



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Einzelmolekül-Fluoreszenzuntersuchungen
der dynamischen Struktur und Stöchiometrie
des über L27-Domänen gebildeten Polaritätskomplexes
Sdt/DPATJ/DLin-7
aus *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Renner
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juni 2013

Aus dem Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie II
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. D. Claus A. M. Seidel

Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	14
1.1	Einleitung	14
1.2	Zielsetzung	19
2	Technische Grundlagen	20
2.1	Fluoreszenz	20
2.2	Fluoreszenzlebensdauer	21
2.3	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	22
2.4	Anisotropie	25
2.5	Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)	27
2.6	Homologiemodellierung	29
2.7	Accessible Volume (AV) Simulation	30
3	Material	32
3.1	Technische Geräte	32
3.2	Chemikalien	33
3.3	Antibiotika	33
3.4	Enzyme & Proteine	34
3.5	Lösungen	34
3.6	Kits	34
3.7	Filtermaterial	35
3.8	Säulen	35
3.9	Plasmide	35
3.10	Bakterienstämme	36
3.11	Oligonukleotide	36
3.11.1	Primer für <i>DLin-7</i> -Konstrukte mit verschiedenen Löslichkeitstags	36
3.11.2	Mutageneseprimer	38
3.12	Farbstoffe	39
4	Methoden	42
4.1	Molekularbiologische Methoden	42

4.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
4.1.2	Präparation von Plasmid-DNA	44
4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
4.1.4	Elution & Konzentrationsbestimmung von DNA aus Agarosegelen	44
4.1.5	Restriktion und Ligation von DNA.....	44
4.1.6	DNA-Sequenzierung.....	45
4.1.7	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	45
4.2	Proteinbiochemische Methoden	46
4.2.1	Induzierte Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	46
4.2.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
4.2.3	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	48
4.2.4	Immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie (IMAC).....	48
4.2.5	Dialyse.....	49
4.2.6	Gelfiltrations- bzw. Größenausschlusschromatographie (GFC).....	49
4.2.7	Ionenaustauschchromatographie.....	49
4.2.8	Proteinaufkonzentrierung.....	50
4.2.9	Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	50
4.2.10	Abschätzung des Markierungsgrades	52
4.3	Spektroskopische Methoden.....	54
4.3.1	Absorptionsspektren.....	54
4.3.2	Fluoreszenzspektren	54
4.3.3	Multiparameterfluoreszenzdetektion (MFD)	54
4.3.4	SMD-Auswertung.....	56
4.3.5	Statische & dynamische FRET-Linien im Einzelmolekülexperiment	58
4.3.5.1	Statische FRET-Linien ohne Dynamik.....	58
4.3.5.2	FRET-Linien mit Dynamik zwischen zwei Zuständen	58
4.3.5.3	FRET-Linien mit Dynamik zwischen multiplen Zuständen	59
4.3.6	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (eTCSPC)	60
5	Durchführung, Ergebnisse & Diskussion	62

5.1	<i>D</i>Lin-7-Varianten mit C-terminalen Poly-Histidin-Tag	62
5.1.1	Durchführung	62
5.1.1.1	Design eines FRET System für Einzelmolekülstudien	62
5.1.1.2	Mutagenese und transgene Konstrukte	62
5.1.1.3	Pulldown-Assay	64
5.1.1.4	Expression und Proteinaufreinigung der His- <i>D</i> Lin-7- und His-Sdt-Varianten	65
5.1.1.5	Expression und Proteinaufreinigung der Strep/His-DPATJ-Varianten	65
5.1.1.6	Fluorophormarkierung der <i>D</i> Lin-7-Varianten	65
5.1.1.7	Einzelmolekül-Multiparameterfluoreszenzdetektion (smMFD)	66
5.1.2	Ergebnisse	68
5.1.2.1	Assay-Bedingungen	68
5.1.2.2	SmMFD-Messungen mit dem LS-Komplex	69
5.1.2.3	Affinitätsmessungen durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	72
5.1.2.4	Quantitative FRET-Analyse durch die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA)	73
5.1.2.5	Zugaben von weiteren Partnern des L/S-Komplexes	76
5.1.3	Diskussion	78
5.1.3.1	Heterogenität des <i>D</i> Lin-7-Komplexes	78
5.1.3.2	Positive Bindungskoopertivität	79
5.1.3.3	Konformative Dynamik und strukturelle Heterogenität von <i>D</i> Lin-7	79
5.2	<i>D</i>Lin-7-Konstrukte mit verschiedenen Löslichkeitstags	82
5.2.1	Durchführung	82
5.2.1.1	Klonierung der Fusionsproteine zur Verbesserung der Löslichkeit	82
5.2.2	Ergebnisse	83
5.2.2.1	Expression und Lysis	83
5.2.2.2	Native Batch-Aufreinigung des Nus- und malE-Konstruktes	84
5.2.2.3	Aufreinigung des malE-Konstruktes mittels ÄKTAprime TM plus und HisTrap TM FF Säule	85
5.2.2.4	Aufreinigung des malE-Konstruktes mittels ÄKTAprime TM plus und MBPTrap HP Säule	86
5.2.2.5	Aufreinigung des malE-Konstruktes mittels ÄKTAprime TM plus und Superdex 200 Säule	87
5.2.2.6	Expression und Aufreinigung des malE-His-Konstruktes mit vollständigem <i>D</i> Lin-7	88

5.2.3	Diskussion	89
5.3	<i>D</i>Lin-7-Varianten mit N-terminalen Poly-Histidin-Tag.....	90
5.3.1	Durchführung.....	90
5.3.1.1	Umklonierung in pET-22b(+)	90
5.3.1.2	Expression der <i>D</i> Lin-7-His-Varianten.....	92
5.3.1.3	Denaturierende Aufreinigung mittels ÄKTAprime™ plus und HisTrap™ FF Säule	92
5.3.1.4	Wahl des Donor- und Akzeptorfarbstoffes.....	92
5.3.1.5	Einzelmolekül-Multiparameterfluoreszenzdetektion (sMFD)	92
5.3.2	Ergebnisse.....	93
5.3.2.1	Aufreinigung der <i>D</i> Lin-7-His-Varianten	93
5.3.2.1.1	Native Aufreinigung.....	93
5.3.2.1.2	Denaturierende Aufreinigung.....	94
5.3.2.1.3	Farbstoffmarkierung der <i>D</i> Lin-7-S72C-Einzelvarianten mit A488 und A647	95
5.3.2.1.4	Farbstoffmarkierung von <i>D</i> Lin-7-Doppelvarianten mit A488 und A647	96
5.3.2.2	SMD-Optimierung mit A647 als Akzeptor und A488 als Donor.....	99
5.3.2.2.1	6 M GdHCl vs. 6 M Harnstoff	99
5.3.2.2.2	Variation der Anregungsleistung am Objektiv.....	100
5.3.2.2.3	Trolox.....	101
5.3.2.3	Farbstoffmarkierung mit optionalen Donor- & Akzeptorfluorophoren	102
5.3.2.3.1	SMD-Messungen: <i>D</i> Lin-7-V69C-K98C mit A647 als Akzeptor und Bodipy FL als Donor	105
5.3.2.3.2	SMD-Messungen: <i>D</i> Lin-7-V69C-K98C mit A647 als Akzeptor und A488 als Donor	107
5.3.2.4	Affinitätsmessungen mittels FCS	109
5.3.2.5	SMD-Messungen mit A647 als Akzeptor und Bodipy FL als Donor	111
5.3.2.5.1	Intra-Domänen-FRET	112
5.3.2.5.1.1	<i>D</i> Lin-7-S27C-S72C	112
5.3.2.5.1.2	<i>D</i> Lin-7-T33C-V69C.....	113
5.3.2.5.1.3	<i>D</i> Lin-7-S44C-S72C	114
5.3.2.5.2	Inter-Domänen-FRET	115
5.3.2.5.2.1	<i>D</i> Lin-7-S27C-S115C	115
5.3.2.5.2.2	<i>D</i> Lin-7-S27C-A163C.....	116

5.3.2.5.2.3	<i>D</i> Lin-7-T33C-K98C	117
5.3.2.5.2.4	<i>D</i> Lin-7-S44C-S115C	118
5.3.2.5.2.5	<i>D</i> Lin-7-V69C-K98C.....	119
5.3.2.5.2.6	<i>D</i> Lin-7-S72C-A163C.....	120
5.3.2.5.3	<i>D</i> Lin-7-S27C-S115C mit BSA.....	121
5.3.2.5.4	<i>D</i> Lin-7-S27C-S115C mit modifizierten FRET-Linien.....	122
5.3.2.5.5	<i>D</i> Lin-7-S27C-S115C fFCS-Analyse.....	124
5.3.2.6	AV-Simulation.....	127
5.3.2.7	eTCSPC- & seTCSPC-Ergebnisse	129
5.3.2.7.1	Formaler Fit der eTCSPC-Daten	129
5.3.2.7.2	Globaler Fit der eTCSPC-Daten und Berechnung der Spezies-gemittelten $\langle \tau_{D(A)} \rangle_x$	130
5.3.2.7.3	Globaler Fit der eTCSPC-Daten und Berechnung der Fluoreszenz-gemittelten $\langle \tau_{D(A)} \rangle_f$	131
5.3.2.7.4	Vergleich der Fluoreszenzlebenszeiten aus seTCSPC- und eTCSPC.....	132
5.3.3	Diskussion	133
5.3.3.1	L27-Domäne	133
5.3.3.2	Vergleich der Intra-Domänen-FRET-Messungen.....	135
5.3.3.3	Vergleich der Inter-Domänen-FRET-Messungen.....	136
5.3.3.4	Strukturmodelle von <i>D</i> Lin-7 im gebundenen und ungebundenen Zustand.....	140
6	Zusammenfassung	147
6.1	Molekularbiologische Aspekte	147
6.2	Ergebnisse der C-terminalen Poly-Histidin-Tag-Varianten	147
6.3	Bindungsverhalten mit Sdt-L (C- und N-terminalen Poly-Histidin-Tag-Varianten).....	148
6.4	Ergebnisse der N-terminalen Poly-Histidin-Tag-Varianten.....	148
6.5	Vergleich der Ergebnisse mit dem Homologiemodell	149
7	Summary	150
7.1	Molecular and biological aspects	150
7.2	Results of the C-terminal poly-histidine-tag-variants.....	150
7.3	Binding behavior with Sdt-L (C- and N-terminal poly-histidine-tag-variants)	151
7.4	Results of the N-terminal poly-histidine-tag-variants	151
7.5	Comparison of the results with the homology model.....	152

8	Zusammenfassung (einseitig)	153
9	Danksagung	154
10	Literaturverzeichnis	155
11	Anhang	160

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Crb/Sdt Komplex und <i>D</i> Lin-7.....	15
Abb. 2 Jablonski-Diagramm.....	20
Abb. 3 Überlappungsintegral J des FRET-Paares Alexa 488 und Cy5.....	22
Abb. 4 Die Transfereffizienz E als Funktion des Donor-Akzeptor-Abstandes R_{DA}	23
Abb. 5 Simulierter Verlauf der Fluoreszenzkorrelationskurve.....	27
Abb. 6 Simulierte <i>D</i> Lin-7-Struktur.....	29
Abb. 7 Schematisch Skizze für die AV-Parameter (A) und Anwendung am Beispiel von Atto 488 (B) .	30
Abb. 8 3D-Modell der <i>D</i> Lin-7-T33C-V69C-Variante mit Donor- und Akzeptorfarbstoff.....	31
Abb. 9 BODIPY® FL N-(2-Aminoethyl)) Maleimid (Herstellerangaben).....	39
Abb. 10 Alexa Fluor® 488 C5 Maleimid (Herstellerangaben).....	39
Abb. 11 Atto 488 Maleimid.....	40
Abb. 12 Alexa Fluor® 594 C5 Maleimid.....	40
Abb. 13 Alexa Fluor® 647 C2 Maleimid.....	41
Abb. 14 Atto 647 N Maleimid.....	41
Abb. 15 Proteingrößenstandard.....	47
Abb. 16 Chemische Reaktion eines Thiols mit einem Maleimid.....	50
Abb. 17 Flussdiagramm für eine Proteinfarbstoffmarkierung.....	51
Abb. 18 Absorptionsspektrum von <i>D</i> Lin-7-S72C-S115C markiert mit A488 und A647.....	52
Abb. 19 Experimenteller Aufbau für Einzelmolekülmessungen.....	54
Abb. 20 Bildung eines 2D-Histogramms aus zwei 1D-Histogrammen.....	57
Abb. 21 Pulldown-Assay von <i>D</i> Lin-7-V69C-K98C mit Sdt-L.....	64
Abb. 22 2D-Histogramm von zwei Doppelmutanten mit und ohne Sdt-L.....	69
Abb. 23 2D-Histogramm von zwei Doppelvarianten mit und ohne Sdt-L.....	71
Abb. 24 PDA-, FCS- und K_D -Analyse.....	72
Abb. 25 PDA Analyse von D-only, DA und DA plus Sdt-L.....	74
Abb. 26 2D Histogramm <i>D</i> Lin-7 mit verschiedenen Bindungspartnern.....	76
Abb. 27 2D Histogramm Inter-molekularer FRET.....	77
Abb. 28 SDS-PAGE des nativen Batch des Nus-V69C- <i>D</i> Lin-7 und V69C-male- <i>D</i> Lin-7-Konstruktes.....	84
Abb. 29 His-Tag-Aufreinigung von <i>D</i> Lin-7-V69C-male-His.....	85
Abb. 30 SDS-PAGE der His-Tag-Aufreinigung von <i>D</i> Lin-7-V69C-male-His.....	85
Abb. 31 Maltose-Aufreinigung von <i>D</i> Lin-7-V69C-male-His.....	86
Abb. 32 Superdex 200 Aufreinigung von <i>D</i> Lin-7-V69C-male-His.....	87
Abb. 33 SDS-PAGE der Superdex 200 Aufreinigung von <i>D</i> Lin-7-V69C-male-His.....	87

Abb. 34 Expression der drei <i>DLin-7_{full}-malE-His</i> -Konstrukte.....	88
Abb. 35 His- und Superdex 200-Aufreinigung von <i>DLin-7-K98C_{full}</i>	88
Abb. 36 Agarosegele von amplifizierten <i>DLin-7</i> -Inserts	91
Abb. 37 Kontrollagarosegele nach Mutagenese	91
Abb. 38 Native His-Tag-Aufreinigung von <i>DLin-7-S72C</i>	93
Abb. 39 Denaturierende His-Tag-Aufreinigung von <i>DLin-7-S72C</i>	94
Abb. 40 Gelfiltration: <i>DLin-7-S72C</i> mit 5x Überschuss an A488 und an A647	95
Abb. 41 Gelfiltration (Desalting 26/10) von <i>DLin-7-T33C-K98C</i>	96
Abb. 42 Ionenaustauscher (Capto Q) von <i>DLin-7-S27C-S72C</i> [0.8x A647]	97
Abb. 43 Gelfiltration (Desalting 26/10) von <i>DLin-7-T33C-K98C</i> [0.8x A647, 10x A488].....	97
Abb. 44 Vergleich 6 M GdHCl gegen 6 M Harnstoff.....	99
Abb. 45 Leistungsserie.....	100
Abb. 46 Trolox-Einfluss.....	101
Abb. 47 S_G/S_R vs $\tau_{D(A)}$ für 6 Farbstoffkombinationen (A-D).....	104
Abb. 48 Probe 2-1 = <i>DLin-7-V69C-K98C</i> (VK) mit A647 als Akzeptor- und Bodipy FL als Donorfarbstoff	106
Abb. 49 Probe 2-2 = <i>DLin-7-V69C-K98C</i> (VK) mit A647 als Akzeptor- und A488 als Donorfarbstoff ..	108
Abb. 50 <i>DLin-7-S27C-S115C</i> -Titration mit Sdt-L	109
Abb. 51 Intra-Domänen-FRET <i>DLin-7-S27C-S72C</i>	112
Abb. 52 Intra-Domänen-FRET <i>DLin-7-T33C-V69C</i>	113
Abb. 53 Intra-Domänen-FRET <i>DLin-7-S44C-S72C</i>	114
Abb. 54 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-S27C-S115C</i>	115
Abb. 55 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-S27C-A163C</i>	116
Abb. 56 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-T33C-K98C</i>	117
Abb. 57 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-S44C-S115C</i>	118
Abb. 58 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-V69C-K98C</i>	119
Abb. 59 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-S72C-A163C</i>	120
Abb. 60 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-S27C-S115C</i> inkl. BSA-Messung	121
Abb. 61 Inter-Domänen-FRET <i>DLin-7-S27C-S115C</i> mit modifizierten FRET-Linien	122
Abb. 62 Populationsselektion für fFCS	124
Abb. 63 fFCS-Analyse von <i>DLin-7-S27C-S115C</i>	126
Abb. 64 L27-Domänen-Tetramerkomplexe.....	133
Abb. 65 L27-Dimere.....	134
Abb. 66 Intra-Domänen-FRET-Vergleich	135

Abb. 67 Inter-Domänen-FRET-Vergleich	136
Abb. 68 Haupt-, Neben- und gebundener Zustand	140
Abb. 69 Strukturmodelle von <i>DLin-7</i>	141
Abb. 70 Alignment der verschiedenen Zustände mit dem Homologiemodell.....	141
Abb. 71 Vierter ungefalteter Zustand bei der L27-Domäne.....	143
Abb. 72 Alignment zwischen Strukturmodell und dem <i>mLin-2/mLin-7</i> -Domänenkomplex (1Y74)....	144
Abb. 73 Bindungs- und Faltungsgleichgewicht mit seinen Komponenten.....	144
Abb. 74 <i>metaPrDos</i> Vorhersage	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Parameter für die AV-Berechnung	31
Tab. 2 Atom-ID für die S-Atome jeder <i>DLin-7</i> -Variante	31
Tab. 3 Förster-Radien R_0 für die verwendeten Farbstoffpaare	31
Tab. 4 Diodenlaser-Spezifikationen für eTCSPC	60
Tab. 5 <i>DLin-7</i> -Varianten mit N-terminalem 6xHis-Tag in pQE-30 Xa	63
Tab. 6 Sdt und <i>DPATJ</i> -Konstrukte.....	63
Tab. 7 Löslichkeitstags und ihre Charakteristika	82
Tab. 8 <i>DLin-7</i> -Konstrukte mit verschiedenen Löslichkeitstags.....	82
Tab. 9 Expressions- und Zellaufschlusstudien	84
Tab. 10 <i>DLin-7</i> -malE-His-Konstrukte mit vollständigem <i>DLin-7</i>	88
Tab. 11 Markierungsgrade nach sequenzieller Farbstoffmarkierung	98
Tab. 12 Markierungsgrade für <i>DLin-7</i> -His-Varianten	98
Tab. 13 <i>DLin-7</i> -V69C-K98C und die verschiedenen Donor- und Akzeptorfluoreszenzfarbstoffe	102
Tab. 14 Markierungsgrade der einzelnen Farbstoffkombinationen	103
Tab. 15 Intra- und Inter-Domänen-FRET	111
Tab. 16 Parameter zur Erstellung der 2D-Histogramme	111
Tab. 17 Parameter und Gleichungen zu Abb. 51.....	112
Tab. 18 Parameter und Gleichungen zu Abb. 52.....	113
Tab. 19 Parameter und Gleichungen zu Abb. 53.....	114
Tab. 20 Parameter und Gleichungen zu Abb. 54.....	115
Tab. 21 Parameter und Gleichungen zu Abb. 55.....	116
Tab. 22 Parameter und Gleichungen zu Abb. 56.....	117
Tab. 23 Parameter und Gleichungen zu Abb. 57.....	118
Tab. 24 Parameter und Gleichungen zu Abb. 58.....	119
Tab. 25 Parameter und Gleichungen zu Abb. 59.....	120
Tab. 26 Parameter und Gleichungen zu Abb. 60.....	121
Tab. 27 Parameter und Gleichungen zu Abb. 61.....	123
Tab. 28 AV-Simulation der Abstände zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor	127
Tab. 29 AV-Simulation für A488 als Donor- und A594 als Akzeptorfarbstoff	128
Tab. 30 AV-Simulation für A488 als Donor- und A647 als Akzeptorfarbstoff	128
Tab. 31 AV-Simulation für Bodipy FL als Donor- und A647 als Akzeptorfarbstoff	128
Tab. 32 eTCSPC eines formalen Fits (Gleichung 4-13) der zeitaufgelösten Fluoreszenz.....	129

Tab. 33 eTCSPC-Ergebnisse: Spezies-gemittelte Fluoreszenzlebensdauern und ihre Anteile	130
Tab. 34 eTCSPC-Ergebnisse: Vergleich der Abstandsverteilung $\langle R_{DA} \rangle$ und gemittelte Fluoreszenz-gewichtete Lebens-dauern $\langle \tau_{D(A)} \rangle_f$	131
Tab. 35 Vergleich von $\tau_{D(A),i}$ und $\langle \tau_{D(A),i} \rangle_f$	132
Tab. 36 Übersicht der SMD-Messergebnisse	138
Tab. 37 Parameter der Haupt-, Neben- und gebundenen Zustände	140
Tab. 38 Vergleich der Abstände in Å zwischen den experimentellen und den Modellradien	142
Tab. 39 Parameter des ungefalteten Zustandes	143
Tab. 40 Pufferbedingungen der Proben	160
Tab. 41 Proteinkonzentration und Markierungsgrad.....	160
Tab. 42 Verdünnungsschritte für die SMD-Messungen	160
Tab. 43 Pufferbedingungen der Proben	161
Tab. 44 Proteinkonzentration und Markierungsgrad.....	161
Tab. 45 Verdünnungsschritte für V69C-K98C-SMD-Messungen bei verschiedenen Leistungen	161
Tab. 46 Pufferbedingungen der Proben	162
Tab. 47 Proteinkonzentration und Markierungsgrad.....	162
Tab. 48 Verdünnungsschritte für V69C-K98C mit und ohne Trolox-SMD-Messungen	162
Tab. 49 Pufferbedingungen der Proben	163
Tab. 50 Proteinkonzentration und Markierungsgrade.....	163
Tab. 51 Harnstoffendkonzentration bei SMD-Messungen von verschiedenen <i>D</i> Lin-7-Varianten.....	163
Tab. 52 Verdünnungsschritte für S72C-S72C-SMD-Messungen.....	164
Tab. 53 Verdünnungsschritte für T33C-V69C- (Abb. 52), T33C-K98C- (Abb. 56) und S44C-S72C- (Abb. 53) SMD-Messungen	165
Tab. 54 Verdünnungsschritte für S27C-S115C- (Abb. 54), S27C-A163C- (Abb. 55), S44C-S115C- (Abb. 57) und S72C-A163C- (Abb. 59) SMD-Messungen	166
Tab. 55 Verdünnungsschritte für S27C-S115C.SMD-Messungen mit BSA	166
Tab. 56 Verdünnungsschritte für V69C-K98C-SMD-Messungen	167

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A, Abs	Absorption
A488	Alexa 488
A594	Alexa 594
A647	Alexa 647
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
B _G	Grünes Hintergrundsignal
bp	Basenpaar
B _R	Rotes Hintergrundsignal
BSA	Bovine serum albumin
cm	Zentimeter
Crb	Crumbs
C-Term	Carboxy-Terminus
D	Rotationsdiffusionskoeffizient
D/A-	Donor/Akzeptor-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dyn. L-korr.	dynamisch Linker korrigiert
E	Transfereffizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBI	European Bioinformatics Institute
F	Fluoreszenz
F _A	Akzeptorfluoreszenz
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
F _D	Donorfluoreszenz
F _p	Intensitätsanteile des durch Fluoreszenz parallel emittierten Lichtes
FPS	FRET positioning system
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
F _s	Intensitätsanteile des durch Fluoreszenz senkrechten emittierten Lichtes
GdHCl	Guanidinhydrochlorid
GFC	Gelfiltrations- bzw. Größenausschlusschromatographie
g _G	Detektionseffizienz für den Donor
g _R	Detektionseffizienz für den Akzeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
I.P.	Isoelektrischer Punkt
IC	Interne Konversion (internal conversion)
IMAC	Immobilisierte Metallchelatchromatographie (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
ISC	Intersystem crossing
J	spektrales Überlappungsintegral
kan	Kanamycin
l	Liter

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L_{Link}	Maximaler Abstand zwischen Chromophor und Protein [Å]
M	Molar
malE	Maltose Bindeprotein
MFD	Multiparameterfluoreszenzdetektion
MP	Messpuffer
MSA	multiple Sequenz-Alignment
n	Brechungsindex des Lösungsmittels
N_A	Avogadro-Konstante
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
N-Term	Amino-Terminus
Nus	NusA Protein (N-utilizing substance A)
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (Probability Distribution Analysis)
PDB	Proteindatenbank
$r_{D,S}$	Streulicht korrigierte Anisotropieverteilung
R_{DA}	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
R_{Dye}	Radius des Chromophors [Å]
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
s	Sekunde
$S_0 - S_n$	Singulettzustände
SDS	Natriumdodecylsulfat
S_G	Signal in den grünen Kanälen
SMD bzw. smMFD	Einzelmolekül-Multiparameterfluoreszenzdetektion (single molecule multiparameter fluorescence detection)
S_R	Signal in den roten Kanälen
stat. L-korr.	Statisch Linker korrigiert
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TCSPC	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (Time-Correlated Single Photon Counting)
t_{diff}	Diffusionszeit
t_{rot}	Rotationszeit
Trx	Thioredoxin
w_{Link}	Breite des Linkers [Å]
α	Crosstalk (spektrales Übersprechen)
ϕ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
ϕ_{FA}	Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptor
$\phi_{FD(0)}$	Fluoreszenzquantenausbeute des Donorfluorophors ohne Akzeptor
κ^2	Orientierungsfaktor, als Mittelwert 2/3
ρ	Rotationskorrelationszeit
τ	Fluoreszenzlebensdauer
$\tau_{D(0)}$	Fluoreszenzlebensdauer des Donors
$\tau_{D(A)}$	Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Membran-assoziierte Proteinkomplexe sind entscheidend in der Untergliederung der Plasmamembran in räumlich und funktionell verschiedene Regionen, die unter anderem Adhäsion, Signal gebende Zentren oder Lagen für Endo- oder Exocytose definieren. In vielen Fällen sind diese Komplexe durch Gerüstproteine (scaffold) organisiert, zu denen Effektorproteine, wie z.B. Adhäsions- oder Signalproteine, rekrutiert werden. Proteingerüste haben zwei, auf den ersten Blick entgegengesetzte Eigenschaften: eine stabile Architektur auf der einen und Verformbarkeit und Flexibilität auf der anderen Seite. Trotz eines umfangreichen Wissens über die Funktion und Zusammensetzung vieler Proteinkomplexe ist wenig über die Dynamik der molekularen Interaktionen bekannt. Die Charakterisierung solcher Wechselwirkungen ist hilfreich, um die Mechanismen von Proteinkomplexbildung zu verstehen.

Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUKs) bilden eine Familie von Gerüstproteinen, die oft mit Signalkomplexen oder zellulären Verbindungen assoziiert sind, wie die tight oder septate junction in den Epithelzellen oder die postsynaptische Dichte in Neuronen oder Immunsynapsen. Ihre Fähigkeit als Plattform für die Rekrutierung von größeren Proteinaggregaten zu dienen, resultiert aus dem Vorhandensein von verschiedenen Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen: Ein bis drei PDZ (PSD-95/Discs large/zonula occludens (ZO)-1)-Domänen, eine SH3- (Src homology-3)-Domäne und eine Guanylat-Kinase(GUK)-Domäne. Einige Mitglieder tragen zusätzlich N-terminal ein oder zwei L27 (Lin-2/Lin-7)-Domänen (Funke et al. 2005; te Velthuis et al. 2007). Dieser modulare Aufbau ist ideal geeignet, um eine Vielzahl von Komponenten in supramolekulare Proteinkomplexe höherer Ordnung zu rekrutieren, deren Zusammensetzung vom Zelltyp und bzw. oder vom Entwicklungsstadium abhängen kann.

L27-Domänen wurden erstmals im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben, in dem Lin-2 und Lin-7 einen heterotrimeren Komplex mit Lin-10 bilden, welcher erforderlich ist, um den Wachstumsfaktor-Rezeptor Let-23 an der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen aufrecht zu erhalten (Simske et al. 1996; Kaech et al. 1998). Die Säuger-orthologen Proteine CASK, MALS/Veli und Mint-1 bilden einen ähnlichen dreigliedrigen Komplex im Gehirn, der im postsynaptischen Raum konzentriert ist (Borg et al. 1998; Butz et al. 1998; Jo et al. 1999). L27-Domänen existieren nicht nur in MAGUK Proteinen, sondern auch in anderen Gerüstproteinen, von denen viele am Aufbau und bzw. oder der Erhaltung der Zellpolarität beteiligt sind. Die Hauptmerkmale dieses Protein-Protein-Wechselwirkung-Moduls sind negativ geladene Reste, welche drei α -helikale Strukturen ausbilden,

und eine konservierte aromatische Aminosäure besitzen (Doerks et al. 2000; Feng et al. 2004). Biophysikalische Untersuchungen haben gezeigt, dass isolierte L27-Domänen unstrukturiert erscheinen, aber eine stärker organisierte, stabile Struktur bei der Heterodimerisierung mit einer zweiten L27-Domäne einnehmen (Harris et al. 2002). Röntgenkristallographie und NMR-Analysen der isolierten L27-Domäne suggerieren die Bildung von Heterotetrameren, die sehr strukturiert sind, während das Monomer weitgehend entfaltet bleibt. Im Heterotetramer bilden zwei der drei α -Helices der einzelnen L27-Domäne ein dichtes, vier-helikales Bündel zu einem Heterodimer, während die dritte α -Helix jeder L27-Domäne an der Bildung eines anderen vier-helikalen Bündels involviert ist, wodurch es zur Entstehung des Heterotetrameres kommt (Harris et al. 2002; Feng et al. 2004; Li et al. 2004; Feng et al. 2005; Petrosky et al. 2005).

