierungsmittelkonzentrationen sichere Werte für die entfaltete Fraktion bestimmt werden konnten.

4.6.1.3. Übergangskurven der Einzelpopulationen

Aus der graphischen Anpassung der Histogramme können die relativen Anteile der einzelnen Populationen bestimmt werden. Diese sind für die native Konformation beider Varianten in Abb. 4.45 für verschiedenen Anpassungsmodelle aufgetragen. Zusätzlich wurde der Anteil der geschlossenen Konformation an allen Ereignissen, die der nativen Population zugezählt werden, berechnet. Diese ergibt sich aus der Anpassung des nativen Anteils durch zwei Gaußglocken, die zwei möglichen Konformationen, einer offenen und einer geschlossenen, entsprechen. Die Fehlerbalken wurden durch Fehlerfortpflanzung aus den Anpassungsfehlern aller einfließenden Parameter bestimmt. Sie sind zum Teil sehr hoch, sodass der Einzelwert als unsicher zu betrachten ist. Der systematische Verlauf der Gesamtzahl an Punkten ist dennoch charakteristisch.

Aus diesen Übergangskurven für den relativen Anteil an nativen Proteinmolekülen x_{nativ} können die Parameter der Entfaltung, die freie Entfaltungsenthalpie $\Delta G_{\text{NU}}(\text{H}_2\text{O})$ in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und die Kooperativität m nach Gl. (4.14) bestimmt werden:

$$x_{\text{nativ}}(c_{\text{GdHCl}}) = x_{\text{nativ},\infty} + \frac{x_{\text{nativ},0} - x_{\text{nativ},\infty}}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G_{\text{NU}}(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot c_{\text{GdHCl}}}{RT}\right)},$$
(4.14)

 $x_{\text{nativ},0}$ und $x_{\text{nativ},\infty}$ sind dabei die Grenzwerte für die Fälle ohne Denaturierungsmittel bzw. für pures Denaturierungsmittel. Dabei wird von der linearen Abhängigkeit der Stabilität des Proteins von der Konzentration des Denaturierungsmittels ausgegangen [65, 111]:

$$\Delta G_{\text{NU}} = \Delta G_{\text{NU}}(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot c_{\text{GdHCl}}. \tag{4.15}$$

 $\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})$ ist ein Maß für die Stabilität des Proteins unter nativen Bedingungen. Eine hohe Energiedifferenz zwischen entfaltetem und nativem Zustand wird durch einen hohen

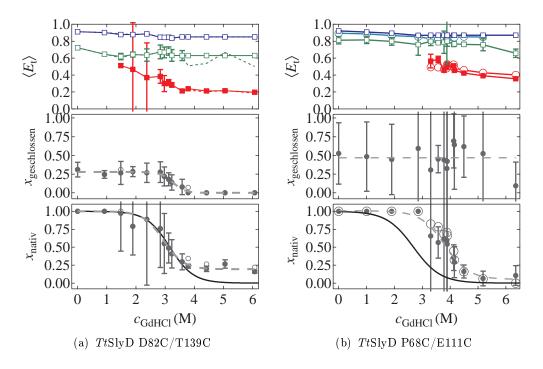


Abb. 4.45.:

Auswertung der GdHCl-Übergänge. Ergebnisse aus der Entfaltung der Varianten D82C/T139C (a) und P68C/E111C (b) des Proteins TtSlyD. Dargestellt sind die mittlern Energietransfereffizienzen der einzelnen Fraktionen (entfaltet: rot; nativ: blau, grün) . Wird die Position der zweiten Gaußglocke in (a) im Gegensatz zu der Anpassung in Abb. 4.43 frei laufen gelassen, ergeben sich z. T. stark fluktuierende und fehlerbehaftete Werte (gestrichelte Kurven). (b) Zusätzlich wurden die mittleren Energietransfereffizienzen aus der Anpassung des logarithmischen Intensitätsverhältnisses (Abb. 4.44(a)) berechnet (offene Kreise: türkis, rot). Aus den Flächen der Fraktionen wurde der Anteil der Moleküle in der nativ geschlossenen Konformation an der Gesamtzahl der nativen Moleküle (Mitte) sowie der Anteil der nativen Moleküle an der Gesamtzahl der gemessenen Moleküle (Unten) berechnet. Die offenene Kreise geben die Ergebnisse an, wenn in (a) die Position der zweiten Gaußglocke frei ist bzw. in (b) die Anpassung des logarithmischen Intensitätsverhältnisses und dessen Anpassung an ein Zwei-Gauß-Modell zugrunde liegt. An alle Übergänge wurde Gl. (4.14) angepasst. Die durchgezogenen grauen Linien (Unten) sind die Übergänge, die sich aus der Ensemblemessung der Tyrosinfluoreszenz mit einem Fluorimeter ergeben.

Wert von $\Delta G_{\rm NU}$ charakterisiert. Die Größe m beschreibt die kooperative Faltung, d. h. den Effekt, dass die Faltung einzelner Peptidkettenabschnitte die Faltung weiterer Abschnitte beeinflusst. Der Übergangsmittelpunkt $c_{1/2}$ kann entweder aus den beiden Größen mit

$$c_{1/2} = \frac{\Delta G_{\text{NU}}(\text{H}_2\text{O})}{m}$$
 (4.16)

berechnet werden oder direkt mit einer Anpassung eines sigmoidalen Übergangs mit dem Wendepunkt $c_{1/2}$ an den experimentell bestimmten Übergang ermittelt werden.

Diese Stabilitätsparameter können auch durch die Messung der Energietransfereffizienz oder der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins im Ensemble bestimmt werden, allerdings muss dabei stets beachtet werden, dass über heterogene Proben gemittelt wird. In Abb. A.12 im Anhang sind beispielhaft die Übergänge aus der mittleren Energietransfereffizienz aller Er-

eignisse dargestellt. Die Verschiebung der mittleren Energietransfereffizienz einer einzelnen Population führt dort zur Verschiebung des Ensemble-Mittelwertes und muss als zusätzlicher Anstieg in der Übergangskurve angepasst werden [85]. Bei Ensemble-FRET-Messungen beeinflusst zusätzlich der Anteil derjenigen Proteinmoleküle, die nur mit einem aktiven Donor markiert sind, den Ensemble-Mittelwert beträchtlich. Da in Abhängigkeit von GdHCl dieser Anteil aufgrund des Photobleichens vom Akzeptor wächst (Abb. A.15 im Anhang), wird der Mittelwert mit steigender GdHCl-Konzentration zu geringeren Energietransfereffizienzen verschoben. Sowohl der Übergangsmittelpunkt als auch die Kooperativität würden ohne Korrektur fehlinterpretiert werden. Erst durch Einzelmolekül-Messungen können diese Heterogenitäten aufgelöst werden.

Die Ergebnisse für die Auswertung der Einzelmolekül-Übergangskurven der nativ gefalteten Proteinmoleküle sind in Tab. 4.13 aufgeführt. Als Vergleich sind ebenso die Ergebnisse aus Ensemble-Entfaltungsmessungen angegeben. In diesen wurde die Fluoreszenz der vier intrinsischen Tyrosinaminosäuren von TtSlyD abhängig von der Konzentration an GdHCl detektiert und daraus der Anteil der nativ gefalteten Moleküle berechnet.

Im Fall der Variante D82C/T139C, bei der jeweils eine Domäne von TtSlyD fluoreszent markiert ist, sind die Parameter der Faltung aus Einzelmolekül-FRET- und Ensemble-Fluoreszenz-Messungen vergleichbar. Dies ist auch am Verlauf der Übergangskurven in Abb. 4.45(a) (unten; gestrichelt: Einzelmolekül-FRET; graue Linie: Ensemble-Fluoreszenz) zu sehen, die nahezu deckungsgleich sind. Für die Variante P68C/E111C zeigt sich jedoch, dass die Übergangskurve aus dem Einzelmolekül-FRET-Experiment deutlich zu höheren GdHCl-Konzentrationen verschoben ist gegenüber der Ensemble-Messung. Diese Verschiebung äußert sich in einem deutlich höheren Übergangsmittelpunkt und einer höheren Gibbs-Energie der Entfaltung (siehe dazu Tab. 4.13).

Inwiefern eine domänenweise Entfaltung und die Population von teilweise gefalteten Zuständen in der Energielandschaft Ursache für die Unterschiede in den experimentell bestimmten Werten sein kann, wird im Kapitel 5 hinterfragt.

Der Verlauf für den Anteil der geschlossenen Konformation an allen nativen Ereignissen unterscheidet sich deutlich für die beiden verschiedenen Varianten. Für die Variante D82C/T139C wird ein charakteristischer Übergang von $(27.8 \pm 0.1)\%$ auf 0 % mit einem Mittelpunkt von $c_{1/2} = (3.3 \pm 0.1)$ M beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die geschlossene Konformation unter Einwirkung des Denaturierungsmittels schneller destabilisiert wird und deshalb deren Anteil sinkt.

Für die Variante P68C/E111C gibt es keinen signifikanten Übergang. Der relative Anteil ist konstant bei $x_{\rm geschlossen} = (46.9\pm0.4)\,\%$. Dies ist ein weiteres starkes Indiz dafür, dass es sich bei keiner der nativen Subpopulationen der Variante P68C/E111C um eine lokale Entfaltung der IF-Domäne handelt. Diese müsste durch die Einwirkung des Denaturierungsmittels unterstützt werden. Das Gleichgewicht müsste sich also deutlich zu dieser Subpopulation hin verschieben. Dies ist nicht zu beobachten. Vielmehr wird bekräftigt, dass die Breite des Histogramms unter nativen Bedingungen dadurch bedingt ist, dass der Abstand zwischen P68C und E111C nicht völlig entkoppelt von der globalen Dynamik zwischen den Domänen ist.

Variante	$\frac{\Delta G_{\rm NU}({\rm H_2O})}{({\rm kJmol^{-1}})}$	$m \atop (\mathrm{kJmol^{-1}M^{-1}})$	$c_{1/2} \ ({ m M})$
Wildtyp*	$35,1 \pm 3,0$	11.4 ± 0.5	3.1 ± 0.1
D82C/T139C	$20,9 \pm 4,4$		2.94 ± 0.07
D82C/T139C*	20.9 ± 4.4 19.6 ± 0.8	7.1 ± 1.5 6.2 ± 0.3	3.2 ± 0.07
P68C/E111C	21.7 ± 5.0	5.7 ± 1.3	$3,81 \pm 0,08$
P68C/E111C*	13.9 ± 0.2	5.2 ± 0.6	$2,7 \pm 0,4$

Tab. 4.13.:

Entfaltungsparameter. Aus den Subpopulation der E_t -Verteilungen wurden die relativen Anteile von nativ gefalteten Proteinen berechnet und Gl. (4.14)-(4.16) an den Verlauf angepasst (bei 300 K). \star : Ergebnisse aus Ensemblemessungen, wobei die Proben bei 278 nm angeregt wurden und die Fluoreszenz der vier Tyrosine von TtSlyD bei 308 nm als Messsignal für den Übergang genutzt wurde.

4.6.2. Interne Dynamik

Im Abschnitt 4.3.3 wurde detailliert auf die interne Dynamik zwischen den Domänen des Proteins TtSlyD eingegangen und deren Einfluss auf die Verteilung der Energietransfereffizienz erläutert. Dabei stellte sich heraus, dass durch die Korrelationsanalyse nach Torres und Levitus [60] eine Dynamik in einem Zeitfenster von 10^{-4} s $\leq \tau \leq 10^{-3}$ s nachweisbar ist. Diese Analyse wird auch auf die Entfaltungsmessungen angewandt (Abb. 4.46). Für geringe Konzentrationen des Denaturierungsmittels sind charakteristische Abfälle im genannten Zeitfenster für beide Varianten des Proteins zu beobachten. Ab einer Konzentration von $c_{
m GdHCl}=3.8\,
m M~(D82C/T139C)$ bzw. $c_{
m GdHCl}=5.2\,
m M~(P68C/E111C)$ verlaufen die Kurven für $\frac{G_{\mathrm{DD}}}{G_{\mathrm{DA}}}$ konstant bis zu Zeiten, in denen die Kurven durch die Zeitauflösung der zugrunde liegenden Daten verfälscht werden. Aus dem Vergleich mit den E_t-Verteilungen (Abb. 4.43 und 4.44) folgt, dass die Dynamik bis zu den Denaturierungsbedingungen gemessen werden kann, bei denen Einzelmolekülereignisse im nativen Bereich gezählt werden. Solange das einzelne Protein also noch nativ gefaltet ist, scheint dessen interne Dynamik unabhängig vom Denaturierungsmittel zu sein. Der Übergang zu kleineren Amplituden des Verhältnisses $\frac{G_{
m DD}}{G_{
m DA}}$ kann durch die Verschiebung der $E_{
m t}$ -Verteilungen zu geringeren Werten erklärt werden. Dieser Zusammenhang geht auch aus den theoretischen Betrachtungen in Abb. 4.26 hervor. Der deutliche Sprung jedoch, der für die Variante P68C/E111C von 0M auf 1M GdHCl beobachtet werden kann, ist dadurch nicht zu erklären. Die E_{t} -Verteilung verschiebt sich nur unwesentlich, wohingegen die Amplitude von $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ auf die Hälfte des Wertes absinkt. Aufgrund der komplexen Zusammenhänge, die der Berechnung von $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ zugrunde liegen, kann nicht eindeutig begründet werden, was zu diesem Sprung geführt hat. Es sollte aber auch nicht außer Betracht gelassen werden, dass $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ artefaktanfällig ist, d. h. dass zum Beispiel Diffusionsereignisse von Agglomeraten die Amplituden der Korrelationskurven verfälschen können, auch wenn diese Ereignisse sehr selten sind.

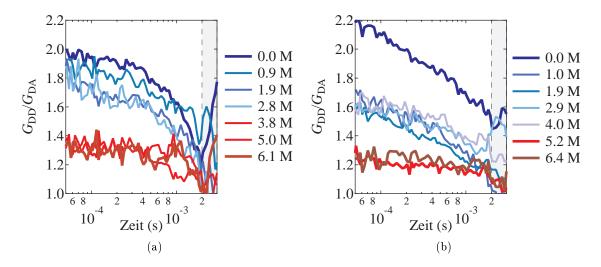


Abb. 4.46.:

Korrelationsanalyse der internen Dynamik unter denaturierenden Bedingungen. Die Varianten D82C/T139C (a) und P68C/E111C (b) des Proteins TtSlyD wurden bei unterschiedlichen GdHCl-Konzentrationen (Legende rechts) im POE-Anregungsschema (40 μ W bei 488 nm, 15 μ W bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Für die Korrelationsanalyse wurden nur Photonen aus Einzelmolekülereignissen ($S_{\rm sum}^{488} > 30\,{\rm s}^{-1}({\rm a})$ bzw. $S_{\rm sum}^{488} > 20\,{\rm s}^{-1}({\rm b})$ und $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1})$ genutzt. Der graue Balken markiert jeweils den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau=2\,{\rm ms}$.

4.6.3. Echtzeit-Rückfaltung

Die Entfaltungsreihen wurden in geschlossenen Mikrokammern durchgeführt, um konstante Bedingungen, vor allem eine konstante Konzentration des Denaturierungsmittels, zu gewährleisten. Würde eine Messung mit hoher GdHCl-Konzentration in der normalen Feuchtkammer durchgeführt, käme es aufgrund der hohen Salzkonzentration schnell zu einem Lösungsmittelaustausch über die Dampfphase. Dieser Effekt ist mit dem Effekt der Osmose an semipermeablen Membranen zu vergleichen. Das hat zur Folge, dass nicht nur die Proteinkonzentration sinkt, sondern auch die Konzentration des Denaturierungsmittels. Dieser Effekt führt bei kleinen Tropfengrößen von maximal $5\,\mu$ l zur drastischen Abnahme der Konzentration. Dieser Nachteil kann aber auch genutzt werden, um die Rückfaltung des Proteins zu beobachten. In Abb. 4.47 ist ein solches Experiment mit einer Startkonzentration von $c_{\text{GdHCl}} = 6 \,\text{M}$ GdHCl dargestellt. Die E_t -Verteilung wurde in Abschnitten von 1000s berechnet. Anhand der gemittelten E_t-Werte aus allen Ereignissen über 10s (Abb. 4.47, Mitte) wird bereits der Übergang in die native Konformation deutlich. Die Einzelhistogramme (Abb. 4.47, oben) bestätigen dieses Bild im Detail. Nach ca. zwei Stunden ist das Histogramm der nativen Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD erneut zu messen. Interessant sind die Intensitätsverläufe der detektierten Photonen (Abb. 4.47, unten). In den ersten 200 s steigt die Intensität im Donor- und Akzeptorkanal, sowohl bei Donoranregung als auch bei direkter Aktzeptoranregung. Dies deutet auf ein anfängliches Verdunsten des Tropfens hin, sodass die Proteinkonzentration leicht steigt. Danach sinkt die Intensität im Donorkanal und Akzeptorkanal bei jeweils direkter Anregung, was auf die Verdünnung durch das Anwachsen

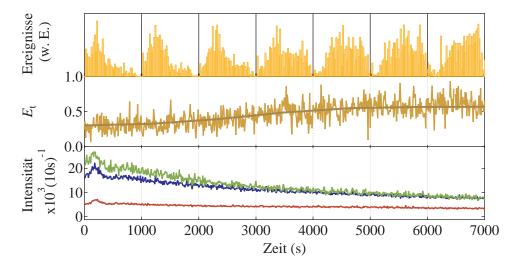


Abb. 4.47.:

Echtzeit-Rückfaltung. Unten: Zeitverlauf der Intensitäten im Donor- (blau) und Akzeptorkanal (rot) während der Donoranregung (488 nm, $40 \,\mu\text{W}$), sowie der Intensität im Akzeptorkanal (grün) nach direkter Anregung (635 nm, $10 \,\text{MHz}$, $15 \,\mu\text{W}$) der Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD bei einer anfänglichen GdHCl-Konzentration von $c_{\text{GdHCl}} = 6 \,\text{M}$. Oben: E_t -Verteilung aller Einzelmolekülereignisse ($S_{\text{sum}}^{488} > 40 \,\text{s}^{-1}$, $S_{\text{akz}}^{635} > 10 \,\text{s}^{-1}$) für jeweils $1000 \,\text{s}$ der Messzeit. Mitte: Zeitverlauf von E_t , gemittelt über Einzelmolekülereignisse von jeweils $10 \,\text{s}$ (braun) und $1000 \,\text{s}$ (dunkelbraun).

des Tropfens zurückzuführen ist. Die Intensität im Akzeptorkanal bei Anregung des Donors bleibt konstant, denn hier kommt es zu zwei Effekten. Zum einen wird das Protein verdünnt, zum anderen wird aber mehr Energie aufgrund der Rückfaltung auf den Akzeptor übertragen. Beide Effekte scheinen sich gegenseitig auszugleichen, sodass die Zählrate nahezu konstant bleibt.