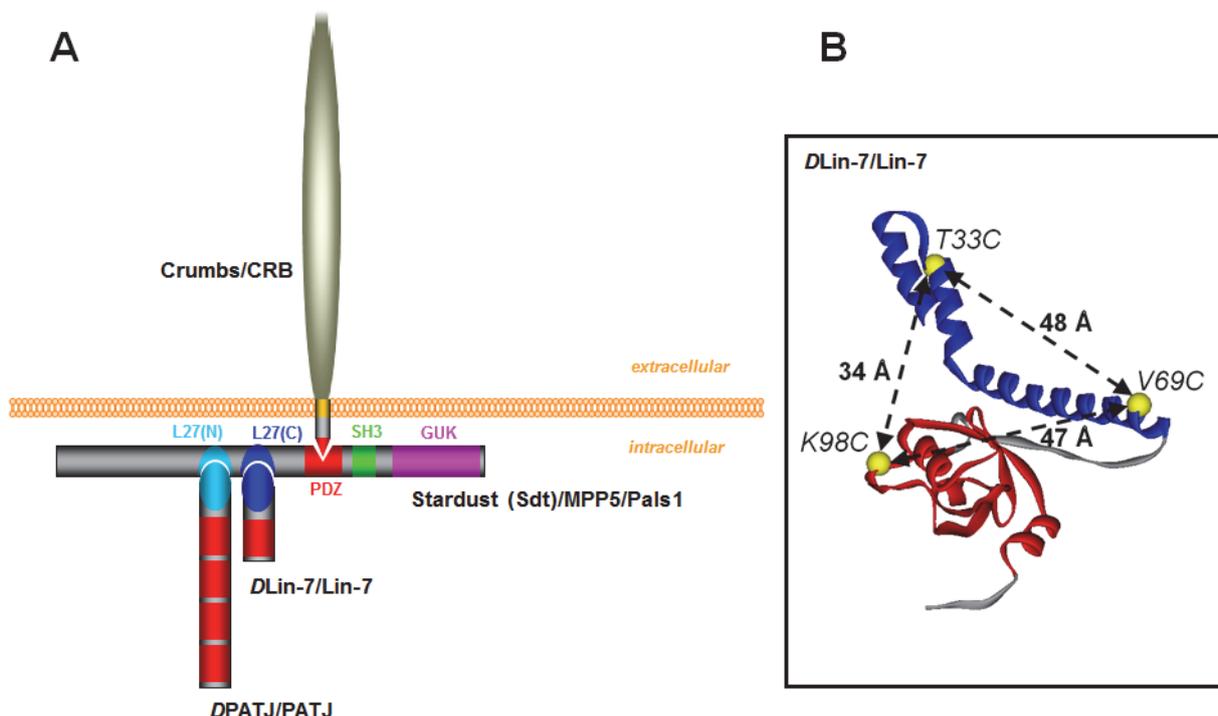


Abb. 1 Crb/Sdt Komplex und DLin-7: (A) Schematische Darstellung der Kernkomponenten des Crb/Sdt Komplexes abgeleitet von *in vitro* Studien zu Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen oder Domänen. Das MAGUK Protein Sdt besteht aus folgenden Domänen: L27N (Türkis), L27C (Blau), PDZ (Rot), SH3 (Grün) und GUK (Pink). Die PDZ-Domäne von Sdt bindet direkt an die C-terminalen Aminosäuren des Transmembranproteins Crumbs. Sdt (Wirbeltier-Ortholog MPP5/Pals1) rekrutiert DPATJ/PATJ und DLin-7/Lin-7 intrazellulär an die Membran durch die direkten Wechselwirkungen zwischen den entsprechenden L27-Domänen (Türkis, Blau). (B) Die Cartoon-Darstellung zeigt DLin-7 in einem vermeintlich gefalteten Zustand: Die Struktur-Vorhersage wurde mit SWISSModel (Kopp et al. 2004) unter Verwendung von Daten aus PDB-Einträgen erstellt. Die PDZ-Domäne ist in Rot, die gefaltete L27-Domäne in Blau und die Verbindungsbereiche in Grau dargestellt. Die Positionen der eingebrachten Cysteine, die für die Farbstoffmarkierung verwendet wurden, sind als gelbe Kugeln zusammen mit den vorhergesagten C α -C α -Abständen zwischen den markierten Positionen gezeigt.

Drosophila stardust (*sdt*) kodiert mehrere MAGUK-Varianten (siehe Abb. 1)(Bachmann et al. 2001; Hong et al. 2001; Berger et al. 2007). *Sdt* und dessen Säuger-Ortholog MPP5/Pals1 (membrane-associated palmitoylated protein-5/protein assoziiert mit Lin-7) enthalten zwei L27-Domänen: Die N-terminale L27N-Domäne (hellblau in Abb. 1) kann *in vitro* an die einzelne L27-Domäne des Gerüstproteins DPATJ/PATJ (protein associated with tight junctions) binden (Roh et al. 2003; Bulgakova et al. 2008), während die C-terminale L27C-Domäne (dunkelblau in Abb. 1) von *Sdt*/MPP5 an die einzelne L27-Domäne von *D*Lin-7/Lin-7 (auch als Mals oder Veli bezeichnet) bindet (Kamberov et al. 2000; Bachmann et al. 2004). Darüber hinaus kann die PDZ-Domäne (rot in Abb. 1) an die C-terminalen Aminosäuren des Transmembranproteins Crumbs (Crb/CRB) binden (Bachmann et al. 2001; Hong et al. 2001; Makarova et al. 2003). Der Crb/*Sdt*/DPATJ/*D*Lin-7-Komplex wird sowohl in Wirbeltieren als auch in *Drosophila* in Epithelzellen exprimiert. Dort ist er apikal zur adherens junction lokalisiert, d.h. jeweils an der tight junction und in der subapikalen Region. Außerdem nimmt er eine entsprechende Position in den Photorezeptorzellen von Wirbeltieren und den Fliegenaugen ein. In *Drosophila* sind die Mitglieder des Komplexes zum einen erforderlich um die epitheliale Polarität des Embryos zu erhalten und zum anderen um eine angemessene Morphogenese und das Überleben der Photorezeptoren zu kontrollieren (Izaddoost et al. 2002; Johnson et al. 2002; Pellikka et al. 2002). Im Zebrafisch wird das *sdt*-Ortholog *nagie oko* in frühen Stadien der Entwicklung für die polarisierte Organisation der Herzmuskelzellen benötigt (Rohr et al. 2006). Das Zebrafisch *crumbs*-Ortholog *oko meduzy* bestimmt apikale Eigenschaften und ist zur Strukturierung der Netzhaut erforderlich (Malicki et al. 1999; Omori et al. 2006). In Kulturen von Säugerzellen ist der Komplex von entscheidender Bedeutung für die Bildung der tight junctions (Roh et al. 2003; Michel et al. 2005). Im Menschen führen Mutationen in *Crb1* zu Retinitis pigmentosa und zur Leberschen kongenitalen Amaurose, zwei schwere Formen der Netzhautdystrophie (Richard et al. 2006; Assémat et al. 2008).

In *Drosophila* wird *Sdt* mit den Kernkomponenten des Komplexes kolokalisiert, wenn dieser in bestimmten Zellen exprimiert wird. In embryonalen Epithelien und in den adulten Photorezeptorzellen ist *Sdt* wichtig für die Organisation des Komplexes, während es in frühen Stadien der Photorezeptorentwicklung entbehrlich ist (Richard et al. 2006). In diesem Stadium werden die beiden L27-Domänen nicht für eine ordnungsgemäße *Sdt*-Lokalisierung benötigt. Im Gegensatz dazu ist die L27N-Domäne (Bindungsstelle für DPATJ) entscheidend für die apikale Lokalisation von *Sdt* in den adulten Photorezeptoren. *Sdt*-Proteine ohne die L27C-Domäne (Bindungsstelle für *D*Lin-7) zeigten ansonsten in mutierten *sdt* Photorezeptorzellen die normale apikalen Lokalisierung und die wiederhergestellte DPATJ Lokalisierung (Bulgakova et al. 2008). Es ist auffallend, dass das Fehlen von

DLin-7 in Epithel- oder Sehzellen keinen Einfluss auf die Lokalisation der anderen Kernkomponenten hat (Bachmann et al. 2008), was die Frage aufwirft, ob *DLin-7* durch ein anderes Protein ersetzt werden kann, welches auch an die L27C-Domäne von Sdt bindet. Ebenso hat das Fehlen der *DPATJ*-Funktion keinen Effekt auf die Embryonalentwicklung (Nam et al. 2006).

Bis jetzt verwendeten alle Methoden eine eher statische Sicht des Komplexes, um dieses Proteingerüst zu charakterisieren. Darüber hinaus leiteten sich die Schlussfolgerungen in allen Fällen aus Interaktionsstudien zwischen isolierten Bindedomänen zweier Proteine ab (z.B. (Feng et al. 2005)). Dies schließt die Untersuchung möglicher kooperativer Effekte, die die Bindungsfähigkeit einer L27-Domäne bei der Bindung des Proteins an die zweite L27-Domäne beeinflussen können, aus. Weiterhin existieren keine Daten über die Stöchiometrie der Proteine in dem Sdt/*DPATJ*/*DLin-7*-Komplex und deren Abhängigkeit von der Konzentration seiner Interaktionspartner. Daher wurden die L27-Domänen-vermittelten Wechselwirkungen zwischen den drei Gerüstproteinen (Abb. 1) durch einen neuartigen Einzelmolekül Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Assay untersucht. Das Ziel war die Parameter und die räumlichen Dynamiken, die die Bildung und Erhaltung des Sdt/*DPATJ*/*DLin-7*-Komplex steuern, zu verstehen und zu quantifizieren.

In den letzten Jahren konnten FRET-Experimente ihr großes Potenzial in Sub-Nanometer-Analysen von biomolekularen Strukturen und Dynamiken auf Einzelmolekülebene zeigen (Ha et al. 1996; Mekler et al. 2002; Rothwell et al. 2003; Joo et al. 2006). Die Berechnung des absoluten FRET-Abstandes zwischen einem Donor- und Akzeptorfluorophor, der die Voraussetzung für die Analyse von molekularen Strukturen ist, wird von vielen Faktoren erschwert. Beobachtete FRET-Effizienzen hängen nicht nur von instrumentellen Bedingungen (Detektionseffizienz und spektraler Crosstalk), sondern auch von den Eigenschaften des Fluorophors (Quantenausbeute, das Nutzungsvolumen des Fluorophors und die Dynamiken der Fluorophorbewegungen) ab (Van der Meer et al. 1999). Die Anwendung der Multiparameterfluoreszenzdetektion (MFD) (Widengren et al. 2006), die alle Fluoreszenzparameter (Intensität, Lebensdauer und Anisotropie) für Donor und Akzeptor auf Einzelmolekülebene sammelt, vermeidet die meisten Probleme. Unvollständige Farbstoffmarkierung, gemittelte Artefakte unterschiedlicher FRET-Populationen, unsichere Annahmen bezüglich der Anisotropie und der Quantenausbeute können gemessen und berücksichtigt werden. Darüber hinaus werden die Nachweiseffizienzen und der Crosstalk durch die Messung von Referenzfarbstoffen definiert, wodurch die systematischen Fehler signifikant reduziert und so eine hohe Genauigkeit der Abstandsmessungen ermöglicht wird (Margittai et al. 2003).

In dieser Arbeit wird eine systematische Reihe von *in vitro* Einzelmolekül-FRET-Experimente mittels MFD durchgeführt, um die Heterogenität des Sdt/DPATJ/DLin-7-Komplexes zu studieren. Das wird durch stufenweise Zugabe von Sdt und DPATJ zu Donor-Akzeptor markiertem DLin-7 erreicht. Durch Messung der FRET-Effizienzen der einzelnen Spezies wird der Grad der Bindung zusammen mit den entsprechenden Donor-Akzeptor-Abständen R_{DA} bestimmt. Die Komplexbildung wird ebenfalls über die Zunahme der translatorischen Diffusionskoeffizienten gemessen, die mittels Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie (FCS) bestimmt wurden. Als eine Voraussetzung für hochauflösende Einzelmolekül-FRET-Studien von markierten Biomolekülen wurde die Wahrscheinlichkeitsverteilungs-analyse (probability distribution analysis, PDA) als ein neues Instrument für die quantitative Analyse komplexer Daten etabliert (Antonik et al. 2006; Kalinin et al. 2007). Auf diese Weise kann der Abstand zwischen zwei Positionen aus einer gemessenen FRET-Verteilung extrahiert werden, der durch das statistische Rauschen im Experiment verbreitert wird. Die erhaltenen FRET-Verteilungen werden mit Blick auf strukturelle Unordnung (disorder) oder Polymorphismus in Proteinen und Proteinkomplexen diskutiert.

1.2 Zielsetzung

Die L27-Domäne wird in einer großen Anzahl von Proteinen als vielseitiges Interaktionsmodul verwendet [SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)(Letunic et al. 2004)) listet insgesamt 480 Domänen]. Sie ist in Proteinen zu finden, die eine wesentliche Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen spielen, wie zum Beispiel der Einrichtung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität, der asymmetrischen Zellteilung und der Clusterbildung von Rezeptoren und Ionenkanälen. Sie kann in einer oder in zwei Kopien pro Molekül enthalten sein, und in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle tritt die L27-Domäne in Kombination mit mindestens einer PDZ-Domäne auf, die stets C-terminal zu der L27-Domäne positioniert ist. Die Anwesenheit einer L27-Domäne kann einen signifikanten Einfluss auf das Oligomerisationsverhalten des jeweiligen Proteins und die Bindungsfähigkeit der benachbarten PDZ-Domänen haben. Dies wurde für das MAGUK-Protein SAP97, das eine L27-Domäne enthält, und seinem nahverwandtem PSD-95 mit fehlender L27-Domäne, demonstriert. Obwohl die drei PDZ-Domänen in den beiden Proteinen zu ca. 90% identisch sind und sie ähnliche Bindungsspezifitäten besitzen, wenn sie *in vitro* als isolierte Domänen analysiert werden, weisen SAP97 und PSD-95 *in vivo* markante Unterschiede in Bezug auf den interagierenden Partner auf. Ferner hat, wie durch die „negativ-Färbung Elektronenmikroskopie“ gezeigt, das PSD-95 eine kompakte Konfiguration und existiert als Monomer, während die Mehrzahl der SAP97-Moleküle stabförmig sind und zu Dimerisierung neigen, ein Verhalten, das von der Anwesenheit einer intakten L27-Domäne abhängt (Nakagawa et al. 2004). Diese Daten zeigen, dass die Anwesenheit einer L27-Domäne nicht nur eine Auswirkung auf die Struktur des gesamten Moleküls hat, sondern auch sein Wechselwirkungsverhalten stark beeinflusst. Der experimentelle Ansatz dieser Arbeit hat die Zielsetzung, die quantitativen Parameter und die räumliche Dynamik der L27-Domäne zu verstehen, um nachvollziehen zu können, wie Membran-assoziierte Proteinkomplexe zelluläre Funktionen regulieren.

2 Technische Grundlagen

2.1 Fluoreszenz

Durch die Absorption (A) eines Photons wird ein Molekül aus seinem elektronischen Singulettgrundzustand S_0 in einen energetisch höheren bzw. angeregten Elektronenzustand $S_1 - S_n$ versetzt. Innerhalb von 10^{-13} s bis 10^{-11} s relaxiert es zum niedrigsten angeregten Elektronenzustand S_1 . Dieser sehr schnell ablaufende Prozess wird als interne Konversion (internal conversion, IC) bezeichnet. Erfolgt die Abgabe der überschüssigen Energie des Moleküls aus dem S_1 -Zustand, welcher eine Lebensdauer von etwa 10^{-9} s besitzt, in Form einer Photonenemission, so bezeichnet man den Prozess als Fluoreszenz (F) und das entsprechende Molekül als Fluorophor. Dabei unterscheidet man zwischen natürlichen (intrinsischen) und künstlichen (extrinsischen) Fluorophoren. Die Frequenz der abgegebenen Strahlung ist dabei im Vergleich zur absorbierten Strahlung rotverschoben, da nicht die gesamte aufgenommene Energie als Fluoreszenzlicht emittiert wird.

Mit der Fluoreszenz konkurrieren weitere strahlungslose Prozesse bei der Rückkehr des Moleküls in den Elektronengrundzustand S_0 : Interne Konversion und der Übergang in den Triplettzustand (intersystem crossing, ISC). Anschließend an ISC erfolgt die Lichtemission durch Phosphoreszenz. Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheiden sich nur in der Zeit, die zwischen Anregung und Emission des Lichtes liegt. In einem nach Jablonski benannten Energietermschema (Abb. 2) werden die einzelnen energetischen Prozesse, wie Absorption, Fluoreszenzemission und die strahlungslosen Desaktivierungsprozesse, zusammengefasst:

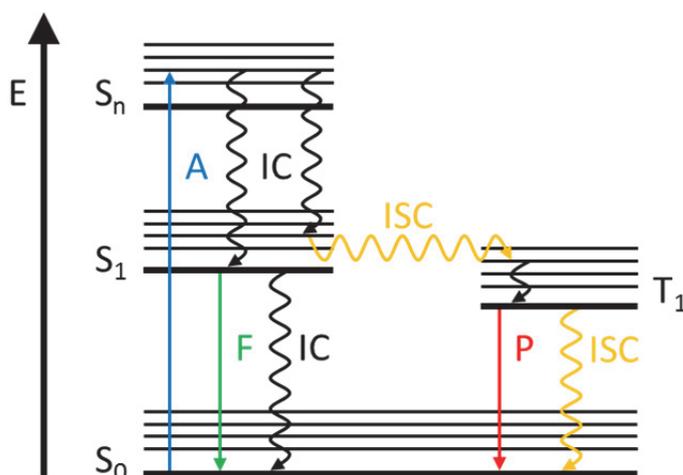


Abb. 2 Jablonski-Diagramm: Mögliche Relaxationsprozesse aus dem angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 eines durch Lichtabsorption (A, Blau) angeregten Fluorophors in einem Energieniveauschema: Fluoreszenz (F, Grün), interne Konversion (IC, Schwarz), Phosphoreszenz (P, Rot) und Übergang in den Triplettzustand T_1 (intersystem crossing, ISC, Orange).

Der Anteil der Fluoreszenz am Gesamtzerfallsprozess aus dem angeregten Zustand S_1 ist durch die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F gegeben. Sie gibt das Verhältnis der Zahl der Moleküle, die Fluoreszenz emittiert haben, zur Zahl der angeregten Moleküle an und lässt sich mit den Geschwindigkeitskonstanten (k_F , k_{IC} und k_{ISC}) durch Gleichung 2-1 ausdrücken.

$\phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \leq 1$	Gleichung 2-1
---	---------------

2.2 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors gibt die mittlere Zeit an, die ein Molekül in einem angeregten Zustand bleibt, bevor es ein Photon emittiert und damit in den Grundzustand zurückkehrt. Die Lebensdauer der Fluoreszenz folgt dabei einem exponentiellen Zerfall, bei dem die Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$ mit $F(0)$ beschrieben wird.

$F(t) = F(0)e^{-t/\tau}$	Gleichung 2-2
--------------------------	---------------

Die Fluoreszenzlebensdauer τ ist dabei der Kehrwert der Summe aller Zerfallskonstanten des Anregungszustands und entspricht der Zeit, nach der die Fluoreszenzintensität auf $1/e$ des Anfangswertes abgeklungen ist:

$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}$	Gleichung 2-3
---	---------------

Besitzt ein Fluorophor Zustände mit unterschiedlicher Fluoreszenzlebensdauer oder befinden sich mehrere Fluorophore mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern in der Probe ist das Abklingverhalten nicht mehr monoexponentiell. Ein solcher Zerfall kann als Summe der individuellen monoexponentiellen Zerfälle beschrieben werden:

$F(t) = \sum_i F_i(0)e^{-t/\tau_i}$	Gleichung 2-4
-------------------------------------	---------------

Dabei werden mit τ_i die Fluoreszenzlebensdauern und mit $F_i(0)$ die entsprechenden Intensitäten der Komponenten zum Zeitpunkt $t = 0$ beschrieben.

2.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Im Jahre 1948 wurde erstmals der Prozess des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) von Theodor Förster beschrieben. Dabei wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes (Donorfluorophor D) strahlungslos auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptorfluorophor A) über einen Abstand von bis zu 100 Å übertragen. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist, dass sich das Donorfluoreszenz- und das Akzeptorabsorptionsspektrum spektral überlappen.

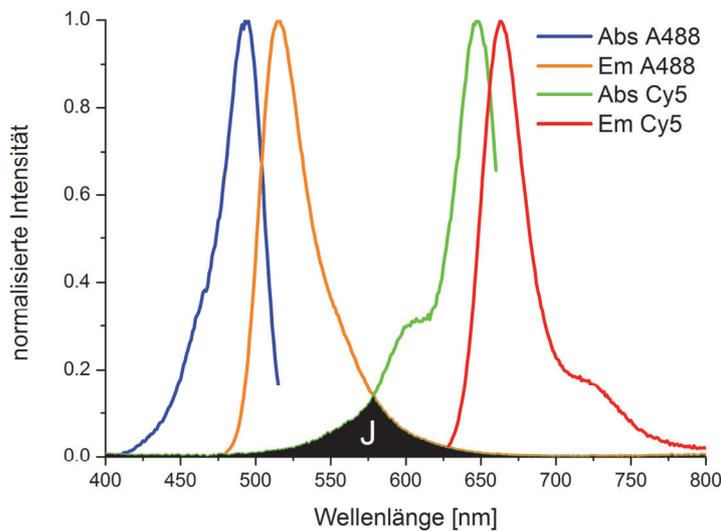


Abb. 3 Überlappungsintegral J des FRET-Paares Alexa 488 und Cy5. Der spektrale Überlapp (J) zwischen Donoremission (Orange) und Akzeptorabsorption (Grün) ist schwarz eingefärbt.

Der Energietransfer beruht auf einer weitreichenden Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor und erfolgt in der Regel zwischen Singulettzuständen (S_1 für Donor, S_0 für Akzeptor) und wird deshalb auch als Singulett-Singulett-Transfer bezeichnet.

Die FRET-Transferrate k_{FRET} lässt sich als Funktion des Abstands R_{DA} zwischen Donor und Akzeptor beschreiben.

$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_{D(0)}} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6$	Gleichung 2-5
--	---------------

$\tau_{D(0)}$ = mittlere Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustands des Donorfluorophors in Abwesenheit des Akzeptorfluorophors

R_{DA} = Abstand zwischen Donor und Akzeptor

R_0 = Förster-Radius.

Die Transfereffizienz E ist die gebräuchlichste Größe für eine quantitative Beschreibung von FRET. Sie gibt den Anteil der auf den Akzeptor übertragenen Energie bezogen auf die vom Donor absorbierte Energie an und entspricht der Quantenausbeute des Energietransfers.

$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + (k_F + k_{ISC} + k_{IC})} = 1 - \frac{\tau}{\tau_{D(0)}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6}$	Gleichung 2-6
---	---------------

Durch die Auftragung der Transfereffizienz E gegen den Abstand R_{DA} wird deutlich, dass R_0 dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor entspricht, bei dem die Hälfte der absorbierten Energie auf den Akzeptor übertragen wird.

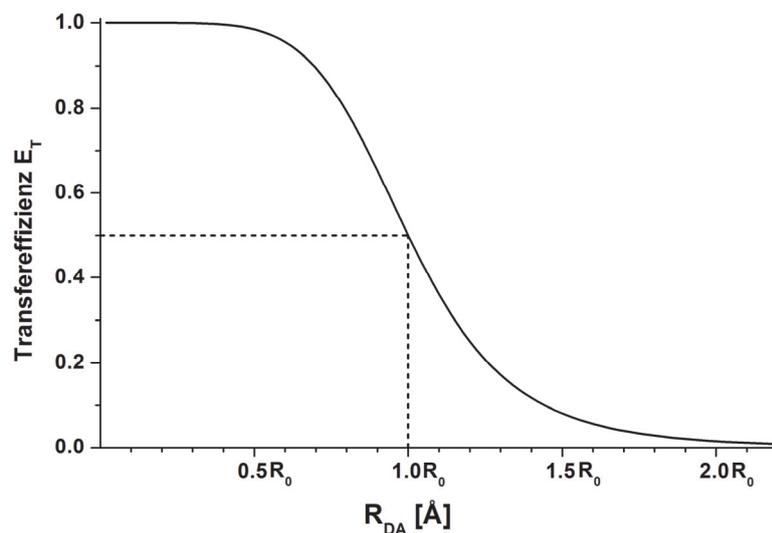


Abb. 4 Die Transfereffizienz E als Funktion des Donor-Akzeptor-Abstandes R_{DA} . Dabei wird R_{DA} in Einheiten von R_0 angegeben.

Aus der Abb. 4 ist ersichtlich, dass Distanzmessungen mit FRET im Abstandsbereich um R_0 am empfindlichsten sind, da kleine Änderungen in R_{DA} einen großen Effekt bzgl. E haben. Der Arbeitsbereich von konventionellen FRET-Messungen ist auf Abstände von etwa $0.5 R_0$ bis $1.5 R_0$ beschränkt. In Einzelmolekülmessungen kann dieser Bereich erweitert werden. Der Förster-Radius R_0 ist eine für jedes Donor-Akzeptor-Paar charakteristische Größe und liegt in der Regel zwischen 20 und 60 Å.

Der Förster-Radius R_0 berechnet sich nach Försters Theorie wie folgt, wobei die Konstanten durch die benutzten Einheiten der Größen festgelegt werden:

$R_0 = \left[\frac{9(\ln 10)}{128\pi^5 * N_A} * \frac{J * \kappa^2 * \phi_{D(0)}}{n^4} \right]^{1/6}$	Gleichung 2-7
--	---------------

J = spektrales Überlappungsintegral

κ^2 = Orientierungsfaktor, als Mittelwert 2/3

$\phi_{D(0)}$ = Fluoreszenzquantenausbeute des Donorfluorophors ohne Akzeptor

N_A = Avogadro-Konstante

n = Brechungsindex des Lösungsmittels

$\frac{R_0}{\text{Å}} = 0.2108 * \left[\frac{\kappa^2 * \phi_{D(0)}}{n^4} * \left(\frac{J(\lambda)}{\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1} \text{nm}^4} \right) \right]^{1/6}$	Gleichung 2-8
--	---------------

J ist das spektrale Überlappungsintegral, das angibt wie stark das Fluoreszenzspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Nur wenn das Überlappungsintegral größer null ist, kann ein Energietransfer stattfinden. J wird wie folgt berechnet:

$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$	Gleichung 2-9
---	---------------

Dabei entspricht $f_D(\lambda)$ dem relativen Fluoreszenzanteil bei der Wellenlänge λ . Hierfür wird die Donorfluoreszenz bei der Wellenlänge λ mit dem Gesamtspektrum normiert. $\epsilon_A(\lambda)$ entspricht dem wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten des Akzeptors.

2.4 Anisotropie

Der aus dem griechischen stammende Begriff der Anisotropie beschreibt die Richtungsabhängigkeit der physikalischen Eigenschaften eines Stoffes. Generell werden die nicht kugelsymmetrischen Vorgänge wie z.B. die Strahlung eines Lasers als anisotrop, hingegen alle anderen Prozesse, z.B. die Sonnenausstrahlung, als isotrop bezeichnet. Um Informationen über die Beweglichkeit, Größe und Form von Makromolekülen zu gewinnen, bedient man sich in der Biochemie der Fluoreszenz-polarisationsmessungen. Dabei wird der Effekt ausgenutzt, dass im Vergleich die emittierte Fluoreszenz der Fluorophore zum linear polarisierten Anregungslicht depolarisiert ist. Fluorophore können nur vom Singulettgrundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 übertreten, wenn die Polarisationsrichtung des Lichtes mit der Richtung des Übergangdipolmomentes des Anregungsprozesses übereinstimmt. Wenn sich anschließend die Ausrichtung des Übergangdipolments der Fluoreszenz geändert hat, so ist die Fluoreszenz relativ zum eingestrahlt Licht depolarisiert. Um diese Depolarisation quantitativ beschreiben zu können, wird das Maß der Anisotropie r verwendet, die wie folgt definiert ist:

$r = \frac{F_p - F_s}{F_p + 2F_s}$	Gleichung 2-10
------------------------------------	----------------

F_p und F_s beschreiben die Intensitätsanteile des durch Fluoreszenz emittierten Lichtes, welche parallel und senkrecht, bezogen auf die Ausrichtung des Anregungslichts, polarisiert sind. Die unterschiedliche Detektionseffizienz in den parallelen und senkrechten Kanälen, die durch den L-förmigen Messaufbau und die Polarisatoren bedingt wird, die vor und nach der Probe positioniert sind, wird durch den so genannten G-Faktor korrigiert:

$r = \frac{F_p - F_s * G}{F_p + 2F_s * G}$	Gleichung 2-11
--	----------------

Die Bewegung der Fluorophore zählt während ihrer Fluoreszenzlebensdauer zu einem der wichtigsten Effekte, die zur Verringerung der Anisotropie führen. Ungebundene, sehr kleine Fluorophore (z.B. Fluorescein in wässriger Lösung) rotieren während ihrer Fluoreszenzlebensdauer deutlich schneller als solche, die an ein Protein gebunden sind. Daher weisen freie Farbstoffe eine Anisotropie nahe Null auf (isotrop), wohingegen gebundene einen von Null abweichenden Wert (anisotrop) aufweisen, der je nach Größe des gekoppelten Proteins steigt. Die Anisotropiemessungen helfen somit bei der Aufklärung der Beweglichkeit der Fluorophore in Fluorophor-Biomolekül-Konstrukten.

Zu beachten ist noch, dass die Anisotropieverringering bei Fluorophorbewegung erheblich durch die Fluoreszenzlebensdauer beeinflusst wird. Bei gleicher Bewegungsfreiheit zeigt ein Farbstoff mit einer längeren Fluoreszenzlebensdauer eine geringere Anisotropie auf als ein kurzlebiger Fluorophor, da dieser wesentlich mehr Zeit zum Rotieren besitzt.

Die Rotationsdiffusion wird durch die Perrin-Gleichung beschrieben (Lakowicz 1999):

$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\rho} = 1 + 6D\tau \text{ bzw. } r = \frac{r_0}{1+(\tau/\rho)}$	Gleichung 2-12
--	----------------

Dabei entspricht τ der Fluoreszenzlebensdauer, ρ der Rotationskorrelationszeit und D dem Rotationsdiffusionskoeffizienten. Ist die Korrelationszeit viel größer als die Lebensdauer ($\rho \gg \tau$), dann ist die gemessene Anisotropie r gleich der fundamentalen Anisotropie ($r_0 =$ Anisotropie eines Ensembles völlig unbeweglicher Moleküle). Ist die Korrelationszeit viel kürzer als die Lebensdauer ($\rho \ll \tau$), dann ist die Anisotropie Null.

2.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Methode zur Untersuchung von Moleküleigenschaften, die zu Hell- und Dunkelzuständen führen. Dazu gehört auch die Beweglichkeit des Moleküls. Mit der FCS können zudem Diffusionszeiten und Diffusionskoeffizienten gemessen werden, und damit auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen, die deren Beweglichkeit beeinflussen. Die Entwicklung von konfokalen Fluoreszenzmikroskopen, die kleine Anregungs- und Detektionsvolumen in der Größenordnung von 1-10 fl sowie ein hohes Signal-zu-Hintergrundverhältnis besitzen, bilden die Grundlage für diese Art der Spektroskopie. Bei der FCS werden die Schwankungen der Fluoreszenz F (Fluoreszenzfluktuationen), verursacht durch Brownsche Teilchenbewegung fluoreszierender Moleküle in der Lösung, gemessen (Magde et al. 1972; Ehrenberg et al. 1974). Im Idealfall wird die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls detektiert, das sich durch den Beleuchtungsfokus bewegt (Einzelmolekülmessung). Eine statistische Auswertung dieser Messung liefert die mittlere Aufenthaltsdauer eines Moleküls im Fokus, aus der wiederum charakteristische Molekülparameter ermittelt werden können.

$$G(t_c) = \frac{\langle F(t) * F(t + t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Gleichung 2-13

Durch die Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ (Gleichung 2-13) wird die Wahrscheinlichkeit beschrieben, dass ein detektiertes Molekül zum Zeitpunkt t_c ebenfalls noch zum Zeitpunkt $t + t_c$ gemessen werden kann:

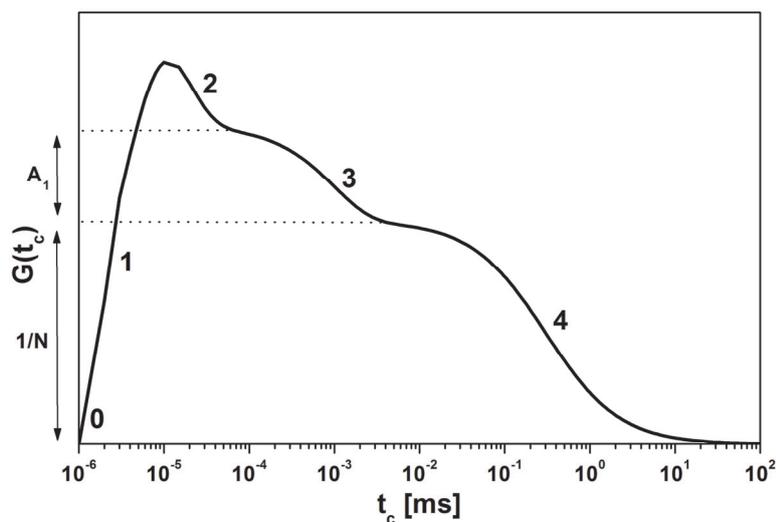


Abb. 5 Simulierter Verlauf der Fluoreszenzkorrelationskurve: Emission eines Photons [0], Antibunching [1], Rotationsdiffusion [2], Triplettkinetik [3] oder Isomerisierungsreaktion und translative Diffusion [4] (Berger 2001)

Abb. 5 zeigt ein Schema einer FCS-Kurve für einen ungebundenen bzw. mobilen Fluorophor. Zum Zeitpunkt $t_c = 0$ wird vom Fluorophor ein Photon emittiert [0]. Für die Aussendung eines zweiten Photons steigt für kurze Korrelationszeiten im Nanosekundenbereich die Wahrscheinlichkeit rasch an (= Antibunching [1]). Jeder Prozess, der die Aussendung von Photonen verhindert, wie der Übergang in den Triplettzustand (ISC), hat ein Abklingen von $G(t)$ zur Folge (Bunching [2-4]), das durch einen Kinetikterm (Bunchingterm) mit einer entsprechenden Zeitkonstante beschrieben werden kann (Schweinberger 2002).

Bei logarithmischer X-Achsenkalierung (Zeitachse) können durch die Amplitude (proportional zum Kehrwert der Molekülzahl im Anregungsvolumen) und die Wendepunkte der Korrelationskurve verschiedene Parameter, wie die charakteristische Zeit der Rotation t_{rot} und die Diffusionszeit t_{diff} , bestimmt werden. Unter Verwendung von Instituts-eigener Software, dem Kalkulationsprogramm Kristine (HHU, Düsseldorf), wird durch Anpassung verschiedener Parameter eine Kurve erstellt, die mit der Korrelationskurve möglichst gut übereinstimmt.

2.6 Homologiemodellierung

Das multiple Sequenzalignment (MSA) der L27-Domäne wurde durch das Webinterface ClustalW2 des European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk>) (Thompson et al. 1994) generiert, in dem die Zielsequenz der L27-Domäne von *D*Lin-7 an die strukturellen Vorlagen aus den RCSB Protein Data Bank Einträgen 1RSO_B (Feng et al. 2004) und 1VF6_A und 1VF6_C (Li et al. 2004) aligniert bzw. ausgerichtet wurde. Das MSA wurde in den swiss-pdb-Viewer (Guex et al. 1997) geladen und an die vollautomatische Homologiemodellierungs-Pipeline SWISS-MODEL übertragen (<http://www.expasy.org/spdbv/>), um das Homologiemodell für die L27-Domäne zu erzeugen (Kopp et al. 2004). Das Homologiemodell der PDZ-Domäne von *D*Lin-7 wurde in analoger Weise erzeugt. Durch die Kombination beider Homologiemodelle wurde die vollständige Strukturmodell des Proteins erhalten (siehe Abb. 6) bzw. der ExPASy Proteomics Server (Gasteiger et al. 2003) passte die komplette Proteinsequenz auf die Konsensusstrukturen der beiden Domänen an und modellierte per Energieminimierung die optimale thermostabile Tertiärstruktur. Für weitere Details siehe (Renner 2005).

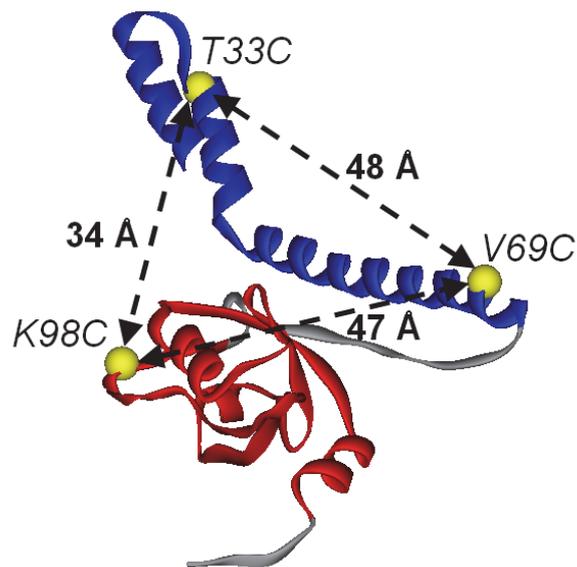


Abb. 6 Simulierte *D*Lin-7-Struktur: Der Cartoon basiert auf der Strukturvorhersage von SWISSModel unter Verwendung der PDB-Einträge (1RSO_B, 1VF6_A und 1VF6_C). Die L27-Domäne (Blau), die PDZ-Domäne (Rot) und die Positionen der eingebrachten Cysteine durch Punktmutationen (T33C, V69C und K98C, jeweils Gelb) sind hervorgehoben. Zusätzlich sind die C α -C α -Abstände (in Å) zwischen den jeweiligen Positionen angegeben.

2.7 Accessible Volume (AV) Simulation

Die räumliche Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde mit Hilfe des AV-Ansatzes simuliert. Die Farbstoffe werden durch eine Kugel mit einem empirischen Radius (R_{Dye}) angenähert. Dabei ist das zentrale Atom des Fluorophors durch einen flexiblen Linker einer bestimmten effektiven Länge (L_{link}) und Breite (w_{link}) mit dem Schwefelatom der Aminosäure Cystein verbunden (siehe Abb. 7).

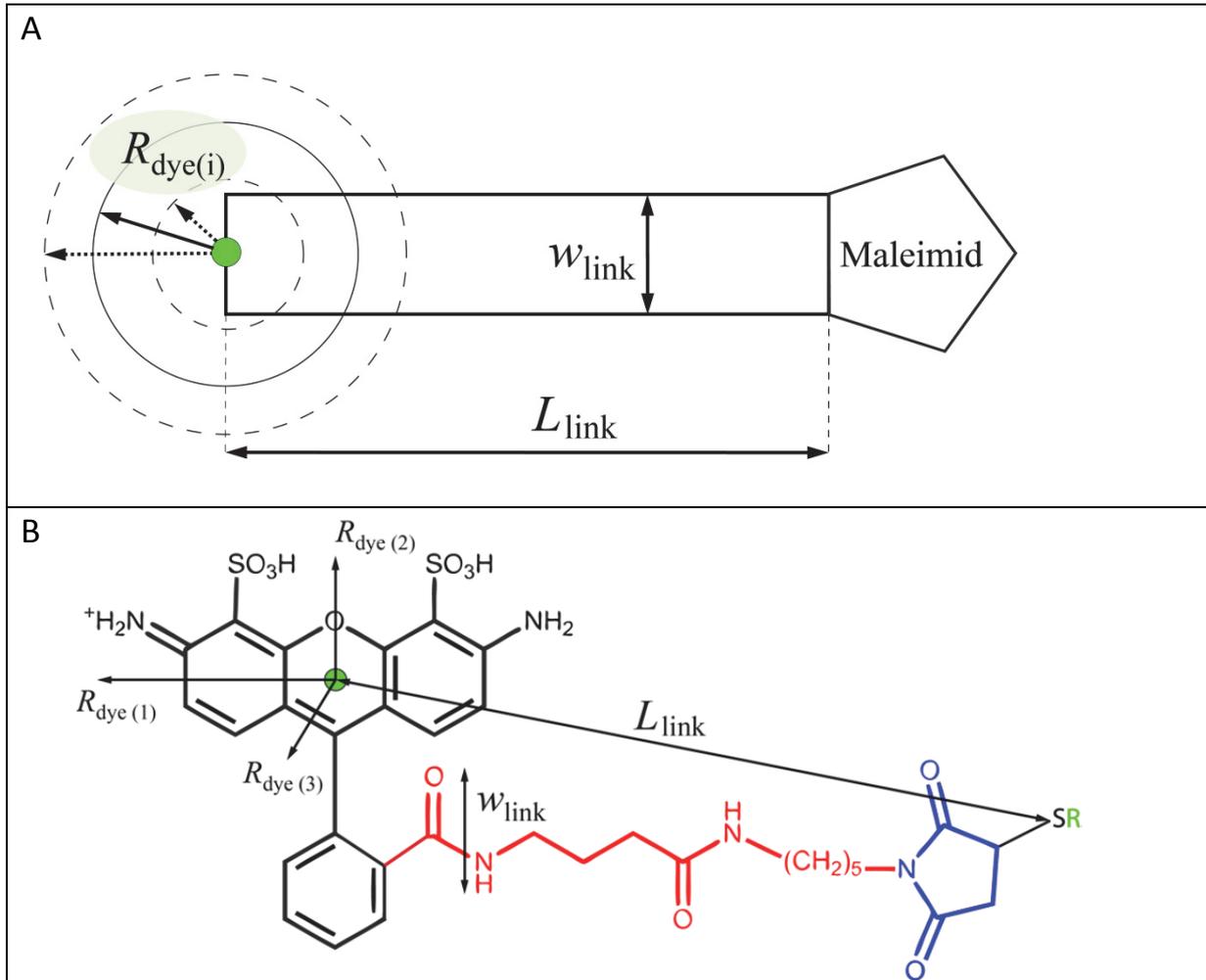


Abb. 7 Schematisch Skizze für die AV-Parameter (A) und Anwendung am Beispiel von Atto 488 (B): $R_{\text{dye}(i)}$, L_{link} und w_{link} sind durch Pfeile angezeigt. Der Chromophor Atto 488 (Schwarz), der Linker (Rot), das Maleimid (Blau) und das Schwefelatom (S, Schwarz) der Aminosäure Cystein (R, Grün) sind farblich hervorgehoben.

Ein geometrischer Suchalgorithmus bestimmt alle Farbstoffpositionen innerhalb der effektiven Linkerlänge vom Befestigungspunkt, die nicht zu sterischen Zusammenstößen mit der makromolekularen Oberfläche führen. Alle erlaubten Positionen werden als gleich wahrscheinlich betrachtet, um ein sterisch zugängliches Volumen für den Farbstoff (accessible volume, AV) zu definieren. Die Implementierung des AV-Algorithmus wird in (Kalinin et al. 2012) genauer beschrieben.

A

B

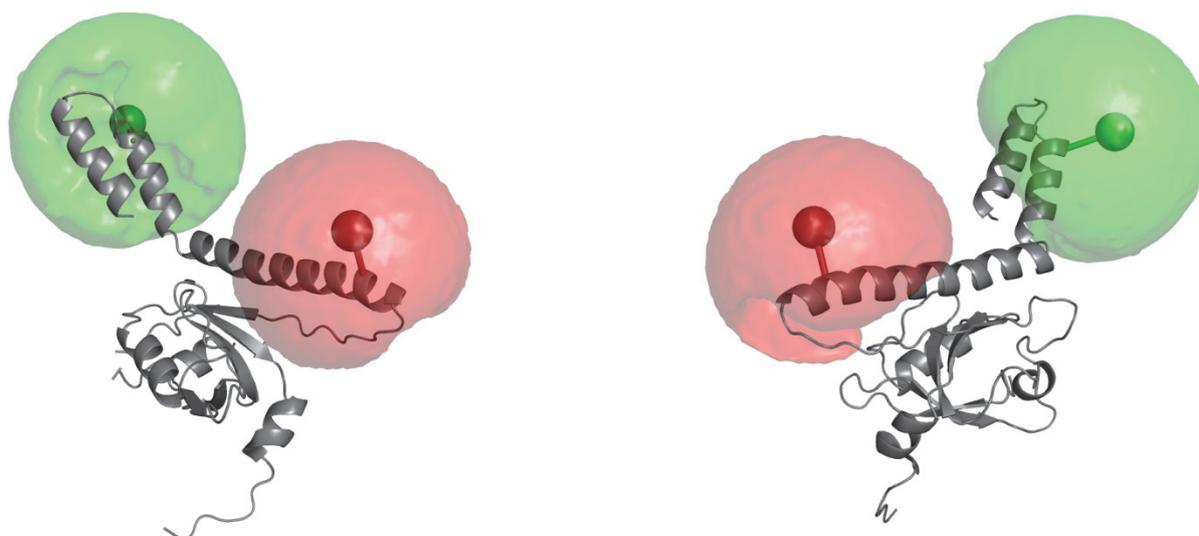


Abb. 8 3D-Modell der *DLin-7-T33C-V69C*-Variante mit Donor- und Akzeptorfarbstoff: Frontansicht (A) und 180° Drehung (B), *DLin-7* (Grau), Donorfarbstoff A488 (Grün) und Akzeptorfarbstoff A594 (Rot). Die mittleren Aufenthaltswahrscheinlichkeiten sind in Form von kleinen farbigen Kugeln dargestellt. Diese sind aus Illustrationsgründen mit den α -Atomen an den Positionen 33 und 69 mit *DLin-7* verbunden. Die grünen und roten Wolken zeigen die äußersten möglichen Farbstoffaufhaltswahrscheinlichkeiten des gewählten Zentrums an, die mit Hilfe der AV-Simulation berechnet wurden.

Das Ergebnis einer AV-Simulation von der *DLin-7-T33C-V69C*-Variante mit dem Donorfarbstoff Alexa 488 (A488) und dem Akzeptorfarbstoff Alexa 594 (A594) ist in Abb. 8 dargestellt. In Tab. 1, Tab. 2 und Tab. 3 sind die Parameter aufgelistet, die für die AV-Simulation verwendet wurden.

Farbstoff	L_{link}	R_{Dye}			W_{link}
	Maximaler Abstand zwischen Chromophor und Protein [Å]	Radien des Chromophors [Å]			Breite des Linkers [Å]
		$R_{\text{Dye}(1)}$	$R_{\text{Dye}(2)}$	$R_{\text{Dye}(3)}$	
Bodipy FL	14.9	4.45	0.9 [2.1, S115C]	3.2	4.5
A488	18.2	5.65	5.2	1.25	4.5
A594	17.4	8.05	4.15	2.05	4.5
A647	17.9	10.15	4.7	2.05	4.5

Tab. 1 Parameter für die AV-Berechnung: Die Farbstoffe wurden in ChemDraw vermessen. Aus sterischen Gründen wurde $R_{\text{Dye}(2)}$ von Bodipy FL für *DLin-7-S115C* auf 2.1 Å erhöht, damit eine Simulation möglich war.

Variante	T33C	V69C	K98C	S27C	S44C	S72C	S115C	A163C
Atom-ID der S-Atome	155	443	647	112	238	467	776 (no AV)	1137

Tab. 2 Atom-ID für die S-Atome jeder *DLin-7*-Variante. Als Grundlage diente die PDB-Datei von *DLin-7* aus der Homologiemodellierung

Farbstoffpaar	A647-Bodipy	A594-A488	A647-A488
R_0 [Å]	57	60	56

Tab. 3 Förster-Radien R_0 für die verwendeten Farbstoffpaare

3 Material

3.1 Technische Geräte

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Autoklav	Systec VE-150	Systec
FPLC-System	ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare
Elektrophorese (SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN II	Biorad
Gel / Fluoreszenz	Stella 3200	Raytest
Dokumentationsanlage		
Geldokumentationsanlage	Doc-Print II	Vilber Lourmat
Inkubationsschüttler	Minitron	Infors HT
Kammerdeckgläser	Nunc Lab-Tek II Chambered Coverglass, 8-Kammern (155409)	Thermo Scientific
Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL	105.250-QS	Hellma
Magnetrührer mit Heizplatte	VMS-A	VWR
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Schüttler	Orbitalschüttler 4010	Köttermann
Sonifikator	Sonopuls HD 2200, MS 72	Bandelin
Spektrometer (Absorption)	Photometer CO8000 Cell Density Meter	WPA Biowave
Spektrometer (Fluoreszenz)	FluoroLog®-3	Horiba Scientific
Spektrometer (UV-Vis)	Cary 300 Bio Spectrophotometer	Varian Inc.
Spektrometer (UV-Vis)	NanoDrop ND-1000	peqlab
Stromquelle	Power Pac 3000	BioRad
Taumler	Stuart® Rotator SB3	BioCote
Thermocycler	Primus 96 advanced	peqlab
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Ultraschallbad	Transsonic Digital S	Elma
Waage	Präzisionswaage CP224S	Sartorius®
Zentrifuge	Sorvall RC 3B Plus	Thermo Scientific
Zentrifuge	Sorvall EvolutionRC	Thermo Scientific
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus

3.2 Chemikalien

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Verbrauchskemikalien in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen:

Name	Hersteller
Acrylamid	Bio-Rad
Agar	Becton, Dickinson & Company
Agarose	Roth
Aktivkohle	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Glycerin	Roth
Harnstoff	Appli Chem
Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Company
Hydroxy(tetramethylchroman)carbonsäure (Trolox)	Sigma-Aldrich
Imidazol	Appli Chem
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	VRW
Natriumhydroxid (NaOH, Pellets)	J.T.Baker
Salzsäure 37%-ige (HCl)	VWR
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	VWR
Trypton	Becton, Dickinson & Company
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Roth

3.3 Antibiotika

Name	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth
Chloramphenicol	Carl Roth
Kanamycin Sulfat	Fluka
Tetracyclin Hydrochlorid	Fluka

3.4 Enzyme & Proteine

Name	Hersteller
dNTP-Mix	Fermentas
Pfu DNA Polymerase	Fermentas
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
Bovine serum albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth
Lysozym	Roche

Alle PCR-basierenden Reaktionen wurden mit der Pfu DNA Polymerase und den dazugehörigen Puffern von Fermentas durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden von New England BioLabs und Fermentas benutzt.

3.5 Lösungen

Name	Produktnummer & Größe	Hersteller
10x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer	161-0772 (5 l)	Biorad
30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1	161-0156 (500 ml)	Biorad
50x TAE-Puffer	106174 (1 l)	Merck
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	SM0311 (5x 50 µg)	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	SM0671 (2x 250µl)	Fermentas
SimplyBlue™ SafeStain	LC6065 (3.5 l)	Invitrogen

Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit deionisiertem H₂O (dH₂O) angesetzt, autoklaviert oder falls nötig steril filtriert.

3.6 Kits

Kit-Name	Produktnummer	Hersteller
HiSpeed Plasmid Midi Kit	12643	Qiagen
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	740609.50	Macherey Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	200522	Agilent Technologies

3.7 Filtermaterial

Name	Produktnummer & Größe	Hersteller
Dialyseschlauch (Spectra/Por 4)	132706 (MWCO 12-14 kDa)	Spectrum Labs
Membran-Filter	513-2151 (Porengröße 0.2 µm)	VWR (Nalgene)
Spritzenvorsatzfilter	514-1112 (Porengröße 0.2 µm)	VWR (Whatman)
Zentrifugal-Filter (Centricon, Amicon Ultra-15)	UFC901024 (MWCO 10 kDa)	Millipore
Zentrifugal-Filter (Centricon, Amicon Ultra-4)	UFC801024 (MWCO 10 kDa)	Millipore

3.8 Säulen

Name	Produktnummer & Größe	Hersteller
HiPrep™ 26/10 Desalting Column	17-5087-01 (1x 53 ml)	GE Healthcare
HisTrap™ FF Column	17-5255-01 (5x 5 ml)	GE Healthcare
HiTrap Capto Q	11-0013-03 (5x 5 ml)	GE Healthcare
MBPTrap HP	28-9187-79 (1x 5 ml)	GE Healthcare
PD-10 Desalting Columns	17-0851-01 (30)	GE Healthcare

3.9 Plasmide

Name	Resistenz	N-Tag	C-Tag	Hersteller
pET-22b(+)	amp	-	His	Novagen
pET-29b(+)	kan	-	His	Novagen
pET-32a(+)	amp	Trx	His	Novagen
pET-41a(+)	kan	GST	His	Novagen
pET-43a(+)	amp	Nus	His	Novagen
pET-51b(+)	amp	Strep	His	Novagen
pMAL-c4E	amp	malE	-	NEB
pQE-30 Xa	amp	His	-	Qiagen

3.10 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Hersteller
BL21 (DH3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
DH5alpha	F ⁻ endA1 <i>glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> <i>φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-</i>	Invitrogen
M15[pREP4]	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺ [pREP4, lacI, kand^r]</i>	Qiagen
XL1blue	endA1 <i>gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10</i> <i>proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Promega

3.11 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden mittels Clone Manager 7 (Scientific & Educational Software) generiert und über metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt.

3.11.1 Primer für DLin-7-Konstrukte mit verschiedenen Löslichkeitstags

Der pQE-30 XA-DLin-7-V69C-Plasmid wurde in allen Fällen als Startkonstrukt verwendet.

Zielkonstrukt 1 **Thioredoxin (Trx) in pET-32a(+)**
 Aufbau T7 – Trx – His – thrombin – [BstBI] – DLin-7 – [BlnI]

Primernamen	Enzym	Primersequenz: 5' - 3'
pET-32a 5'	BstBI TT/CGAA	TT AAT TTC GAA GCA GAA CCA CTG ACT T A E P L T
pET-32a 3'	BlnI GC/TGAGC	TAT AT G CTC AGC TTA TTG GCG ACG ACG T

Zielkonstrukt 2 **Glutathion-S-Transferase (GST) in pET-41a(+)**
 Aufbau T7 – GST – His – thrombin – [MfeI] – DLin-7 – [AvrII]

Zielkonstrukt 3 **Nus in pET-41a(+)**
 Aufbau T7 – [NdeI] - Nus – His – [SacII]– thrombin – [MfeI] – DLin-7 – [AvrII]

Primernamen	Enzym	Primersequenz: 5' - 3'
pET-41a 5'	MfeI C/AATTG	G CCT A CA ATT G CA GAA CCA CTG ACT TT P T I A E P L T
pET-41a 3'	AvrII C/CTAGG	AT ATA CCT AGG TTA TTG GCG ACG ACG T

3.11.2 Mutageneseprimer

Position	Primername	Primersequenz: 5' - 3'
C33T	t97a_g98c_c99a 5'	GGCGACTTCCCTACGACA ⁺ AAACTGGCCGCCCTG
C33T	t97a_g98c_c99a 3'	CAGGGCGGCCAGTTT ⁺ TGTCGTAGGGAAGTCGCC
C69V	t205g_g206t_c207g 5'	CAGGGCTCACACGACGTG ⁺ AGGGCATCCGCCACT
C69V	t205g_g206t_c207g 3'	AGTGGCGGATGCCCTCAC ⁺ GTCGTGTGAGCCCTG
T33C	a97t_c98g_a99c 5'	GGCGACTTCCCTACGTGC ⁺ AAACTGGCCGCCCTG
T33C	a97t_c98g_a99c 3'	CAGGGCGGCCAGTTT ⁺ GCA ⁺ CGTAGGGAAGTCGCC
S27C	a79t_t81c 5'	GAAAAGCTGCAAGCGTGC ⁺ GGCGACTTCCCTACG
S27C	a79t_t81c 3'	CGTAGGGAAGTCGCCGCA ⁺ CGCTTGCAGCTTTTC
S44C	c131g_g132c 5'	GCAAAAGGTGCTCAACTGC ⁺ GACTTCATGACCTCCGT
S44C	c131g_g132c 3'	ACGGAGGTCATGAAGTCGC ⁺ AGTTGAGCACCTTTTGC
S72C	c215g 5'	CACGACGTGAGGGCATGC ⁺ CGCCACTGC
S72C	c215g 3'	GCAGTGGCGCAT ⁺ TGCCCTCACGTCGTG
S115C	c344g_g345c 5'	GTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAACTGC ⁺ CCCATCTATATAT
S115C	c344g_g345c 3'	ATATATAGATGGG ⁺ GC ⁺ AGTTTTGCTCCTTGCCCCCATTAC
A163C	g487t_c488g_t489c 5'	GAGAAGCCGTAGAGCTATTAAAGCAA ⁺ TGC ⁺ GTCGGATCTGTAAAG
A163C	g487t_c488g_t489c 3'	CTTTACAGATCCGACGCA ⁺ TTGCTTTAATAGCTCTACGGCCTTCTC

3.12 Farbstoffe

Donorfarbstoff: BODIPY® FL N-(2-Aminoethyl) Maleimid

Anregungsmaximum [nm]	504
Emissionsmaximum [nm]	510
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	79000
Fluoreszenzquantenausbeute ϕ	0.94
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	5.7
Korrekturfaktor (CF) für $\lambda = 280$ nm	0.04
Nettoladung	0
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C2/A9
Invitrogen-Bestellnummer	B-10250

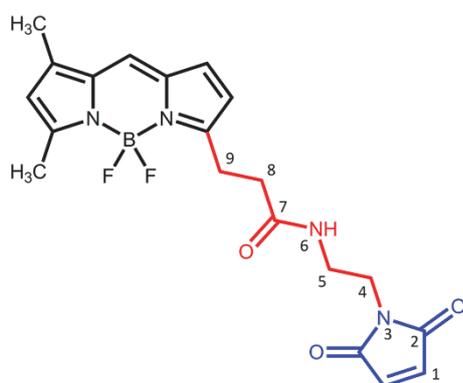


Abb. 9 BODIPY® FL N-(2-Aminoethyl) Maleimid (Herstellerangaben). Fluorophor (Schwarz), Linker (Rot) und Maleimid (Blau). A9 bezieht sich auf die Atomanzahl zwischen der chemischen Kopplungsstelle am Maleimid und dem Fluorophor.

Donorfarbstoff: Alexa Fluor® 488 C₅ Maleimid

Anregungsmaximum [nm]	494
Emissionsmaximum [nm]	519
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	73000
Fluoreszenzquantenausbeute ϕ	0.92
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	4.1
Korrekturfaktor (CF) für $\lambda = 280$ nm	0.11
Nettoladung	-1
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C5/A10
Invitrogen-Bestellnummer	A-10254

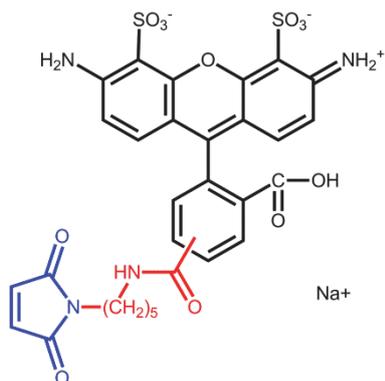


Abb. 10 Alexa Fluor® 488 C₅ Maleimid (Herstellerangaben)

Donorfarbstoff: Atto 488 Maleimid (MFP488)

Anregungsmaximum [nm]	501
Emissionsmaximum [nm]	523
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	90000
Fluoreszenzquantenausbeute ϕ	0.8
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	4.1
Korrekturfaktor (CF) für $\lambda = 280$ nm	0.10
Nettoladung	-1
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C5/A15
Atto-Tec-Bestellnummer	AD 488-41

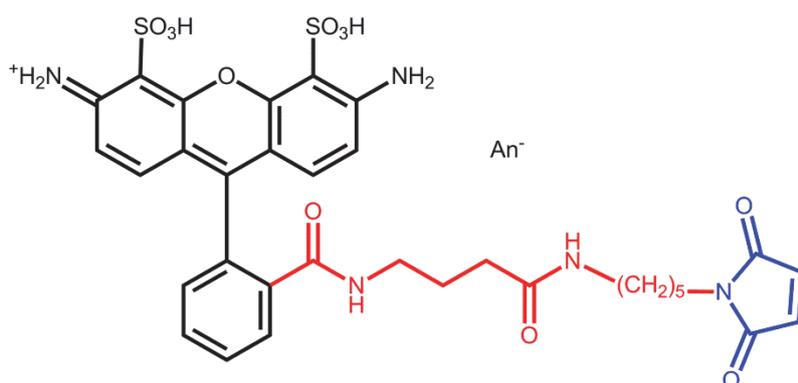
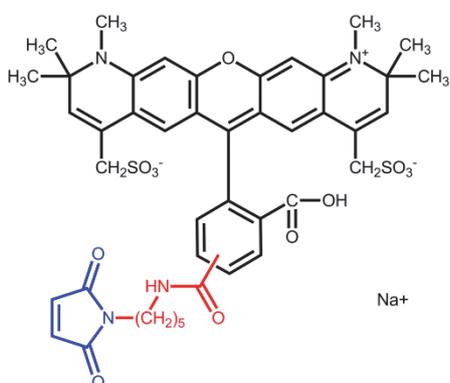


Abb. 11 Atto 488 Maleimid (Herstellerangaben)

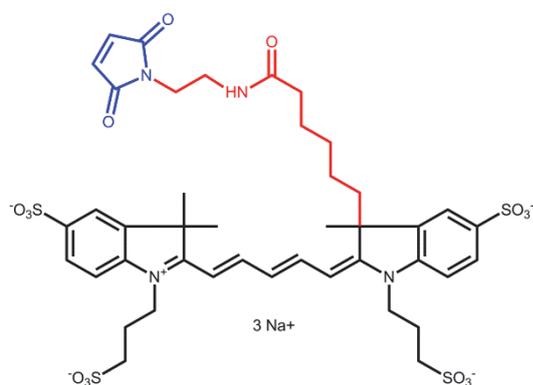
Akzeptorfarbstoff: Alexa Fluor® 594 C₅ Maleimid

Anregungsmaximum [nm]	590
Emissionsmaximum [nm]	617
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	92000
Fluoreszenzquantenausbeute ϕ	0.66
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	3.9
Korrekturfaktor (CF) für $\lambda = 280$ nm	0.56
Nettoladung	-1
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C5/A10
Invitrogen-Bestellnummer	A-10256

Abb. 12 Alexa Fluor® 594 C₅ Maleimid (Herstellerangaben)

Akzeptorfarbstoff: Alexa Fluor® 647 C₂ Maleimid

Anregungsmaximum [nm]	651
Emissionsmaximum [nm]	672
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	250000
Fluoreszenzquantenausbeute ϕ	0.33
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	1
Korrekturfaktor (CF) für $\lambda = 280$ nm	0.03
Nettoladung	-3
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C2/A12
Invitrogen-Bestellnummer	A-20347

Abb. 13 Alexa Fluor® 647 C₂ Maleimid (Herstellerangaben)**Akzeptorfarbstoff: Atto 647 N Maleimid**

Anregungsmaximum [nm]	644
Emissionsmaximum [nm]	669
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	150000
Fluoreszenzquantenausbeute ϕ	0.65
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	3.5
Korrekturfaktor (CF) für $\lambda = 280$ nm	0.05
Nettoladung	1
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C4/A14
Atto-Tec -Bestellnummer	AD 647N-41

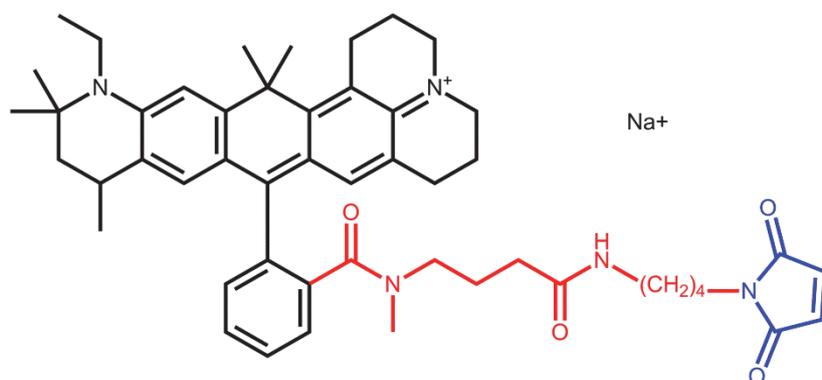


Abb. 14 Atto 647 N Maleimid (Herstellerangaben)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifizierung von definierten DNA-Bereichen aus einem Gemisch von DNA-Molekülen. Hierfür macht man sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, einzelsträngige Matrizen-DNA zu einem Doppelstrang zu katalysieren, sofern ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Startermolekül („Primer“) zur Verfügung steht. Als Primer dienen zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide, die in den Randbereichen komplementär zum Matrizenstrang sind und unter geeigneten Bedingungen sequenzspezifisch an diesen binden.