4.6.4. Zusammenfassung

In den ersten Abschnitten des Kapitels 4 Ergebnisse lag das Hauptaugenmerk auf dem Tal des nativen Zustandes innerhalb der Energielandschaft von TtSlyD. In diesem Abschnitt wurde nun mit Einzelmolekülexperimenten zusätzlich der entfaltete Zustand studiert. Durch das Denaturierungsmittel GdHCl wurde der entfaltete Zustand stabilisiert und das Gleichgewicht verschoben. Die Einzelmolekül-FRET-Experimente erlauben aber nicht nur, die relative Verschiebung der Populationen zueinander zu beobachten, sondern zusätzlich Informationen über die einzelnen Populationen selbst zu erhalten. So konnte mit der Verschiebung der mittleren Energietransfereffizienz der entfalteten Population das Aufquellen des entfalteten Zustandes mit dem Denaturierungsmittel für beide fluoreszent markierten Doppelvarianten, D82C/T139C und P68C/E111C, beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 6 M des Denaturierungsmittels wurde eine Persistenzlänge von $l_P = (8.7 \pm 0.8)$ Å bestimmt.

Als Vergleich für die Einzelmolekül-FRET-Experimente wurde die Entfaltung der Proteinvarianten auch im Ensemble studiert. Dabei wurde die Fluoreszenz der vier Tyrosin-Aminosäuren in der Sequenz von TtSlyD verfolgt. Während die Einzelmolekül-Übergangskurve der

nativ gefalteten Proteinmoleküle für die Variante D82C/T139C die Ergebnisse aus den Ensemblemessungen reproduziert, wurde für die Variante P68C/E111C, bei der beide Farbstoffe in der IF-Domäne lokalisiert sind, im Einzelmolekülexperiment eine deutlich höhere Stabilität bestimmt. Es ist denkbar, dass diese Unterschiede auf die Wahl der betrachteten Konformationskoordinaten zurückzuführen sind. Während mit der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz über das gesamte Protein gemittelt wird, wird im Einzelmolekül nur der Abstand zwischen P68C und E111C erfasst. Dies kann ein Hinweis auf eine komplexere Energielandschaft der Faltung sein, bei der Zwischentäler existieren, innerhalb deren das Protein TtSlyD nur teilweise gefaltet ist.

Abhängig von der Konzentration des Denaturierungsmittels wurden die Korrelationskurven der einzelnen Messungen hinsichtlich der Proteindynamik untersucht. Daraus ergab sich, dass die Austauschdynamik, die im nativen Zustand für beide Proteinvarianten festgestellt wurde, stabil ist gegenüber dem Denaturierungsmittel. So lange nativ gefaltete Proteinmoleküle im Experiment detektiert wurden, konnte auch eine Dynamik nachgewiesen werden. Somit folgt, dass die Struktur der Energielandschaft innerhalb des nativen Zustands nicht durch das Denaturierungsmittel beeinflusst wird.

5. Zusammenfassung und Diskussion

5.1. Struktur, Funktion und Dynamik

Eine der grundlegenden Fragestellungen auf dem Gebiet der Biochemie ist die Erklärung der erstaunlich hohen katalytischen Effizienz, die durch Reaktionen mit Enzymen erreicht wird. Das ursprüngliche Schlüssel-Schloss-Prinzip [112], bei welchem das Substrat exakt zum Enzym passen muss, wurde beginnend in den 1960ern durch weitere Thesen ausgebaut. Dabei wird nicht länger das gesamte Enzym als funktionstragend gesehen, sondern nur einzelne katalytische Gruppen. Diese sind bei Substratbindung in ihrer Konzentration erhöht und in ihrer Orientierung optimiert. Eine strukturelle Flexibilität ermöglicht dabei die Anpassung an das Substrat; man spricht von einer induzierten Anpassung (engl.: induced fit) [113]. Ausgehend von diesem Modell scheinen dynamische Änderungen in der Struktur des Enzyms eine wichtige Grundlage für dessen enzymatische Aktivität zu sein. Die Publikationen von Frauenfelder et al. [2, 114] weisen bereits auf die Bedeutung interner Bewegung für die Funktion eines Enzyms am Beispiel des Myoglobins hin. Dennoch ist die Relevanz dynamischer Fluktuationen auch im aktuellen Forschungsumfeld eine Streitfrage [1]. Dabei überstreichen dynamische Änderungen einen großen Zeitbereich, der von ps-ns für die Reorganisation einzelner Atome bis hin zu ms-s für Konformationsänderungen ganzer Proteinabschnitte reicht. Verschiedene Beispiele werden in dem Übersichtsartikel von Nagel & Klinman [1] aufgeführt. Die Beobachtung solcher Bewegungen setzt vielfältige experimentelle Möglichkeiten voraus, die auf den verschiedenen Zeitskalen sensitiv sind. So haben NMR-spektroskopische Untersuchungen für Proteine wie Cyclophilin A [115], Adenylatkinase [14, 116] und die Dihydrofolatreduktase [117] mehrfach zeigen können, dass die intrinsische Dynamik maßgeblich mit der katalytischen Funktion des Enzyms verknüpft ist. Aber auch auf dem Feld der Einzelmolekülspektroskopie wurden wichtige Beiträge geliefert. Bereits 1998 gab es erste Ergebnisse zur intramolekularen Dynamik der Meerrettichperoxidase [118]. Chen et al. veröffentlichten 2003 FRET-Daten zum T4-Lysozym [119], das mehrere Konformationen einnehmen und dynamische Übergänge zeigen soll. Santoso et al. [61] konnten für die DNA-Polymerase I intramolekulare Bewegungen auf einer ms-Zeitskala nachweisen. Für die Adenylatkinase konnte erst durch detaillierte Einzelmolekülexperimente [3] die großskalige Bewegung der zwei Untereinheiten zwischen unterschiedlichen Konformationen eindeutig nachgewiesen und so das Bild aus kristallographischen, NMR-spektroskopischen und simulierten Daten vervollständigt werden. Schließlich liefern auch kraftspektroskopische Einzelmoleküluntersuchungen [120–122] und Simulationsrechnungen [123] ihren Beitrag zu diesem mannigfaltig diskutierten Forschungsthema.

In dieser Arbeit lag das Augenmerk auf dem Zwei-Domänen-Protein SlyD aus dem Organismus Thermus thermophilus (kurz: TtSlyD). Das Enzym TtSlyD katalysiert den cis-trans-Übergang einer Peptidyl-Prolyl-Bindung, welcher oft ratenlimitierend für die Faltung von Proteinen ist [15, 16]. Diese katalytische PPIase-Aktivität ist in der FKBP-Domäne lokalisiert, wohingegen die IF-Domäne als Chaperon wirkt und die Aggregation von Peptidketten verhindert [4-6]. Für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des Proteins auf Einzelmolekülniveau wurde das Protein innerhalb beider Domänen mit jeweils einem Farbstoff markiert. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen diesen Farbstoffen macht den Abstand zwischen IF- und FKBP-Domäne experimentell zugänglich. Für frei diffundierende Moleküle wurde unter nativen Bedingungen eine breite Verteilung für die Energietransfereffizienz bestimmt. Aus dieser geht deutlich hervor, dass TtSlyD nicht durch eine einzige Konformation beschrieben werden kann. Diese These wird von NMR-spektroskopischen Untersuchungen gestützt, aus denen zwar wohl definierte Strukturen der einzelnen Domänen hervorgehen, aber aus denen keine definierte relative Orientierung der Domänen zueinander bestimmt werden kann [6, 18]. Weitere Hinweise auf eine strukturelle Flexibilität geben Daten aus der Röntgenkristallographie. Löw et al. [4] haben verschiedene Kristallstrukturen bestimmt, bei denen die relative Domänenorientierung variiert.

Um die Form der Energietransfereffizienzverteilung besser beurteilen zu können, wurde durch zahlreiche Kontrollexperimente sichergestellt, dass weder durch den experimentellen Aufbau hervorgerufene Effekte noch lokale Effekte an den Farbstoffen die Breite der Verteilung erklären können. So können die Photophysik, das Photobleichen und die gehinderte Rotation der Farbstoffe als Einflüsse ausgeschlossen werden.

Die Breite der Verteilung ist somit eindeutig durch eine strukturelle Heterogenität des Proteins begründet. Die Verteilung konnte durch ein Zwei-Gauß-Modell angepasst werden, das zwei mögliche Konformationen wiedergibt. In Analogie zur Adenylatkinase [3] wurde die Hypothese für eine offene und eine geschlossene Konformation aufgestellt. Die Abstände zwischen den Farbstoffen konnten dabei mit 5,0 nm und 3,7 nm abgeschätzt werden. Der Farbstoffabstand in der offenen Konformation ist somit nur geringfügig größer als der aus der Röntgenstruktur bestimmte Abstand zwischen den C_{α} -Atomen. Diese Abweichung kann durch die chemische Bindung der Farbstoffe an das Protein erklärt werden. Aus dem Vergleich mit simulierten Daten geht jedoch hervor, dass zwei Zustände nicht hinreichend sind, um die komplette Form der Verteilung erklären zu können. Weitere Konformationen mit vielleicht nur geringen strukturellen Änderungen müssen existieren. Dies ist nicht unerwartet, da Kristallographie- und NMR-Untersuchungen zeigen konnten, dass vor allem die IF-Domäne eine hohe lokale Flexibilität aufweist [94].

Für die hochauflösende Röntgenkristallographie muss ein Protein in einem homogenen Kristall vorliegen. Zwar können durch ausgefeilte Techniken Zwischenzustände eines dynamischen Übergangs kristallisiert werden [124], die kinetische Information struktureller Änderungen ist jedoch nicht direkt experimentell zugänglich¹. In der NMR-Spektroskopie ist die Beobachtung von Bewegungen möglich, die im ps- bis ns-Bereich, im μ s- bis ms-Bereich oder im Langzeit-

¹Die Debye-Waller-Faktoren (b-Faktoren) der einzelnen Atome werden oft so interpretiert, dass daraus Rückschlüsse über die lokale Dynamik des Proteins auf atomarer Ebene gewonnen werden [125].

bereich von min- bis h liegen [14, 66]. Allerdings muss die Dynamik zur Veränderung der lokalen Umgebung einzelner Atome führen (zum Beispiel Veränderung der chemischen Verschiebung der einzelnen Aminosäure für NMR-Austausch-Experimente [14]). Eine großskalige Bewegung, die diese lokale Umgebung nicht stört, kann durch NMR nicht erkannt werden. Somit ergab sich die Zielstellung, durch die Analyse der fluoreszenzspektroskopischen Daten die Frage zu klären, ob das Protein eine breit gefächerte statische Heterogenität aufweist oder tatsächlich eine zusätzliche Austauschdynamik zwischen den einzelnen Konformationen stattfindet, die anderen Messmethoden nicht zugänglich ist. Durch das Korrelationsverfahren können jegliche dynamische Änderungen, die zu Fluktuationen im Fluoreszenzsignal führen, erkannt und analysiert werden. Dies ist bereits weit etabliert für schnelle photophysikalische und photochemische Prozesse [92, 126–128], wurde aber auch zur Beobachtung von Konformationsaustausch auf der ms-Zeitskala genutzt [37, 129, 130]. In dieser Arbeit wird das Analyse-Verfahren nach Torres und Levitus [60] genutzt. Dieses ermöglicht die Trennung der Konformationsdynamik innerhalb des Proteins von der Diffusionsdynamik des kompletten Proteins. Somit können auch Bewegungen auf deutlich langsameren Zeitskalen erfasst werden. Santoso et al. gelang es, auf diese Weise den Konformationsaustausch der DNA-Polymerase I nachzuweisen. Im Gegensatz zur Arbeit von Santoso et al. wurden in dieser Arbeit nur Photonen aus ausgewählten Einzelmolekülereignissen genutzt. Somit werden Hintergrundeffekte reduziert, sowie gleichzeitig Artefakte durch Photobleichen und unterschiedlich große Beobachtungsvolumina der Detektionskanäle minimiert. Diese Form der Photonenselektion verbietet allerdings die Anpassung an das analytische Modell von Torres und Levitus [60]. Um dennoch quantitative Ergebnisse aus dem Korrelationsverfahren gewinnen zu können, wurden dynamische Mehr-Zustands-Systeme in einem idealisierten Beobachtungsvolumen simuliert und deren Fluoreszenzsignal analog zu den experimentellen Daten ausgewertet. Aus dem Vergleich von simulierten und experimentellen Daten konnte eine interne Austauschdynamik in einem Zeitbereich von $50 \,\mathrm{s}^{-1}$ bis $200 \,\mathrm{s}^{-1}$ nachgewiesen werden. Dieses interessante Ergebnis zeigt, dass bereits ohne ein Substrat das Enzym verschiedene Konformationen bevölkert und dass ein dynamischer Austausch zwischen diesen Konformationen stattfindet. Für andere Enzyme wurden bereits ähnliche Beobachtungen gemacht, die darauf hindeuten, dass ein Enzym auch in der ungebundenen Form alle Konformationen intrinsisch durchläuft, die für die Katalyse relevant sind [3, 61, 115, 119, 131, 132].

Während die Korrelationskurven nach Torres und Levitus für simulierte und experimentelle Datensätze gut übereinstimmten, konnten die aus den simulierten Photonendaten berechneten Energietransfereffizienzverteilungen die Breite der experimentell bestimmten Verteilung nicht reproduzieren. Somit wurde geschlussfolgert, dass die Ereignisse, die zwischen den beiden Hauptmaxima der Verteilung liegen, nicht allein durch Ausmittelung aufgrund dynamischer Übergänge begründet werden können, sondern eine zusätzliche strukturelle Inhomogenität vorliegen muss, die über das einfache Zwei-Zustands-Modell hinausgeht.

Da die Fragestellung nach einem Zusammenhang zwischen Katalyse und Dynamik im Zentrum dieser Arbeit stand, wurden analog zu den Versuchen mit freiem Enzym, Versuche in Anwesenheit von verschiedenen Bindungspartnern durchgeführt. FK506 und Rapamycin sind Inhibitoren der PPIase-Aktivität und binden an die FKBP-Domäne, wohingegen RCM-T1

als Modellsubstrat für die PPIase-Aktivität gilt. Insulin wird zum Prüfen der Chaperonaktivität eingesetzt. Es bindet an die IF-Domäne. Erstaunlicherweise konnte für keinen der Bindungspartner eine signifikante Verschiebung weder in der Energietransfereffizienzverteilung noch in der Korrelations-Dynamikanalyse festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde sowohl bei der Adenylatkinase [3] als auch bei der DNA-Polymerase I [61] eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den Zuständen festgestellt. Während die genannten Enzyme kleine Substrate mit einer hohen Spezifität binden, katalysiert SlyD große Substrate, d. h. große ungefaltete Proteinketten, mit geringer Spezifität. Für SlyD verschiedener Organismen wurden moderate Substrat- und Inhibitoraffinitäten im geringen Mikromolarbereich bestimmt (zum Beispiel EcSlyD: für RCM-T1 ist $K_{\rm M}=1.7\,\mu{\rm M}$, für entfaltete Proteinketten ist $K_i = 0.2 - 2.3 \,\mu\text{M}$, für FK506 ist $K_i = 4.6 \,\mu\text{M}$) [5]. Zoldak et al. konnten zeigen, dass die Bindung entfalteter Proteinketten an die IF-Domäne keinen wesentlichen Einfluss auf PPIase-Aktivität der FKBP-Domäne hat [133]. All diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass Bindungspartner das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen des Enzyms TtSlyD nicht stören. Als weiterer Bindungspartner gilt das TAT-Signalpeptid, dass vorrangig mit Aminosäuren der IF-Domäne wechselwirkt [94]. Aufgrund eines Tryptophans in der Sequenz des Peptids wird aber die Fluoreszenz beider Farbstoffe stark gelöscht. wenn das Peptid am Protein TtSlyD bindet. Einzelmolekül-FRET-Experimente waren aus diesem Grund nicht möglich. Fluktuationen im Fluoreszenzsignal auf einer Zeitskala von 60 µs könnten jedoch Hinweise auf die Bindungskinetik oder aber auf eine eventuelle schnelle interne Dynamik innerhalb der IF-Domäne geben. Um diese Vermutungen jedoch bestätigen zu können, sind weitere Experimente nötig.

Mit einer alternativen fluoreszent markierten Variante des Proteins sollte neben dem Domänenabstand auch die thermodynamische Stabilität der IF-Domäne selbst kontrolliert werden. Da durch Kovermann et al. eine hohe lokale Flexibilität innerhalb dieser Domäne bestimmt wurde [94], stand zur Diskussion, ob es zur lokalen Entfaltung der Domäne kommen kann. Das Experiment lieferte eine Verteilung mit sehr hohen Energietransfereffizienzen, wie sie für den kleinen Abstand (Abstand der C_{α} -Atome ist $2,2\,\mathrm{nm}$ [4]) erwartet werden. Allerdings konnte die genannte Verteilung nicht durch ein Ein-Zustands-Modell erklärt werden. Folglich kann eine lokale Entfaltung allein durch die Einzelmolekülexperimente nicht ausgeschlossen werden. Ensemble-FRET-Studien von Zoldak et al. [22] an EcSlyD (Abb. 2.3) weisen jedoch darauf hin, dass die IF-Domäne durch die FKBP-Domäne stabilisiert wird und beide Domänen kooperativ entfalten. Desweiteren konnte in den NMR-Spektren für TtSlyD kein Hinweis auf eine lokale Entfaltung im Zeitbereich von Millisekunden gefunden werden [67]. Diese Zeitskala geht aus der Dynamikanalyse auf Einzelmolekülebene hervor, mit welcher Raten von (200...800) s⁻¹ bestimmt wurden. Zusammenfassend kann also die begründete Annahme gestellt werden, dass die IF-Domäne stabil ist. Jedoch muss beachtet werden, dass durch die Positionierung eines der Farbstoffe am Rand der IF-Domäne (P68C) im unstrukturierten Verbindungsbereich zur FKBP-Domäne, die FRET-Messungen nicht komplett von der globalen Dynamik beider Domänen zueinander entkoppelt sind. Dies erklärt auch die vergleichbaren Ergebnisse der Dynamikanalyse beider Varianten des Proteins. Die geringfügig schnellere interne Dynamik mit Raten größer 200 s⁻¹ ist ein Indiz für einen komplexen Bewegungsraum. Das heißt, dass bei Betrachten unterschiedlicher generalisierter Koordinaten verschiedene Geschwindigkeitsraten der Bewegung detektiert werden. Die Koordinaten sind in diesem Fall zum einen der Abstand zwischen den Aminosäuren D82C und T139C, zum anderen zwischen den Aminosäuren P68C und E111C.

Für diese beiden Abstandskoordinaten kann ein erstes Modellbild einer Energielandschaft für TtSlyD als Zwei-Domänen-Protein entworfen werden. Die Energielandschaft ist durch zwei Täler im nativen Zustand charakterisiert, die dem offenen und dem geschlossenen Zustand zwischen der IF- und der FKBP-Domäne entsprechen. Die Täler sind energetisch äquivalent und werden aus diesem Grund vergleichbar stark populiert. Die Energiebarriere zwischen den Tälern bestimmt eine Austauschdynamik in der Größenordnung von $100 \, \text{s}^{-1}$. Die absolute Höhe der Energiebarriere ist allein aus dieser Angabe jedoch nicht zu berechnen. Dafür wäre der Vorfaktor vor dem Exponentialterm der Arrhenius-Abhängigkeit in Gl. (2.3) notwendig. Dieser Vorfaktor ist abhängig von der zugrundeliegenden Theorie für das Überwinden der Energiebarriere (zum Beispiel Kramers-Theorie [10, 134]) und ist nicht bekannt.

Die zusätzliche Plastizität durch kleinskalige strukturelle Änderungen der Domänen zueinander spiegelt sich in mehreren Teiltälern innerhalb der beiden Haupttäler wider. Ob ein dynamischer Austausch zwischen diesen Teiltälern erfolgt, konnte nicht direkt durch die hier genutzten Analyseverfahren beobachtet werden. So können verschiedene Modelle aufgestellt werden. In einem Modell existieren zwischen den Teiltälern sehr hohe Energiebarrieren, die deutlich höher als die Energiebarriere zwischen den beiden Hauptkonformationen sind, sodass keine oder eine nur sehr langsame Austauschdynamik stattfindet. In einem weiteren Modell sind die Energiebarrieren so niedrig, dass ein schneller Austausch stattfindet. Dabei muss diese Dynamik in einem Zeitfenster von $2 \cdot 10^2 \,\mathrm{s}^{-1}$ bis $10^5 \,\mathrm{s}^{-1}$ liegen, da sie zum einen schneller als der Austausch zwischen den Hauptkonformationen (200 s⁻¹) sein muss, zum anderen aber nicht schneller als die Photonenzählrate sein darf, damit diese dynamischen Informationen nicht vollständig ausgemittelt werden. In diesem Grenzfall wäre die Verbreiterung der Energietransfereffizienz-Verteilung nicht mehr begründet. Sowohl die Detektion von dynamischen Austauschprozessen im Bereich von (200...800) s⁻¹ für die Variante P68C/E111C von TtSlyD als auch die anschaulichere Topologie der Energielandschaft sind Argumente für dieses zweite Modellbild.

Für ein abschließendes Modell für die Wirkungsweise von TtSlyD fließen auch die Erkenntnisse aus Ensemblemessungen zur Aktivität und Spezifität verschiedener Vertreter dieser Gruppe von Proteinen aus einer FKBP- und einer Chaperon-Domäne ein [5, 24]. So zeigt zum Beispiel das Ein-Domänen-Protein FKBP12, das der FKBP-Domäne von TtSlyD strukturell sehr ähnlich ist, für die Isomerisierung eines Tetrapeptids eine sehr hohe Spezifität bezüglich der Peptidyl-Prolyl-Bindung. Desweiteren zeichnet sich FKBP12 durch eine sehr geringe katalytische Effizienz für die Faltungsreaktion anderer Proteinketten aus [24]. Das Einbringen einer Chaperon-Domäne in die Sequenz von FKBP12 hat einerseits kaum einen Einfluss auf die Spezifität und die katalytische Effizienz bezogen auf die Isomerisierung des Tetrapeptids [24]. Betrachtet man andererseits die Rückfaltung anderer Proteinketten, so steigt die katalytische Effizienz durch die Chaperon-Domäne auf bis zu 1000fach erhöhte Werte [24]. Die Spezifität geht dabei verloren. Alle Proteinketten der genutzten Gruppe wurden mit

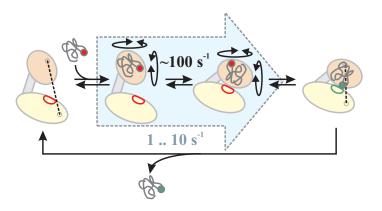


Abb. 5.1.:

Vorgeschlagenes Modell für die Funktionsweise von $Tt\mathrm{SlyD}$. Die ungefaltete Proteinkette (graue Linie) wird unspezifisch von der IF-Domäne (orange) gebunden. Verschiedene Orientierungen und Positionen werden aufgrund der hohen strukturellen Flexibilität mit einer Rate von ca. $100\,\mathrm{s^{-1}}$ durchlaufen. Bei einer optimierten Lage relativ zum aktiven Zentrum (rot umrandet) in der FKBP-Domäne (gelb) wird die Peptidyl-Prolyl-Bindung isomerisiert (roter Kreis wird zu grünem Kreis) und das Produkt wird wieder von der IF-Domäne gelöst. Dieses Lösen ist der ratenlimitierende Schritt und bestimmt die Umsatzrate im Bereich von $(1-10)\,\mathrm{s^{-1}}$. Zusätzlich ist der durch FRET messbare Abstand als Strichellinie symbolisiert.

ähnlichen katalytischen Effizienzen gefaltet. Eine Reduzierung der katalytischen Effizienz um den Faktor 100 wurde auch für das Protein TtSlyD beobachtet, wenn die IF-Domäne durch Mutation entfernt wurde [4].

Anhand der Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, konnte im Zusammenspiel mit bereits publizierten Daten ein Modell aufgestellt werden, wie das Protein SlyD möglicherweise arbeitet und welche Rolle die IF-Domäne für die Katalyse in der FKBP-Domäne spielt (Abb. 5.1):

Entfaltete Proteinketten binden zunächst unspezifisch an die IF-Domäne, was durch NMR-Titrations-Experimente bestätigt wurde [4]. Die wiederholte Bewegung der IF-Domäne in Richtung der FKBP-Domäne erhöht die lokale Substratkonzentration am dort lokalisierten aktiven Zentrum. Gleichzeitig steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Peptidyl-Prolyl-Bindung nahe und in der passenden Orientierung zu den katalytisch aktiven Aminosäuren ist. Im Modell von Jakob et al. [24] geht man davon aus, dass der ratenlimitierende Schritt der Katalyse die Lösung des Substrats von der IF-Domäne ist, nachdem diese das Substrat zur FKBP-Domäne transportiert hat und bevor die eigentliche katalytische Isomerisierung stattfindet. Diese verläuft deutlich schneller. Für die Isomerisierung einer Leu-Pro-Bindung in einem Tetrapeptid wurde zum Beispiel eine katalytische Rate von $k_{\text{kat}} = 600 \,\text{s}^{-1}$ bestimmt [135]. In dem Modell, das in dieser Arbeit aufgestellt wurde, wird das Substrat nicht von der IF-Domäne gelöst und anschließend von der FKBP-Domäne gebunden. Vielmehr bleibt es in Bindung mit der IF-Domäne, auch während der Substratkatalyse am aktiven Zentrum der FKBP-Domäne. Aufgrund der Flexibilität zwischen den beiden Domänen und der relativ schnellen Dynamik im Bereich von $100\,\mathrm{s}^{-1}$ kann die IF-Domäne verschiedene Orientierungen des Substrats zum aktiven Zentrum "probieren". Die IF-Domäne wirkt somit als unspezifischer Fangarm, der die Substrate in eine optimierte Position zur spezifisch wirksamen FKBP-Domäne bringt. Dieses veränderte Modellbild wird durch die Messungen gestützt, aus denen hervorging, dass weder das Gleichgewicht noch die Dynamik von Substraten oder Inhibitoren gestört werden. In Analogie zu dem Modell in Abb. 5.1 findet der Produkt-Substrat-Austausch wahrscheinlich in der offenen Konformation statt. Dies ist jedoch nur eine Vermutung. Da in der Energietransfereffizienz-Verteilung von TtSlyD keine Veränderungen nach Substrat-Zugabe messbar waren, kann kein großer Unterschied in den Affinitäten zum Substrat zwischen geschlossener und offener Konformation existieren, sodass der Produkt-Substrat-Austausch auch in der geschlossenen Konformation denkbar ist. Das Lösen des Produkts von der IF-Domäne ist immer noch der ratenlimitierende Schritt, der schließlich zu einer katalytischen Umsatzrate in der Größenordnung von $k_{\rm kat} \approx 1\,{\rm s}^{-1}$ führt, wie sie für SlyD aus verschiedenen Organismen bestimmt wurde [5, 24]. NMR-Relaxationsexperimente konnten eine langsame Dynamik im Bereich von $(1-10)\,{\rm s}^{-1}$ nachweisen. Diese resultiert wahrscheinlich aus den lokalen Verschiebungen während des eigentlichen Katalyseschritts. Die schnelleren, großskaligen Konformationsbewegungen der beiden Domänen zueinander, die aus den Einzelmolekülversuchen hervorgingen, sind der NMR-Spektroskopie nicht zugänglich.

TtSlyD zählt zu einer ganzen Gruppe von Mehr-Domänen-Proteinen, die jeweils eine FKBP-Domäne haben, welche durch eine Chaperon-Domäne ergänzt wird. Auch für andere Vertreter dieser Gruppe wurden ähnliche Beobachtungen bezüglich der PPIase-Aktivität gemacht. Der Triggerfaktor [25–28], FkpA [29–31], SurA [32, 33] und MtFKBP17 [20] sollen als Beispiele genannt sein. Das in dieser Arbeit vorgestellte mechanistische Modell für TtSlyD könnte somit eine generelle Gültigkeit für die Wirkungsweise einer ganzen Gruppe von Proteinen haben.

5.2. Stabilität und Faltung

Mit dem Dreibein aus Struktur, Dynamik und Funktion wurde bislang nur der native Zustand des Proteins diskutiert. Es wurde ein Bild der Energielandschaft entwickelt, das allein auf das globale Minimum des nativen Zustandes begrenzt ist. Wie aber wird dieser funktionstragende, hochstrukturierte Zustand gebildet und wie stabil ist er gegenüber äußeren Einflüssen? Diese Fragestellungen führen schnell zum Bild der Energielandschaft, in der neben dem energetisch günstigen Tal des nativen Zustandes mindestens ein weiteres Tal für den breiten Konformationsraum des denaturierten, entfalteten Zufallsknäuels existiert.

Die Arbeiten von Anfinsen zeigen, dass ausschließlich die sequentielle Abfolge der Aminosäuren alle Informationen für die native Struktur des Proteins trägt [136]. Somit ist das Ergebnis der Proteinfaltung, die native Konformation, vorgegeben. Die Frage bleibt nach dem konformationellen Weg, nach der Trajektorie zur gefalteten Struktur. Dieser Weg hängt von der Form der Energielandschaft ab. Die steilen Wände, die vom breiten Konformationsraum des entfalteten Knäuels in das scharfe Minimum des nativen Zustandes führen, werden als Faltungstrichter bezeichnet [12]. Abhängig von der Größe des Proteins und der Anzahl möglicher lokaler Kontakte zwischen den Aminosäuren kann die Oberfläche des Faltungstrichters sehr rau sein. Das Protein kann in diesen lokalen Minima teilweise gefaltete Zustände annehmen oder Intermediate ausbilden. Die mehrdimensionale Energielandschaft bietet somit mannigfaltige Möglicheiten für den Weg vom Zufallsknäuel zur nativen Struktur.

Betrachtet man nicht nur das einzelne Protein, sondern das Molekül in einem Ensemble vieler anderer Moleküle, so können intermolekulare Kontakte zwischen teilweise oder komplett entfalteten Proteinketten zur Aggregation und Fehlfaltung dieser führen. Dies zählt als die potentielle Ursache vieler, vor allem neurodegenerativer Krankheitsbilder (Alzheimer, Parkinson, Huntington) [137] und rückt das Verständnis der Proteinfaltung auch aus medizinischem Interesse in den Fokus der Wissenschaft.

Aufgrund der Komplexität durch mögliche Zwischenzustände, verschiedene Faltungswege und potentielle Fehlfaltungen stellt das Faltungsproblem eine vielversprechende Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie dar. Bereits 1997 wurde die domänenweise Entfaltung einzelner Titin-Moleküle sowohl mit Rasterkraftspektroskopie [138] als auch mit optischen Pinzetten [139] untersucht. Auf dem Feld der optischen Einzelmolekülspektroskopie wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen künstlich eingebrachten Farbstoffen am Protein genutzt, um aus der Abstandsinformation Rückschlüsse auf die Konformation bzw. die Struktur des Proteins zu ziehen. Die ersten Versuche wurden in der Gruppe von Hochstrasser an immobilisierten Proteinen durchgeführt [140, 141]. Die Faltung wurde als antikorrelierter Verlauf der Intensitäten von Donor- und Akzeptorfarbstoff einzelner Proteine beobachtet. In den folgenden Jahren wurden viele verschiedene Proteine in ihrem Faltungsverhalten studiert, wie der Chymotrypsin Inhibitor 2 [142], das Kälteschockprotein TmCsp [57], Barstar [95], das Protein L [143], die Ribonuklease H [144] oder die Adenylatkinase [145, 146]. Alternativ zu den Experimenten an immobilisierten Molekülen [144–146], die unter dem Einfluss möglicher Wechselwirkungen mit der Oberfläche standen, wurde die Analyse transienter Fluoreszenzereignisse frei diffundierender Moleküle entwickelt und mehrfach angewendet [57, 95, 142, 143]. Die Proteine wurden stets im thermodynamischen Gleichgewicht bei verschiedenen Denaturierungsbedingungen betrachtet. Verschiedene Gruppen konnten aber auch Einzelmolekül-FRET-Daten anhand kinetischer Versuche gewinnen. So zeigten Lipman et al. den schnellen Kollaps der entfalteten Kette des Kälteschockproteins unter Rückfaltungsbedingungen [147]. Orte et al. gelang es, die Ausbildung eines Intermediat-Zustandes und verschiedene Faltungswege einer Variante des grün fluoreszierenden Proteins (Citrine) nachzuweisen [148].

Bei den meisten der aufgeführten Proteine handelt es sich um kleine Ein-Domänen-Proteine, die nachweislich einem Zwei-Zustands-Übergang von der entfalteten Polypeptidkette zum nativen Zustand folgen. Selten wurden bisher komplexere Systeme mit Einzelmolekül-FRET untersucht. Zwar gibt es FCS-Studien zur Entfaltung der Multi-Domänen-Proteine $F(ab')_2$ und Protein A, aber Guo et al. konzentrierten sich hauptsächlich auf das unterschiedliche Diffusionsverhalten der entfalteten Ketten, nicht aber auf die Entfaltung an sich [149]. Die Analyse der Entfaltung von TtSlyD als Zwei-Domänen-Protein öffnet somit ein neues Feld. Es ergeben sich innovative Fragestellungen. So interessiert unter anderem, ob die Domänen kooperativ entfalten oder ob die IF-Domäne eine geringere Stabilität aufweist als das Gesamtprotein und somit teilweise entfaltete Zustände existieren.

Um das Faltungsverhalten des Proteins TtSlyD untersuchen zu können, wurden zwei Varianten, D82C/T139C und P68C/E111C, mit dem Farbstoffpaar AF488 und A647N markiert, wobei die erst genannte Variante den Zwischen-Domänen-Abstand und die zweit genannte Variante die internen Abmessungen innerhalb der IF-Domäne experimentell zugänglich machen. Für beide Varianten wurde bei verschiedenen Konzentrationen des Denaturierungsmittels GdHCl die Verteilung der Energietransfereffizienz bestimmt. Im Gegensatz zu der Analyse fluoreszenzspektroskopischer Daten im Ensemble [22], gibt der Einzelmolekül-FRET nicht nur Auskunft über die relativen Verhältnisse der einzelnen Populationen. Ferner sind auch Strukturänderungen innerhalb jener Populationen über Verschiebungen der mittleren Energietransfereffizienzen zugänglich.