Zur Amplifizierung des gewünschten DNA-Bereiches wird ein thermostabiles Enzym, die so genannte DNA-Polymerase, verwendet, die aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-DNA-Polymerase) gewonnen wird. Diese verfügt über eine Korrekturfunktion zur Minimierung der Fehlerrate beim Amplifizieren. Neben den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten, kurz dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), werden für eine standardisierte PCR eine DNA-Polymerase, spezifischer Puffer und Mg^{2+} -Ionen benötigt, welche als Co-Faktoren für die Katalyse dienen.

Das eigentliche PCR-Programm läuft in drei Schritten ab: Beim Denaturierungsschritt trennen sich die beiden Matrizenstränge durch Erhitzen voneinander. Die anschließende Absenkung auf eine für die Primer spezifische Temperatur führt dazu, dass es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Primer und der einzelsträngigen Matrizen-DNA kommt. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet und erfolgt gleichzeitig an beiden Einzelsträngen der Matrizen-DNA. Im darauffolgenden Elongationsschritt wird die Temperatur auf das Optimum der *Pfu*-Polymerase erhöht, wodurch die Primer verlängert werden, und am Ende dieses Schrittes zwei doppelsträngige Kopien der Template-DNA vorliegen, welche wiederum als Vorlage für den nächsten PCR-Zyklus dienen. Nach 30-40 Zyklen ist eine ausreichend große Menge an DNA für die Klonierungsexperimente erreicht (Saiki et al. 1985).

Die PCR erfolgte unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Fermentas) in einem PCR-Automaten (Primus 96 advanced, Peqlab). Ein Standard-PCR-Ansatz (für 5x 50 μ l) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen, welcher unter den darauffolgenden Standardbedingungen durchgeführt wurde.

PCR-Ansatz:

5 µl	DNA (50 ng/µl)
5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2.5 U/µl)
25 µl	<i>Pfu</i> -Puffer (10x, mit MgSO ₄)
15 µl	DMSO (6%)
12,5 µl	5'-Primer (50 µmol)
12,5 µl	3'-Primer (50 µmol)
5 µl	dNTP Mix (0.2 mM von jedem)
170 µl	dH ₂ O
Σ 250 µl	5x 50 µl Ansätze

PCR-Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur	
1	5 min	95 °C	Initialisierung
2	45 s	98 °C	Denaturierung
3	80 s	Gradient (59 °C – 69 °C)	Hybridisierung
4	45 s	72 °C	Elongation
5	Goto 2	30 Mal	
6	10 min	72 °C	
7	Hold	4 °C	

Die *Pfu*-Polymerase katalysiert in 60 s 500 Basenpaare inklusive Korrekturlesung (Proof-Reading). Das zu amplifizierende *DLin-7*-Fragment ist 195 AS = 585 bp lang. Die benötigte Zeit läge somit bei $585 \text{ bp} / 500 \text{ bp} * 60 \text{ s} = 70.2 \text{ s}$. Es wurden 80 sec eingestellt.

Anschließend wurde das PCR clean-up Protokoll aus dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte abweichend mit 35 µl auf 70 °C vorgewärmten dH₂O.

4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Standardpräparation von Plasmid-DNA basiert auf der Methode der alkalischen Lyse (Bimboim et al. 1979). Für kleinere Plasmidmengen (Mini-Präp) erfolgte die Präparation mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen). Größere Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 200 µg) wurden unter der Verwendung des HiSpeed Plasmid Midi Kits (Quiagen) erzeugt. In beiden Fällen wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls verfahren.

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Die Gele bestehen aus 1% Agarose, welche zuvor in 1x TAE-Puffer (pH 8.3 Tris-Acetat-EDTA, Merck) gelöst und erhitzt wurde. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Zugabe einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0.5% (w/v) Ethidiumbromid, 1 µl / 10 ml flüssiger Agaroselösung). Die Agarosegele werden auf einen waagrecht liegenden Gelträger gegossen und anschließend nach Erstarren in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Gelkammer überführt. In die durch einen Kamm ins Gel eingefügten Taschen werden sowohl die DNA-Proben, welche zuvor mit 6x Blaumarker versetzt werden, als auch ein Längenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (100 V für 20 min) werden die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix gezogen werden, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller durch das Gel wandern und damit eine Größenauftrennung erfolgt. Die DNA-Fragmente können Dank des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids unter einer UV-Lampe visualisiert und mit Hilfe einer Gel-Dokumentationsanlage DOC-Print 2 (Vilbert Lourmat GmbH) elektronisch dokumentiert werden.

4.1.4 Elution & Konzentrationsbestimmung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Verwendung des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel) erfolgte anschließend nach Herstellerangaben die Elution der DNA aus den Gelen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 (peqlab) bestimmt.

4.1.5 Restriktion und Ligation von DNA

Die gezielte Spaltung von Plasmid- bzw. Fragment-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Standardenzyme von New England BioLabs, FastDigest-Enzyme von Fermentas). Pro Spaltungsansatz wurde 1 U pro µg DNA eingesetzt und anschließend 1 h bei 37 °C inkubiert. Abhängig vom Enzym wurde nach der Spaltung eine Inaktivierung durch 20 minütiges Erhitzen auf 65 °C durchgeführt.

Die Ligation von DNA-Fragmenten (Inserts) und Plasmid-DNA geschah mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England BioLabs). Die in der Reaktion eingesetzte Plasmid-zu-Insert Menge variiert dabei in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4. Die Ligation lief in 1 h bei 37 °C nach Herstellerangaben mit anschließender Hitzedeaktivierung bei 65 °C für 10 min ab.

4.1.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde extern durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 20 µl der aus der Midi-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA in einer Konzentration von 30-100 ng/µl eingeschickt. Die Übermittlung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte elektronisch.

4.1.7 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Je 1 µl aus der Midi-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA wurde zu einem Aliquot (200 µl) an kompetenten Zellen gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec erfolgte die Zugabe von 700 µl LB (Luria Bertani) Medium und die anschließende phänische Expression bei 37 °C für 1 h im Schüttelinkubator. 50 µl bzw. 200 µl des Transformationsansatzes wurden direkt auf eine Ampicillin(100 µg/ml)- oder Kanamycin(50 µg/ml)-Agarplatte ausplattiert. Die Wahl der Agarplatte richtete sich dabei nach der Antibiotikumresistenz der jeweiligen Plasmid-DNA. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht (Hanahan 1983).

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Induzierte Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Expression wurden *E. coli* BL21 (DE3)-, M15[pREP4] und XL1blue- Zellen verwendet.

LB Medium	LB Agarplatten	1000x Stock
10 g/L Typton	LB Medium	100 mg/ml Ampicillin
5 g/L Yeast Extract	1.5 % (w/v) Agar	50 mg/ml Kanamycin
10 g/L NaCl		1 mol/l IPTG
1 NaOH Pellet		

Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin. Die Vorkulturen (je 100 ml) wurden entweder mit einem Klon transformierter Zellen (siehe 4.1.7) oder 50 µl einer Kryokultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm (rounds per minute) im Inkubator geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen (3 x 2L) mit dem entsprechenden Volumen einer OD₆₀₀ von 0.09 aus der Vorkultur angeimpft. Zusätzlich wurden Kryokulturen angelegt, indem 1.8 ml Vorkultur mit 0.2 ml Glycerin versetzt bei -80 °C gelagert wurden. Nach 2h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm wurde die Expression bei einer OD₆₀₀ von 0.5 (+/- 0.1) durch Zugabe von IPTG (1 mM) und einer Temperaturerniedrigung auf 30 °C induziert. Nach 4h Expression wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt und anschließend die Zellen bei 10.000 rpm für 20 min (Evolution RC, Rotor SLA 3000) geerntet. Nach der Gewichtsbestimmung des Zellpellets wurden die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Durch die stündliche Entnahme einer Probe aus den Hauptkulturen wurde die Expression durch die denaturierende SDS-PAGE kontrolliert (siehe 4.2.2).

4.2.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine binden SDS (Natriumdodecylsulfat) zu einem negativ geladenen SDS-Proteinkomplex, wobei die Proteine denaturiert werden. Bei der SDS-PAGE wandert der SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht auf (Rehm 2002).

Die Proteinproben der Expression, Homogenisierung und Aufreinigung wurden mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 98 °C aufgeköcht. Nach kurzem Abzentrifugieren (2 min, 13.000 rpm) erfolgte die Beladung des Sammelgels. Zusätzlich wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) als Längenstandard aufgetragen.

SDS-Probenpuffer	1x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer
50 mM Tris, pH 6.8	25 mM Tris, pH 8.3
10% (v/v) Glycerol	192 mM Glycin
4% (v/v) SDS	0.1%(w/v) SDS
2% (v/v) β -Mercaptoethanol	
0.03% (w/v) Bromphenolblau	

Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) System, indem die beladenen Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, in dieses eingespannt und mit Laufpuffer gefüllt wurde. Durch die Anlegung einer elektrischen Spannung erfolgte die Auftrennung der Proben (100 V für 10 min = Probenfokussierung im Sammelgel, 200 V für 40-45 min = Auftrennung im Trenngel). Anschließend erfolgte die Färbung der Gele mit SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Zur Dokumentation wurden die angefärbten Gele gescannt und so digital archiviert.

Chemikalie	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid (30%, 29:1)	4 ml	5 ml	830 μ l
1 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml	---
1 M Tris-HCl, pH 6.8	---	---	626 μ l
dH ₂ O	2.09 ml	1.09 ml	3.459 ml
SDS (20%)	50 μ l	50 μ l	25 μ l
APS (10%)	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	5 ml

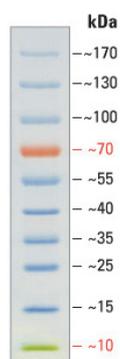


Abb. 15 Proteingrößenstandard: SDS-PAGE-Bandenprofile des PageRuler Prestained Protein Ladders (Fermentas).

4.2.3 Zellaufschluss von *E. coli*

Die aus 4.2.1 gewonnenen Zellpellets wurden mit 25 ml (5x an Gewicht entsprechenden Volumen) Lysispuffer (Nativ: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl; Denaturierend: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 6 M Urea, pH 7.5), welcher zusätzlich 1 mg/ml Lysozym (Roche) enthielt, resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Das mechanische Aufbrechen der Zellen erfolgte mittels Ultraschall über den Sonifikator Sonoplus HD 2200, MS 72 (Bandelin). Die Proben wurden jeweils 3x für 45 s plus 60 s Ruhephase mit 50 % Pulsrate und 50 % Leistung auf Eis mit Ultraschall beschallt. Bei 10.000 rpm für 30 min wurden die Suspension in einer Sorvall EvolutionRC (Thermo Scientific) mit einem SS 34 Rotor (Thermo Scientific) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (zellfreier Extrakt) für die Proteinaufreinigung weiter verwendet.

4.2.4 Immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie (IMAC)

Die IMAC wird am häufigsten zur schnellen Isolierung rekombinanter Proteine, die einen Polyhistidin-affinitätsanker (His-Tag) enthalten, eingesetzt. Bei diesem Verfahren ist eine metallkomplexierende Gruppe am Säulenmaterial immobilisiert. Multivalente Übergangsmetallionen wie Ni^{2+} werden in der Weise gebunden, dass eine oder mehrere Koordinationsstellen für eine Wechselwirkung mit basischen Gruppierungen von Proteinen vorhanden sind. Wegen der nicht so selektiven Bindung ist zur Trennung der gebundenen Adsorbenten eine Gradientenelution notwendig (Fallert-Müller 2004).

Die *DLin-7*-Konstrukte besitzen basierend auf dem jeweiligen Expressionsvektor einen 6x N-terminalen oder 6x C-terminalen Histidinrest (His-Tag). Beide lassen sich sowohl nativ als auch denaturierend unter der Verwendung einer ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) und einer bzw. zwei hintereinander geschalteten 5 ml HisTrap™ FF Column (GE Healthcare) aufreinigen. Im ersten Schritt erfolgte die Äquilibrierung der Säulen mit 5 Säulenvolumen Lysispuffer. Für die jeweiligen Pufferzusammensetzungen siehe Abschnitt 4.2.9. Der zellfreie Extrakt wurde über die Pufferleitung A auf die Säule aufgetragen und mit dem Anstieg der Absorption bei 280 nm wurde der Durchfluss gesammelt. Nach dem Beladen wurde die Säule mit Lysispuffer gespült und die Waschfraktion mit dem Einsetzen des Abfalls des Absorptionssignals bei 280 nm gesammelt. Der Waschvorgang wurde solange durchgeführt bis das Absorptionssignal eine vergleichbare Intensität wie vor der Beladung der Säule aufwies. Durch einen Imidazolgradienten über eine Länge von 10 Säulenvolumen von 0 bis 300 mM Imidazol wurden die His-getaggten Proteine von der Ni-NTA-Matrix wieder eluiert bzw. in 2 ml Einheiten fraktioniert. Proben vom Rohextrakt, Durchfluss, Waschschrift und Fraktionen der Elution wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um so die Reinheit der Proteine zu überprüfen.

4.2.5 Dialyse

Die Fraktionen mit der höchsten Proteinreinheit wurden vereinigt und in einen Dialyseschlauch Spectra/Por 4 (Spectrum Labs) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 12-14 kDa überführt, welcher zuvor 10 min in dH₂O rehydriert wurde. Die eigentliche Dialyse zur Entfernung von Imidazol vollzog sich über Nacht bei 4 °C in 4 Liter Dialysepuffer.

4.2.6 Gelfiltrations- bzw. Größenausschlusschromatographie (GFC)

Bei dieser Chromatographietechnik, der sogenannten Gelfiltration, werden die Moleküle basierend auf den verschiedenen Größen aufgetrennt. Das verwendete Säulenmaterial Sephadex erlaubt eine schnelle Trennung zwischen Substanzen mit großem und kleinem molekularem Gewicht. Außerdem dient es zum Entsalzen der Proben und zum Pufferaustausch. Kleine Moleküle, wie Salz oder freier Farbstoff oder andere kleine Verunreinigungen, werden effizient von den groß molekular gewichtigen Substanzen separiert. Moleküle, die größer als die größten Poren in der Sephadexmatrix sind, werden abgesondert von der Matrix und als erstes im oder direkt nach dem Hohlraumvolumen (void volume) eluiert. Als Hohlraumvolumen wird das Säulenvolumen außerhalb der Sephadexmatrix bezeichnet. Moleküle, die kleiner als die größten Poren der Sephadexmatrix sind, penetrieren die Matrixporen unterschiedlich stark. Sie haben einen größeren Zugang zum Säulenvolumen als die großen Moleküle und werden daher nach den großen Molekülen eluiert, kurz bevor ein gesamtes Säulenvolumen an Puffer die Säule passiert hat (GE Healthcare 2007).

Das dialysierte Protein wurde mit 20 mM β -Mercaptoethanol (β -ME) für 1h bei 4 °C versetzt, um die Reduktion von Disulfidbrücken zu gewährleisten, damit die Cysteine für die Kopplungsreaktion des Farbstoffes an das Protein frei zugänglich sind. Über PD-10 Desalting Säulen (GE Healthcare) wurde anschließend das β -ME schnell entfernt und die Farbstoffreaktion sofort gestartet. Freier Farbstoff wurde anschließend mit Hilfe einer HiPrep™ 26/10 Desalting Säule (GE Healthcare) vom markierten Protein getrennt. Dabei wurde markiertes Protein zuerst eluiert, bevor die Fraktion mit dem freien Farbstoff folgte.

4.2.7 Ionenaustauschchromatographie

Bei diesem chromatographischen Verfahren, werden die Proteine anhand ihrer Ladung getrennt. Die elektrostatische Wechselwirkung erfolgt zwischen den Probemolekülen und den an der Agarosematrix gebundenen funktionellen Gruppen (Ligand Q, starkes Anion) der stationären Phase. Die Salzionen in der mobilen Phase konkurrieren mit den Probemolekülen um die Ladung der stationären Phase. Durch eine erhöhte Salzkonzentration werden die Probemoleküle von den Ladungen verdrängt und eluiert (Lottspeich F. 2006).

Eine 5 ml HiTrap Capto Q Säule (GE Healthcare) wurde dazu verwendet doppelt, einfach und unmarkiertes Protein zu trennen. Die Capto Q Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Puffer 1, welcher kein Salz enthielt, equilibriert. Die 3 ml Probenaufragung erfolgte direkt auf der Säule und nicht über die A Linie der ÄktaPrime. Über einen Salzgradienten (0 M bis 0.5 M NaCl) von 10 Säulenvolumen (50 ml) wurden die mit Farbstoff unterschiedlich stark markierten Proteinen von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt.

4.2.8 Proteinaufkonzentrierung

Bei zu geringer Proteinkonzentration wurde auf Zentrifugalfilter, den Centricon Amicon Ultra-15 und Amicon Ultra-4 (Millipore) zurückgegriffen. Beide Filter besaßen eine Ausschlussgröße von 10 kDa. Dazu wurden die Filtereinheiten mit 15 ml bzw. 4 ml Proteinlösung gefüllt und in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) bei 4 °C und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (rcf) von 4300 für 20 min zentrifugiert. Bei Bedarf wurde dieser Vorgang wiederholt.

4.2.9 Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die aufgereinigten *DLin-7*-Proteine wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, bei denen das Fluorophor-Maleimid eine spezifische Kopplung mit der Thiolgruppe von Cysteinen eingeht:

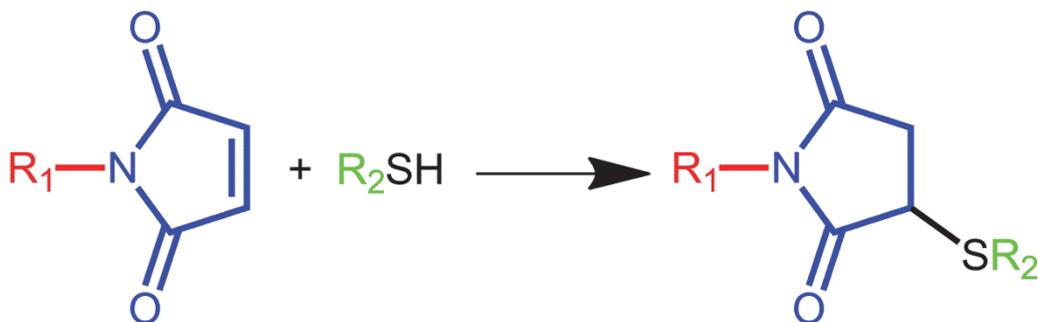


Abb. 16 Chemische Reaktion eines Thiols mit einem Maleimid mit den Substituenten R_1 und R_2

Die Einzel- und Doppelcysteinvarianten von *DLin-7* wurden unterschiedlich mit Farbstoff markiert: Einzelvarianten wurden jeweils mit einem Farbstoff-zu-Protein-Verhältnis von 5:1 mit einem Donor- oder Akzeptorfarbstoff markiert. Bei den Doppelcysteinvarianten dagegen wurden im ersten Schritt mit 0.8x Überschuss an Akzeptorfarbstoff und im zweiten Markierungsschritt mit 5x Donorfarbstoff gearbeitet. Testmarkierungen haben gezeigt, dass die Akzeptor-Donor-Markierung eine bessere Auftrennung während der Markierung und einen höheren Markierungsgrad aufwies als die Donor-Akzeptor-Markierung. Der gesamte Proteinmarkierungsprozess ist zur besseren Übersicht im Flussdiagramm (Abb. 17) dargestellt. Der Markierungsgrad der Proteine wurde anschließend mittels

eines Absorptionsspektrums bestimmt. Für die Berechnung wurde die Proteinabsorption bei 280 nm, die Absorption im Maximum des Farbstoffes und die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe (siehe Werte in 3.12) und vom Protein (Berechnung über ExpASy-ProtParam (Walker 2005), siehe Anhang, <http://web.expasy.org/protparam>) benötigt. Zur genauen Berechnung siehe 4.2.10.

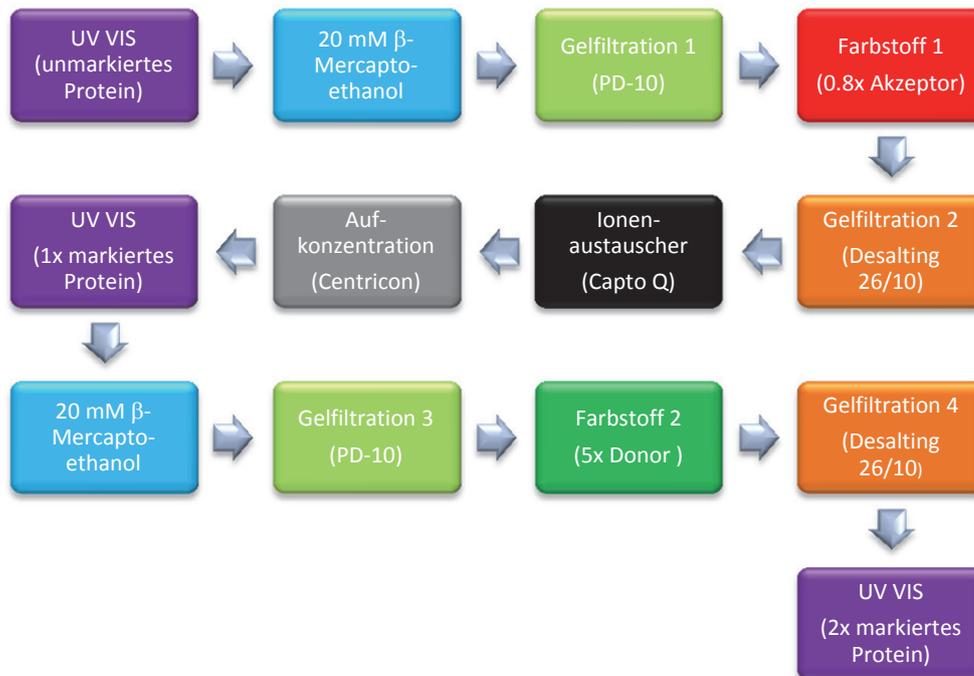


Abb. 17 Flussdiagramm für eine Proteinfarbstoffmarkierung: Das Diagramm zeigt die einzelnen Schritte einer Farbstoffmarkierung für eine *D*Lin-7-Doppelcysteinvariante. Das Diagramm ist auch für Einzelcysteinvarianten anwendbar, indem nach der Gelfiltration 1 direkt zu Farbstoff 2 (5x Donor oder alternativ 5x Akzeptor) gesprungen wird.

Die verschiedenen Puffer und deren chemische Zusammensetzung, die während der Proteinfarbstoffmarkierung verwendet wurden, sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

Verwendung/ Substanz	Lysis (denat.)	Elution	Dialyse	Gelfiltration		Ionenaustauscher		Nativ
				1 & 3	2 & 4			
Tris-HCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	20 mM	20 mM	20 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM	-	-	1 M	300 mM
Urea	6 M	2 M	2 M	2 M	2 M	2 M	2 M	
Imidazol	-	500 mM	-	-	-	-	-	
pH (RT)	7.5	7.5	7.5	7.5/7.9	7.5/7.9	7.9	7.9	7.5
Säule	-	His-Trap	-	PD-10	26/10	Capto Q	Capto Q	-

4.2.10 Abschätzung des Markierungsgrades

Abb. 18 zeigt das Absorptionsspektrum der Proteinprobe *D*Lin-7-S72C-S115C markiert mit A488 als Donor- und A647 als Akzeptorfarbstoff. Für die Abschätzung des Markierungsgrades werden die Extinktionskoeffizienten (Donor, Akzeptor und Protein), die Korrekturfaktoren (*cf*) für Donor und Akzeptor und die relativen Absorptionswerte bei 280 nm, 494 nm und 651 nm (bezogen auf das jeweilige Absorptionsmaximum) benötigt.

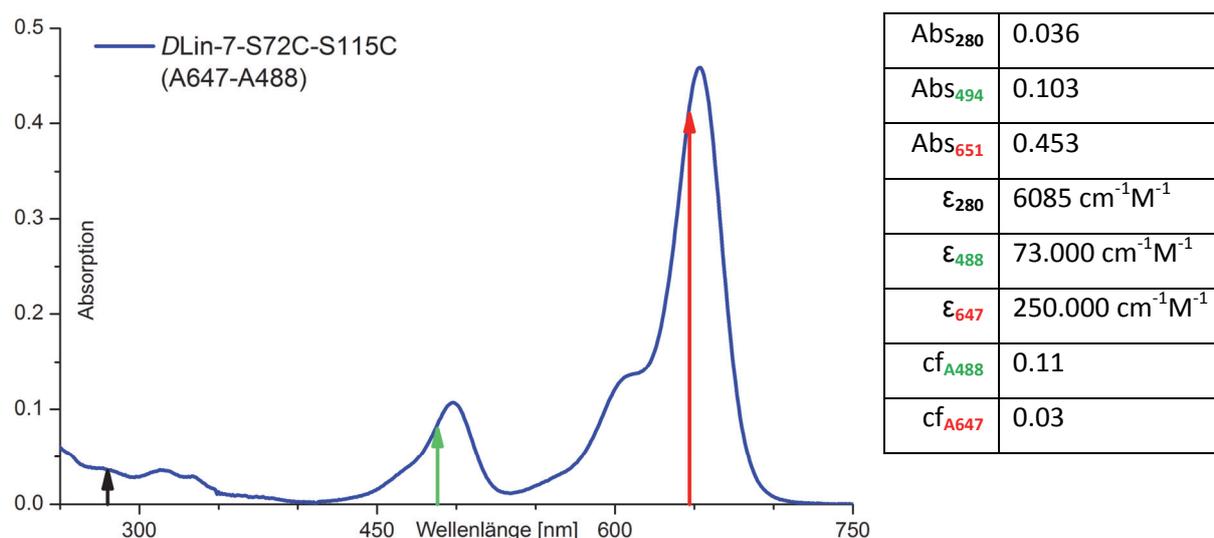


Abb. 18 Absorptionsspektrum von *D*Lin-7-S72C-S115C markiert mit A488 und A647: 50 µl Probe wurde in 150 µl Puffer (4x Verdünnung) gemessen. Zusätzlich sind die Extinktionskoeffizienten (Donor, Akzeptor und Protein), die Korrekturfaktoren für Donor und Akzeptor und die drei zur Berechnung des Markierungsgrad benötigten Absorptionswerte angegeben. Die drei Wellenlängen 280 nm (Schwarz), 491 nm (Grün) und 647 nm (Rot) sind im Absorptionsspektrum durch Pfeile markiert.

Die Berechnung der Konzentrationen der Farbstoffe und des Proteins erfolgt durch Umformung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit den Extinktionskoeffizienten ϵ und der Schichtdicke d . Die Überlagerung des Akzeptorfarbstoffes im Absorptionsmaximum des Donorfarbstoffes wird in Gleichung 4-1 berücksichtigt. Zur Vereinfachung wurde die Donorfarbstoffkonzentration nach Gleichung 4-2 abgeschätzt und betrug 5.62 µM. Der abweichende Fehler, abhängig vom jeweiligen Farbstoffpaar, liegt zwischen 1 – 10 %.

$c_{\text{Donor(A488)}} = \frac{\frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probenzugabe}}} * (Abs_{494} - Abs_{651} * cf_{A,494})}{\epsilon_d * d}$	Gleichung 4-1
--	---------------

$c_{\text{Donor(A488)}} \approx \frac{\frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probenzugabe}}} * Abs_{494}}{\epsilon_d * d} \approx \frac{\frac{200 \mu\text{l}}{50 \mu\text{l}} * 0.103}{73000 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]} \approx 5.62 \mu\text{M}$	Gleichung 4-2
---	---------------

Für den Akzeptor wurde nach Gleichung 4-3 eine Farbstoffkonzentration von 7.24 µM berechnet.

$c_{\text{Akzeptor}(A647)} = \frac{\frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probenzugabe}}} * Abs_{651}}{\epsilon_d * d} = \frac{\frac{200 \mu\text{l}}{50 \mu\text{l}} * 0.453}{250000 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]} = 7.24 \mu\text{M}$	Gleichung 4-3
---	------------------

Da das Proteinsignal bei der Absorption von 280 nm durch die Signalüberlagerung mit den beiden Farbstoffe verfälscht wird, muss dieser Wert mit Hilfe der Korrekturfaktoren für A488 und A647 nach Gleichung 4-4 berechnet werden:

$c_{\text{Protein}} = \frac{(Abs_{280} - [(Abs_{494} - Abs_{651} * c_{fA,494}) * c_{fD,280}] + (Abs_{651} * c_{fA,280}))}{\frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probenzugabe}}} * \epsilon_{\text{Protein}} * d}$	Gleichung 4-4
---	------------------

Analog zu Gleichung 4-2 wurde die tatsächliche Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm nach Gleichung 4-5 abgeschätzt.