So konnte für die entfaltete Fraktion von $Tt\mathrm{SlyD}$ in beiden Fällen das Aufquellen des Zufallsknäuels mit steigender Denaturierungsmittelkonzentration festgestellt werden. Dieses Verhalten wurde sowohl für kleinere Ein-Domänen- [108] als auch für Multi-Domänen-Proteine [149] nachgewiesen. Unter Annahme des WLC-Modells [110] konnte unabhängig von der Position der Farbstoffe eine Persistenzlänge von $l_{\rm p}=(8,7\pm0,8)$ Å bei 6,0 M GdHCl ermittelt werden. Die FRET-Messungen sind folglich in sich konsistent, aber auch vergleichbar mit Ergebnissen anderer Gruppen. So haben Hoffmann et al. [150] für verschiedene Varianten von $Tm\mathrm{Csp}$ Persistenzlängen in der Größenordnung von $l_{\rm p}\approx10,0$ Å bestimmt, sind dabei aber auch von einem geringeren Vorschub in der Konturlänge pro Aminosäure $(3,8\,\text{Å})$ ausgegangen. Mit angepassten Werten erhält man für $Tt\mathrm{SlyD}$ einen Wert von $l_{\rm p}=(9,2\pm0,8)$ Å. Dieses Ergebnis ist auch vergleichbar mit den Werten $l_{\rm p}=(8...9)$ Å von O'Brien et al. [106], die aus der Simulation verschiedener Kettenmodelle für das entfaltete Knäuel hervorgehen. Für die Variante D82C/T139C konnte die mittlere Energietransfereffizienz der entfalteten Fraktion zusätzlich auf native Bedingungen extrapoliert werden. Dies resultiert in einer Persistenzlänge von $l_{\rm p}=(3,2\dots3,4)$ Å, wobei sich die Spanne der Ergebnisse aus den verschiedenen

Vorschublängen [107, 150] ergibt. Auch dieser Wert liegt in guter Übereinstimmung mit bereits veröffentlichen Daten, wie $l_p = (3.9 \pm 0.7) \,\text{Å}$ für Tm Csp [150], verschiedenen kraftspektroskopisch bestimmten Werten $(l_p = (3,3...4,2) \text{ Å})$ [151] oder den simulierten Werten $l_{\rm p}=(3,0\ldots3,5)\,{\rm A}$ [106]. Der damit verbundene Kollaps der denaturierten Kette bei fehlendem Denaturierungsmittel wird damit begründet, dass GdHCl als Salz die attraktiven elektrostatischen Kräfte innerhalb des Zufallsknäuels abschirmt [95]. Für die zweite Variante P68C/E111C konnte eine Extrapolierung nicht vorgenommen werden, da erst für sehr hohe GdHCl-Konzentrationen sichere Werte für die entfaltete Fraktion bestimmt werden konnten. Im Gegensatz zur entfalteten Population ist die Energietransfereffizienz der nativ gefalteten Moleküle annähernd unabhängig von der Konzentration des Denaturierungsmittels. Nur eine leichte Verschiebung der mittleren Energietransfereffizienz zu geringeren Werten ist für geringe Konzentrationen bis 2,0 M GdHCl zu beobachten. Dabei ist nicht eindeutig zu klären, ob diese Verschiebung durch Ereignisse bereits entfalteter Proteine entsteht, die in der nativen Verteilung eingeordnet werden oder ob es sich um eine systematische Verschiebung durch ein Aufquellen des gefalteten Zustands selbst handelt. O'Brien et al. haben durch theoretische Berechnungen die Hypothese für ein ähnliches Verhalten der nativen Fraktion des Kälteschockproteins aufgestellt [106], die allerdings nicht durch Experimente bestätigt werden konnte.

Aus den Flächen der einzelnen Populationen im Energietransfereffizienz-Histogramm konnten Übergangskurven ermittelt und daraus die thermodynamischen Kenngrößen der Stabilität und Kooperativität bestimmt werden. Für die Variante D82C/T139C wurden die Vergleichswerte aus Ensemble-Experimenten überzeugend reproduziert. Die Ergebnisse für die Variante P68C/E111C fallen im Einzelmolekül-Experiment durch eine höhere Stabilität auf, sodass der Übergangsmittelpunkt um 1M zu höheren Konzentrationen von GdHCl verglichen zu den Ensemble-Messungen verschoben ist.

Da die native Verteilung der Variante D82C/T139C durch das Zwei-Zustands-Modell einer möglichen offenen und geschlossenen Konformation angepasst wurde, konnte auch das Verhalten dieser zwei nativen Subpopulationen in Abhängigkeit des Denaturierungsmittels ausgewertet werden. Innerhalb des Entfaltungsübergangs des Gesamtproteins mit einem Mittelpunkt von $c_{1/2} = (2.95 \pm 0.07) \,\mathrm{M}$ verschiebt sich das Gleichgewicht deutlich zur offenen Konformation. Die geschlossene Konformation wird zunehmend destabilisiert. Es ist nicht auszuschließen, dass elektrostatische Wechselwirkungen, die vielleicht Grundlage dieser Konformation waren, zu stark durch GdHCl abgeschirmt werden. Der Übergangsmittelpunkt liegt allein für die Betrachtung der geschlossenen Konformation anteilig an allen nativen Ereignissen bei $c_{1/2} = (3.3 \pm 0.1)$ M. Interessanterweise kann eine interne Austauschdynamik nach der Methode von Torres und Levitus [60] bis zu Konzentrationen von 3,5 M GdHCl beobachtet werden. Diese Konzentration ist vergleichbar mit dem Übergangsmittelpunkt der geschlossenen Konformation. Es kann geschlussfolgert werden, dass sich auch unter denaturierenden Bedingungen die Proteine im gesamten nativen Konformationsraum auf einer vergleichbaren Zeitskala bewegen. Dies bedeutet, dass die Form des nativen Tals in der Energielandschaft robust gegenüber dem Denaturierungsmittel GdHCl sein muss.

Mit der Markierung der Variante P68C/E111C sollte die Struktur, vor allem die Stabilität

der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins kontrolliert werden. Unter nativen Bedingungen ergab sich zwar eine $E_{\rm t}$ -Verteilung, die nicht allein durch eine Konformation beschrieben werden konnte. Jedoch sprechen mehrere Gründe gegen die lokale Entfaltung der IF-Domäne als Ursache für die Breite der Verteilung. So gibt es keinerlei Hinweise in NMR-Spektren auf solch eine Entfaltung [67]. Ferner würde unter Zugabe des Denaturierungsmittels die lokale Entfaltung begünstigt und somit das Gleichgewicht zu dieser Subpopulation verschoben werden. Aufgrund der deutlichen Zunahme der Persistenzlänge, auch unter Einwirkung geringer Denaturierungsmittelkonzentrationen [150], müsste die Fraktion der lokal entfalteten IF-Domäne eine signifikante Verschiebung in der Energietransfereffizienz-Verteilung aufweisen. In den vorgestellten Einzelmolekül-Experimenten sind weder eine signifikante Verschiebung in der mittleren Energietransfereffizienz, noch eine systematische Veränderung des Verhältnisses der Subpopulationen für die Variante P68C/E111C nachweisbar. Die Breite der unter nativen und schwach denaturierenden Bedingungen gemessenen Verteilung ist folglich dem Effekt zuzuschreiben, dass der Abstand zwischen den fluoreszent markierten Aminosäuren nicht vollständig von der globalen Dynamik zwischen den Domänen entkoppelt ist.

Für höhere Konzentrationen an GdHCl ($c > 3.0 \,\mathrm{M}$) wird auch für die Variante P68C/E111C eine Fraktion ermittelt, die deutlich dem entfalteten Protein zuzuordnen ist. Überraschend ist jedoch, dass die entfaltete Fraktion erst bei Konzentrationen des Denaturierungsmittels auftritt, die deutlich höher liegen, als sie nach den Ensemble-Messungen erwartet werden. Der Übergangsmittelpunkt ist um etwa 1 M GdHCl verschoben. Dieses Ergebnis wirft nun die Frage auf, was der Grund für diesen Unterschied ist. Während im Einzelmolekül-Experiment die Energietransfereffizienz zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff die Messgröße darstellt und so nur der Abstand zwischen den Aminosäuren P68C und E111C die bestimmende Größe für den daraus ermittelten Übergang ist, wird in den Ensemble-Messungen die intrinsische Fluoreszenz der vier Tyrosinaminosäuren experimentell bestimmt. Drei der vier Tyrosine sind in der FKBP-Domäne lokalisiert, ein weiteres Tyrosin befindet sich in der IF-Domäne (Abb. 2.3). Die Veränderung der Fluoreszenz mit dem Denaturierungsmittel resultiert aus der Veränderung der chemischen Umgebung der Tyrosine. Wie die einzelnen Tyrosin-Aminosäuren dabei zum Gesamtsignal beitragen, ist nicht bekannt und kann nur durch Einzelvarianten aufgeklärt werden. Unter der Annahme, dass alle Tyrosine eine vergleichbare Fluoreszenzänderung zeigen, spiegelt der Ensemble-Übergang nicht nur eine Mittelung über das Protein-Ensemble, sondern auch über beide Domänen von TtSlyD wider, da es in beiden Domänen Tyrosin-Aminosäuren gibt.

Bei SlyD aus dem Organismus E. coli (EcSlyD, s. Abb. 2.3) ist, im Gegensatz zu TtSlyD, keines der vier Tyrosine als intrinsische Fluoreszenzsonde in der IF-Domäne lokalisiert (Abb. 2.3), sodass Zoldak et al. davon ausgehen, dass nur die Entfaltung der FKBP-Domäne erfasst wird [22]. Durch die Mutation eines Tryptophans in die IF-Domäne (D101W) und eine getrennte Betrachtung der Tyr- und Trp-Fluoreszenz ist es möglich, beide Domänenfaltungen unabhängig voneinander beobachten zu können. Umfangreiche kinetische und Gleichgewichts-Entfaltungsstudien wurden im Ensemble durchgeführt [22]. In Abhängigkeit von Harnstoff als Denaturierungsmittel wurden kinetisch die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten (kEF und kF) bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 4,0 M Harnstoff stimmen die Raten für die Tyr- und

Trp-Fluoreszenz überein, d. h. die Prozesse unterliegen einem gemeinsamen ratenlimitierenden Schritt. Zoldak et al. gehen davon aus, dass die Faltung der FKBP-Domäne dieser ratenlimitierende Schritt ist [22]. Unter stark denaturierenden Bedingungen ($c = 8.1 \,\mathrm{M}$ Harnstoff) unterscheiden sich die Verläufe in der Tyr- und Trp-Fluoreszenz für die Entfaltung. Während die FKBP-Domäne (Tyr) weiterhin mit einer Rate zu beschreiben ist $(k_{\rm EF}=2.6\,{\rm s}^{-1})$, treten für die IF-Domäne (Trp) zwei Komponenten auf. Eine Komponente zeigt dieselbe Rate wie für die FKBP-Domäne und eine zweite Komponente ist ungefähr 90 Mal schneller mit $k_{\rm EF} = 240\,{\rm s}^{-1}$. Diese Aufspaltung wird ab $c = 4.0\,{\rm M}$ Harnstoff beobachtet, wobei der relative Anteil der schnellen Entfaltung mit der Harnstoffkonzentration steigt, die Raten aber annähernd konstant bleiben. Analog wurden Ergebnisse für das stärkere Denaturierungsmittel GdHCl bestimmt. Dabei treten die zwei Entfaltungskomponenten bereits ab $c = 1.0 \,\mathrm{M}$ GdHCl auf. Im Fall von GdHCl steigt die schnelle Entfaltungsrate mit der Konzentration. Werden die Daten auf $c = 0.0 \,\mathrm{M}$ GdHCl extrapoliert, erhält man die Faltungs- und Entfaltungsraten für die IF-Domäne (Trp) von $k_{\rm F}=460\,{\rm s}^{-1}$ und $k_{\rm EF}=20\,{\rm s}^{-1}$. Diese Daten werden so interpretiert, dass die IF-Domäne unter nativen Bedingungen von der Einbindung in die FKBP-Domäne stabilisiert wird und kooperativ in einem Zwei-Zustands-Übergang mit dieser Domäne entfaltet. Unter denaturierenden Bedingungen wird die IF-Domäne aber zunehmend destabilisiert und entfaltet mit Raten, die bis zu 100 Mal größer sind als die Entfaltungsrate der FKBP-Domäne. Für die Rückfaltung ist entscheidend, ob die FKBP-Domäne noch gefaltet oder bereits selbst entfaltet ist. Im ersten Fall ist eine schnelle Rückfaltung möglich, im zweiten ist sie durch die Rückfaltung der FKBP-Domäne limitiert.

Mit dieser Vielzahl an Ergebnissen für EcSlyD im Hintergrund wurden die Einzelmoleküldaten für TtSlyD betrachtet. Warum ist der Faltungsübergang für die Variante P68C/E111C so stark gegenüber dem Ensemble-Experiment verschoben? Intuitiv würde man vermuten, dass die Ergebnisse der Einzelmolekül-Betrachtung die reine Entfaltung der IF-Domäne widerspiegeln, da die Farbstoffe des FRET-Paares in der IF-Domäne lokalisiert sind, während der Ensemble-Übergang das gesamte Protein oder annähernd nur die FKBP-Domäne von TtSlyD beschreibt. Dies würde aber bedeuten, dass die IF-Domäne eine höhere Stabilität als die FKBP-Domäne besitzt. Dieses Ergebnis stünde in einem klaren Widerspruch zu den Ergebnissen für EcSlyD von Zoldak et al. [22].

Alternativ können zwei mögliche Faltungs-Hypothesen aufgestellt werden, die den Unterschied zwischen Ensemble- und Einzelmolekül-Experiment erklären können. Die erste Hypothese beschreibt weiterhin eine domänenweise Entfaltung, bei der die IF-Domäne unter denaturierenden Bedingungen schon entfaltet vorliegt, während die FKBP-Domäne noch nativ gefaltet ist (Abb. 5.2: Hypothese 1). Dies kann auf folgende Weise durch die Einzelmolekül-Ergebnisse erklärt werden: Die Farbstoffe des FRET-Paares haben sowohl im nativen Zustand des Proteins, als auch in dem Zwischen-Zustand mit einer entfalteten IF-Domäne einen geringen Abstand, da die Enden der IF-Domäne fest in der gefalteten FKBP-Domäne verankert sind. In beiden Fällen würden hohe Energietransfereffizienzen gemessen, sodass die Entfaltung der IF-Domäne durch eine Verschiebung der Energietransfereffizienz nicht detektiebar ist. Der Übergang der Einzelmolekül-Daten der Variante P68C/E111C zeigt somit erst die Entfaltung der stabileren FKBP-Domäne und liegt deshalb bei einem höheren Übergangsmit-

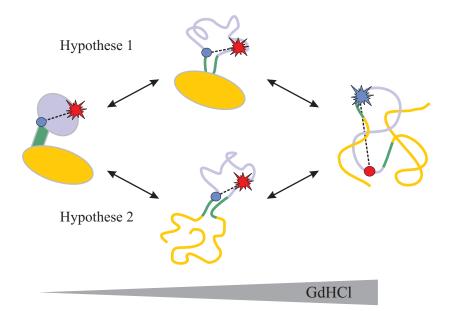


Abb. 5.2.:

Faltungsmodelle für TtSlyD. Die native Struktur ist durch die FKBP-Domäne (gelb), den Verbingungsbereich (grün) und die IF-Domäne (violett) charakterisiert. Im Fall der Variante P68C/E111C des Proteins sind beide Farbstoffe des FRET-Paares in der IF-Domäne lokalisiert. Aufgrund des geringen Abstandes in der Struktur wird ein hoher Energietransfer gemessen (Akzeptor als roter Stern, Donor als blauer Kreis). (Oben) Hypothese 1: Entfaltet nur die IF-Domäne zusammen mit dem Verbindungsbereich (Mitte), bleibt die hohe Energietransfereffizienz aufgrund des geringen sequenziellen Abtandes von 22 Aminosäuren (grün) erhalten. Erst durch die Entfaltung des gesamten Proteins (rechts) sinkt die Energietransfereffizienz, die nun durch den Sequenzabstand von 43 Aminosäuren (violett) bestimmt wird (Donor als blauer Stern, Akzeptor als roter Kreis). (Unten) Hypothese 2: Das komplette Protein entfaltet kooperativ (Mitte), allerdings bleiben residuale Strukturen in dem Verbindungsbereich (grün), der als Faltungskern wirkt, erhalten, die erst durch stark denaturierende Bedingungen mit steigender GdHCl-Konzentration aufgelöst werden (rechts). Da die Farbstoffe bei der Variante P68C/E111C am Rand der IF-Domäne und teilweise im Verbindungsbereich liegen, steigt die Energietransfereffizienz nicht bei der Entfaltung des Proteins, sondern erst bei der kompletten Auflösung der residualen Strukturen.

telpunkt. Gegen diese These sprechen die Ergebnisse von Zoldak et al. aus Gleichgewichts-Entfaltungsstudien von EcSlyD, die eine kooperative Entfaltung der einzelnen Domänen zeigen. Desweiteren ist es unwahrscheinlich, dass die Entfaltung der IF-Domäne zu keiner Änderung in der Energietransfereffizienz-Verteilung führen sollte.

Im Gegensatz zu dieser ersten Hypothese geht die zweite Hypothese von einer kooperativen Faltung bzw. Entfaltung der IF- und FKBP-Domäne aus. Diese kooperative Entfaltung wird durch den Übergang im Ensemble-Experiment visualisiert, während der Übergang im Einzelmolekül-Experiment auf residuale Strukturen im bereits entfalteten Zustand des Proteins hinweist, die erst unter stark denaturierenden Bedingungen aufgelöst werden (Abb. 5.2: Hypothese 2). Solche residualen Strukturen wurden bereits für andere Proteine nachgewiesen [152]. Betrachtet man die Faltung eines Proteins, geht man davon aus, dass diese Strukturen in den ersten Schritten (Zeiten im Sub-μs-Bereich [152]) vom entfalteten Zufallsknäuel zum nativen Zustand ausgebildet werden. Dabei handelt es sich nicht um Sekundärstrukturelemente, sondern vielmehr um eine nativähnliche Topologie des Peptidrückgrats, die durch

nichtlokale Wechselwirkungen stabilisiert wird [153]. Im Fall von TtSlyD P68C/E111C liegen die Farbstoffe des FRET-Paares genau am Rand des Verbindungsbereiches zwischen den Domänen (P68C) beziehungsweise nur vier Aminosäuren sequentiell von diesem entfernt in der IF-Domäne (E111C). Geht man von einer kooperativen Faltung der beiden Domänen aus, muss diese Faltung über den Verbindungsbereich vermittelt werden. Somit spielt der Verbindungsbereich nicht nur im nativen Zustand als dynamischer Verbindungsarm, sondern auch in der Proteinfaltung eine zentrale Rolle. Es liegt nahe, dass in diesem wichtigen Bereich residuale Strukturen existieren können, die eine höhere Stabilität aufweisen als das Gesamtprotein. Ein Indiz für die ausgezeichnete Bedeutung des Verbindungsbereiches ist auch die hohe sequentielle Übereinstimmung der Aminosäuren innerhalb des Verbindungsbereiches, die sich durch Vergleich verschiedener Zwei-Domänen-FKBP ergibt [20]. Mit der zweiten Hypothese wird der Verbindungsbereich als eine Art Faltungskern interpretiert, dessen Topologie sich auf einer schnellen Zeitskala ausbildet, bevor die Sekundärstrukturelemente der einzelnen Domänen formiert werden.

Fasst man die bisher erhaltenen Ergebnisse zusammen, bietet die Untersuchung der Entfaltung des Zwei-Domänen-Proteins TtSlyD auf Einzelmolekülebene neue Erkenntnisse. Während ein Teil durch bekanntes Wissen über Ein-Domänen-Proteine bestätigt werden kann, müssen andere Aspekte weiterführend untersucht und analysiert werden. So konnten zwar mögliche Hypothesen für den Faltungsweg aufgestellt werden. Während die domänenweise Entfaltung vor allem durch Ensemble-Experimente von Zoldak et al. widerlegt wird, kann die Hypothese residualer Reststrukturen in einem Faltungskern erst durch weitere Experimente bestätigt werden (siehe Kapitel 6 Ausblick). Die Faltungsproblematik bildet somit ein neues Forschungsthema, das vielversprechend und zukunftsweisend ist. Denn nur mit der Aufklärung des Faltungsprozesses können die Ursachen für Fehlfaltungen verstanden werden. SlyD als Vertreter der Zwei-Domänen-Proteine könnte allgemein gültige Neuaussagen zur Faltung komplexerer Systeme als der bisher betrachteten Ein-Domänen-Proteine liefern.

6. Ausblick

Das Ziel der Arbeit war es, die Zusammenhänge zwischen Funktion, Dynamik und Struktur von Proteinen am Beispiel des Zwei-Domänen-Proteins TtSlyD verstehen zu lernen. Zwei verschiedene Varianten des Proteins wurden mit einem FRET-Farbstoffpaar fluoreszent markiert. Aus der Verteilung der Energietransfereffizienz konnten Aussagen über die strukturelle Heterogenität im nativen Zustand, über eine Austauschdynamik zwischen den beiden Hauptkonformationen und über die Entfaltung des Zwei-Domänen-Proteins getroffen werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sind neue Fragestellungen aufgekommen, deren Beantwortung das Ziel weiterführender Experimente und Projekte sein kann.

Alle vorgestellten Einzelmolekül-Experimente fanden an frei diffundierenden Molekülen statt. Die dynamischen Informationen wurden indirekt aus Korrelationsanalysen gewonnen. Für eine direkte Beobachtung der Dynamik ist eine Immobilisierung der Proteine erforderlich. Zeitabhängige Intensitätsverläufe einzelner Proteinmoleküle können so aufgenommen werden. Die längeren Beobachtungszeiten würden das Verfolgen langsamer dynamischer Übergänge in der Größenordnung von 100 s⁻¹ ermöglichen, während die Korrelationsanalyse im Grenzbereich des zugänglichen Zeitfensters arbeitet. Erste Versuche wurden bereits in einer Bachelorarbeit von Lydia Lutter an TtSlyD in immobilisierten Vesikeln durchgeführt [154]. Diese deuten auf eine Bestätigung von zwei Hauptkonformationen von TtSlyD hin. Durch die weitere Analyse der Zeitspuren können die Übergangsraten zwischen den Hauptkonformationen bestimmt und mit den Ergebnissen der Korrelationsanalyse verglichen werden [155]. Aus dem zeitabhängigen Verlauf der Energietransfereffizienz sollte ebenso klar werden, welches Modell der Energielandschaft den nativen Zustand von TtSlyD am besten beschreibt, ob die Energiebarrieren zwischen den Teilzuständen innerhalb der Konformationen deutlich höher oder deutlich niedriger als die Barriere zwischen den Hauptkonformationen sind (siehe dazu Abb. A.9 im Anhang).

Das Protein TtSlyD stammt aus dem thermophilen Organismus Thermus thermopilus, dessen optimale Wachstumstemperatur deutlich über 50 °C liegt [156]. So stellt sich die Frage, ob die strukturelle Heterogenität und die interne Dynamik von TtSlyD von der Temperatur abhängig sind. Diese Frage kann durch temperaturabhängige Einzelmolekül-Messungen beantwortet werden, die eine temperierbare Messkammer verlangen. Der Temperaturverlauf der Dynamikraten, wie sie aus Lösungs- aber auch aus Immobilisierungs-Experimenten bestimmt werden können, könnte genutzt werden, um Rückschlüsse auf die Energiebarriere zwischen den einzelnen Zuständen zu gewinnen. Dafür ist auch eine detaillierte Diskussion der verschiedenen theoretischen Modelle (zum Beispiel: Kramers-Theorie) notwendig, die den Übergang zwischen Zuständen über eine Energiebarriere beschreiben.

Die Wechselwirkungsstudien mit Bindungspartnern können weiter ausgebaut werden. So

könnten Versuche mit einer gekürzten Form des TAT-Signal-Peptids ohne Tryptophan durchgeführt werden, um den Einfluss auf TtSlyD untersuchen zu können, ohne die Fluoreszenz der FRET-Farbstoffe zu löschen. Aber auch Experimente mit der ungekürzten Form des TAT-Signal-Peptids mit Tryptophan sind von Interesse. Aus konzentrationsabhängigen Messungen können eventuell Aussagen über die Bindungskinetik getroffen werden. Im Fall von immobilisierten TtSlyD-Molekülen ist eine explizite Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten denkbar. Diese Art von Experiment ist auch für alle weiteren Bindungspartner möglich. Aufgrund der nötigen hohen Konzentration der Bindungspartner sollten diese für bindungskinetische Studien mit einem nichtfluoreszenten Löschmolekül markiert werden.

Da im Modell über den Wirkungsmechanismus von TtSlyD in dieser Arbeit angenommen wurde, dass die Dynamik zwischen den Domänen die hohe Rückfaltungsrate der Substratproteine erklärt, wäre es von großem Interesse, diese Dynamik zu blockieren und den Einfluss auf die Aktivität des Proteins untersuchen zu können. Dies ist eventuell durch Mutationen möglich, die eine Versteifung des Verbindungsbereiches zwischen den beiden Domänen zur Folge haben.

Das Projekt, die Faltung des Zwei-Domänen-Proteins vollständig zu verstehen, steht erst am Anfang. Weitere Experimente sind notwendig, um ein komplettes Faltungsmodell aufstellen zu können. Unter anderem können die Farbstoffpositionen im Protein variiert werden, sodass die Entfaltung der FKBP-Domäne separat messbar ist. Auch für die Beoachtung der IF-Domänen-Entfaltung müssen die Farbstoffpositionen optimiert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, wie der Einbau einer Disulfidbrücke in den Verbindungsbereich zwischen den Domänen die Entfaltung beeinflusst. Sollte der Verbindungsbereich ein Faltungskern sein, würde dieser durch die Disulfidbrücke zusätzlich stabilisiert. Der Entfaltungsübergang der Variante P68C/E111C von TtSlyD sollte in diesem Fall deutlich beeinflusst werden. Der Denaturierungsübergang von TtSlyD kann auch durch einen Temperaturanstieg induziert werden. Durch Zirkulardichroismus-Messungen konnte die Übergangstemperatur des Wildtyps von TtSlyD mit $\vartheta_{\rm M}=80\,^{\circ}{\rm C}$ bestimmt werden [67]. Ein Faltungsübergang in einem so hohen Temperaturbereich stellt allerdings große Anforderungen an die Messapparatur. Der hohe Temperaturunterschied zur Umgebung (Raumtemperatur) erschwert die stabile Regelung der Temperatur in der Messkammer. Die Erwärmung des Objektivs und die Veränderung der optischen Abbildung dürfen nicht vernachlässigt werden. Wenn diese Einflüsse jedoch verstanden sind und beachtet werden, wäre die Messung von Temperaturübergängen ein möglicher neuer Zugang zum Faltungsmechanismus von TtSlyD.

Konzentriert man sich auf die entfaltete Polypeptidkette als Biopolymer, sind weitere Entfaltungsmessungen mit dem Denaturierungsmittel Harnstoff von Interesse. Das Verhalten der entfalteten Peptidkette ist in Harnstoff und GdHCl unterschiedlich, da es sich bei GdHCl im Gegensatz zu Harnstoff um ein Salz mit einer hohen Ionenstärke handelt. Durch GdHCl können elektrostatische Wechselwirkungen abgeschirmt werden, von denen vermutet wird, dass sie unter nativen Bedingungen den entfalteten Zustand hauptsächlich bestimmen [95]. Neben diesen gezielten Fragestellungen liegt das Augenmerk stets auf der Optimierung des Systems. So sollte auch versucht werden, die Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Protein zu reduzieren. Alternative Farbstoffe können detailliert studiert werden.

A. Anhang - Zusätzliche Abbildungen

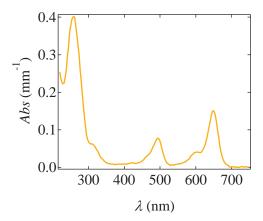


Abb. A.1.:

Absorptionsspektrum der Referenzprobe dsDNA. Es enstehen die Maxima für die intrinsische DNA-Absorption bei $(260\pm2)\,\mathrm{nm}$ mit $Abs=(0,400\pm0,005)$, für AF488 bei $(493\pm2)\,\mathrm{nm}$ mit $Abs=(0,078\pm0,005)\,\mathrm{mm}^{-1}$ und für A647N bei $(649\pm2)\,\mathrm{nm}$ mit $Abs=(0,150\pm0,005)\,\mathrm{mm}^{-1}$. Die Fehler ergeben sich aus den Abweichungen von drei Messungen und der Wellenlängenauflösung des Spektrometers. Mit den Absorptionskoeffizienten $\varepsilon_{\mathrm{AF488}}=72000\,\mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}$ und $\varepsilon_{\mathrm{A647N}}=150000\,\mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}$ lässt sich die Konzentration der dsDNA zu $(10\dots11)\,\mu\mathrm{M}$ bestimmen.

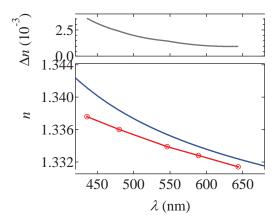


Abb. A.2.:

Dispersion. Brechungindex von Wasser [83] (blau) und des Immersionsöls Immersol W [82] (rot). Die Kurven wurden nach Interpolation voneinander abgezogen. Die Differenz ist im oberen Teil in grau dargestellt.

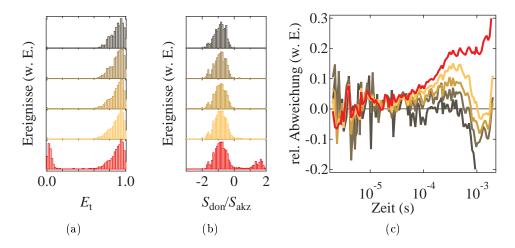


Abb. A.3.:

Photobleichen des Akzeptors. Einfluss des Photobleichens vom Akzeptor auf die Analyse der experimentell bestimmten Verteilungen aus Abb. 4.44. Die in die Auswertung einfließenden Ereignisse werden mit unterschiedlichen Schwellenkriterien ausgewählt. Die Summenschwelle liegt bei $S_{\rm sum}^{488} > 30\,{\rm s}^{-1}$, die Akzeptorschwelle läuft von $S_{\rm akz}^{635} > 0\,{\rm s}^{-1}$ (rot) über $10\,{\rm s}^{-1}$ (gelb), $20\,{\rm s}^{-1}$ (ockar), $30\,{\rm s}^{-1}$ (braun) bis $S_{\rm akz}^{635} > 40\,{\rm s}^{-1}$ (dunkelbraun). Die Photonen aus dem Akzeptor- und Donorkanal der jeweils ausgewählten Ereignisse werden in beide Richtungen kreuzkorreliert ($G_{\rm DA}, G_{\rm AD}$). Deren relative Abweichung zueinander ist in (c) aufgetragen $(0,5(G_{\rm DA}-G_{\rm AD})/(G_{\rm DA}+G_{\rm AD}))$. Diese stellt ein Indiz für das Bleichen des Akzeptors innerhalb der ausgewählten Ereignisse dar.

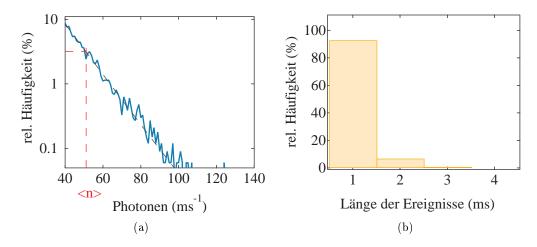


Abb. A.4.:

Photonenzählrate und Länge der Einzelmolekülereignisse . Verteilung der Photonenzählraten (a) und der Länge der Einzelmolekülereignisse (b). Die Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD wurde im POE-Schema (40 μ W bei 488 nm, 15 μ W bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Die Einzelmolekülereignisse wurden über die Schwellen $S_{\rm sum}^{488} > 40\,{\rm s}^{-1}$ und $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$ ausgewählt. Für jedes Ereignis wurden die Zählrate pro Zeiteinheit (ms) und die Länge des Ereignisses in absoluten Zeiteinheiten bestimmt. Die Verteilungen wurden jeweils auf ihre Gesamtfläche normiert und prozentual dargestellt ((a): blau, (b): gelbe Balken). Für die Zählraten (a) ergibt sich eine exponentielle Verteilung (grau gestrichelt). Der Mittelwert wurde zu $\langle n \rangle = 51\,{\rm ms}^{-1}$ bestimmt (rotes Fadenkreuz). Die maximale Photonenzählrate ist $n_{\rm max} = 100\,{\rm ms}^{-1}$.

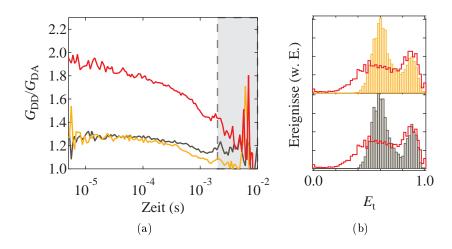


Abb. A.5.:

Simulation und Experiment im Vergleich bei unterschiedlichen Raten. Die experimentellen Ergebnisse der Einzelmolekül-Experimente an der Variante D82C/T139C des Proteins TtSlyD (rot) aus den Abb. 4.9(b) und 4.32(a) werden im Vergleich zu simulierten Daten (orange, braun) dargestellt. Aus der Anpassung mit einem Zwei-Gauß-Modell der Daten aus Abb. 4.9(b) resultieren die mittleren Energietransfereffizienzen $\langle E_{t,1} \rangle = 0,56$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,88$. Aus den Flächen der zwei Gaußkurven kann ein relatives Populationsverhältnis von $\frac{2,25}{1}$ für den Zustand mit geringerer Energietransfereffizienz bestimmt werden. Basierend auf diesen Daten wurde ein doppelt markiertes Protein mit zwei verschiedenen Farbstoffabständen $(r_1 = 4,80\,\text{nm},\ r_2 = 3,59\,\text{nm})$ simuliert. Bei einem Försterradius von $R_0 = 5,0\,\text{nm}$ resultieren diese in zwei Verteilungen mit $\langle E_{t,1} \rangle = 0,56$ und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,88$ (b). Zwischen den Zuständen wird eine zusätzliche Dynamik mit den Raten $k_{12} = 90\,\text{s}^{-1}$ und $k_{21} = 200\,\text{s}^{-1}$ (orange) bzw. $k_{12} = 220\,\text{s}^{-1}$ und $k_{21} = 500\,\text{s}^{-1}$ (braun) simuliert. Das Ratenverhältnis entspricht dem Verhältnis der Populationen der experimentellen Daten. (a) Die Photonen aus den Ereignissen mit $S_{\text{sum}}^{488} > 60\,\text{s}^{-1}$ werden kreuzkorreliert und in Hinsicht auf ihre interne Dynamik kontrolliert (Kurven entsprechend zu (b) farbig kodiert). Der graue Balken (a) markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2\,\text{ms}$. Aus den Energietransfereffizienz-Verteilungen (a) folgt, dass die Abschätzung des Ratenverhältnisses fehlerhaft ist und die Population des offenen Zustands überbewertet wird. Auch die Amplitude der Korrelationsanalyse (a) kann mit den Annahmen in der Simulation nicht reproduziert werden.