$c_{\text{Protein}} \approx (Abs_{280} - [(Abs_{494} * c_{fD,280}) + (Abs_{651} * c_{fA,280})]) * \frac{\frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probenzugabe}}}}{\epsilon_{\text{Protein}} * d}$	Gleichung 4-5
$c_{\text{Protein}} \approx (0.036 - [(0.103 * 0.11) + (0.453 * 0.03)]) * \frac{\frac{200 \mu\text{l}}{50 \mu\text{l}}}{6085 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]}$	
$c_{\text{Protein}} \approx 7.25 \mu\text{M}$	

Aus dem Quotienten von Farbstoff- und Proteinkonzentration ergibt sich der Markierungsgrad:

$\text{Markierungsgrad}_{\text{Donor}} = \frac{c_{\text{Donor}}}{c_{\text{Protein}}} = \frac{5.62 \mu\text{M}}{7.25 \mu\text{M}} = 77.5\%$	Gleichung 4-6
--	------------------

$\text{Markierungsgrad}_{\text{Akzeptor}} = \frac{c_{\text{Akzeptor}}}{c_{\text{Protein}}} = \frac{7.24 \mu\text{M}}{7.25 \mu\text{M}} = 99.9\%$	Gleichung 4-7
--	------------------

Für die Einzelvarianten konnte der Markierungsgrad max. bei 100% und für die Doppelvarianten bei max. 200% liegen. Es handelt sich hierbei um eine Abschätzung des Markierungsgrades. Die Extinktionskoeffizienten bezogen sich auf die Herstellerangaben und können durch das Protein und durch die jeweiligen Puffer variieren. Die Abschätzung des Markierungsgrades liefert eine Aussage darüber, ob sowohl ein Donor- als auch ein Akzeptormolekül an das Protein gekoppelt wurden.

4.3 Spektroskopische Methoden

4.3.1 Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren zur Bestimmung der Protein- bzw. Farbstoffkonzentration wurden an einem Cary 300 Bio Spectrophotometer (Varian Inc.) aufgenommen. Die verwendeten Proben befanden sich dabei in Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL (Hellma) vom Typ 105.250-QS mit einer Schichtdicke von 10 mm. Die Einstellungen (Zweistrahlmodus, Basislinienkorrektur, Schrittweite von 1 nm und eine Integrationszeit von 0.3 s) wurden bei allen Messungen angewendet. In der Referenzküvette befand sich der korrespondierende Puffer. Die Absorptionsspektren für unmarkiertes Protein wurden im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 500 nm und für Protein mit Farbstoff von 250 nm bis 750 nm gemessen. Die Spektren wurden bei Bedarf durch die Subtraktion des Streulichtanteiles korrigiert.

4.3.2 Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem FluoroLog[®]-3 (Horiba Scientific) unter Verwendung der Quarzküvetten detektiert. Für die Emissionsspektren wurden eine Schrittweite von 1 nm und eine Integrationszeit von 0.3 s gewählt. Probenabhängig wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen variiert. Bei Bedarf wurden zusätzlich die Spaltbreiten verändert, um ein stärkeres bzw. schwächeres Signal zu bekommen.

4.3.3 Multiparameterfluoreszenzdetektion (MFD)

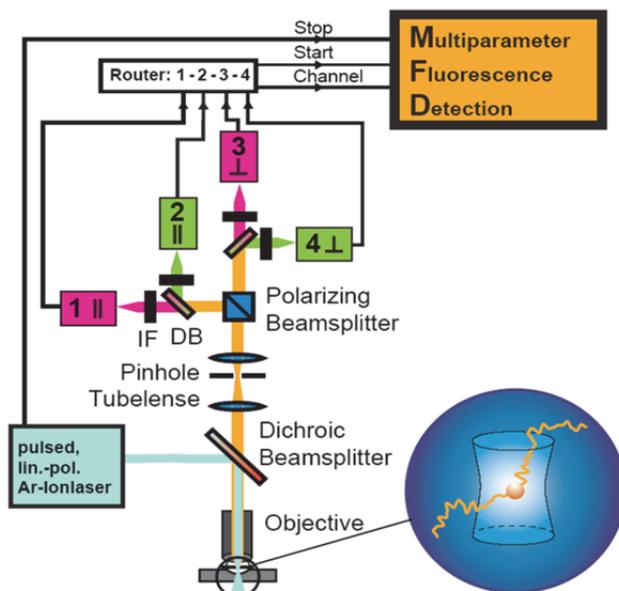


Abb. 19 Experimenteller Aufbau für Einzelmolekülmessungen

Abb. 19 beschreibt den experimentellen Aufbau für die Einzelmolekülmessungen: Die Proben wurden durch einen gepulsten, linear polarisierten Ionenlaser (Innove Sabre, Coherent, Santa Clara, CA, USA) bei 496.5 nm und unterschiedlichen Leistungen (35 MHz – 160 MHz) angeregt. Nach dem Passieren des dichroitischen Strahlteilers (DB, Dichroic Beamsplitter, Q 505 LPXR, AHF, Tübingen, Deutschland) wird das Laserlicht durch ein 60x Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1.2 (Olympus, Deutschland) in eine verdünnte Lösung (< 50 pM) von farbstoffmarkierten Proteinen fokussiert. Sobald ein Molekül durch das Detektionsvolumen diffundiert, bewirkt dieses einen kurzen Fluoreszenzimpuls (burst). Die emittierten Photonen passieren den dichroitischen Strahlteiler und werden durch die Tubuslinse (tubelense) auf die Lochblende (pinhole) mit einem Durchmesser von 100 µm fokussiert. Anschließend erfolgt die Aufteilung der Photonenspur nach senkrechten und parallelen Komponenten durch einen polarisierenden Strahlteiler (polarizing beamsplitter). Durch den Einsatz eines weiteren dichroitischen Strahlteilers (Q 595 DCXR, AHF, Tübingen, Deutschland) erfolgte eine Trennung des Wellenlängenbereiches ober- und unterhalb von 595 nm. Um zu gewährleisten, dass die Detektoren nur jeweils grüne bzw. rote Photonen registrieren, wurden grüne (HQ 533/46 nm für Alexa 488, Bodipy FL und Atto 488) bzw. rote (HQ 720/150 nm für Alexa 647 und HQ 645/75 nm für Alexa 594) Bandpassfilter (IF; AHF, Tübingen, Deutschland) vor selbige gesetzt. Als Detektoren dienten Avalanche Photodioden, jeweils zwei für den grünen Spektralbereich (PDM050CTC, PicoQuant, Berlin, Deutschland) und zwei für den roten Spektralbereich (SPCM-AQR-14, Laser Components, Deutschland). Die Signale aller Detektoren werden durch eine passive Verzögerungseinheit und zwei Router zu zwei synchronisierten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählkarten (single photon counting boards, SPC 832, Becker und Hickl, Berlin, Deutschland) geführt, die mit einem PC verbunden sind. Bursts von Fluoreszenzphotonen werden vom Hintergrund (~ 1-2 kHz) durch unterschiedliche Schwellenwertintensitäten unterschieden (Eggeling et al. 2001; Kühnemuth et al. 2001; Margittai et al. 2003; Rothwell et al. 2003)

4.3.4 SMD-Auswertung

Die Analyse der Einzelmoleküldaten erfolgte unter Verwendung des institutseigenen Computerprogrammes Paris (Version 8.5) und die graphische Darstellung der Paris-Ergebnisse über Margarita (Version 8.5). Nach dem Programmstart der Paris.exe wurden im Menüpunkt „Setup“ die im Experiment verwendeten SPC-Karten (SPC832 ext.clock (tauSPADs)) und als „Experiment“ das 4-Kanal-Setup (4 channels (2 colors, 2 polarisations)) ausgewählt, wodurch die Standardparameter eingeladen wurden. Eine detaillierte Beschreibungen der einzelnen Parameter ist in (Sisamakidis et al. 2010) dokumentiert. Neben dem eigentlichen Probandensatz werden auch die drei folgenden Datensätze für die jeweiligen grünen und roten Kanäle benötigt: Der Streulichtanteil von reinem Wasser (Green Scatter, Red Scatter), das Hintergrundsignal vom verwendeten Messpuffer (Green B_G , Red B_G) und zwei Signale von Referenzfarbstoffen (grün = Rh110, rot = Rh101). Die Datenanalyse erfolgte „burstweise“, d.h. aus dem gesamten Datensatz wurden nur die Einzelmolekülevents für die Auswertung verwendet, welche eine Mindestanzahl von 80 Photonen aufwiesen und zusätzlich über einer variablen Schwelle (threshold), der sogenannten Interphotonenzeit, zwischen 0.1 bis 0.4 ms (ca. 2σ) lagen. Jeder selektierte Burst wurde anschließend prozessiert und unter Verwendung des Maximum Likelihood Algorithmus gefittet (Maus et al. 2001).

Das gesamte Signal S in den grünen und roten Kanälen, welches die Fluoreszenz von Donor und Akzeptor während eines Bursts beinhaltet, muss um das mittlere Hintergrundsignal $\langle B \rangle$ korrigiert werden. Da zusätzlich die Detektionseffizienzen für den Donor (g_G) und den Akzeptor (g_R) bekannt sind, kann das korrespondierende, reine Fluoreszenzsignal F berechnet werden.

$F_D = \frac{S_G - \langle B_G \rangle}{g_G}$	Gleichung 4-8
---	---------------

Aufgrund der verwendeten Filter und des Strahlteilers kann ein Teil der Donoremission in den roten Kanälen detektiert werden. Dieses Verhältnis wird durch das spektrale Übersprechen (Crosstalk, α) beschrieben.

$F_A = \frac{S_R - \alpha(S_G - \langle B_G \rangle) - \langle B_R \rangle}{g_R}$	Gleichung 4-9
---	---------------

Zur besseren Auflösung von Subpopulationen in einem heterogenen System werden die 1D-Histogramme von zwei der erhaltenen Parameter gegenübergestellt. Abb. 20 zeigt diese Darstellung schematisch. Dabei finden sich drei Regionen mit gleichen Verteilungen in x und y-Richtungen im 2D-Plot um deutlich voneinander abweichende Mittelwerte. Diese Populationen werden auch als Zustände oder Spezies bezeichnet. Der Zustand B in Abb. 20 kann nur im 2D-Histogramm, aber nicht in den einzelnen 1D-Histogrammen aufgelöst werden (Berger 2001).

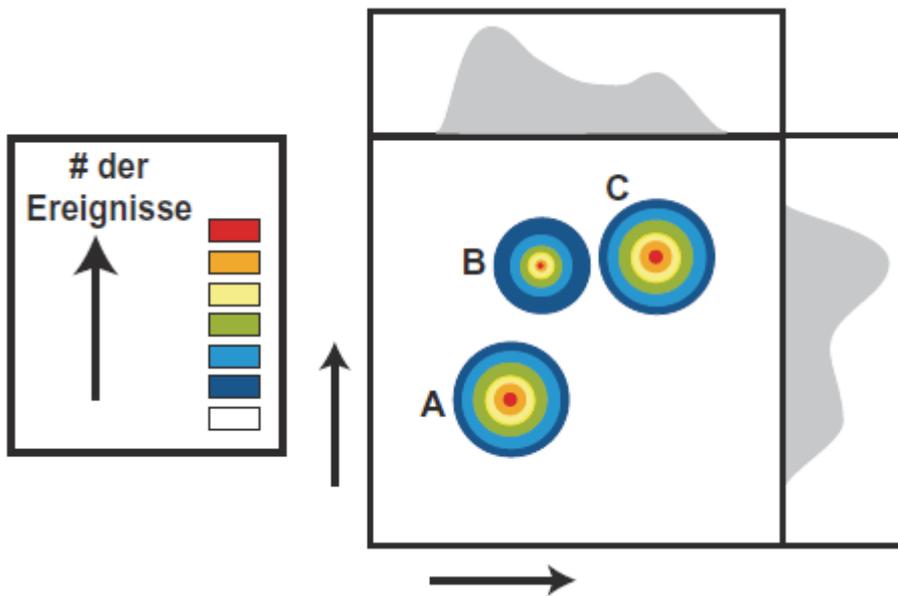


Abb. 20 Bildung eines 2D-Histogramms aus zwei 1D-Histogrammen: Schematische Darstellung einer Probe mit drei Populationen. In den 1D-Histogrammen von zwei Fluoreszenzparametern sind nur die Verteilungen um zwei Mittelwerte erkennbar (Berger 2001)

4.3.5 Statische & dynamische FRET-Linien im Einzelmolekülexperiment

4.3.5.1 Statische FRET-Linien ohne Dynamik

Die FRET-Linie repräsentiert die Abhängigkeit zwischen den FRET Indikatoren abgeleitet aus den Intensitäten (z.B. F_D/F_A), der Fluoreszenzlebensdauer des Donors und der Stärke des Energietransfers.

$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{\text{statisch}} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \left(\frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(A)}} - 1\right)^{-1}$	Gleichung 4-10
---	-------------------

In Gleichung 4-10 fließen zur Bestimmung der sogenannten statischen FRET-Linie experimentelle Parameter wie die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe ($\phi_{FD(0)}$ für den Donor, ϕ_{FA} für den Akzeptor), das Hintergrundsignal (B_G für die grünen und B_R für die roten Kanäle), die Detektionseffizienzen (g_G und g_R , jeweils für grün und rot) und der Crosstalk (α , Gleichung 4-8) ein. Allerdings wird bei der Formel für die statische FRET-Linie nicht die Flexibilität des Farbstofflinkers bei der Verteilung der Donor-Akzeptor-Distanzen mit einbezogen. Zusätzlich muss die nicht-exponentielle Fluoreszenzabklingzeit des Donorfarbstoffes selbst betrachtet werden. Dieser Effekt kann, wie in (Sisamakís et al. 2010) beschrieben, korrigiert werden. Hierbei wird eine Näherung durch ein Polynom verwendet:

$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{\text{statisch \& L-korr.}} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \left(\frac{\langle\tau_{D(0)}\rangle_x}{c_3\langle\tau_{D(A)}\rangle_f^3 + c_2\langle\tau_{D(A)}\rangle_f^2 + c_1\langle\tau_{D(A)}\rangle_f + c_0} - 1\right)^{-1}$	Gleichung 4-11
---	-------------------

$\langle\tau_i\rangle_x$ und $\langle\tau_i\rangle_f$ sind die Spezies- und die durchschnittliche gemittelte Fluoreszenzlebensdauer. Bei der Berechnung der Koeffizienten $c_{[i]}$ im Polynom werden die Parameter ($\tau_{D(0)}$, $\phi_{FD(0)}$, ϕ_{FA} , R_0 und σ) berücksichtigt und bei den entsprechenden Abbildungen mit angegeben.

4.3.5.2 FRET-Linien mit Dynamik zwischen zwei Zuständen

Für den Fall, dass es zu einem Übergang zwischen zwei verschiedenen Zuständen kommt, kann man diese Zustände auch mit einer dynamischen FRET-Linie beschreiben. Dies geschieht, wenn die Fluoreszenzpopulationen aufgrund der Interkonversion zwischen zwei oder mehreren konformationellen Zuständen in vermischten Populationen resultieren. Diese lassen sich in einem F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ Histogramm nicht mehr auf der statischen Linker-korrigierten FRET-Linie lokalisieren (Gleichung 4-11). Hierfür wird ein einfaches Zwei-Zustands-System nach (Sisamakís et al. 2010) für die dynamische FRET-Linie angewendet:

$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \frac{\tau_1 * \tau_2}{\tau_{D(0)} * [\tau_1 + \tau_2 - \langle \tau \rangle_f] - \tau_1 * \tau_2}$	Gleichung 4-12
--	-------------------

Dabei sind $\langle \tau \rangle_f$ die gemittelte Fluoreszenzlebensdauer und $\phi_{FD(0)}$ und ϕ_{FA} die Quantenausbeuten der Farbstoffe. τ_1 und τ_2 korrespondieren mit den zwei Fluoreszenzlebensdauern der beiden interkonvertierenden Zustände. Analog zur Korrektur der statischen FRET-Linie ergibt sich somit die dynamisch korrigierte FRET-Linie:

$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn \& L-korr.} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \frac{\tau_1 * \tau_2}{\langle \tau_{D(0)} \rangle_x * [\tau_1 + \tau_2 - (c_3 \langle \tau_{D(A)} \rangle_f^3 + c_2 \langle \tau_{D(A)} \rangle_f^2 + c_1 \langle \tau_{D(A)} \rangle_f + c_0)] - \tau_1 * \tau_2}$	Gleichung 4-13
--	-------------------

τ_1 und τ_2 sind in diesem Fall die gemittelten Fluoreszenzlebensdauern. Die Koeffizienten $c_{[i]}$ im Polynom können identisch mit denen aus der statischen Korrektur (Gleichung 4-11) sein (McCann et al. 2012).

4.3.5.3 FRET-Linien mit Dynamik zwischen multiplen Zuständen

Diese FRET-Linien spielen eine Rolle, wenn die betrachteten Proteine entfaltet sind und langsam ($< \text{ms}$) zwischen den einzelnen Zuständen wechseln. Dieser Fall lässt sich auf Gleichung 4-13 zurückführen, wenn die entfalteten Proteinketten formal als zusätzliche Linker berücksichtigt werden, indem die halbe Weite σ der Farbstoffabstandsverteilung erhöht wird (z.B. $\sigma = 6 \text{ \AA}$ für reinen Farbstoffeffekt und $\sigma = 11 \text{ \AA}$ für entfaltetes Protein). Die Abstandsverteilung kann durch vier oder mehr Zustände approximiert werden, so dass jeweils Übergänge mit kleinen Abstandsänderungen zu benachbarten Konfigurationen stattfinden.

4.3.6 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (eTCSPC)

Zur Bestimmung der Lebensdauer wurde die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (*ensemble* time-correlated single photon counting, eTCSPC) an einem IBH-5000U System (IBH, Schottland) durchgeführt. Um den jeweiligen Donor- bzw. Akzeptorfarbstoff anzuregen, wurden zwei verschiedene mit Lichtleitern eingekoppelte Diodenlaser (Picoquant, Berlin) als Lichtquelle verwendet (Details siehe Tab. 4).

Farbstoff	Anregung	Emission	Diodenlaser	Repetitionsrate
Donor	470 nm	520 nm	LDH-P-C 470	8 MHz
Akzeptor	635 nm	665 nm	LDH-8-1 126	10 MHz

Tab. 4 Diodenlaser-Spezifikationen für eTCSPC

Das IBH-5000U System besteht u.a. aus zwei Monochromatoren und Polaristatoren, die sich jeweils anregungs- und detektionsseitig befinden. Die korrespondierenden Spaltbreiten der Monochromatoren wurden auf 2 nm (Anregung) bzw. auf 16 nm (Detektion) und die Polarisatoren auf 0 ° (Anregung) und 54.7 ° (Detektion) eingestellt. Der „magische Winkel“ von 54.7 ° dient der Vermeidung von polarisationsbedingten Artefakten, um so das bereinigte Abklingen der Fluoreszenz zu bestimmen (Lakowicz 1999). Zusätzlich wurden zwei Kantenfilter eingesetzt (Donoranregung, >480 nm; Akzeptoranregung, >640 nm) um den Streulichtanteil zu minimieren. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Proben werden durch einen Laserpuls angeregt und das Abklingen der Fluoreszenz auf einer Zeitachse in i Kanälen endlicher Breite (0.0141 ns / Kanal) detektiert bzw. aufgetragen. Hieraus entsteht ein Fluoreszenzzerfallshistogramm mit exponentiellen Abklingkurven. Die Messungen wurden gestoppt, sobald die Anzahl der gezählten Photonen in einem Kanal 100.000 betrug. Formal wurden alle zeitaufgelösten Fluoreszenzintensitäten $F(t)$ durch eine multiexponentielle Modellfunktion mit drei Lebensdauern $\tau_{(i)}$ und drei Spezies $x_{(i)}$ beschrieben (Sindbert et al. 2011):

$$F(t) = x_1 e^{-t/\tau_1} + x_2 e^{-t/\tau_2} + x_3 e^{-t/\tau_3}$$

Gleichung 4-14

Anhand der Anpassung lässt sich die Spezies-gemittelte Fluoreszenzlebensdauer $\langle \tau \rangle_x$ (Gleichung 4-15) und die Fluoreszenz-gewichtete Lebensdauer $\langle \tau \rangle_f$ (Gleichung 4-16) berechnen.

$$\langle \tau \rangle_x = x_1 \tau_1 + x_2 \tau_2 + x_3 \tau_3$$

Gleichung 4-15

Im Gegensatz zu eTCSPC-Messungen wird in Einzelmolekülmessungen die Fluoreszenz-gewichtete Lebensdauer eines jeden Bursts bestimmt. Daher wurden zum Vergleich der Ensemblemessungen und Einzelmolekülmessungen die Lebensdauern gemäß Gleichung 4-16 umgerechnet.

$\langle \tau \rangle_f = \frac{1}{\langle \tau \rangle_x} (x_1 \tau_1^2 + x_2 \tau_2^2 + x_3 \tau_3^2)$	Gleichung 4-16
--	----------------

Bei den gegebenen Farbstoffen ist die Donorlebensdauer in Abwesenheit des Akzeptorfarbstoffes bereits multiexponentiell. Daher wird die zeitaufgelöste Donorfluoreszenzintensität $F_{D(0)}$ beschrieben durch Gleichung 4-17.

$F_{D(0)}(t) = \sum_i x_D^{(i)} \exp\left(-t/\tau_{D(0)}^{(i)}\right)$	Gleichung 4-17
--	----------------

Zur Interpretation der zeitaufgelösten Fluoreszenz des Donors in Anwesenheit des Akzeptors wurde dies in der Anpassung der Messdaten durch einen globalen Fit der Donorfluoreszenz in An- und Abwesenheit des Akzeptorfarbstoffes berücksichtigt. Hier wurde davon ausgegangen, dass alle Donorspezies durch den Akzeptor in gleicher Weise mit der FRET-Rate (k_{FRET}) gelöscht werden (Kalinin et al. 2004). Da die Farbstoffe mit Linkern an die Biomoleküle gekoppelt sind, ist eine Abstandsverteilung zu erwarten (hier beschrieben durch eine Gaussverteilung). Gemäß dieser Verteilung werden die Donorlebensdauern ($\tau_{D(0)}^{(i)}$) gelöscht.

Um die Anpassung vorzunehmen, erfolgte zusätzlich die Aufnahme der Instrumentenantwortfunktion (instrument response function, IRF) mit einer konzentrierten Dispersion einer Ludox-Lösung als Referenzsubstanz und einem 25%igen-Neutraldichtefilter (neutral density filter, ND).

5 Durchführung, Ergebnisse & Diskussion

5.1 *DLin-7*-Varianten mit C-terminalen Poly-Histidin-Tag

5.1.1 Durchführung

5.1.1.1 Design eines FRET System für Einzelmolekülstudien

Während dieser Arbeit wurde ein neuer FRET basierter Assay designt, der es ermöglicht, die strukturellen Veränderungen von *DLin-7* auf atomarer Ebene zu verfolgen. Die Induzierung dieser Veränderung geht dabei von der Bildung des Sdt/*DPATJ/DLin-7*-Komplexes aus. Um geeignete Positionen für die Markierung mit Farbstoffen in FRET-Experimenten abzuschätzen, wurde ein dreidimensionales vergleichendes Proteinstrukturmodell von *DLin-7* generiert, indem die vollautomatische Homologiemodellierungs-Pipeline SWISS-MODEL (für Details siehe Kapitel 2.6) verwendet wurde. Der Cartoon in Abb. 6 zeigt *DLin-7* in einem vermeintlich gefalteten Zustand. Die PDZ-Domäne ist in rot und die gefaltete L27-Domäne in blau dargestellt. Die Aminosäurepositionen Thr33, Val69 und Lys98 (dargestellt in Gelb) wurden ausgewählt, um einen Satz von einfachen und doppelten Cysteinsubstitutionsmutanten von *DLin-7* zu erzeugen, in denen die beiden Cysteine unterschiedlich große Abstände voneinander besitzen.

5.1.1.2 Mutagenese und transgene Konstrukte

Eine amino- bzw. N-terminale 6xHis-getaggte Variante von *DLin-7* (His-*DLin-7*) wurde durch Einführen einer PCR-amplifizierten *DLin-7*-cDNA (Bachmann et al. 2004) (Asp3 bis Gln195, Primer: *DLin-7*-QE-5 = GAA CAG CAA TAG GCC TGA TAA CGC AG; *DLin-7*-QE-3 = 3,1 CTA GTG GAT CGG TAC CGT CTA ATG G) über ein Stu/Asp718 Fragment in den pQE-30 Xa (Qiagen) kloniert. Cysteine für die spätere Farbstoffmarkierung wurden in *DLin-7* an den Positionen Thr33, Val69 und Lys98 mit Hilfe des QuickChange II-Site Directed Mutagenese-Kits (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers eingeführt. Die His-*DLin-7*-Varianten, die in diesem Abschnitt verwendet wurden, waren die einzelnen Mutanten T33C und V69C und die Doppelmutanten T33C-V69C und V69C-K98C.

Folgende N-terminale 6xHis-getaggten Varianten von Sdt wurden verwendet: i) His-Sdt-L27N-PDZ bestehend aus L27N, L27C und der PDZ-Domäne (bezeichnet als Sdt-L) wurde durch das Einbringen eines PCR-amplifizierten *sdt* cDNA-Fragments ebenfalls in pQE-30 Xa kloniert (Bachmann et al. 2001; Berger et al. 2007). Mit Bezug auf die Sdt-A-Isoform (Asp542 bis Arg944) erfolgte die Klonierung über die Schnittstellen Stu und Asp718 unter Verwendung zweier Primer (*sdt*-L27N-5 = CCA CAT TGG AGA GGC CTG ACA GC; *sdt*-PDZ-3 = GTC GAA ATG GTA CCG TAC CGT ACG TGC AAC). ii) His-Sdt-L27C-PDZ umfasst die Carboxy- bzw. C-terminale L27- und die PDZ-Domäne (bezeichnet als Sdt-S) und wurde

durch Einbringen eines PCR-amplifizierten *sdt* cDNA-Fragments (bezogen auf die Sdt-A Isoform: Arg672 bis Arg944; Primer: sdt-L27C-5 = CAT GTC CTG AGG CCT CGC ACC; sdt-PDZ-3 = siehe oben) als StuI/Asp718 Fragment in pQE-30 Xa kloniert.

Eine N-terminale Strep- und C-terminale 10xHis-getaggte *DPATJ*-Variante, die eine einfache L27-Domäne enthält, wurde durch die Einführung eines PCR-amplifizierten *DPATJ* cDNA-Fragments (Bhat et al. 1999) (Ala5 bis Gln209; Primer: PATJ-L27-5 = CAA GAT GCA CGT CGA CGC GGA T; PATJ-L27-3 = GTG CGA GGC GGC CGC CTG TTC G) als Sall/NotI-Fragment in pET-51b(+) kloniert (Novagen). Zur besseren Übersicht sind alle *D*Lin-7-Varianten aufgelistet (Renner 2005):

	Variante	AS	Sequenz	N-Term	C-Term	Plasmid
0	Wildtyp	1-195	MADNAEPLT...	-	-	-
1	T33C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa
2	V69C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa
3	K98C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa
4	T33C-V69C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa
5	T33C-K98C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa
6	V69C-K89C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa
7	T33C-V69C-K89C	3-195	--DNAEPLT...	His	-	pQE-30 Xa

Tab. 5 *D*Lin-7-Varianten mit N-terminalem 6xHis-Tag in pQE-30 Xa

Die dazu gehörigen Bindungspartner Stardust (Sdt) und *DPATJ* wurden ebenfalls erzeugt (Abb. 1):

	Variante	AS	Domänen	N-Term	C-Term	Plasmid
1	Sdt-S	672-773	L27C	His	-	pQE-30 Xa
2	Sdt-M	542-773	L27N-L27C	His	-	pQE-30 Xa
3	Sdt-L (Abschnitt 5.1)	542-944	L27N-L27C-PDZ	His	-	pQE-30 Xa
4	Sdt-L (Abschnitt 5.3)	542-944	L27N-L27C-PDZ	Strep	His	pET-51b(+)
5	<i>DPATJ</i>	5-209	L27	Strep	His	pET-51b(+)

Tab. 6 Sdt und *DPATJ*-Konstrukte

Für die Doppelmarkierung von zwei Cysteinen wurde ein Gemisch der reaktiven Derivate des Maleimids (Donorfarbstoff D (A488) und Akzeptorfarbstoffes A (A594)) verwendet. Dieser Ansatz der zufälligen Markierung lieferte heterogene Gemische von allen vier möglichen Farbstoffkombinationen. Mit Hilfe des smMFD-Aufbaues wurden in den Messungen die FRET-aktiven Moleküle in den Proben ermittelt, so dass die D-only- und die A-only-markierten Moleküle für die weiteren Analysen ausgeschlossen werden konnten.

5.1.1.3 Pulldown-Assay

Um die Funktionsfähigkeit der Proteinvarianten zu gewährleisten, wurde ein Pulldown-Assay für die Variante *DLin-7-V69C-K98C* mit Sdt-L (Abb. 21) durchgeführt. Für jeden Pulldown-Assay wurde etwa 100 µg an bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem His-Sdt-L-Protein an 50 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gebunden. Biotinyliertes *DLin-7*, *DLin-7-V69C-K98C* und Luciferase wurden durch *in vitro* Transkription/Translation mit dem „TNT Coupled Reticulocyte Lysate System/Non-Radioactive Translation Detection System“ (Promega) erzeugt. Vergleichbare Mengen an *in vitro* transkribierten/translatierten Proteinen wurden mit Ni-NTA Agarose gekoppeltem His-Sdt-L27N-PDZ-Protein inkubiert. Der Pulldown-Assay wurde wie in (Bachmann et al. 2004) beschrieben durchgeführt. Die eluierten markierten Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert und mit Streptavidin-POD (1:1000, Roche) detektiert.

Sdt-L entspricht dem His-Sdt (L27N-PDZ) Fusionsprotein, das beide L27-Domänen (L27N und L27C) und die PDZ-Domäne besitzt (gekoppelt an Ni-NTA-Agarose). Sdt-L eluiert jeweils zusammen mit *in vitro* transkribiertem/translatiertem *DLin-7* (Spur 2) und dem *DLin-7-V69C-K98C*-Variante (Bahn 4), während es mit Luciferase (Spur 3) nicht eluiert wird. Die Bindung von *DLin-7* und *DLin-7-V69C-K98C* an Sdt-L ist spezifisch, genau wie alleinige Ni-NTA-Agarose *DLin-7* nicht zum Ausfallen bringt (Spur 5).