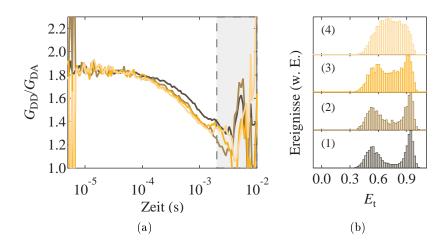


Abb. A.6.:

Einfluss der Konzentration auf die Energietransfereffizienz-Verteilung und auf die Korrelationsanalyse. Je höher die Konzentration der fluoreszenten Probe ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich mehr als ein Teilchen im Beobachtungsvolumen befinden. Ist dies der Fall, wird die Information mehrerer Teilchen gemittelt. Dies führt zum Verschmelzen der einzelnen Populationen im Energietransfereffizienz-Histogramm (b). Die Korrelations-Analyse auf interne Dynamik bleibt nahezu unverändert (a). Die Daten resultieren aus der Simulation eines doppelt markierten Proteins mit zwei verschiedenen Farbstoffabständen $(r_1 = 5,0\,\mathrm{nm},\ r_2 = 3,3\,\mathrm{nm})$. Bei einem Försterradius von $R_0 = 5,0\,\mathrm{nm}$ resultieren diese in zwei Verteilungen mit $\langle E_{\mathrm{t},1} \rangle = 0,50\,\mathrm{und}\ \langle E_{\mathrm{t},2} \rangle = 0,92\,\mathrm{(b)}$. Zwischen den Zuständen wird eine zusätzliche Dynamik mit den Raten $k_{12} = k_{21} = 100\,\mathrm{s}^{-1}$ simuliert. Das Protein wird in verschiedenen Konzentrationen simuliert. Die apparente mittlere Zahl der Teilchen im Fokus wird durch Autokorrelation des Donorsignal zu $N = 0,16\,\mathrm{(1)},\,N = 0,19\,\mathrm{(2)},\,N = 0,34\,\mathrm{(3)}\,\mathrm{und}\,N = 0,59\,\mathrm{(4)}$ bestimmt. (a) Die Photonen aus den Ereignissen mit $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 60\,\mathrm{s}^{-1}$ werden kreuzkorreliert und die Simulation in Hinsicht auf ihre interne Dynamik kontrolliert (Kurven entsprechend zu (b) farbig kodiert). Der graue Balken markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2\,\mathrm{ms}$.

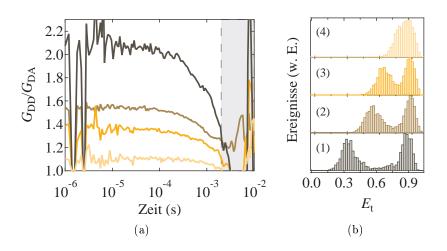


Abb. A.7.:

Einfluss des Unterschieds in der Energietransfereffizienz-Verteilung auf die Korrelationsanalyse. Je dichter die mittleren Energietransfereffizienzen liegen, desto geringer ist die Amplitude des Korrelationsverhältnisses. Die Daten resultieren aus der Simulation eines doppelt markierten Proteins mit zwei verschiedenen Farbstoffabständen $(r_1 = 5,8\,\mathrm{nm}$ (schwarz), $r_1 = 5,0\,\mathrm{nm}$ (braun), $r_1 = 4,2\,\mathrm{nm}$ (ockar), $r_1 = 4,7\,\mathrm{nm}$ (gelb); $r_2 = 3,6\,\mathrm{nm}$). Bei einem Försterradius von $R_0 = 5,0\,\mathrm{nm}$ resultieren diese in zwei E_t -Verteilungen mit $\langle E_{t,1} \rangle = 0,30$ (1), $\langle E_{t,1} \rangle = 0,50$ (2), $\langle E_{t,1} \rangle = 0,60$ (3) bzw. $\langle E_{t,1} \rangle = 0,75$ (4), und $\langle E_{t,2} \rangle = 0,88$ (b). Zwischen den Zuständen wird eine zusätzliche Dynamik mit den Raten $k_{12} = k_{21} = 100\,\mathrm{s}^{-1}$ simuliert. (a) Die Photonen aus den Ereignissen mit $S_{\mathrm{sum}}^{488} > 60\,\mathrm{s}^{-1}$ werden kreuzkorreliert und die Simulation in Hinsicht auf ihre interne Dynamik kontrolliert. Der graue Balken markiert den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2\,\mathrm{ms}$.

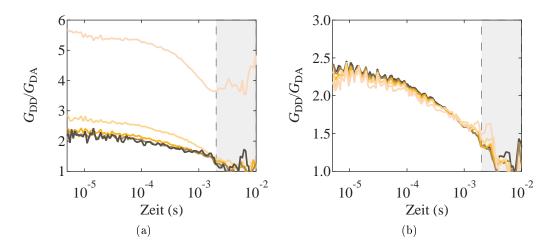


Abb. A.8.:

Einfluss der Auswahlschwellen auf die Korrelationsanalyse. Die Variante P68C/E111C des Proteins TtSlyD wurde im beugungsbegrenzten Fokus im POE-Schema (40 μ W bei 488 nm, 15 μ W bei 635 nm und 10 MHz) angeregt. Für alle Photonen aus den Einzelmolekülereignissen wurde das Verhältnis $\frac{G_{\rm DD}}{G_{\rm DA}}$ berechnet. Die Einzelmolekülereignisse wurden in (a) mit $S_{\rm sum}^{488} > 20 \, {\rm s}^{-1}$ und einer variablen Akzeptorschwelle von $S_{\rm akz}^{635} > 0 \, {\rm s}^{-1}$ (rosa) zu $S_{\rm akz}^{635} > 40 \, {\rm s}^{-1}$ (dunkelbraun) ausgewählt. In (b) war die Akzeptorschwelle mit $S_{\rm akz}^{635} > 20 \, {\rm s}^{-1}$ fest, die Summenschwelle wurde von $S_{\rm sum}^{488} > 10 \, {\rm s}^{-1}$ (rosa) zu $S_{\rm sum}^{488} > 50 \, {\rm s}^{-1}$ (dunkelbraun) variiert. Die Abstufung fand in beiden Fällen in $10 \, {\rm s}^{-1}$ -Schritten statt. Der graue Balken markiert jeweils den durch die Datenbearbeitung beeinflussten Zeitbereich ab $\tau = 2 \, {\rm ms}$.

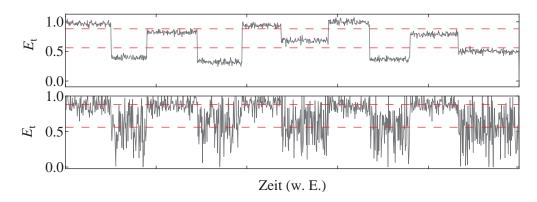


Abb. A.9.:

Skizze des zeitabhängigen FRET-Verlaufs eines einzelnen Moleküls. Auf Grundlage des Bildes der Energielandschaft für TtSlyD wurden zwei mögliche zeitabhängige FRET-Verläufe für die Variante D82C/T139C skizziert. In beiden Fällen ist die Energielandschaft im nativen Zustand durch zwei Haupttäler gekennzeichent, die eine offene und eine geschlossene Konformation zwischen den Domänen wiedergeben. Diese Zustände werden durch die mittleren Energietransfereffizienzen von $\langle E_{t,1} \rangle = 0,56$ und $\langle E_{\rm t,2} \rangle = 0.88$ beschrieben (rot gestrichelte Linien). Ein langsamer Austausch zwischen diesen Hauptkonformationen findet in einer Größenordnung von $100\,\mathrm{s}^{-1}$ statt. Diese Haupttäler sind in weitere Teiltäler unterteilt, durch die kleinskalige strukturelle Änderungen der Domänen innerhalb der Hauptkonformationen beschrieben werden. (Oben): Sind diese Teilzustände durch sehr hohe Energiebarrieren (deutlich höher als die Energiebarriere zwischen offener und geschlossener Konformation) voneinander getrennt, gibt es keinen Austausch zwischen den Teiltälern. Vielmehr wechselt das Protein zwischen einer der möglichen offenen Konformationen in eine der möglichen geschlossenen Konformationen, danach wieder in eine andere mögliche offenen Konformation und so fort. Dies führt dazu, dass der Energietransfer konstant ist, während das Protein in einer Hauptkonformation ist. Allerdings ergeben sich verschieden Niveaus der Energietransfereffizienz innerhalb der Hauptkonformationen. (Unten): Sind die Teilzustände durch Energiebarrieren getrennt, die deutlich niedriger als die Barriere zwischen der offenen und geschlossenen Konformation sind, erfolgt auf einer schnelleren Zeitskala innerhalb der Hauptkonformationen die Dynamik mit kleinskaligen Änderungen. Dies führt dazu, dass sich die Energietransfereffizienz dynamisch ändert, während das Molekül in einer der Hauptkonformationen ist.

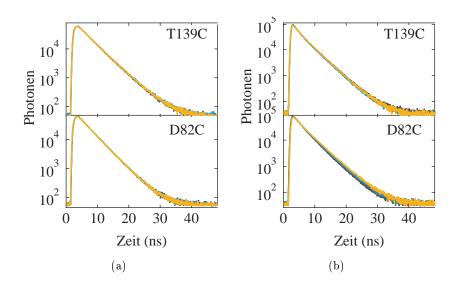


Abb. A.10.:

Einfluss der Inhibitoren auf die Fluoreszenzfarbstoffe. Die mit AF488 (a) und A647N (b) markierten Varianten D82C und T139C des Proteins TtSlyD wurden mit einem gepulsten Laser (5 μ W bei 470 nm bzw. 635 nm, 20 MHz) angeregt. Der Fluoreszenzabfall ist ohne einen Bindungspartner (schwarz), mit Rapamycin ($c=40\,\mu\mathrm{M}$, blau) und FK506 ($c=75\,\mu\mathrm{M}$, orange) dargestellt.

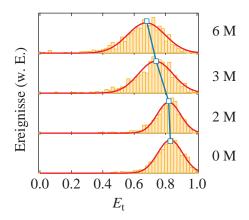


Abb. A.11.:

Entfaltung der Referenzprobe dsDNA. Die Messung erfolgte in Lösung mit dem POE-Anregungsschema ($40\,\mu\mathrm{W}$ bei $488\,\mathrm{nm}$, $15\,\mu\mathrm{W}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz}$) bei verschiedenen Konzentrationen an GdHCl (unkorrigierte Werte in der rechten Spalte). Für alle Einzelmolekülereignisse ($S_\mathrm{sum}^{488} > 40\,\mathrm{s}^{-1}$ bis $2\,\mathrm{M}$, $S_\mathrm{sum}^{488} > 20\,\mathrm{s}^{-1}$ ab $2\,\mathrm{M}$, $S_\mathrm{akz}^{635} > 10\,\mathrm{s}^{-1}$) wurde E_t berechnet. Die Histogramme wurden mit einem Gauß-Modell angepasst (rote Linien). Die mittleren Positionen sind durch Quadrate hervorgehoben. Für Konzentrationen $c > 2\,\mathrm{M}$ an GdHCl findet wahrscheinlich eine strukturelle Veränderung der dsDNA statt, sodass sie als Referenzprobe nicht mehr geeignet ist.

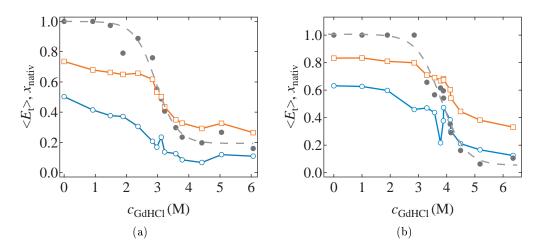


Abb. A.12.:

Vergleich der Energietransfereffizienz im Ensemble mit Einzelmolekül-Ergebnissen. Für die Varianten D82C/T139C (a) und P68C/E111C (b) wurde die mittlere Energietransfereffizienz aller Einzelmolekülereignisse in Abhängigkeit der Denaturierungsmittelkonzentration berechnet. Dabei wurden die Ereignisse entweder nur mit der Summenschwelle $S_{\rm sum}^{488} > 30\,{\rm s}^{-1}$ (blaue Kreise) oder zusätzlich mit der Akzeptorschwelle $S_{\rm akz}^{635} > 10\,{\rm s}^{-1}$ (rote Quadrate) ausgewählt. Im ersten Fall (blaue Kreise) werden auch die Ereignisse in die Mittelwertbildung einbezogen, die durch Moleküle ohne einen aktiven Akzeptorfarbstoff hervorgerufen werden. Da der Anteil an diesen Molekülen abhängig von der Konzentration an GdHCl ist, wird die Übergangskurve in der Energietransfereffizienz stark verschmiert. Im zweiten Fall (rote Quadrate) werden beide Schwellwerte ($S_{\rm sum}^{488}$ und $S_{\rm akz}^{635}$) genutzt. In diesem Fall verfälschen die Strukturänderungen innerhalb der einzelnen Populationen (zum Beispiel das Aufquellen des entfalteten Zustands) den Verlauf der Energietransfereffizienz. Zum Vergleich sind die Übergänge aufgetragen (grau; Anpassung durch Gl. (4.14): Strichellinie)), die aus der Einzelmolekül-Auswertung für den Anteil der nativ gefalteten Moleküle $x_{\rm nativ}$ resultieren (siehe Abschnitt 4.6).

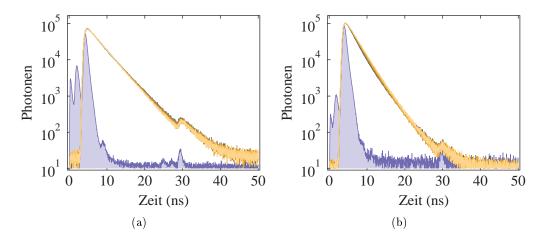


Abb. A.13.:

Einfluss von GdHCl auf die Fluoreszenzfarbstoffe. Fluoreszenzslebensdauer der Farbstoffe AF488 (a) und A647N (b) in NaP-Puffer bei verschiedenen Konzentrationen von GdHCl ($c_{\rm GdHCl}=0\,\rm M$ (dunkelbraun) bis $c_{\rm GdHCl}=6\,\rm M$ (hellgelb) in Schritten von $\Delta c_{\rm GdHCl}=1\,\rm M$. Die Instrumentantwortfunktion (blau) wurde in Wasser ohne Filter in der Detektion gemessen und auf eine gemeinsame Amplitude mit den Fluoreszenzabklingkurven der Farbstofflösungen normiert.

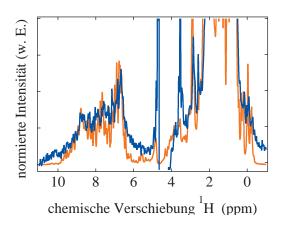


Abb. A.14.:

1D-NMR-Spektren. Eindimensionales Protonenspektrum des Wildtyps (rot) von TtSlyD und der fluoreszent markierten Variante P68C/E111C (blau) von TtSlyD bei einer Konzentration von 1 mM (rot) bzw. 2 μ M (blau). Die Spektren wurden bei $T=298\,\mathrm{K}$ an einem 600 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Aufnahmezeit für das Wildtypprotein betrug 1 min, für die fluoreszent markierte Variante 6 h. Die Dispersion innerhalb des Amidprotonenbereiches (etwa $^1\mathrm{H}=(6\dots9)\,\mathrm{ppm}$) ist vergleichbar.

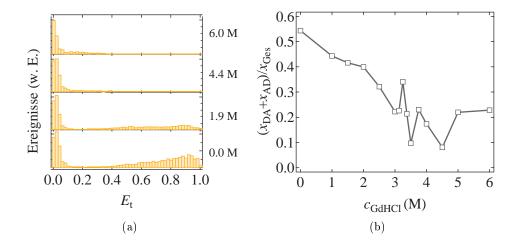


Abb. A.15.:

Einfluss von GdHCl auf das Photobleichen. (a) Energietransfereffizienz-Verteilung für alle Einzelmolekülereignisse ($S_{\mathrm{sum}}^{488} > 30\,\mathrm{s}^{-1}$). Die Messung erfolgte in Lösung mit dem POE-Anregungsschema ($40\,\mu\mathrm{W}$ bei $488\,\mathrm{nm}$, $15\,\mu\mathrm{W}$ bei $635\,\mathrm{nm}$ und $10\,\mathrm{MHz}$) bei verschiedenen Konzentration von GdHCl (rechte Spalte). (b) Berechnung des relativen Anteils der Ereignisse mit doppelt markierten Molekülen ($x_\mathrm{DA} + x_\mathrm{AD}$) an allen Ereignissen, die die Summenschwelle (S_{sum}^{488}) erfüllen. Aufgrund des Photobleichens des Akzeptors nimmt der Anteil der Moleküle mit einem aktiven Akzeptor mit der GdHCl-Konzentration ab.

B. Literaturverzeichnis

- [1] Z. D. Nagel and J. P. Klinman. A 21st century revisionist's view at a turning point in enzymology. *Nat. Chem. Biol.*, 5:543-550, 2009.
- [2] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254:1598–603, 1991.
- [3] K. A. Henzler-Wildman, V. Thai, M. Lei, M. Ott, M. Wolf-Watz, T. Fenn, E. Pozharski, M. A. Wilson, G. A. Petsko, M. Karplus, C. G. Hübner, and D. Kern. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, 450:838–844, 2007.
- [4] C. Löw, P. Neumann, H. Tidow, U. Weininger, C. Haupt, B. Friedrich-Epler, C. Scholz, M. T. Stubbs, and J. Balbach. Crystal structure determination and functional characterization of the metallochaperone slyd from thermus thermophilus. J. Mol. Biol., 398:375–390, 2010.
- [5] C. Scholz, B. Eckert, F. Hagn, P. Schaarschmidt, J. Balbach, and F. X. Schmid. Slyd proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*, 45:20–33, 2006.
- [6] U. Weininger, C. Haupt, K. Schweimer, W. Graubner, M. Kovermann, T. Brüser, C. Scholz, P. Schaarschmidt, G. Zoldak, F. X. Schmid, and J. Balbach. Nmr solution structure of slyd from escherichia coli: Spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function. J. Mol. Biol., 387:295–305, 2009.
- [7] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, and D. Tsernoglou. Temperature-dependent x-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, 280:558–563, 1979.
- [8] A. Ansari, J. Berendzen, S. F. Bowne, H. Frauenfelder, I. E. Iben, T. B. Sauke, E. Shyamsunder, and R. D. Young. Protein states and proteinquakes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82:5000-5004, 1985.
- [9] M. B. Jackson. Molecular and Cellular Biophysics. Cambridge University Press, 2010.
- [10] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force. Physica, 7:284–304, 1940.
- [11] U. Weininger, M. Zeeb, P. Neumann, C. Löw, M. T. Stubbs, G. Lipps, and J. Balbach. Structure-based stability analysis of an extremely stable dimeric dna binding protein from sulfolobus islandicus. *Biochemistry*, 48:10030–10037, 2009.
- [12] K. A. Dill and H. S. Chan. From levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Mol Biol*, 4:10–19, 1997.
- [13] T. R. Jahn and S. E. Radford. The yin and yang of protein folding. FEBS J., 272:5962–5970, 2005.

- [14] K. Henzler-Wildman and D. Kern. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450:964–72, 2007.
- [15] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, and M. Brennan. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, 14:4953–4963, 1975.
- [16] T. Kiefhaber, H. P. Grunert, U. Hahn, and F. X. Schmid. Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease t1 folding. *Biochemistry*, 29:6475–6480, 1990.
- [17] G. Fischer. Über peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerasen und ihre effektoren. *Angew. Chem.*, 106:1479–1501, 1994.
- [18] L. Martino, Y. He, K. L. D. Hands-Taylor, E. R. Valentine, G. Kelly, C. Giancola, and M. R. Conte. The interaction of the escherichia coli protein slyd with nickel ions illuminates the mechanism of regulation of its peptidyl-prolyl isomerase activity. FEBS J., 276:4529-4544, 2009.
- [19] T. Cheng, H. Li, W. Xia, and H. Sun. Multifaceted slyd from helicobacter pylori: implication in [nife] hydrogenase maturation. J. Biol. Inorg. Chem., 17:331–343, 2012.
- [20] R. Suzuki, K. Nagata, F. Yumoto, M. Kawakami, N. Nemoto, M. Furutani, K. Adachi, T. Maruyama, and M. Tanokura. Three-dimensional solution structure of an archaeal fkbp with a dual function of peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone-like activities. J. Mol. Biol., 328:1149-60, 2003.
- [21] W. Graubner, A. Schierhorn, and T. Bruser. DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J. Biol. Chem.*, 282:7116–7124, 2007.
- [22] G. Zoldak, L. Carstensen, C. Scholz, and F. X. Schmid. Consequences of domain insertion on the stability and folding mechanism of a protein. *J. Mol. Biol.*, 386:1138–1152, 2009.
- [23] T. A. Knappe, B. Eckert, P. Schaarschmidt, C. Scholz, and F. X. Schmid. Insertion of a chaperone domain converts fkbp12 into a powerful catalyst of protein folding. J. Mol. Biol., 368:1458–68, 2007.
- [24] R. P. Jakob, G. Zoldak, T. Aumüller, and F. X. Schmid. Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106:20282–7, 2009.
- [25] T. Hesterkamp and B. Bukau. The escherichia coli trigger factor. FEBS Lett., 389:32–4, 1996.
- [26] C. Scholz, G. Stoller, T. Zarnt, G. Fischer, and F. X. Schmid. Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. EMBO J., 16:54–8, 1997.
- [27] G. Kramer, D. Boehringer, N. Ban, and B. Bukau. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat* Struct Mol Biol, 16:589–597, 2009.

- [28] A. V. Ludlam, B. A. Moore, and Z. Xu. The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from vibrio cholerae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101:13436-13441, 2004.
- [29] K. Ramm and A. Plückthun. The periplasmic escherichia coli peptidylprolyl cis,transisomerase fkpa. J. Biol. Chem., 275:17106–17113, 2000.
- [30] K. Ramm and A. Plückthun. High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric e. coli peptidyl-prolyl-isomerase fkpa. J. Mol. Biol., 310:485 – 498, 2001.
- [31] K. Hu, V. Galius, and K. Pervushin. Structural plasticity of peptidyl-prolyl isomerase sfkpa is a key to its chaperone function as revealed by solution nmr. *Biochemistry*, 45:11983–11991, 2006.
- [32] H. M. Webb, L. W. Ruddock, R. J. Marchant, K. Jonas, and P. Klappa. Interaction of the periplasmic peptidylprolylcis-trans isomerase sura with model peptides. J. Biol. Chem., 276:45622–45627, 2001.
- [33] X. Xu, S. Wang, Y.-X. Hu, and D. B. McKay. The periplasmic bacterial molecular chaperone sura adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. J. Mol. Biol., 373:367 381, 2007.
- [34] J. R. Lakowicz and B. R. Masters. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. Springer, 2008.
- [35] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday Soc.*, 9:14–19, 1950.
- [36] S. Doose, H. Neuweiler, and M. Sauer. A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *ChemPhysChem*, 6:2277–2285, 2005.
- [37] S. Doose, H. Neuweiler, H. Barsch, and M. Sauer. Probing polyproline structure and dynamics by photoinduced electron transfer provides evidence for deviations from a regular polyproline type ii helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104:17400–5, 2007.
- [38] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 74:3597–3619, 2003.
- [39] M. Prummer and C. G. Hübner. Single-Molecule Fluorescence: Biophysics, chapter 17. 2009.
- [40] F. Hillger, D. Hanni, D. Nettels, S. Geister, M. Grandin, M. Textor, and B. Schuler. Probing protein-chaperone interactions with single-molecule fluorescence spectroscopy. Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 47:6184-6188, 2008.
- [41] Th. Förster. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. Ann. Phys., 437:55–75, 1948.
- [42] L. Stryer and R. P. Haugland. Energy transfer: a spectroscopic ruler. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 58:719-726, 1967.
- [43] M. Berberan-Santos and M. J. E. Prieto. Monte carlo simulation of orientational effects on direct energy transfer. J. Chem. Phys., 88:6341–6349, 1988.

- [44] S. Kalinin, E. Sisamakis, S. W. Magennis, S. Felekyan, and C. A. M. Seidel. On the origin of broadening of single-molecule fret efficiency distributions beyond shot noise limits. J. Phys. Chem. B, 114:6197–6206, 2010.
- [45] A. Gräslund, R. Rigler, and J. Widengren, editors. Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology Nobel Symposium. Springer Verlag, 2010.
- [46] X. Zhuang and M. Rief. Single-molecule folding. Curr. Opin. Struct. Biol., 13:88 97, 2003.
- [47] T. Hirschfeld. Optical microscopic observation of single small molecules. *Appl. Opt.*, 15:2965–2966, 1976.
- [48] D.-P. Herten. Optische einzelmolekülspektroskopie. einblicke in den nanokosmos. *Chemie in unserer Zeit*, 42:192–199, 2008.
- [49] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, and S. A. Soper. Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Lett.*, 174:553 557, 1990.
- [50] E. L. Elson and D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13:1–27, 1974.
- [51] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29:705–708, 1972.
- [52] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22:169–175, 1993.
- [53] O. Krichevsky and G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. Rep. Prog. Phys., 65:251, 2002.
- [54] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, and S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93:6264– 6268, 1996.
- [55] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita, and M. Yoshida. F1-atpase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell*, 93:1117–1124, 1998.
- [56] R. B. Best, K. A. Merchant, I. V. Gopich, B. Schuler, A. Bax, and W. A. Eaton. Effect of flexibility and cis residues in single-molecule fret studies of polyproline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(4):18964–18969, 2007.
- [57] B. Schuler, E. A. Lipman, and W. A. Eaton. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419:743–747, 2002.
- [58] G. Haran. Single-molecule fluorescence spectroscopy of biomolecular folding. J. Phys.: Condens. Matter, 15:R1291, 2003.
- [59] X. Michalet, S. Weiss, and M. Jäger. Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics. *Chem. Rev.*, 106:1785–1813, 2006.

- [60] T. Torres and M. Levitus. Measuring conformational dynamics: a new fcs-fret approach. J. Phys. Chem. B, 111:7392–400, 2007.
- [61] Y. Santoso, C. M. Joyce, O. Potapova, L. Le Reste, J. Hohlbein, J. P. Torella, N. D. Grindley, and A. N. Kapanidis. Conformational transitions in dna polymerase i revealed by single-molecule fret. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107:715–20, 2010.
- [62] R. H. Webb. Confocal optical microscopy. Rep. Prog. Phys., 59:427, 1996.
- [63] I. Gopich and A. Szabo. Theory of photon statistics in single-molecule f[o-umlaut]rster resonance energy transfer. J. Chem. Phys., 122:014707, 2005.
- [64] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers*, 13:29–61, 1974.
- [65] C. N. Pace. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.*, 131:266 280, 1986.
- [66] M. Kovermann. NMR-spektroskopische Charakterisierung funktioneller Proteinzustände. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011.
- [67] M. Kovermann. Personal Communication, 2012.
- [68] C. N. Pace and G. R. Grimsley. Ribonuclease t1 is stabilized by cation and anion binding. *Biochemistry*, 27:3242–3246, 1988.
- [69] U. Heinemann and W. Saenger. Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease t1-2[prime]-guanylic acid complex: an x-ray study. *Nature*, 299:27–31, 1982.
- [70] T. Kiefhaber, R. Quaas, U. Hahn, and F. X. Schmid. Folding of ribonuclease t1. 1. existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, 29:3053–3061, 1990.
- [71] T. Kiefhaber, R. Quaas, U. Hahn, and F. X. Schmid. Folding of ribonuclease t1. 2. kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry*, 29:3061–3070, 1990.
- [72] U. Heinemann and U. Hahn. Structural and functional studies of ribonuclease T1. 1989.
- [73] M. Oobatake, S. Takahashi, and T. Ooi. Conformational stability of ribonuclease t1. J. Biochem., 86:55-63, 1979.
- [74] M. Mücke and F. X. Schmid. Folding mechanism of ribonuclease t1 in the absence of the disulfide bonds. *Biochemistry*, 33:14608–19, 1994.
- [75] M. Haslbeck, S. Walke, T. Stromer, M. Ehrnsperger, H. E. White, S. Chen, H. R. Saibil, and J. Buchner. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.*, 18:6744–51, 1999.
- [76] Schäfter und Kirchhoff, Hamburg, Deutschland. Singlemode Fiber Cables SMC, 2011.
- [77] Perkin Elmer, Fremont, CA, USA. Single Photon Counting Module, 2004.

- [78] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat, and S. Weiss. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101:8936–8941, 2004.
- [79] B. K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle, and D. C. Lamb. Pulsed interleaved excitation. Biophys. J., 89:3508–22, 2005.
- [80] T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, and S. Weiss. Polarization spectroscopy of single fluorescent molecules. *J. Phys. Chem. B*, 103:6839–6850, 1999.
- [81] Steinbach Kumke Eaton W. Schuler B., Lipman. Polyproline and the 'spectroscopic ruler' revisited with single-molecule fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102:2754–2759, 2005.
- [82] Zeiss Datenblatt: Immersol W (Ausgabe 01/2004).
- [83] The International Association for the Properties of Water and Steam. Release on the refractive index of ordinary water substance as a function of wavelength, temperature and pressure, 1997.
- [84] N. Tokuriki, F. Stricher, J. Schymkowitz, L. Serrano, and D. S. Tawfik. The stability effects of protein mutations appear to be universally distributed. J. Mol. Biol., 369(5):1318 1332, 2007.
- [85] C. Haupt. Enzym-Substrat-Erkennung in katalyierten Proteinfaltungsreaktionen. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009.
- [86] H. S. Chung, J. M. Louis, and W. A. Eaton. Experimental determination of upper bound for transition path times in protein folding from single-molecule photon-byphoton trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009.
- [87] W. Min, G. Luo, B. J. Cherayil, S. C. Kou, and X. S. Xie. Observation of a power-law memory kernel for fluctuations within a single protein molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 94:198302, 2005.
- [88] H. Chen, E. Rhoades, J. S. Butler, S. N. Loh, and W. W. Webb. Dynamics of equilibrium structural fluctuations of apomyoglobin measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104:10459-64, 2007.
- [89] S. Doose, H. Neuweiler, and M. Sauer. Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: a reporter for conformational dynamics of macromolecules. *Chemphyschem*, 10:1389–98, 2009.
- [90] H. Neubauer, N. Gaiko, S. Berger, J. Schaffer, C. Eggeling, J. Tuma, L. Verdier, C. A. M. Seidel, C. Griesinger, and A. Volkmer. Orientational and dynamical heterogeneity of rhodamine 6g terminally attached to a dna helix revealed by nmr and single-molecule fluorescence spectroscopy. J. Am. Chem. Soc., 129:12746-12755, 2007.
- [91] A. Iqbal, S. Arslan, B. Okumus, T. J. Wilson, G. Giraud, D. G. Norman, T. Ha, and D. M. J. Lilley. Orientation dependence in fluorescent energy transfer between cy3 and cy5 terminally attached to double-stranded nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A., 105:11176-11181, 2008.

- [92] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler. Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Chem. Phys.*, 250:171– 186, 1999.
- [93] G. Lipari and A. Szabo. Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic-resonance relaxation in macromolecules and membranes. *Biophys. J.*, 30:489–506, 1980.
- [94] M. Kovermann, R. Zierold, C. Haupt, C. Low, and J. Balbach. NMR relaxation unravels interdomain crosstalk of the two domain prolyl isomerase and chaperone SlyD. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814:873–881, 2011.
- [95] H. Hofmann, R. P. Golbik, M. Ott, C. G. Hübner, and R. Ulbrich-Hofmann. Coulomb forces control the density of the collapsed unfolded state of barstar. J. Mol. Biol., 376:597 – 605, 2008.
- [96] X. Kong, E. Nir, K. Hamadani, and S. Weiss. Photobleaching pathways in single-molecule fret experiments. J. Am. Chem. Soc., 129(15):4643-4654, 2007.
- [97] T. Ha and J. Xu. Photodestruction intermediates probed by an adjacent reporter molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 90:223002, 2003.
- [98] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, and C. A. Seidel. Analysis of photobleaching in single-molecule multicolor excitation and forster resonance energy transfer measurements. J. Phys. Chem. A, 110:2979-95, 2006.
- [99] I. V. Gopich and A. Szabo. Single-molecule fret with diffusion and conformational dynamics. J. Phys. Chem. B, 111:12925–12932, 2007.
- [100] M. Antonik, S. Felekyan, A. Gaiduk, and C. A. M. Seidel. Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. J. Phys. Chem. B, 110:6970–6978, 2006.
- [101] D. Nettels, A. Hoffmann, and B. Schuler. Unfolded protein and peptide dynamics investigated with single-molecule fret and correlation spectroscopy from picoseconds to seconds. J. Phys. Chem. B, 112:6137–6146, 2008.
- [102] S. Brinkers, H. R. C. Dietrich, R. H. de Groote, T. Y. Young, and B. Rieger. The persistence length of double stranded dna determined using dark field tethered particle motion. J. Chem. Phys., 130:215105, 2009.
- [103] S. F. Göthel and M. A. Marahiel. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*, 55:423–36, 1999.
- [104] C. B. Kang, Y. Hong, S. Dhe-Paganon, and H. S. Yoon. Fkbp family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals*, 16:318–25, 2008.
- [105] B. Vollmert and J.-X. Huang. Coil properties of ring-shaped polymer chains, theoretical calculation and experimental determination of $\eta_{\rm ring}/\eta_{\rm open}$. Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications, 1:333–339, 1980.
- [106] E. P. O'Brien, G. Morrison, B. R. Brooks, and D. Thirumalai. How accurate are polymer models in the analysis of förster resonance energy transfer experiments on proteins? J. Chem. Phys., 130:124903, 2009.

- [107] S. R. K. Ainavarapu, J. Brujic, H. H. Huang, A. P. Wiita, H. Lu, L. Li, K. A. Walther, M. Carrion-Vazquez, H. Li, and J. M. Fernandez. Contour length and refolding rate of a small protein controlled by engineered disulfide bonds. *Biophys. J.*, 92:225 – 233, 2007.
- [108] G. Ziv, D. Thirumalai, and G. Haran. Collapse transition in proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11:83–93, 2009.
- [109] P. G. de Gennes. Scaling concepts in polymer physics. Cornell University Press, 1979.
- [110] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 68:1106-1122, 1949.
- [111] D. W. Bolen and Marcelo M. Santoro. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. incorporation of .delta.g.degree.n-u values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, 27:8069–8074, 1988.
- [112] E. Fischer. Ber. d. Deut. Chem. Ges., 27:3222, 1894.
- [113] D. E. Koshland. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 44:98–104, 1958.
- [114] R. H. Austin, K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, and I. C. Gunsalus. Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry*, 14:5355–5373, 1975.
- [115] E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay, and D. Kern. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, 438:117–121, 2005.
- [116] M. Wolf-Watz, V. Thai, K. Henzler-Wildman, G. Hadjipavlou, E. Z. Eisenmesser, and D. Kern. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. Nat. Struct. Mol. Biol., 11:945–949, 2004.
- [117] G. Bhabha, J. Lee, D. C. Ekiert, J. Gam, I. A. Wilson, H. J. Dyson, S. J. Benkovic, and P. E. Wright. A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis. *Science*, 332:234–238, 2011.
- [118] L. Edman, Z. Földes-Papp, S. Wennmalm, and R. Rigler. The fluctuating enzyme: a single molecule approach. *Chem. Phys.*, 247:11 22, 1999.
- [119] Y. Chen, D. Hu, E. R. Vorpagel, and H. P. Lu. Probing single-molecule t4 lysozy-me conformational dynamics by intramolecular fluorescence energy transfer. J. Phys. Chem. B, 107:7947–7956, 2003.
- [120] J. Alegre-Cebollada, R. Perez-Jimenez, P. Kosuri, and J. M. Fernandez. Single-molecule force spectroscopy approach to enzyme catalysis. *J. Biol. Chem.*, 285:18961–6, 2010.
- [121] E. A. Abbondanzieri, W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick, and S. M. Block. Direct observation of base-pair stepping by rna polymerase. *Nature*, 438:460–5, 2005.
- [122] Y. R. Chemla, K. Aathavan, J. Michaelis, S. Grimes, P. J. Jardine, D. L. Anderson, and C. Bustamante. Mechanism of force generation of a viral dna packaging motor. Cell, 122:683–92, 2005.