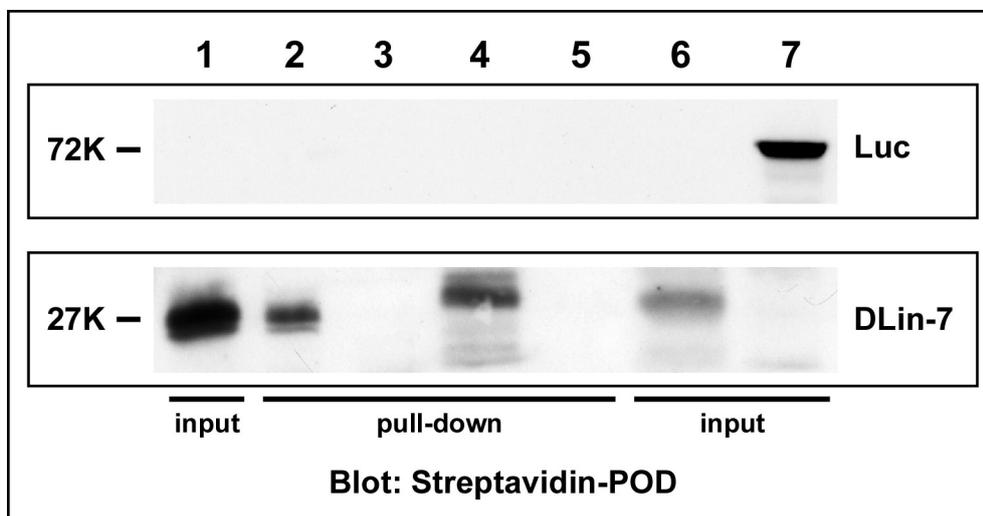


Abb. 21 Pulldown-Assay von *DLin-7-V69C-K98C* mit Sdt-L: Das His-Sdt-L27N-PDZ Fusionsprotein, welches sowohl die L27-Domänen als auch die PDZ-Domäne von Sdt umfasst (gekoppelt an Ni-NTA-Agarose) wurde mit *in vitro* transkribiertem/translatiertem (i.v.t./t.) *DLin-7* (Spur 2) und der Doppelcysteinmutante *DLin-7-V69C-K98C* (Spur 4) jeweils eluiert, während der Pulldown mit Luciferase (Spur 3) negativ ausfiel. Die Bindung von *DLin-7* und *DLin-7-V69C-K98C* an His-Sdt-L27N-PDZ ist spezifisch, da Ni-NTA-Agarose alleine nicht in der Lage ist einen positiven Pulldown mit *DLin-7* (Spur 5) zu liefern (1= input i.v.t./t. *DLin-7*, 2 = Pulldown i.v.t./t. *DLin-7*, 3 = Pulldown i.v.t./t. Luciferase, 4 = Pulldown i.v.t./t. *DLin-7-V69C-K98C*, 5 = Pulldown i.v.t./t. *DLin-7-V69C-K98C* nur mit Ni-NTA-Agarose, 6 = input i.v.t./t. *DLin-7-V69C-K98C*, 7 = input i.v.t./t. Luciferase). Die Input Spuren zeigen biotinyliertes *DLin-7*, *DLin-7-V69C-K98C* und Luciferase Proteine. Dabei enthielten sie jeweils äquivalent bis zu 10% des entsprechenden Materials, welches in den Pulldownspuren analysiert wurde.

5.1.1.4 Expression und Proteinaufreinigung der His-DLin-7- und His-Sdt-Varianten

Die His-DLin-7- und die His-Sdt-Varianten wurden in *E. coli*-Zellen M15 [pREP4] exprimiert. Die transformierten Zellen, welche die jeweiligen Expressionsplasmide enthielten, wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin bei 37 °C angezogen. Die Expression wurde in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} : 0.4 – 0.6) durch die Zugabe von 0.5 mM IPTG zu den Zellen induziert. Die Expression erfolgte bei 30 °C und die Zellen wurden 4 h nach Induktion geerntet. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen und der Rohextrakt anschließend zentrifugiert (45.000 g, 30 min, 4 °C). Da die Expression der jeweiligen Proteine zu Proteinaggregaten (inclusion bodies) führte, wurde das erhaltene Zellpellet in 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, 5% Glycerin (w/v), pH 7.5 und 8 M Harnstoff enthaltendem Puffer resuspendiert. Das Protein wurde unter Verwendung des Ni-NTA-Batch-Verfahrens unter denaturierenden Bedingungen nach Protokoll des "QIAexpressionist™" aufgereinigt. Die Rückfaltung wurde durch extensive Dialyse gegen den Messpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 2.5% (w/v) Glycerol, pH 7.5) bewirkt. Alle Proteine wurden bei 4 °C in dem Messpuffer gelagert, bis sie für die weiteren Experimente benötigt wurden.

5.1.1.5 Expression und Proteinaufreinigung der Strep/His-DPATJ-Varianten

Das Plasmid, das das DPATJ-Konstrukt enthält, wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Zellen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C gezüchtet. Die Expression wurde durch Zugabe von 0.5 mM IPTG zu den Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} : 0.4 – 0.6) induziert. Die Expression erfolgte bei 30 °C und die Zellernte 4 h nach Induktion. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen, zentrifugiert und das Zelllysate gesammelt. Das Strep/His10 doppelgetaggte Protein wurde unter nativen Bedingungen nach dem umfassenden IBA Handbuch "Expression und Aufreinigung von Proteinen mit Strep-Tag und/oder 6xHistidin-Tag" aufgereinigt. Das Protein wurde aufkonzentriert und der Puffer gegen den Messpuffer unter Verwendung einer Amicon Zentrifugal-Filtereinheit (Millipore, MWCO: 30.000) ausgetauscht. Die Reinheit der Proteine wurde durch SDS-PAGE analysiert.

5.1.1.6 Fluorophormarkierung der DLin-7-Varianten

Für die Farbstoffmarkierung von DLin-7 wurde der Puffer unter Verwendung einer PD-10-Säule (GE Healthcare) gegen 150 mM Tris, pH 7.5 ausgetauscht. Die Einzelcysteinvarianten DLin-7-T33C und DLin-7-V69C wurden mit einem 50x Überschuss von Alexa 488 (Donor [D], A488) und Alexa 594 (Akzeptor [A], A594) (Molecular Probes) markiert. Die Doppelcysteinvarianten DLin-7-T33C-V69C und DLin-7-V69C-K98C wurden mit einem D:A (A488/A594)-Verhältnis von 1:5 nach dem Zufallsprinzip markiert. Die Markierung wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

Der freie Farbstoff wurde vom Protein über die Größenausschlusschromatographie (HiPrep26/10 Entsalzungssäule, GE Healthcare) in 20 mM Tris, 2 M NaCl, pH 8.5 abgetrennt. Zur Trennung von markiertem und unmarkiertem Protein wurde die Ionenaustauschchromatographie verwendet. Dafür musste das Salz zuerst aus der Proteinprobe entfernt werden, indem sie erneut über eine in 20 mM Tris, pH 7.5 äquilibrierte 26/10 Entsalzungssäule geleitet wurde, bevor die Beladung auf einer im gleichen Puffer äquilibrierten 1ml HiTrap™ Q FF-Säule (GE Healthcare) folgte. Ein Gradient von 20 mM Tris, 200 mM NaCl pH 7.5 wurde über 10 ml eingestellt, bei dem das markierte Protein typischerweise bei 180 mM NaCl eluiert wurde. Anschließend fand die Dialyse der markierten Proteine in den Messpuffer (s. oben) statt. Der Grad der Farbstoffmarkierung (degree of labeling, DOL) wurde unter Verwendung der Gleichung $DOL = \frac{[\text{Farbstoff}]}{[\text{Protein}]}$ und den jeweiligen Extinktionskoeffizienten ($5960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Einzylcysteinvarianten, $6085 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Doppelcysteinvarianten) berechnet und um die Fluorophorabsorption bei 280 nm korrigiert. Typischerweise lag der DOL zwischen 90% und 100% für die Einzel- und zwischen 3,5% und 55% für die Doppelcysteinvarianten (die einzelnen Konzentrationen werden in den Bildunterschriften gegeben).

5.1.1.7 Einzelmolekül-Multiparameterfluoreszenzdetektion (smMFD)

Stark verdünnte Lösungen der Fluorophor-markierten *D*Lin-7-Varianten (<200 pM) wurden alleine oder in Gegenwart von unmarkiertem *D*Lin-7, Sdt-L, Sdt-S und/oder DPATJ gemessen. Aufgrund von Proteinadsorption auf der Oberfläche der Deckplättchen und der Adsorption während der Verdünnungsprozedur betrug die tatsächliche Proteinkonzentration weniger als 200 pM. Die tatsächliche Proteinkonzentration im Tropfen wurde auf Basis der gefilterten FCS-Kurven für die 100% Donor-only markierte Probe *D*Lin-7-T33C abgeschätzt. Die experimentellen Datensätze berücksichtigen den Markierungsgrad (siehe Abschnitt 5.1.1.6) der Proben. Für die Messung im Tropfen mit Donor-only-Molekülen waren die genauen Verdünnungsstufen bekannt. Die absolute Zahl der markierten Moleküle im Anregungsvolumen des Mikroskops wurde durch die Anpassung der FCS-Kurven erhalten. Die Filter für die Fluoreszenzlebensdauer wurden gemäß (Bohmer et al. 2001; Enderlein et al. 2005; Kapusta et al. 2007) entworfen. Dabei wurde ein Zweikomponentensystems berücksichtigt: die Streuung aus der Pufferlösung und die Fluoreszenz des Donorfarbstoffes.

Markierte Moleküle diffundieren durch eine konfokales Detektionsvolumen und erzeugen einen kurzen Burst von Fluoreszenz über die Diffusionszeit (ca. 3 ms), die dann dazu verwendet werden, um die Intensitäten (F), die Lebensdauern (τ), und die Anisotropien (r) von Donor (D) und Akzeptor (A) zu bestimmen. Die Datenanalyse wurde, wie in (Rothwell et al. 2003; Antonik et al. 2006; Kalinin et al. 2007) beschrieben, durchgeführt. 2D-Frequenz Histogramme von Einzelmoleküldaten werden erzeugt, in denen die Frequenz in Graustufen von weiß nach schwarz zunimmt. Die

Fluoreszenzintensitäten des Donors und des Akzeptors, F_D und F_A , sind korrigiert. In diese Korrektur fließen das grüne und rote Hintergrundsignal ($B_G = 2.610$ kHz, $B_R = 0.539$ kHz), der spektrale Crosstalk ($\alpha = 0.072$) und die Detektionseffizienzen ($g_G = 0.2705$, $g_R = 0.396$) in Gleichung 5-3 von (Rothwell et al. 2003) ein.

F_D und F_A werden dazu verwendet um den Abstand zwischen den Farbstoffen R_{DA} nach Gleichung 5-1 anzunähern, wobei der reduzierte Förster-Radius $R_{0r} = 59.0$ Å (Rothwell et al. 2003) und die Akzeptorquantenausbeute $\phi_{FA} = 0.8$ beträgt.

$R_{DA} = R_{0r} \left[\phi_{FA} (F_D/F_A)^{1/6} \right]$	Gleichung 5-1
--	---------------

In $\tau_{D(A)}$ vs. R_{DA} Diagrammen (siehe Abb. 22, Abb. 26 und Abb. 27) korreliert die Donorlebensdauer $\tau_{D(A)}$ mit R_{DA} nach Gleichung 5-2, bei der zusätzlich die Donorquantenausbeute ($\phi_{FD} = 0.62$) und die Donorfluoreszenzlebensdauern in Abwesenheit ($\tau_{D(0)}$) und in Anwesenheit ($\tau_{D(A)}$) des Akzeptors mit in die Gleichung einfließen. Die direkte Anregung des Akzeptors ist vernachlässigbar. Analog zu Gleichung 4-3 wird keine Korrektur für die Farbstoffabstandsverteilung und die Dynamik des Systems berücksichtigt.

$R_{DA} = R_{0r} \left(\frac{\phi_{FD} \tau_{D(A)}}{\tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}} \right)^{1/6}$	Gleichung 5-2
--	---------------

Ebenfalls angegeben (grau schattierter Kasten) ist der maximal plausible Abstand ($R_{DA}(\text{Max})$) mit einem Wert von ~ 100 Å, für das verwendete DA-Paar (Oberer Kasten, gestrichelte Linien für Donor-only Spezies). $\tau_{D(A)}$ vs. $r_{D,S}$ Diagramme zeigen die Abhängigkeit der Donoranisotropie ($r_{D,S}$) gegenüber der Donorlebensdauer ($\tau_{D(A)}$) gemäß Gleichung 5-3 (Perrin-Gleichung), bei der ein Wert von $r_0 = 0.37$ für die fundamentale Anisotropie, und die variable mittlere Rotationskorrelationszeiten von ρ_D verwendet wurde.

$r_D = \frac{r_0}{1 + \tau_{D(A)}/\rho_D}$	Gleichung 5-3
--	---------------

5.1.2 Ergebnisse

5.1.2.1 Assay-Bedingungen

Die L27-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne, die in der Lage ist, Gerüstproteine in einem supramolekularen Assemble durch Bildung von heteromeren L27-Domänenkomplexen, wie dem Sdt/DPATJ/DLin-7-Komplex, zu organisieren. Im Folgenden werden die Komponenten Sdt, DPATJ und DLin-7 als S, P und L bezeichnet und können somit den tetrameren L27-Domänenkomplex als S/P/L definieren. Die Strukturen lassen vermuten, dass eine tetramere Struktur, die aus zwei Heterodimer Einheiten besteht, die allgemeine Assembleanordnung für verwandte Paare von L27-Domänen ist (Feng et al. 2005; Petrosky et al. 2005). Strukturanalysen der L27-Domänenkomplexstruktur zeigten ferner, dass das zentrale Vier-Helix-Bündel eine tetramere Anordnung vermittelte, die stark unter den verschiedenen Paaren von L27-Domänenkomplexen ausgeprägt ist. Bisher untersuchten alle strukturellen Studien nur zwei identische Heterodimere, die ein symmetrisches Dimer bilden. Für die Interaktion von DLin-7 mit Sdt-S (S-S), welches nur die L27C-Domäne enthält, ist die Bildung eines 1:1-Komplexes von S-S/L zu erwarten (Harris et al. 2002). Außerdem zeigten NMR-Studien, dass bei höheren Konzentrationen im submillimolaren Bereich die Fusionsproteine [mLin-7(L27)-mLin-2(L27C)] und [Patj(L27)-Pals1(L27N)] dimerisieren, um einen tetrameren Komplex aus zwei identischen Einheiten zu bilden (Feng et al. 2005). Dies wirft die Frage auf, ob auch der S-S/L-Komplex bei diesen Konzentrationen zu dem (S-S/L)₂-Komplex dimerisieren kann. Allerdings gibt es keine Untersuchungen mit dem nativen Sdt-L, welches beide L27-Domänen enthält. Bei der verwendeten Konzentration von weniger als 200 pM an markierten DLin-7 wird die Ausbildung des LS-Komplexes begünstigt, wenn die Sdt-L-Konzentration 1 μM (5000x Überschuß) beträgt. Verschiedene doppelt markierte DLin-7-Varianten wurden verwendet, um die Komplexbildung via intra-molekularem FRET (Abb. 6) zu verfolgen. Um zu testen, ob auch der S/L₂-Komplex gebildet wird, wurde ein inter-molekularer FRET-Assay benutzt. Dazu wurden zwei einfach markierte DLin-7-Varianten verwendet, in denen ein DLin-7 mit einem Donor- und das andere DLin-7 mit einem Akzeptorfarbstoff markiert wurde.

5.1.2.2 SmMFD-Messungen mit dem LS-Komplex

Zu Beginn wurde die Konformation von *D*Lin-7 unter Verwendung der zwei doppelt markierten Varianten *D*Lin-7-V69C-K98C und *D*Lin-7-T33C-V69C untersucht. Farbstoffmarkierte Moleküle diffundieren durch ein konfokales Detektionsvolumen und erzeugen dabei einen kurzen Burst an Fluoreszenz über die Diffusionszeit (ca. 3 ms), welche anschließend selektiert und analysiert werden können, um u. a. die Fluoreszenzintensitäten (F), Lebensdauern (τ), und die Anisotropien (r) des Donors (D) und des Akzeptors (A) zu bestimmen.

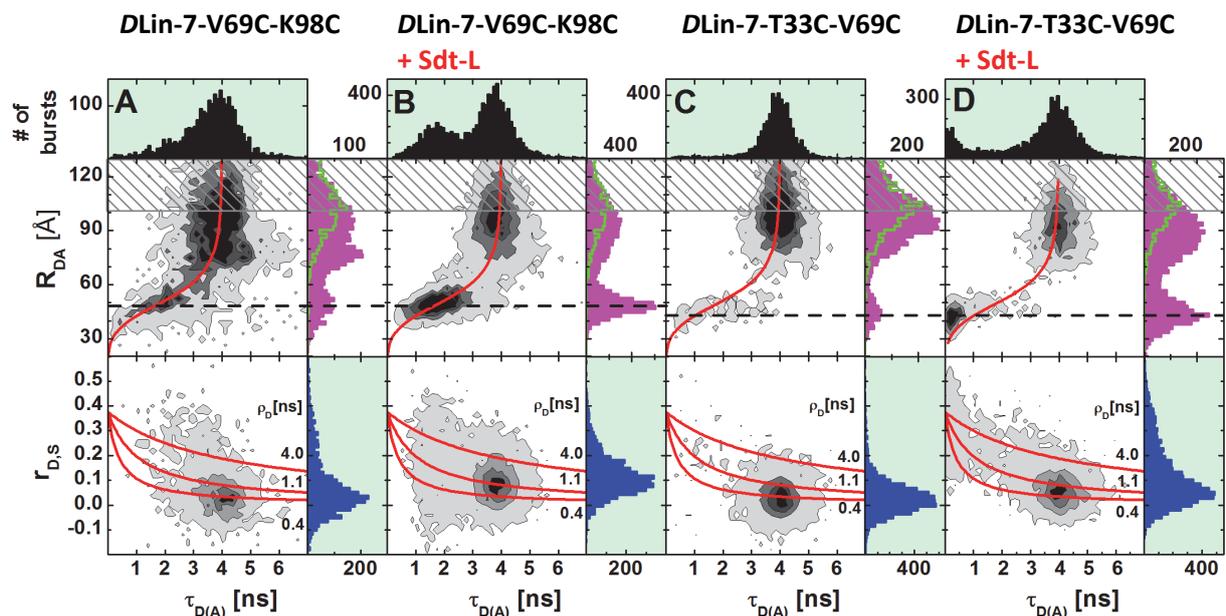


Abb. 22 2D-Histogramm von zwei Doppelmutanten mit und ohne Sdt-L: Die 2D-Frequenz Histogramme der Einzelmoleküldaten zeigen R_{DA} vs. $\tau_{D(A)}$ (obere Zeile) und $r_{D,s}$ vs. $\tau_{D(A)}$ (untere Zeile) für 110 pM markiertem (3 nM insgesamt) *D*Lin-7-V69C-K98C (A488-A594) ohne (A) und mit 1 μ M Sdt-L (B) und 430 pM markiertem (2 nM insgesamt) *D*Lin-7-T33C-V69C (A488-A594) ohne (C) und mit 1 μ M Sdt-L (D). Die Proben wurden in 50 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 2.5 % (w/v) Glycerin, pH 7.5 gemessen. Die Frequenz ist von Weiß (niedrigste) bis Schwarz (höchste) skaliert. Die 2D-Diagramme zusammen mit den überlagerten Gleichungen (Abstandsfunktion nach Gleichung 5-1: $R_{DA} = 53.1 \cdot (0.81 \cdot x / (4-x))^{(1/6)}$, rote Linien) und deren maximal gemessenem Abstand (R_{DA} , Grau schraffierter Kasten) werden mit Hilfe der Parameter generiert, die im experimentellen Teil beschrieben sind. Die gestrichelten Linien deuten den durchschnittlichen Abstand der high FRET-Spezies an. Zusätzlich sind jeweils drei Perrin-Gleichungen eingezeichnet.

Um einen ersten Einblick über die Existenz der unterschiedlichen Abstandspopulationen zu bekommen, wurde in einem zweidimensionalen Frequenzhistogramm der Abstand (R_{DA}) gegen die Donorlebensdauer in Anwesenheit des Akzeptors ($\tau_{D(A)}$) aufgetragen (Abb. 22, obere Zeile). Der Abstand R_{DA} wurde dabei mit dem Fluoreszenzintensitätsverhältnis von Donor und Akzeptor (F_D/F_A) approximiert (siehe Gleichung 5-1 im Abschnitt 5.1.1.7). Die untere Zeile in Abb. 22 zeigt die Auftragung der Anisotropie des Donors (r_D) gegen $\tau_{D(A)}$. Die Zahl der Moleküle (fluoreszierende Bursts) in jedem Kanal (bin) sind über eine Grauskala von Weiß (niedrigste) bis Schwarz (höchste) eingefärbt. In Abwesenheit von Sdt-L (Abb. 22 A, C) zentriert sich die Mehrheit der Einzelmolekülereignisse in einer breiten Population bei $\tau_{D(A)} = 4$ ns und $R_{DA} \approx 90$ Å. Diese Peaks reichen sogar in

noch höhere unbegründete Abstände ($R_{DA} > 100 \text{ \AA}$), weil die zufällig markierten Proben eine erhebliche Menge an Donor-only markiertem Protein enthalten (grau schraffierter Kasten). Darüber hinaus zeigen die R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ Verteilungen aufgrund der begrenzten Photonenzahlen pro Burst eine inhärente statistische Verbreiterung, den so genannten „shot noise“. Die Analyse dieses breiten Peaks zeigt, dass sie eigentlich aus zwei überlappenden Spezies bestehen: Donor-only (grüne Linie in Abb. 22, 1D R_{DA} Histogramme) und einer Spezies mit niedrigem FRET (low FRET, LF) und einer sehr breiten Abstandsverteilung. Dies wird ausführlicher in Abschnitt 5.1.2.4 diskutiert. Außerdem ist in Abb. 22 ein zweiter separierter Peak mit kurzen Abständen sichtbar, was den direkten Beweis für das Auftreten einer dritten (high FRET Population, HF) liefert. Dieser HF-Peak wird in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ Sdt-L (Abb. 22 B, D) deutlich vergrößert. Ebenfalls auf den $\tau_{D(A)}$ vs. R_{DA} Plots dargestellt ist die theoretische Beziehung zwischen $\tau_{D(A)}$ und R_{DA} (rot sigmoidale Linie, Gleichung 5-2 im Abschnitt 5.1.1.7). Falls eine lokale Donorlöschung (quenching) bzw. Donorverstärkung (dequenching) auftreten würde, wird eine horizontale Verschiebung von dieser Linie erwartet. Eine lokale Akzeptorlöschung bzw. Verstärkung würde eine vertikale Verschiebung von dieser Linie ergeben. Durch diese Überlegung wurde gezeigt, dass sich die zwei Spezies (LF und HF) aufgrund von FRET und nicht aufgrund von Änderungen in der Donor- oder Akzeptorquantenausbeute durch lokale Umgebung ändern. Ein weiteres Problem in der quantitativen Analyse von FRET-Messungen ist, dass die Beweglichkeit der Fluorophore eingeschränkt sein kann. Deshalb wurde die Donoranisotropie ($r_{D,S}$), welche die Mobilität der Teilchen misst, ebenfalls untersucht (Abb. 22, untere Zeile). Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Abstände aufgrund Spezies spezifischer Farbstofforientierungseffekte auftreten, wurde die mittlere (mean) Donorrotationskorrelationszeit (ρ_D) mittels Perrin-Gleichung (Gleichung 5-3, Absatz 5.1.1.7) berechnet. Diese ist als rote Linie für ρ_D von 0.4 ns, 1.1 ns und 4.0 ns eingezeichnet. Zwei große Hauptpopulationen sind in dem Anisotropieplot entlang der gezeichneten Linien für $\rho_D = 0.4 \text{ ns}$ und $\rho_D = 1.1 \text{ ns}$ zentriert. Die ausreichend hohe Drehbeweglichkeit validiert den angenommenen Wert von $2/3$ für den Orientierungsfaktor κ^2 , der für die R_{DA} Berechnung benötigt wird. Für eine Beschreibung der Parameter, die FRET beeinflussen, siehe Absatz 5.1.1.7. Hier konnte direkt gezeigt werden, dass für eine bestimmte Messung alle FRET-Spezies sehr ähnliche Populationen an ρ_D haben, so dass die beobachteten FRET-Unterschiede nicht durch die Unterschiede in der Ausrichtung erklärbar sind. Nach der Komplexbildung mit Sdt-L ändert sich der mittlere Abstand (gestrichelte schwarze Linien in Abb. 22) der HF-Population für beide *DLin-7*-Varianten nicht innerhalb des statistischen Fehlers (ca. 5%). Die gemessenen Werte der mittleren Abstände des komplexierten *DLin-7* unterscheiden sich um 7 \AA für die verschiedenen FRET-Paare (*DLin-7-T33C-V69C* = 41 \AA ; *DLin-7-V69C-K98C* = 48 \AA), welche mit den vorhergesagten Ca-Ca -Abständen aus dem Homologiemodell (Abb. 6) um 7 bzw. 1 \AA abweichen.

Eine alternative Darstellung der Messergebnisse im 2D-Histogramm ist die Auftragung von F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ (Abb. 23). Das korrigierte Grün-zu-Rot-Verhältnis (F_D/F_A) zeigt deutlich, dass bei Zugabe des Bindungspartners (Abb. 23 B und D) sich der Anteil der FRET-Population bei beiden *D*Lin-7-Doppelvarianten erhöht.

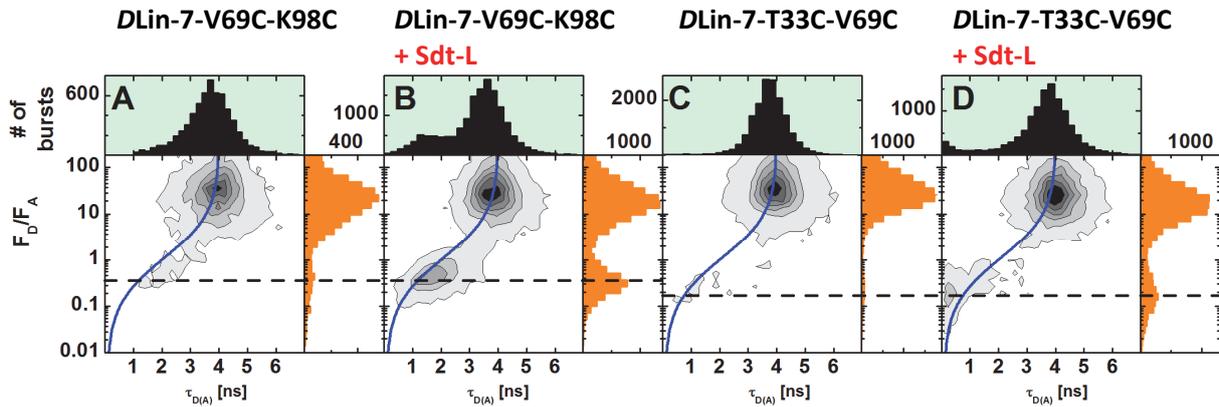


Abb. 23 2D-Histogramm von zwei Doppelvarianten mit und ohne Sdt-L: Im Gegensatz zu Abb. 22 (R_{DA} vs. $\tau_{D(A)}$) sind hier F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ aufgetragen. Sowohl bei *D*Lin-7-V69C-K98C als auch bei *D*Lin-7-T33C-V69C sieht man durch die Zugabe des Bindungspartners eine deutliche Zunahme der FRET-Population. Zusätzlich ist die statische L-korr. FRET-Linie (Gleichung 4-11, Blau) = $(0.8/0.6207)/((4.0000/((-0.0376*x^3)+(0.2794*x^2)+0.4934*x-0.0432))-1)$ eingezeichnet.

5.1.2.3 Affinitätsmessungen durch Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

Vorherige biophysikalische Charakterisierungen von L27-Domänen von verschiedenen *D*Lin-7-Varianten ergaben teilweise widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Affinitäten (100 nM bis 10 μ M) und komplexe Stöchiometrien (Harris et al. 2002; Li et al. 2004; Feng et al. 2005; Petrosky et al. 2005; Straight et al. 2006). Daher wurden Titrations von DA-markiertem *D*Lin-7-V69C-K98C mit Sdt-L durchgeführt, um die Dissoziationskonstante K_D des S/L-Komplexes zu bestimmen. MFD Daten ermöglichen eine simultane Analyse des gleichen Datensatzes für FRET und FCS.

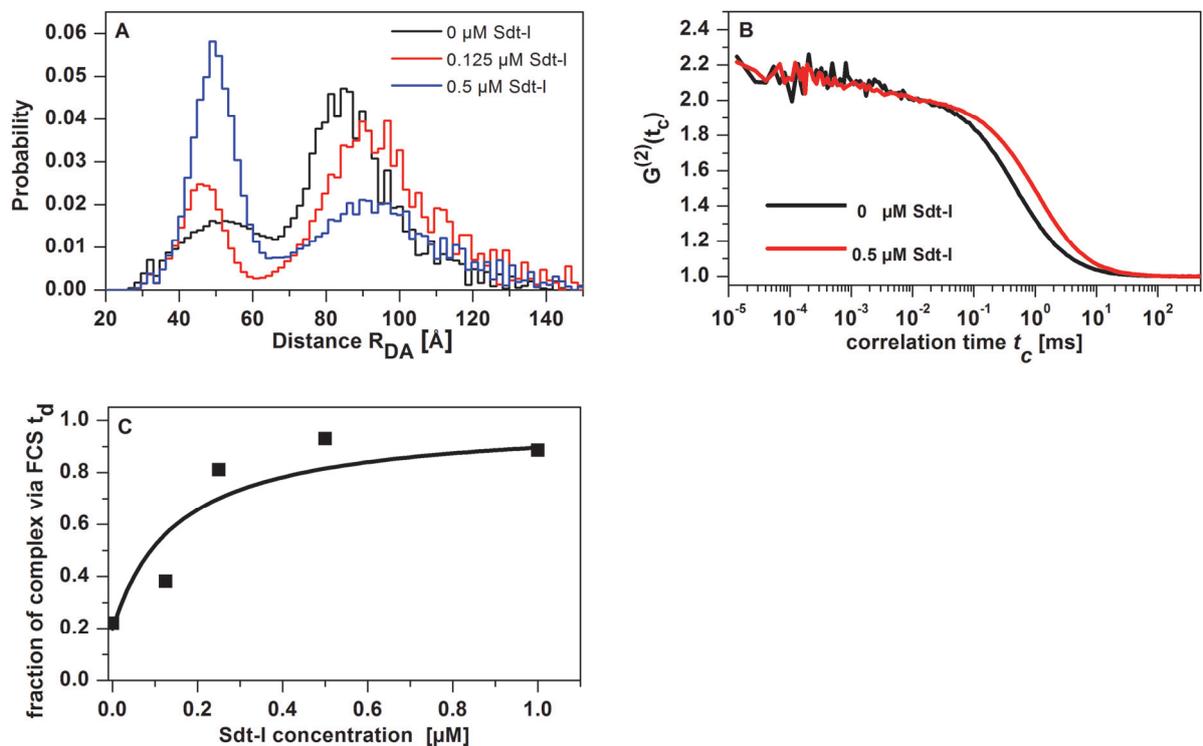


Abb. 24 PDA-, FCS- und K_D -Analyse: (A) Frequenz-Histogramme der Einzelmoleküldaten zeigen die relative Wahrscheinlichkeit vs. R_{DA} von 110 pM markiertem (3 nM insgesamt) *D*Lin-7-V69C-K98C (A488-A594) ohne Sdt-L (Schwarz) und mit 0,125 μ M Sdt-L (Rot) und 0,5 μ M Sdt-L (Blau). Mit Sdt-L nimmt die Konzentration der HF-Population zu, die LF-Population sinkt und sowohl die HF- und LF-Peaks sind zu höheren Distanzen verschoben. (B) Diffusionszeiten der FCS-Messungen von 125 pM *D*Lin-7-V69C-K98C (A488-A594) ohne Sdt-L (Schwarz, $t_d = 0,48$ ms) und mit 0,5 μ M Sdt-L (Rot, $t_d = 3$ ms). Die Daten zeigen, dass markiertes *D*Lin-7 mit Sdt-L eine längere Diffusionszeit hat, die eine Bindung zwischen den beiden Proteinen indiziert. (C) Die Änderung von Θ_a kann durch das hyperbolische Langmuir Bindungsisotherm $\Theta_a = \Theta_{a,min} + (1 - \Theta_{a,min})[S]/(K_D + [S])$ für die Bildung des 1:1 Komplex S/L mit einer Komplexdissoziationskonstante $K_D = 150 \pm 60$ nM ($\Theta_{a,min} = 0,2$) beschrieben werden. Bezüglich veröffentlichter Daten von L27-Domänekomplexen gehört dieser K_D -Wert zu der Klasse der L27-Komplexe mit hoher Affinität.

Im ersten Schritt wurde die FRET-Änderung analysiert, in dem die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (probability distribution analysis, PDA), auf das Verhältnis von Donor- zu Akzeptorsignal S_G/S_R angewandt wurde, um die durch shot-noise verbreiterte DA-Abstandsverteilungen R_{DA} zu erzeugen. Abb. 24 A zeigt, dass die HF-Population mit zunehmender Sdt-L-Konzentration bei ca. 48 Å zentriert liegt, während die Populationen von LF und fluoreszierenden Verunreinigungen sich verringern. Die

Verunreinigungen in der Sdt-L Probe von 1 μM haben eine Konzentration von etwa 10^{-11} M. Aber sobald sie fluoreszieren sind sie leicht zu erkennen und müssen in der Analyse der S_G/S_R Histogramms berücksichtigt werden, da sie einen signifikanten Anteil an der Gesamtfluoreszenz besitzen. Beim Berechnen und Vergleichen der Fluoreszenzkorrelationskurven für alle Punkte der Titration wird ein deutlicher Anstieg der charakteristischen FCS-Diffusionszeit t_d infolge der Komplexbildung beobachtet (Abb. 24 B). Zwei Diffusionszeiten $t_d(\text{frei}) = 0.4$ ms und $t_d(\text{Komplex}) = 1.1$ ms mit unterschiedlichen Fraktionen der beiden Spezies sind ausreichend, um den erhaltenen Satz von Korrelationskurven zu beschreiben. Der charakteristische Anstieg des Anteils von Komplex Θ_a ist mit der langen Diffusionszeit des Sdt-L/DLin-7-Komplexes (S/L) verbunden (siehe Abb. 24 C). Bei dieser Titration wurde die Sdt-L/DLin-7-Komplexbildung durch zwei komplementäre Beobachtungen bestätigt: (1) Anstieg von intra-molekularem FRET aufgrund der DLin-7-Faltung (Abb. 24 A), und (2) Anstieg der translatorischen Diffusionszeit aufgrund der Komplex bedingten Erhöhung des Molekulargewichts und des Volumens (Abb. 24 B, C). Die Änderung von Θ_a kann durch die hyperbolische Langmuir Bindungsisotherme $\Theta_a = \Theta_{a,\text{min}} + (1 - \Theta_{a,\text{min}})[S]/(K_D + [S])$ für die Bildung des 1:1 Komplexes S/L beschrieben werden. Der S/L -Komplex besitzt eine Dissoziationskonstante $K_D = 150 \pm 60$ nM mit $\Theta_{a,\text{min}} = 0.2$. Bezüglich veröffentlichter Daten von L27-Domänekomplexen (Harris et al. 2002; Li et al. 2004; Feng et al. 2005) gehört dieser K_D -Wert zu der Klasse der L27-Komplexe mit hoher Affinität.

5.1.2.4 Quantitative FRET-Analyse durch die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA)

Als eine Voraussetzung für hochauflösende FRET-Einzelmolekülstudien von markierten Biomolekülen wird die PDA zur quantitativen Analyse von komplexen FRET Daten angewendet. In den jüngsten Einzelmolekül-FRET-Messungen mit überlappenden Populationen war es so weit nicht möglich, die Anzahl der vorhandenen Spezies und die Homogenität der einzelnen Zustände rigoros zu bestimmen. Die theoretischen PDA-Verteilungen sind ausdrücklich für einen festen DA-Abstand zwischen zwei Positionen berechnet. Sie berücksichtigen zusätzlich den spektralen Crosstalk, die stochastischen Variationen und den Hintergrund. Diese simulierten FRET-Verteilungen haben die minimale Breite, die eine FRET-Verteilung nach der Statistik haben muss (Antonik et al. 2006; Kalinin et al. 2007). Jede zusätzliche Verbreiterung enthält die gewünschte strukturelle Information, die durch PDA zurückgewonnen werden kann. Um Systeme, die aus mehreren nicht interkonvertierenden fluoreszierenden Zuständen bestehen, zu beschreiben, sind mehrere Erweiterungen der PDA-Theorie entwickelt worden (Kalinin et al. 2008). Abb. 25 A zeigt die PDA-Analyse von DLin-7-T33C, welches mit dem Donorfarbstoff A488 markiert ist.

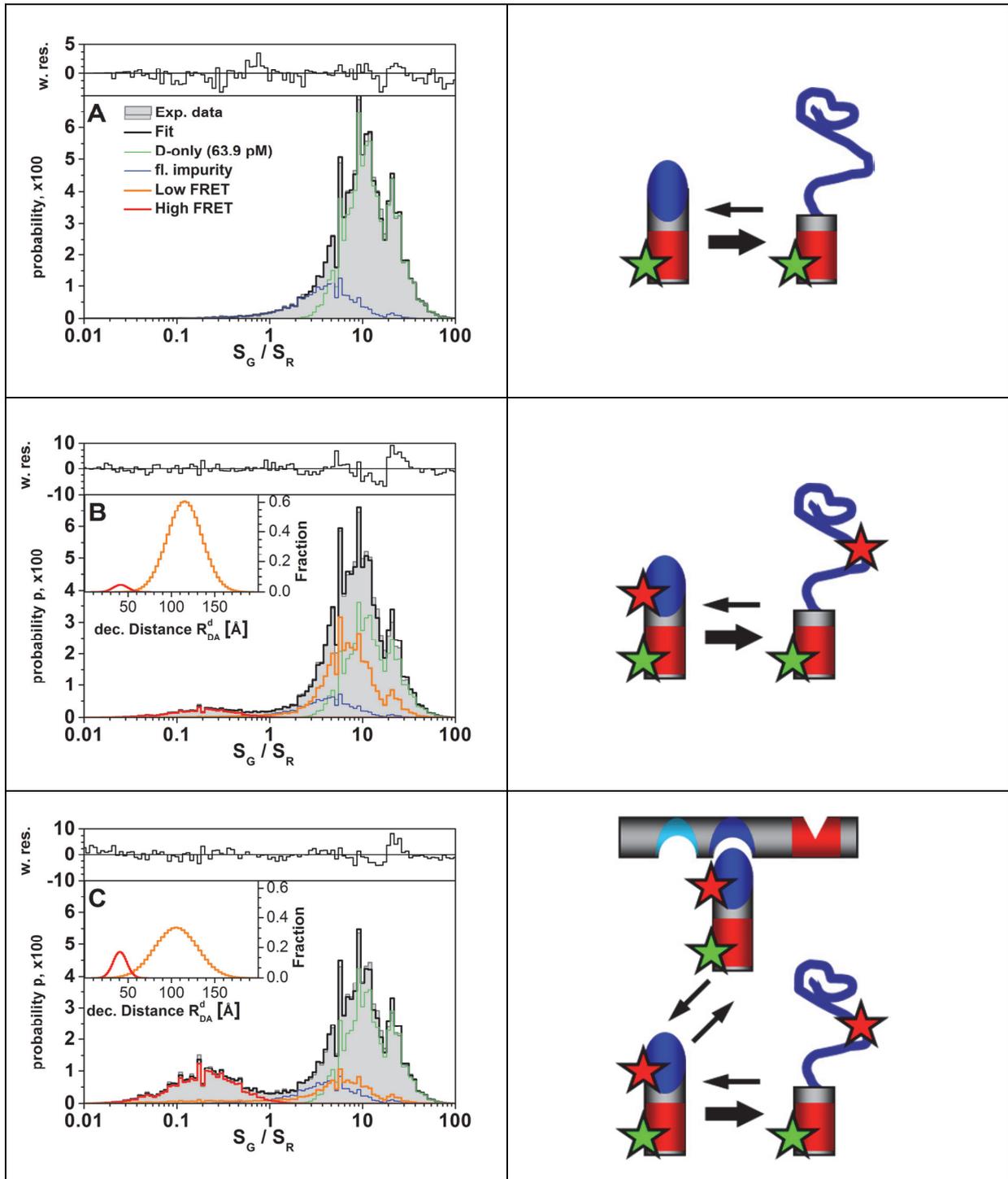


Abb. 25 PDA Analyse von D-only, DA und DA plus Sdt-L: PDA von (A) 64 pM totalen markierten *DLin-7-T33C* (A488), 430 pM markiertes (2 nM total) *DLin-7-T33C-V69C* (A488-A594) in Abwesenheit (B) und in Gegenwart (C) von 1 μ M Sdt-L. Für (B, C) wurde eine PDA mit vier Spezies durchgeführt: HF (rote Linie), LF (orangene Linie), Donor-only (entspricht $R_{DA}^d = \infty$; grüne Linie) und fluoreszierenden Verunreinigungen (blaue Linie). Der sichtbare Anteil der fluoreszierenden Verunreinigungen wurde in allen Analysen konstant gehalten. Die kleinen Einsätze in den Feldern (B) und (C) zeigen die Verteilungen der DA-Abstände bereinigt von der shot-noise (R_{DA}^d), die durch PDA erhalten wurden: (B): 4,7% HF Population, \bar{R}_{DA}^d (HF) = 41,5 Å, σ_R (HF) = 8,7 Å; 57,2% LF Population, \bar{R}_{DA}^d (LF) = 118 Å, σ_R (LF) = 19 Å. (C): 15,2% HF Population, \bar{R}_{DA}^d (HF) = 40,6 Å, σ_R (HF) = 8,4 Å; 33,1% LF Population, \bar{R}_{DA}^d (LF) = 112 Å, σ_R (LF) = 24 Å. Gemeinsame PDA Parameter: Grüne Hintergrundzählrate: 2,1 kHz; Rote Hintergrundzählrate: 0,56 kHz. Andere PDA Parameter sind in 5.1.1.7 angegeben.

Im Gegensatz zu Abb. 24 A sind in Abb. 25 die experimentellen Rohdaten (Verhältnis der Signale im grünen zu roten Spektralbereich, S_G/S_R) dargestellt, so dass das Hintergrundsignal mit in die PDA-Modellfunktion einbezogen werden kann. In der semiquantitativen Analyse mit ungefähren Abstandswerten R_{DA} (Abb. 22) führt die Subtraktion des mittleren Hintergrundsignals von den gemessenen Signalen zu einer leichten Verzerrung der erhaltenen R_{DA} -Verteilung bei großen Abständen. Dies ist mit dem Verlust der Donor-only Moleküle zu erklären, da deren Signale kleiner als das mittlere Hintergrundsignal sind. Jedoch ist das in der PDA nicht der Fall. Die Ergebnisse der PDA werden als shot-noise bereinigten DA-Abstand R_{DA}^d angegeben. In der Donor-only Probe ist die FRET-Effizienz Null, das formal einem $R_{DA}^d = \infty$ entspricht. Darüber hinaus musste ein kleiner Betrag von fluoreszierenden Verunreinigungen berücksichtigt werden, deren Verteilungseigenschaften während der Datenanpassung konstant gehalten wurden. Für die Analyse des doppelt markierten *DLin-7-T33C-V69C* ohne und mit $1 \mu\text{M}$ Sdt-L wurde die PDA mit vier Spezies durchgeführt: HF, LF, Donor-only und fluoreszierende Verunreinigungen. Nach der Komplexbildung mit Sdt-L findet keine Änderung innerhalb des statistischen Fehlers vom mittleren Abstand \bar{R}_{DA}^d von HF für die beiden *DLin-7*-Varianten statt: \bar{R}_{DA}^d (*DLin-7-T33C-V69C*) $\approx 41 \text{ \AA}$ und \bar{R}_{DA}^d (*DLin-7-V69C-K98C*) $\approx 48 \text{ \AA}$ (Daten nicht gezeigt). Der durchschnittliche Abstand \bar{R}_{DA}^d von LF ist für beide Varianten sehr groß. Er liegt im Bereich von 112 bis 118 \AA . Darüber hinaus sind die Standardabweichungen in dem Abstand von $\sigma_R(\text{LF}) = 19$ bis 24 \AA und bei $\sigma_R(\text{HF}) = 8.5 \text{ \AA}$ außergewöhnlich breit für die beiden Spezies, verglichen mit Fluoreszenzfarbstoffen, die an DNA gekoppelt sind ($\bar{R}_{DA}^d = 54 \text{ \AA}$ und $\sigma_R(\text{DNA}) = 2.3 \text{ \AA}$ (Antonik et al. 2006)). Da es keine größeren Anisotropie Heterogenitäten gibt und die τ_{DA} - R_{DA} -Daten sich in der Nähe der statischen FRET-Beziehung befinden (Gleichung 5-2 im Abschnitt 5.1.1.7), ist es sehr wahrscheinlich, dass quasi statische strukturelle Unordnung (disorder) auftritt, die in Absatz 5.1.3.3 näher diskutiert wird.

5.1.2.5 Zugaben von weiteren Partnern des L/S-Komplexes

Um den Einfluss der L27N-Domäne auf die Bindung von *DLin-7* an Sdt zu testen, wurde die Sdt-Variante Sdt-S verwendet, die nur über die spezifische L27C-Domäne verfügt. Das τ_{DA} vs. R_{DA} Histogramm in Abb. 26 A zeigt, dass sich die HF-Population in Gegenwart von 0.5 μM Sdt-S nicht erhöht, verglichen mit Sdt-L (Abb. 26 B). Dagegen erhöht die Anwesenheit von DPATJ den Anteil der HF-Spezies signifikant, was eine verbesserte Bindung von *DLin-7* an Sdt-L anzeigt (Abb. 26 C, D). Dies weist auf eine beträchtliche positive Kooperativität bei der Bindung von jeder L27-Domäne angesichts der Bildung eines tetrameren L27-Domänenkomplexes hin. Bisher wurde eine 5000x höhere Konzentration von Sdt-L gegenüber *DLin-7* verwendet, um den S/L-Komplex zu begünstigen.

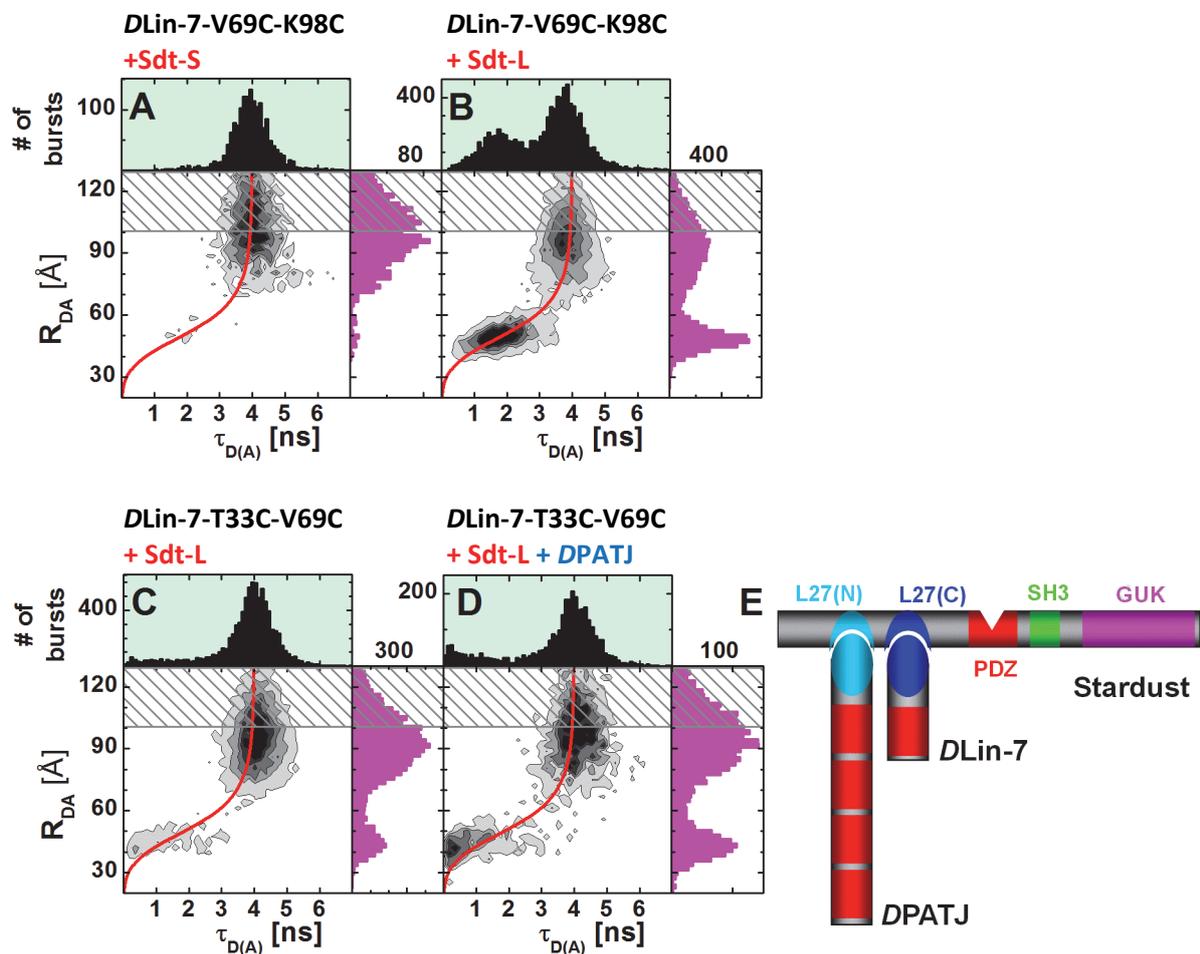


Abb. 26 2D Histogramm *DLin-7* mit verschiedenen Bindungspartnern: 2D-Frequenz Histogramme der Einzelmoleküldaten zeigen R_{DA} vs. $\tau_{D(A)}$ (A) 55 pM markiertes (2 nM insgesamt) *DLin-7-V69C-K98C* (A488-A594) mit 0.5 μM Sdt-S, (B) siehe Abb. 22 B, (C) 360 pM markiertes (2 nM total) *DLin-7-T33C-V69C* (A488-A594) mit 1 μM Sdt-L und (D) nach Zugabe von 150 nM DPATJ. Siehe Abb. 22 für weitere Beschreibungen (intra-molekularer FRET). (E) Schematische Darstellung von Sdt mit zwei von drei Bindungspartnern *DLin-7* und DPATJ.

Um zu testen, ob auch der S/ L_2 -Komplex als Folge einer nicht-kanonischen Bindung gebildet werden kann, erfolgte der Einsatz eines inter-molekularen FRET-Experiments unter Verwendung von zwei einfach markierten *DLin-7*-Varianten. Dabei wurde *DLin-7-T33C* mit Donor- (A488) und *DLin-7-V69C*

mit Akzeptorfarbstoff (A594) markiert. Um das Gleichgewicht in Richtung S/L_2 zu verschieben, wurde die Gesamtkonzentration an *DLin-7* bis auf 4.2 nM (0.2 nM Donor-markiertes und 4 nM Akzeptor-markiertes *DLin-7*) erhöht, was den Überschuss von *Sdt-L* auf das 250x reduziert hat. Abb. 27 zeigt ein R_{DA} vs. $\tau_{D(A)}$ Diagramm von dieser Probe mit einer sehr breiten R_{DA} -Verteilung. Eine FRET-Spezies ist bei $\tau_{D(A)} = 2$ ns und $R_{DA} \approx 52$ Å deutlich sichtbar zentriert (gestrichelte Linie). Neben dieser Spezies sind auch andere FRET aktive Spezies sichtbar, welche alle ebenfalls auf der sigmoiden FRET-Kurve nach Gleichung 5-2 liegen.

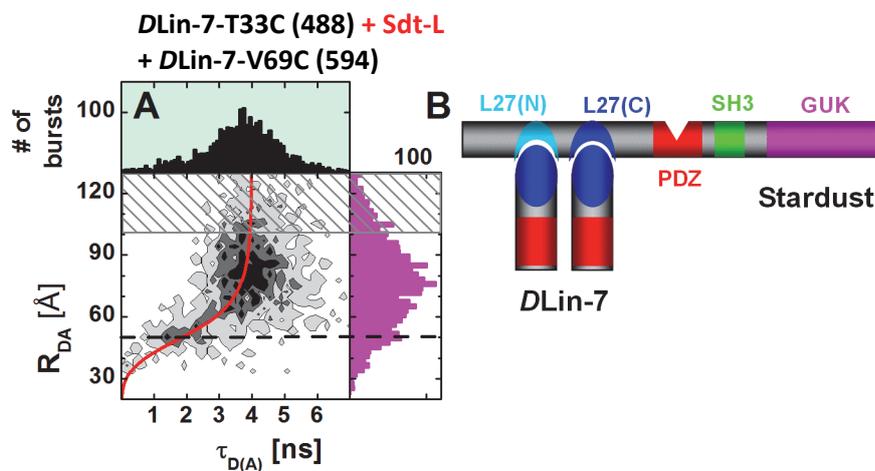


Abb. 27 2D Histogramm Inter-molekularer FRET: (A) Die Einzelmoleküldaten zeigen R_{DA} vs. $\tau_{D(A)}$ für ein Gemisch von 64 pM Donor markiertem *DLin-7-T33C* (A488) mit 1 μ M *Sdt-L* und 10 nM Akzeptor markiert *DLin-7-V69C* (A594). Aufgrund der hohen Konzentration an Akzeptor, die auf der direkten Anregung basiert, wurde zur Analyse der rote Hintergrund auf 14.571 KHz verändert (siehe Abb. 22 zur weiteren Beschreibung). (B) Schematische Darstellung von *Sdt* mit zwei *DLin-7* als Bindungspartner. Dabei ist die Bindung von *DLin-7* an die L27(N)-Domäne von *Sdt* nicht kanonisch.

Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits bei einem *DLin-7* zu *Sdt-L* Konzentrationsverhältnis von 250 mehr als ein *DLin-7* gebunden sein kann. Die beobachteten kurzen Abstände lassen annehmen, dass die beiden *DLin-7* dicht aneinander zu einem nicht-kanonischen Komplex binden; höchstwahrscheinlich ist die L27-Domänen von *Sdt* mit involviert. Es ist bemerkenswert, dass der Komplex S/L_2 Eigenschaften besitzt, die auffallend verschieden von dem des S/L -Komplex sind: (1) Die Fluoreszenzhelligkeit (brightness) dieses Komplexes ist deutlich reduziert und dadurch schwerer in einem Einzelmolekülexperiment zu erfassen und (2) die Löslichkeit dieses Komplexes ist reduziert und die Adsorptionsgeschwindigkeit am Deckglas gleichzeitig viel höher. Das bedeutet auch, dass unter den Bedingungen in Abb. 22 auch Oligomere mit intermolekularem FRET gebildet werden.

5.1.3 Diskussion

5.1.3.1 Heterogenität des *DLin-7*-Komplexes

Ein unerwartetes Ergebnis der Analyse war die Beobachtung, dass *DLin-7* verschiedene Proteinkomplexe eingehen kann. Dabei spielen die Art und die Konzentration seiner Partner eine wichtige Rolle. Die Einzelmolekül-FRET-Experimente haben gezeigt, dass die Stöchiometrie des Sdt/*DLin-7*-Komplexes von zwei kritischen Bedingungen abhängt. Die Konzentrationen beider Proteine bestimmen den Grad der Bindung (Abb. 27), und das Verhältnis der Konzentrationen der beiden Proteine ermittelt die Stöchiometrie der gebildeten Komplexe, da Sdt zwei L27-Domänen besitzt. Bei einem großen Überschuss von Sdt (2500x) wird ein *S/L*-Komplex begünstigt, während bei einem niedrigeren Überschuss von Sdt zusätzlich ein *S/L₂* Komplex detektiert wird. Eine Möglichkeit diesen Komplex zu erklären, ist durch nicht kanonische Bindung von *DLin-7* an den *S/L*-Komplex über die L27N-Domäne. Die Bindung von *DLin-7* an L27N kann zwei Konsequenzen haben: (1) *DLin-7* könnte *DPATJ* im tetrameren Sdt/*DPATJ/DLin-7*-Komplex ersetzen, und damit die Rolle von *DPATJ* in der Komplexbildung übernehmen und verschiedene Defekte, die durch den Verlust von *DPATJ* induziert werden, retten bzw. ausgleichen; (2) eine sehr hohe *DLin-7*-Konzentration kann zur Auslagerung von *DPATJ(P)* aus dem *S/P/L*-Komplex führen. Es ist bemerkenswert, dass bereits bei mikromolaren Konzentrationen eine Dimerisierung des *LS*-Komplexes zu *S₂/L₂* entdeckt und in NMR-Experimenten verwendet wurde (Feng et al. 2005; Petrosky et al. 2005). Analog zur *DLin-7*-Bindung kann man vermuten, dass *DPATJ* und Sdt ebenfalls einen *S/P*- und einen *S/P₂*-Komplex bilden können.

Flexible Bindungseigenschaften von Proteinen, die in L27-vermittelten Proteinkomplexen beteiligt sind, wurden unter *in vivo* Bedingungen beschrieben. *Caenorhabditis elegans* LIN-7, ist ein Bestandteil des dreigliedrigen LIN-2/LIN-7/LIN-10-Proteinkomplexes, der für die baso-laterale Lokalisation des EGF-Rezeptors LET-23 erforderlich ist. Es bindet an die zweite L27-Domäne von LIN-2, während EPS-8, ein Protein ohne eine L27-Domäne, an die erste N-terminale L27-Domäne von LIN-2 bindet (d.h. seine Bindungseigenschaften sind vergleichbar mit der von *DPATJ*). Das Fehlen von LIN-7 verhindert die baso-laterale Retention von LET-23. Eine Konzentrationserhöhung an EPS-8 rettet teilweise die Fehlanordnung des LET-23-Rezeptors, der durch den Verlust von Lin-7 induziert wird. Außerdem hat die Konzentration an EPS-8 einen Einfluss auf die Lokalisation von LET-23: ein hohes Konzentrationsmaß an EPS-8 begrenzt LET-23 an der baso-lateralen Membran, während ein Verlust des *eps-8* Gens den Rezeptor entfernt (Stetak et al. 2006).

5.1.3.2 Positive Bindungskoopertivität

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis war der Nachweis einer positiven Kooperativität, die während der Formierung der drei Proteine zu dem spezifischen tetrameren L27-Domänenkomplex auftrat. Zwei Ergebnisse liefern den Beweis, dass die L27-Domänen aller beteiligten Proteine zur positiven Kooperativität beitragen: (1) Das Fehlen der L27N-Domäne von Sdt (so wie in Sdt-S) reduziert den Anteil des gebundenen *D*Lin-7 (sprich den *S*/*L*-Komplex) (Abb. 26 A), und (2) das Vorhandensein von *DPATJ* erhöht signifikant die von *D*Lin-7 an Sdt-L gebundene Fraktion (Abb. 26 B, C). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer strengen Regulierung von Proteinkonzentrationen in den Zellen für den Bau von Proteinkomplexen. Daher hängt das Verständnis für die Formierung von Proteingerüsten und ihrer Dynamik von der Kenntnis über die absoluten und "aktiven" Proteinkonzentrationen und deren Verhältnisse ab. Diese Daten bilden auch die Grundlage für die computergestützte Modellierung, was die Bestimmung der optimalen Gerüstkonzentration erlaubt, die die maximale Stoffwechselaktivierung für gegebene Konzentrationen von anderen Signalmolekülen ermöglicht (Cheong et al. 2008).

5.1.3.3 Konformative Dynamik und strukturelle Heterogenität von *D*Lin-7

SmMFD detektierte die Existenz von zwei großen konformativen Zuständen von freiem ungebundenen *D*Lin-7 (Abb. 22), welches stabil auf der Millisekundenzeitskala der Experimente ist. Unter Berücksichtigung der PDA sind zwei FRET-Populationen (High-FRET, HF und Low-FRET, LF) ausreichend, um die FRET-Daten zu beschreiben (Abb. 25). Nach der Komplexbildung mit Sdt-L ändert sich der mittlere Abstand \bar{R}_{DA}^d für beide *D*Lin-7-Varianten nicht innerhalb des statistischen Fehlers. Die Abstände für die beiden Varianten unterscheiden sich deutlich von den im Homologiemodell vorhergesagten: \bar{R}_{DA}^d (*D*Lin-7-T33C-V69C) = 41 Å und \bar{R}_{DA}^d (*D*Lin-7-V69C-K98C) = 48 Å. Beide Varianten weisen eine breite Standardabweichung im Abstand von $\sigma_R(\text{HF}) = 8,5$ Å auf. Der durchschnittliche Abstand von LF reicht von 112 bis 118 Å mit einem überraschend großen $\sigma_R^d(\text{LF}) = 19$ bis 24 Å. Es gibt zwei mögliche Erklärungen:

(1) Im Hinblick auf die Konzepte von einer signifikanten Menge von struktureller Unordnung oder Polymorphismus in einzelnen Proteinen und Proteinkomplexen (Fuxreiter et al. 2007; Radivojac et al. 2007; Tompa et al. 2008) ist es offensichtlich, dass *D*Lin-7 ebenfalls zu dieser stark wachsenden Kategorie gehört. Die große Breite des R_{DA} ermöglicht es, die L27-Domäne in *D*Lin-7 als "erweiterte" ungeordnete Region ("extended" disordered region, random coil like) zu kategorisieren, deren globale Abstandsschwankungen langsamer sind als die Verweilzeit (dwell time) von wenigen

Millisekunden des Moleküls in dem Beobachtungsvolumen des konfokalen Mikroskops (Radivojac et al. 2007). Neuere Beobachtungen haben gezeigt, dass viele Proteine oder Regionen von Proteinen in ihrem nativen, funktionsfähigen Zustand strukturell ungeordnet (disordered) sind und ein kontinuierliches Spektrum von strukturellen Zuständen abdecken: von statischer zur dynamischen Unordnung und von segmentaler zur völligen Unordnung. Dabei unterscheidet man zwischen intrinsisch ungeordneten Bereichen (intrinsically disordered regions, IDR) und den intrinsisch ungeordneten Proteinen (intrinsically disordered proteins, IDPs). Als Konsequenz können sie nicht ausreichend durch eine einzige sich im Gleichgewicht befindende 3D-Struktur beschrieben werden. In diesem Zusammenhang entspricht die *DLin-7-LF*-Population dem strukturell ungeordneten und die *HF*-Population dem vorübergehend gefalteten Zustand der *L27*-Domäne.