- [123] J. D. McGeagh, K. E. Ranaghan, and A. J. Mulholland. Protein dynamics and enzyme catalysis: Insights from simulations. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814:1077 1092, 2011.
- [124] I. Schlichting, J. Berendzen, Ke. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, R. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko, and S. G. Sligar. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science*, 287:1615–1622, 2000.
- [125] M.J.E. Sternberg, D.E.P. Grace, and D.C. Phillips. Dynamic information from protein crystallography: An analysis of temperature factors from refinement of the hen egg-white lysozyme structure. *J. Mol. Biol.*, 130(3):231 253, 1979.
- [126] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C. A. M. Seidel. Photobleaching of fluore-scent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem.*, 70:2651–2659, 1998.
- [127] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. J. Phys. Chem., 99:13368– 13379, 1995.
- [128] J. Widengren and P. Schwille. Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. J. Phys. Chem. A, 104:6416-6428, 2000.
- [129] K. Chattopadhyay, E. L. Elson, and C. Frieden. The kinetics of conformational fluctuations in an unfolded protein measured by fluorescence methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102:2385–9, 2005.
- [130] H. Neuweiler, C. M. Johnson, and A. R. Fersht. Direct observation of ultrafast folding and denatured state dynamics in single protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106:18569–74, 2009.
- [131] S. Hammes-Schiffer and S. J. Benkovic. Relating protein motion to catalysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 75:519–541, 2006.
- [132] J. A. Hanson, K. Duderstadt, L. P. Watkins, S. Bhattacharyya, J. Brokaw, J. W. Chu, and H. Yang. Illuminating the mechanistic roles of enzyme conformational dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104:18055–60, 2007.
- [133] G. Zoldak and F. X. Schmid. Cooperation of the prolyl isomerase and chaperone activities of the protein folding catalyst slyd. J. Mol. Biol., 406:176 194, 2011.
- [134] P. Hänggi, P. Talkner, and M. Borkovec. Reaction-rate theory: fifty years after kramers. Rev. Mod. Phys., 62:251–341, 1990.
- [135] S. T. Park, R. A. Aldape, O. Futer, M. T. DeCenzo, and D. J. Livingston. Ppiase catalysis by human fk506-binding protein proceeds through a conformational twist mechanism. J. Biol. Chem., 267:3316–3324, 1992.
- [136] C. B. Anfinsen. The influences of three-dimensional configuration on the chemical reactivity and stability of proteins. J. Polym. Sci., 49:31–49, 1961.
- [137] C. M. Dobson. Protein folding and misfolding. Nature, 426:884–90, 2003.

- [138] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by afm. Science, 276:1109–1112, 1997.
- [139] M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante. Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 276:1112–1116, 1997.
- [140] Y. Jia, D. S. Talaga, W. L. Lau, H. S. M. Lu, W. F. DeGrado, and R. M. Hochstrasser. Folding dynamics of single gcn-4 peptides by fluorescence resonant energy transfer confocal microscopy. *Chem. Phys.*, 247:69 – 83, 1999.
- [141] D. S. Talaga, W. L. Lau, H. Roder, J. Tang, Y. Jia, W. F. DeGrado, and R. M. Hochstrasser. Dynamics and folding of single two-stranded coiled-coil peptides studied by fluorescent energy transfer confocal microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97:13021–13026, 2000.
- [142] A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Beligere, M. Dahan, A. B. Martin, D. S. Chemla, P. E. Dawson, P. G. Schultz, and S. Weiss. Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97:5179-5184, 2000.
- [143] E. Sherman and G. Haran. Coil globule transition in the denatured state of a small protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103:11539–11543, 2006.
- [144] E. V. Kuzmenkina, C. D. Heyes, and G. U. Nienhaus. Single-molecule fret study of denaturant induced unfolding of rnase h. J. Mol. Biol., 357:313 324, 2006.
- [145] E. Rhoades, E. Gussakovsky, and G. Haran. Watching proteins fold one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100:3197–3202, 2003.
- [146] E. Rhoades, M. Cohen, B. Schuler, and G. Haran. Two-state folding observed in individual protein molecules. J. Am. Chem. Soc., 126:14686–14687, 2004.
- [147] E. A. Lipman, B. Schuler, O. Bakajin, and W. A. Eaton. Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science*, 301:1233–1235, 2003.
- [148] A. Orte, T. D. Craggs, S. S. White, S. E. Jackson, and D. Klenerman. Evidence of an intermediate and parallel pathways in protein unfolding from single-molecule fluorescence. J. Am. Chem. Soc., 130:7898–7907, 2008.
- [149] L. Guo, P. Chowdhury, J. M. Glasscock, and F. Gai. Denaturant-induced expansion and compaction of a multi-domain protein: Igg. J. Mol. Biol., 384:1029 1036, 2008.
- [150] A. Hoffmann, A. Kane, D. Nettels, D. E. Hertzog, P. Baumgartel, J. Lengefeld, G. Reichardt, D. A. Horsley, R. Seckler, O. Bakajin, and B. Schuler. Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104:105-110, 2007.
- [151] H.-X. Zhou. Polymer models of protein stability, folding, and interactions. *Biochemistry*, 43:2141–2154, 2004.

- [152] C. Camilloni, L. Sutto, D. Provasi, G. Tiana, and R. A. Broglia. Early events in protein folding: Is there something more than hydrophobic burst? *Protein Sci.*, 17(8):1424–1433, 2008.
- [153] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, R. O. Dror, and D. E. Shaw. How fast-folding proteins fold. *Science*, 334(6055):517–520, 2011.
- [154] L. Lutter. Einzelmolekülspektroskopische untersuchungen zur molekularen dynamik des in liposomen eingekapselten proteins slyd. Master's thesis, Universität zu Lübeck, 2010.
- [155] M. Ott. Konformationsänderungen und enzymatische Aktivität am einzelnen Molekül. PhD thesis, Universität zu Lübeck, 2008.
- [156] T. Oshima and K. Imahori. Description of thermus thermophilus (yoshida and oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a japanese thermal spa. Int. J. Syst. Bacteriol., 24:102–112, 1974.

C. Abkürzungsverzeichnis

TS

TetraSpeck

A647N Atto 647N A655 Atto 655 Alexa Fluor 488 AF488 ALEX engl. alternating laser excitation APD Avalanche-Photodioden **DMSO** Dimethylsulfoxid DNA engl. Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure doppelsträngige DNA dsDNADTTDithiothreitol **EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure FAMS engl. fluorescence aided molecule sorting, durch Fluoreszenz gestütztes Sortieren von Molekülen FCS engl. fluorescence correlation spectroscopy, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie **FKBP** FK506 bindendes Protein FRET Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer GdHCl Guanidinhydrochlorid ICengl. internal conversion, Interne Konversion $_{\mathrm{IF}}$ engl. insert in flap, im Bogen eingefügt ISCengl. intersystem crossing, Interkombination IRFengl. instrument response function, Instrumentantwortfunktion **NMR** engl. nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz MBengl. molecular brightness, Molekulare Helligkeit pdb engl. protein data bank, Proteindatenbank PET Photoinduzierter Elektronentransfer PIE engl. pulse interleaved excitation PMMA Polymethylmethacrylat POE engl. pulse overlaid excitation rISCengl. reverse intersystem crossing, reverse Interkombination PSFPunktspreizfunktion RMS engl. root mean square, Wurzel aus dem mittleren Quadrat RCM-T1 Ribonuklease T1 SVStöchiometrisches Verhältnis TAT engl. Twin-Arginine Translocation, Twin-Arginin-Transport TCSPC engl. time correlated single photon counting, zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung TFE Trifluoroethanol Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TTTR engl. time-tagged-time-resolved, Modus zur Speicherung von Einzelphotonendaten

mit Mikro- und Makrozeiten

WLC engl. Wormlike Chain, wurmähnliches Modell

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Modellbild einer Energielandschaft	6
2.2.	Dreidimensionale Kristallstruktur des Proteins Tt SlyD und Prolyl-Bindung .	8
2.3.	Vergleich der SlyD-Strukturen aus verschiedenen Organismen	9
2.4.	Jablonski-Diagramm	10
2.5.	Vereinfachtes Jablonski-Diagramm für FRET	14
2.6.	Verschiedene Einflüsse auf die Energietransfereffizienz	16
2.7.	Ratenschema zur Berechnung der Energietransfereffizienz	17
2.8.	Darstellung der Punktspreizfunktion an einer Lochblende	21
2.9.	Einfluss der Pinhole-Lochblende	22
2.10.	Konfokales Prinzip	24
2.11.	Signal-zu-Rausch-Verhältnis	26
2.12.	Prinzip der Einzelmolekül-FRET-Experimente	27
2.13.	Energietransfereffizienz und Schrotrauschen der Photonen	28
2.14.	Beispiel einer Autokorrelationskurve	31
3.1.	Spektren und Überlappungsintegral von AF488 und A647N	34
3.2.	Thioether-Bindung	35
3.3.	Kontrolle des Markierungsverfahrens	36
3.4.	Schematische Darstellung der Messkammern	37
3.5.	Messapparatur	39
3.6.	Verwendete Filter und Korrekturfaktor	42
3.7.	Prinzip: POE-Schema	44
3.8.	Sortierung der Moleküle	46
3.9.	Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer	47
3.10.	Einfluss der Instrumentenantwortfunktion	48
3.11.	Bestimmung des zeitabhängigen Anisotropiezerfalls	49
4.1.	Energietransferhistogramme verschiedener Referenzproben	55
4.2.	Rasterbild entlang der optischen Achse von TS-Kugeln	56
4.3.	Einfluss der Pinhole-Lochblende auf das stöchiometrische Verhältnis	59
4.4.	Limitierung durch Schrotrauschen	60
4.5.	Einfluss des Immersionsmediums	62
4.6.	Einfluss des Korrekturrings	63
4.7.	Korrekturring bei Denaturierungsmessungen	64
4.8.	Bestimmung der Enzymaktivität von Tt SlyD	65
4.9.	Energietransfereffizienz und Stöchiometrie von $Tt\mathrm{SlyD}$ D82 $\mathrm{C/T139C}$	70
4.10.	Variation der Summen- und Akzeptorschwelle	72
	Einfluss des Zeitfensters auf die Energietransfereffizienz	73
4.12.	Einfluss der Fokusgröße	73

4.13.	Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren	76
4.14.	Photophysik von AF488 und A647N: Autokorrelation	78
	Photophysik von AF488 und A647N: Leistungsabhängigkeit	79
	2D-Histogramm für Donor-Anisotropie und Energietransfereffizienz	82
	Einfluss des Probenpuffers auf die Rotationsfreiheit des Donorfarbstoffes	83
	Prinzip: Analyse auf Photobleichen	84
	Korrelationsanalyse auf Photobleichen	87
	Photobleichen nach Anwendung der Akzeptorschwelle	88
	Unspezifische Bindung der Farbstoffe: Autokorrelation	89
	Ultrazentrifugation von A647N	90
	A655 als Alternative zum Akzeptor A647N	91
	Variante D82C/E137C von Tt SlyD	92
	Analyse des FRET-Experimentes auf interne Dynamik	93
	Amplitude von $G_{\mathrm{DD}}/G_{\mathrm{DA}}$ nach dem Modell von Torres-Levitus	95
	Normierung von $G_{\mathrm{DD}}/G_{\mathrm{DA}}$	96
	Prinzip: Dynamik-Zeitskala	97
	Simulation: Einfluss der internen Dynamik auf die Energietransfereffizienz	98
	Unterschied zwischen Simulation und Modell nach Photonenauswahl	99
	Simulation: Variation der FRET-Effizienzen und Austauschraten	101
	Experiment: Korrelations analyse auf interne Dynamik von Tt SlyD	101
	Experiment: Variation der Zeitauflösung	104
	Experiment: Variation der Schwellwerte	105
		106
	Drei-Zustands-Modell in der Energietransfereffizienz-Verteilung	
		108
	Wechselwirkung mit dem TAT-Peptid	
		113
		114
	Analyse der internen Dynamik von Tt SlyD P68C/E111C	116
	Kristallstruktur des Proteins Tt SlyD und Markierung beider Varianten	
	Entfaltung der Variante D82C/T139C von Tt SlyD	
	Entfaltung der Variante P68C/E111C von TtSlyD	
	Ergebnisse aus der Entfaltung der Varianten von Tt SlyD	
	Korrelationsanalyse auf interne Dynamik unter denaturierenden Bedingungen	128
	Echtzeit-Rückfaltung	129
1.11.	Denozero redexiarding	120
5.1.	Vorgeschlagenes Modell für die Funktionsweise von Tt SlyD	136
5.2.	Hypothetische Faltungswege von Tt SlyD	143
	Absorptionsspektrum der dsDNA	
	Brechungsindex von Immersol W	147
	Einfluss von Photobleichen des Akzeptors	148
	Histogramm über Zählraten	148
	Simulation: Dynamik mit unterschiedlichen Einzelraten	149
	Simulation: Einfluss der Konzentration	150
	Simulation: Einfluss des Unterschieds in der Energietransfereffizienz	
ΛΩ	Einfluss der Auswahlschwallen	151

A.9. Modell des zeitabhängigen FRET-Verlaufs eines einzelnen Moleküls	152
A.10.Einfluss der Bindungspartner auf die Farbstoffe	153
A.11.Entfaltung der Referenzprobe dsDNA	153
A.12. Vergleich der Energietransfereffizienz im Ensemble mit SMS-Ergebnissen	154
A.13.Fluoreszenzslebensdauer der Farbstoffe unter denaturierenden Bedingungen	154
A.14.NMR-Spektrum von Tt SlyD P68C/E111C	155
A.15.Einfluss von GdHCl auf das Photobleichen	155

Publikationen

Kahra, D., Kovermann, M., Löw, C., Hirschfeld, V., Haupt, C., Balbach, J., Hübner, C. G. (2011): Conformational plasticity and dynamics in the generic protein folding catalyst SlyD unraveled by single-molecule FRET. *J. Mol. Biol.*, 411:781–790.

Danksagung

Große Projekte sind selten ganz allein zu stemmen. Diese Dissertationsschrift war ein solches Projekt für mich. Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Christian Hübner, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Er hat mich für die Idee der Einzelmolekülspektroskopie begeistert. Durch einen Themenwechsel während meiner Promotionszeit wurde mir ermöglicht, meinen Fokus auf die Physik der Proteine zu richten. In diese spannende und weit gefächerte Thematik habe ich mich Schritt für Schritt durch Diskussionen, Erklärungen und Vorträge mit, von und bei Christian vertiefen können.

Michael Kovermann möchte ich für unsere Kooperation danken. Durch seine Anregungen kam es überhaupt erst zu dem Projekt mit dem Zwei-Domänen-Protein TtSlyD. Damit war es aber nicht getan. Ein reger Austausch über Messergebnisse und daraus resultierende neue Ideen und Interpretationsmöglichkeiten hat das gemeinsame Projekt über die letzten dreieinhalb Jahre immer wieder motiviert.

Bei Christian Löw möchte ich mich für seine unwahrscheinlich schnelle und effiziente Protein"Produktion" bedanken. Seine Proben, verschiedene Varianten von TtSlyD, stehen schließlich
im Zentrum meiner Arbeit. Aber Christian gilt auch mein Dank für sein stetes Interesse
an meinen Ergebnissen. Mit seinen Interpretationen und Argumentationen aus Sicht eines
Biochemikers hat er meine Arbeit bereichert.

Caroline Haupt möchte ich für zahlreiche Hilfestellungen bei biochemischen Fragen, aber auch für die unterstützenden Messungen an TtSlyD und das Bereitstellen der Proben für die Experimente mit Bindungspartnern von TtSlyD danken.

Tobias Aumüller danke ich für die Synthese und das Bereitstellen der Prolin-Proben, die ich für Vergleichsexperimente nutzen konnte.

Johannes Hohlbein möchte ich für die Simulationsroutinen danken. Erst durch Vergleich mit simulierten Daten konnten viele meiner Messergebnisse analysiert werden.

Maria Ott gilt mein Dank, weil mit ihrer Dissertationsschrift bereits viele Vorarbeiten absolviert waren und ein umfangreiches Paket zur Datenanalyse bereitstand.

Meiner Kollegin, Verena Hirschfeld, danke ich für ihre kompetente Unterstützung bei dem Markierungsprozess der Proteinvarianten, aber auch für ihre Hilfestellungen bei meinen ersten Protein-Messungen.

Danke auch an Verena Hirschfeld und Michael Kovermann für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen konstruktiven Hinweise.

Bei meinen Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Physik, möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken. Dazu zähle ich natürlich die vielen Diskussionen quer über den Schreibtisch und das Weitergeben von Tricks und Kniffs in unserer Auswerte-Software. Aber ich möchte auch den nichtwissenschaftlichen Teil des Arbeitstages nicht unerwähnt lassen. Ich bin fest davon überzeugt, dass gemeinsame Kaffeepausen und das Genießen von selbst gebackenem Kuchen genauso wie politische Diskussionen in der Mittagsrunde die wissenschaftliche Leistung steigern. Ich danke meine Kollegen auch, dass sie mir durch ihre Akzeptanz und ihre herzliche Begrüßung einen scheinbar nahtlosen Wiedereinstieg nach meiner Elternzeit geschaffen haben.

Schließlich möchte ich meinen ganz persönlichen Dank an meine Familie und meine Freunde aussprechen. Sie haben mir stets den Rücken gestärkt und mich bei dem unterstützt, was ich mir vorgenommen habe. Vor allem haben sie mir aber auch immer das Leben außerhalb des Labors gezeigt und so bestimmt über die eine oder andere frustrierende Phase hinweg geholfen.

Zum Schluss möchte ich meiner eigenen kleinen Familie danken. Maja und Michael, ihr wart und seid ohne Zweifel das wichtigste Ergebnis meiner Promotionszeit.