(2) Die andere Erklärungsmöglichkeit ist die Aggregation von *DLin-7* (siehe Abb. 26), die zu intermolekularem FRET in einem variablen Bereich führen kann. Das minimale Modell zur Beschreibung der Bindung von *DLin-7* an *Sdt* muss drei Stufen beinhalten (Grünberg et al. 2006): (1) das globale Faltungsgleichgewicht mit vielen verschiedenen *DLin-7*-Konformeren, (2) die Auswahl der geeigneten Konformere (*HF*-Zustand) und die Bildung eines Begegnungskomplexes, und (3) die lokale Co-Faltung für eine feste Bindung, was einer induzierten Anpassung (induced fit) in Bezug auf die lokale konformationelle Feinabstimmung entspricht. Wie andere Proteine, die bei Signaltransduktion, Enzymkatalyse oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen beteiligt sind, tritt die *DLin-7*-Bindung als eine Folge der Bindung an komplementäre präexistierende Zustände des Partners auf, die folglich das Gleichgewicht verschieben. Mit anderen Worten, die dynamische strukturelle Plastizität ist eine intrinsische Eigenschaft eines Proteins und ist in seiner Sequenz kodiert. Der Partner induziert nicht die Bildung einer neuen Struktur, sondern selektiert viel mehr eine bereits bestehende Struktur (Henzler-Wildman et al. 2007).

Vermutlich verleihen die ungeordneten Regionen dem Protein einen Vorteil im Hinblick auf seine Fähigkeit mit mehreren Partnern zu interagieren. Die Lokalisierung der Interaktionssequenzen innerhalb der ungeordneten Regionen hat mehrere mögliche Vorteile: (1) Die Interaktionsmodule sind allgemein zugänglich. (2) Ihre Position relativ zu dem Rest des Proteins kann variieren, damit die orientierungsbezogenen Einschränkungen reduziert werden können. (3) Die gleichen bzw. ähnlichen Sequenzen können in multiple Proteine eingefügt werden, ohne dass ihre Strukturfunktion bzw. die Faltungsaspekte beeinträchtigt werden. (4) Proteindomänen, welche an das Interaktionsmodul fusioniert werden, haben aufgrund ihrer Lage in den nativ entfalteten Regionen typischerweise keinen Einfluss auf die Erkennungsstellen.

Angesichts der wichtigen Rolle von Disorder-Proteinen im Bereich der Protein-Protein-Interaktionen und in den regulatorischen Prozessen wird angenommen, dass die inhärente strukturelle Plastizität wesentlich für das Verständnis der Ausbildung von tetrameren L27-Domänenkomplexen zu sein scheint. Des Weiteren kann dadurch im Allgemeinen ein besserer Einblick in die zugrunde liegenden molekularen Grundlagen der Interaktion innerhalb einer Zelle gewonnen werden. In einem zellulären Kontext sind die heterogene Stöchiometrie der L27-Domänenkomplexe und die Möglichkeit des Austausches von bestimmten Mitgliedern sehr wichtig.

Aufgrund der geringen Proteinausbeute und dem gleichzeitigen hohen Anteil an unlöslichen Aggregaten werden im nächsten Abschnitt Versuche unternommen diese Aggregatbildung zu verringern. Dabei werden verschiedene Löslichkeitstags an *DLin-7* getestet.

5.2 DLin-7-Konstrukte mit verschiedenen Löslichkeitstags

Fusionstags können zur Verbesserung der Ausbeute und der Löslichkeit vieler rekombinanter Proteine dienen. Bei der Expression und Reinigung von großen Mengen von löslichem Protein können Expressionsschwierigkeiten auftreten, die oft eine schlechte Ausbeute und die Bildung von unlöslichen Aggregaten (inclusion bodies) beinhalten. Genfusionstechnologien können diese Hindernisse überwinden und zu vereinfachter Reinigung und Verbesserung der Löslichkeit führen. Es sind verschiedene Fusionstags für die Expression und Reinigung von Proteinen verfügbar, welche grob in zwei Kategorien eingeteilt werden: Affinitätstags, die zwar in der Reinigung behilflich sind, aber nicht die Löslichkeit der Proteine im Wesentlichen erhöhen, und Löslichkeitstags, die speziell für die Verbesserung der Löslichkeit und Wiederherstellung von funktionellen Proteinen dienen (Chelur et al. 2008).

Tag	Größe	Tagplatzierung	Verwendung
GST	211 aa (26 kDa)	N-	Löslichkeit & Reinigung
MBP (malE)	396 aa (40 kDa)	N-, C-	Löslichkeit & Reinigung
NusA (NUS)	495 aa (54 kDa)	N-	Löslichkeit
Thioredoxin (TRX)	109 aa (12 kDa)	N-, C-	Löslichkeit

Tab. 7 Löslichkeitstags und ihre Charakteristika

5.2.1 Durchführung

5.2.1.1 Klonierung der Fusionsproteine zur Verbesserung der Löslichkeit

	Variante	AS	Sequenz	N-Term	C-Term	Plasmid
1	V69C	5-195	----AEPLT...	TRX-His	-	pET-32a(+)
2	V69C	5-195	----AEPLT...	GST-His	-	pET-41a(+)
3	V69C	5-195	----AEPLT...	NUS-His	-	pET-41a(+)
4	V69C	5-195	----AEPLT...	-	His	pET-29b(+)
5	V69C	5-195	----AEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)
6	K98C _{full}	1-195	MADNAEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)
7	T33C-K98C _{full}	1-195	MADNAEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)
8	V69C-K89C _{full}	1-195	MADNAEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)

Tab. 8 DLin-7-Konstrukte mit verschiedenen Löslichkeitstags

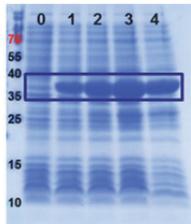
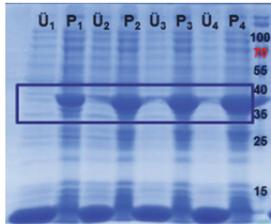
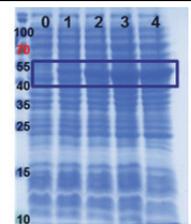
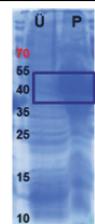
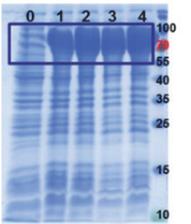
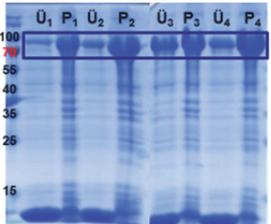
Mit Hilfe der verschiedenen Primer (siehe Abschnitt 3.11.1) wurden sowohl die verschiedenen Tags als auch die unterschiedlichen DLin-7-Inserts via PCR amplifiziert. Mit den entsprechenden Enzymen

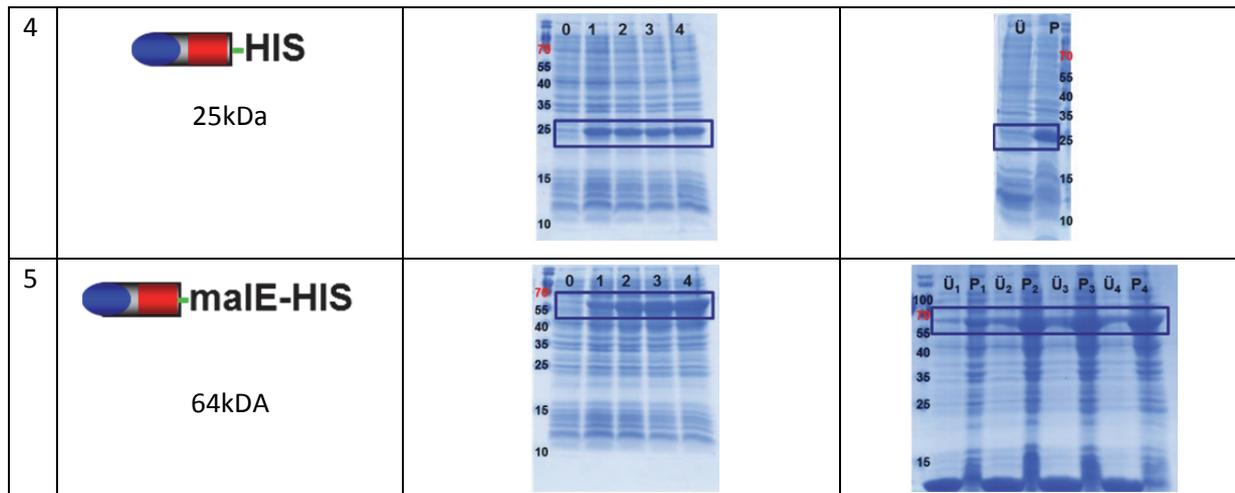
wurden die Fragmente geschnitten und anschließend mit den passenden Plasmiden ligiert. Nach erfolgreicher Transformation wurde eine Plasmidvervielfältigung nach dem Mini-Präp Protokoll (siehe Abschnitt 4.2.1) durchgeführt und die Korrektheit der Konstrukte über eine Sequenzierung kontrolliert.

5.2.2 Ergebnisse

5.2.2.1 Expression und Lysis

Es wurden verschiedene Expressionsstudien mit anschließendem Zellaufschluss durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das *DLin-7*-Konstrukt aufgrund der verschiedenen Löslichkeitstags im löslichen Teil des Rohextrakts befindet. Tab. 9 zeigt die Anzucht bei 37 °C und die Expression bei 30 °C. Es wurden noch zwei weitere Temperaturvariationen getestet (Anzucht & Expression bei jeweils 25 °C und Anzucht bei 37 °C und Expression bei 25 °C), die allerdings alle das gleiche Ergebnis lieferten und daher nicht dargestellt werden. Die Expression war in allen 5 Konstrukten erfolgreich. Allerdings lieferte der Zellaufschluss nur in 2 Fällen das gewünschte Ergebnis. Beim *NUS-DLin-7*-(*NUS*-His-V69C) und beim *DLin-7*-*maIE*-(V69C-*maIE*-His)-Konstrukt befand sich *DLin-7* im löslichen Überstand.

	<i>DLin-7</i> -V69C-Konstrukt und Größe	Expression (Anzucht 37 °C / Induktion 30 °C)	Zellaufschluss (Überstand / Pellet)
1	TRX-HIS  36 kDa		
2	GST-HIS  49 kDa		
3	NUS-HIS  78 kDa		



Tab. 9 Expressions- und Zellaufschlussstudien: Spalte 2 beinhaltet die verschiedenen *DLin-7-V69C*-Konstrukte, bei denen die L27-Domäne in Blau und die PDZ-Domäne in Rot dargestellt ist. Expression (Spalte 3): Die Anzucht der kompetenten Zellen erfolgte bei 37 °C und die Induktion mit 1 mM IPTG bei 30 °C. Zum Start der Induktion (Zeitpunkt 0) und nach jeder weiteren Stunde (1, 2, 3 und 4) wurde eine Probe entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Zellaufschluss (Spalte 4): Jede Probe wurde mit Lysozym inkubiert und anschließend mit dem Sonifizierer behandelt und via SDS-PAGE analysiert. Der Längenstandard ist auf jedem Gel mitaufgetragen. Die entscheidenden Proteinbanden sind durch ein farbiges Rechteck hervorgehoben.

5.2.2.2 Native Batch-Aufreinigung des Nus- und malE-Konstruktes

Die native Aufreinigung der beiden Konstrukte wurde nach dem Protokoll 12 aus dem Handbuch für Expression und Aufreinigung von 6xHis-getaggtten Proteinen „QIAexpressionist“ (Qiagen 2003) durchgeführt.

	NaH ₂ PO ₄	NaCl	Imidazol	pH
Lysispuffer	50 mM	300 mM	10 mM	8.0
Elutionspuffer	50 mM	300 mM	250 mM	8.0

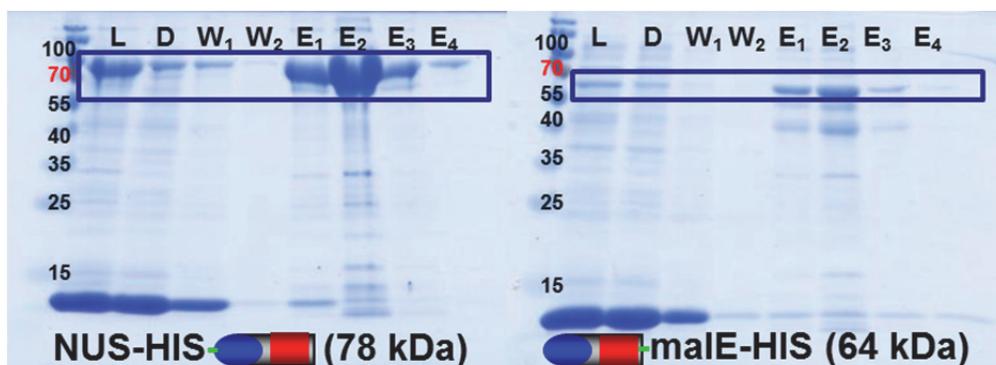


Abb. 28 SDS-PAGE des nativen Batch des Nus-V69C-*DLin-7* und V69C-malE-*DLin-7*-Konstruktes: Für jedes Konstrukt wurden Proben vom Rohextrakt (Load, L), dem Durchfluss (D), den beiden Waschfraktionen (W1 und W2) und den vier Elutionsfraktionen (E1-E4) aufgetragen. Sowohl das Nus-Konstrukt mit einer Größe von 78 kDa als auch das malE-Konstrukt mit einer Größe von 64 kDa wird an das Ni-NTA gebunden und mit Hilfe des Imidazols im Elutionspuffer eluiert.

Jeweils 4 ml Lysat vom jeweiligen Konstrukt wurde mit 1 ml Ni-NTA Slurry 1h bei 4 °C auf dem Stuart-Rotator inkubiert. Nach dem Beladen der Säule mit dem Lysat-Ni-NTA-Mix erfolgten zwei Waschschritte (2x 4ml Lysispuffer) und die anschließende Elution (4x 0.5 ml Elutionspuffer). Alle Fraktionen (Fr.) wurden auf der SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 28). Beide Proteine binden über ihren His-Tag an die Ni-NTA-Matrix, da jeweils nur eine schwache Bande in den Durchflussfraktionen zu sehen ist. Sowohl das Nus- als auch das male-Konstrukt konnten erfolgreich eluiert werden.

5.2.2.3 Aufreinigung des male-Konstruktes mittels ÄKTaprime™ plus und HisTrap™ FF Säule

Das Pellet eines 6 Liter Expressionsansatzes (Anzucht bei 37 °C / Expression für 4 h bei 25 °C) wurde mit dem doppelten Volumengewicht mit Lysispuffer (siehe 5.2.2.2) resuspendiert, mit Lysozym (10 mg/ml) für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 3x sonifiziert. Nach dem Abzentrifugieren (30 min bei 10.000 g) wurde der Überstand auf eine 5 ml HisTrap™ FF Säule beladen und das Protein über einen Imidazolgradienten (20 Säulenvolumen, 100 ml) eluiert (Abb. 29).

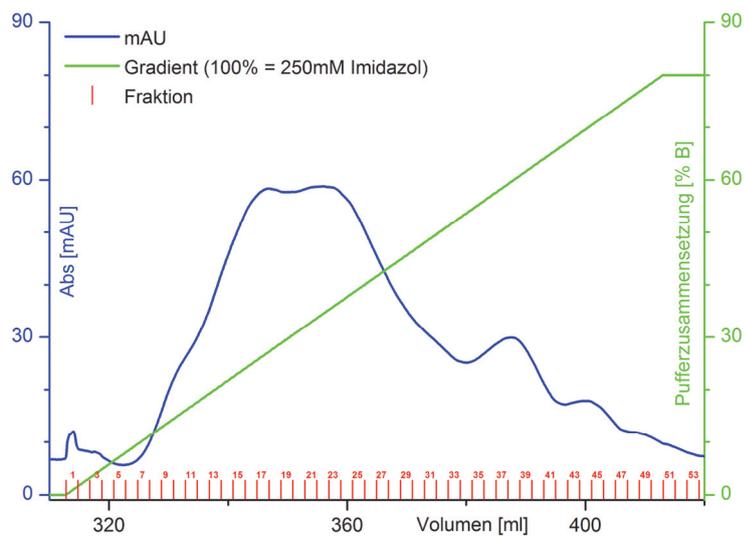


Abb. 29 His-Tag-Aufreinigung von *DLin-7-V69C-male-His*: Der Imidazolgradient (Grün) wurde über 100 ml von 0 % B (10 mM) bis 80 % B (200 mM) gefahren. Die Flussrate betrug 1 ml/min und die Fraktionsgröße (Rot) 2 ml. Die Proteinabsorption (Blau) in mAU zeigt mehrere Maxima (Peaks).

Die Analyse der einzelnen Fraktion (Abb. 30) ergab keine saubere Auftrennung der Proteinbanden.

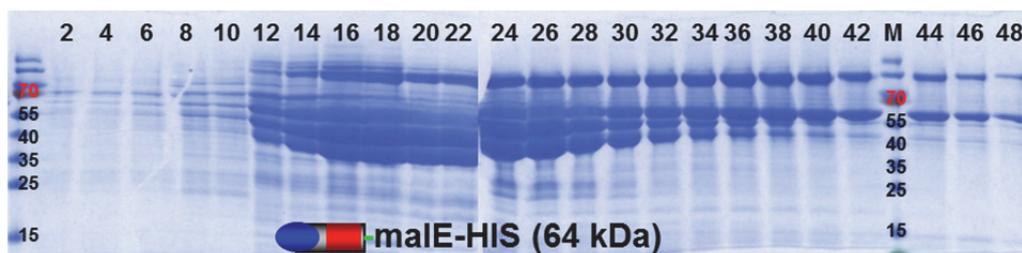


Abb. 30 SDS-PAGE der His-Tag-Aufreinigung von *DLin-7-V69C-male-His*: Neben der gewünschten Proteinbande bei einer Größe von 64 kDa gibt es in allen Fraktionen noch zusätzlich bis zu 3 weitere Banden. Die verschiedenen Proteinbanden sind trotz leichter Gelüberladung klar zu erkennen.

5.2.2.4 Aufreinigung des malE-Konstruktes mittels ÄKTaprime™ plus und MBPTrap HP Säule

Aufgrund der fehlgeschlagenen Proteinseparation mit Hilfe der HisTrap™ FF Säule wurde die Auftrennung über den zweiten Tag (malE) durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen 12 bis 48 (aus 5.2.2.3) vereinigt und gegen Maltosepuffer A dialysiert und anschließend bis zu einem Volumen von 5 ml mittels Amicon Centricon eingengt. Die Beladung der 1 ml MBPTrap HP Säule erfolgte über die Linie A des Äkta-Systems.

	Tris-HCl	NaCl	EDTA	Maltose	pH
Maltosepuffer A	20 mM	200 mM	1 mM	- mM	7.4
Maltosepuffer B	20 mM	200 mM	1 mM	10 mM	7.4

Die Bindung des Proteins an die Säule war erfolgreich, da der Hauptanteil an V69C-malE-His während der Elution mit Maltosepuffer B in Form eines scharfen Peaks von der Säule erfolgte (Abb. 31). Allerdings zeigte die Analyse über die SDS-PAGE ebenfalls 3-4 Proteinbanden unterschiedlicher Größe pro Fraktion (vergleichbar mit Abb. 30) Das Gel wurde aufgrund von Probenüberladung nicht dargestellt.

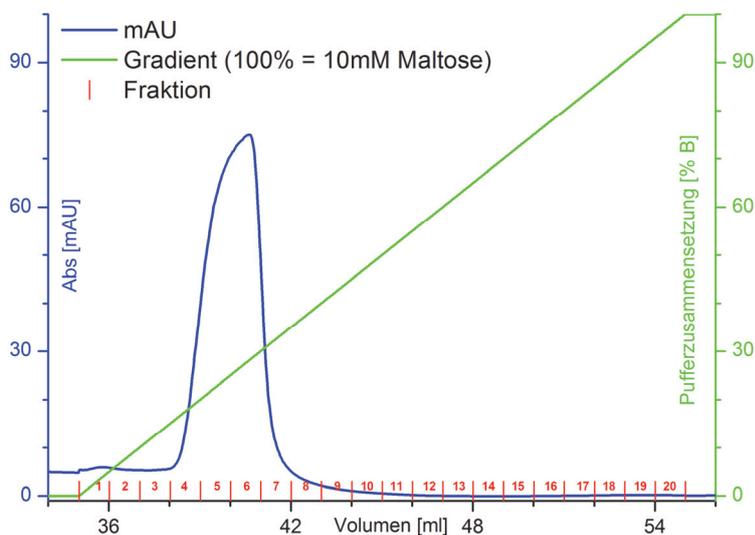


Abb. 31 Maltose-Aufreinigung von DLin-7-V69C-malE-His: Das Elutionsprofil zeigt einen scharfen Peak, der sich über vier Fraktionen 4-7 verteilt. Das gesamte Protein wird bei 20 – 30% B (2-3 mM Maltose) eluiert.

5.2.2.5 Aufreinigung des malE-Konstruktes mittels ÄKTaprime™ plus und Superdex 200 Säule

Mit Hilfe des Superdex 200 wurde ein dritter Versuch unternommen, die drei Proteine voneinander zu trennen. Die Proben aus 5.2.2.4 wurden mit Hilfe eines Amicon Centricons bis auf 1 ml eingengt. Die Probe wurde über den Loop auf die Säule beladen. Für den Lauf wurde der Maltosepuffer A aus 5.2.2.4 mit einer Flussrate von 0.5 ml/min und einer Fraktionsgröße von 1 ml verwendet.

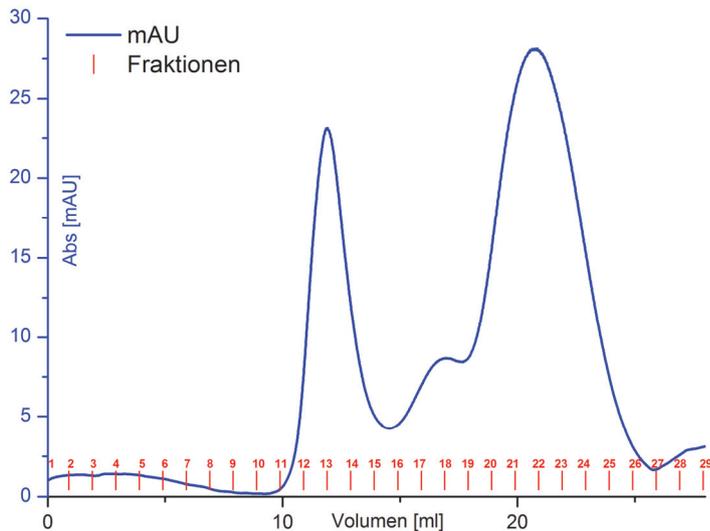


Abb. 32 Superdex 200 Aufreinigung von DLin-7-V69C-malE-His: 1 ml Probenauftragung mit einer Flussrate von 0.5 ml/min und einer Fraktionsgröße von 1 ml. Vereinigt wurden Fraktion 12-15 (1. Peak)

Im Elutionsprofil (Abb. 32) ist ein erster großer Ausschlag (Fr. 12-15), eine kleine Schulter (Fr. 16-18) und ein zweiter größerer Peak (Fr. 19-25) zu erkennen. Die Probenanalyse auf dem SDS-Gel (Abb. 33) zeigt, dass die Größenauftrennung erfolgreich verlaufen ist. Im ersten Peak ist das DLin-7-malE-His-Konstrukt (64 kDa) klar zu erkennen. Ober- und unterhalb der gewünschten Proteinbande erkennt man schwach Anteilig Banden der anderen Proteine, welche sich erst mit fortlaufender Fraktionsnummer intensiver und breiter auf dem Gel abzeichnen. Nach der Vereinigung der vier Fraktionen 12-15 wurde spektroskopisch die Proteinkonzentration (7 μ M) bestimmt. Die Proben wurden mit 20% Glycerin versetzt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

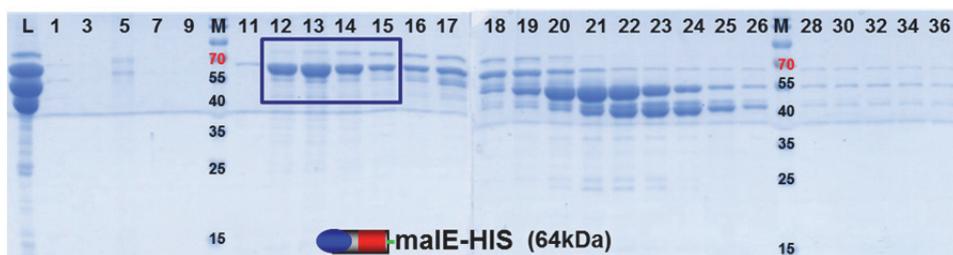


Abb. 33 SDS-PAGE der Superdex 200 Aufreinigung von DLin-7-V69C-malE-His: In der ersten Spalte ist Load (L) aufgetragen, bei dem man eine schwache und drei starke Proteinbanden im Bereich von 70-40 kDa erkennen kann. Das DLin-7-malE-His-Konstrukt mit einer Größe von 64 kDa wird in den Fraktionen 12-15 sichtbar. In den höheren Fraktionen nimmt der Anteil des DLin-7-malE-His-Konstruktes ab und gleichzeitig der Anteil der anderen Proteine deutlich zu.

5.2.2.6 Expression und Aufreinigung des malE-His-Konstruktes mit vollständigem *DLin-7*

Parallel zu den verschiedenen Aufreinigungsversuchen des *DLin-7*-V69C-malE-His-Konstruktes wurde das vollständige *DLin-7*-Gen via PCR mit den Primern pQE_*DLin-7*_pET29 5' und pET-29b(+) 3' (siehe 3.11.1) amplifiziert und in den pET-29b(+)-Vektor kloniert.

	<i>DLin-7</i> -Variante	AS	Sequenz	N-Term	C-Term	Plasmid
1	K98C _{full}	1-195	MADNAEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)
2	T33C-K98C _{full}	1-195	MADNAEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)
3	V69C-K89C _{full}	1-195	MADNAEPLT...	-	malE-His	pET-29b(+)

Tab. 10 *DLin-7*-malE-His-Konstrukte mit vollständigem *DLin-7*

Die Umklonierung gestaltete sich schwieriger als erwartet, da die Sequenzierungen nicht das gewünschte Ergebnis lieferten. Nach dem Austausch aller Enzyme und Ligasen gelang es schließlich eine Einzel- und zwei Doppelvarianten zu generieren. Nach der Midi-Präparation folgte der erfolgreiche Expressionstest bei 37 °C Anzucht und 30 °C Expression (Abb. 34).

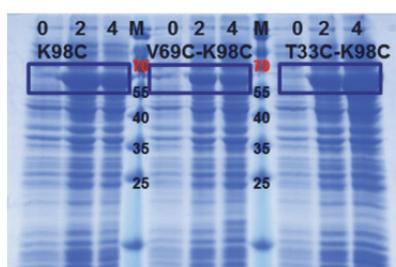


Abb. 34 Expression der drei *DLin-7*_{full}-malE-His-Konstrukte: Es wurden jeweils Proben zu Beginn der Expression (Zeitpunkt 0), nach 2 und nach 4 Stunden gezogen und auf das Gel (SDS-PAGE) aufgetragen. In allen drei Fällen ist eine Expressionsbande mit passender Größe klar erkennbar.

Die Proteinaufreinigung erfolgte analog zu 5.2.2.3 und 5.2.2.5 mit einer Proteinkonzentration von 5.5 µM.

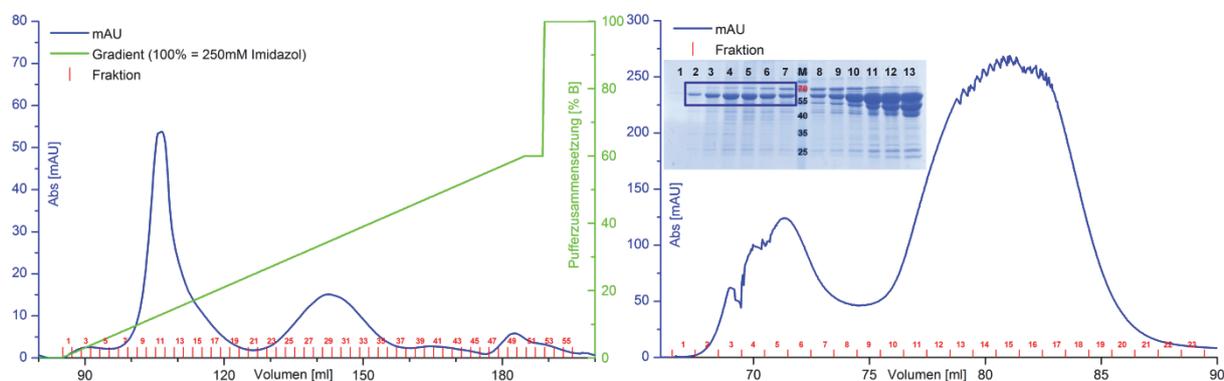


Abb. 35 His- und Superdex 200-Aufreinigung von *DLin-7*-K98C_{full}: Bei der His-Tag-Aufreinigung (links) wurden die Fraktionen des 2. Peaks (Fr. 23-37) vereinigt und für die Superdex 200 Aufreinigung (rechts) weiterverwendet. Dort lieferte der erste Peak (Fr. 2-7) das Protein mit den geringsten Verunreinigungen bei der SDS-PAGE.

5.2.3 Diskussion

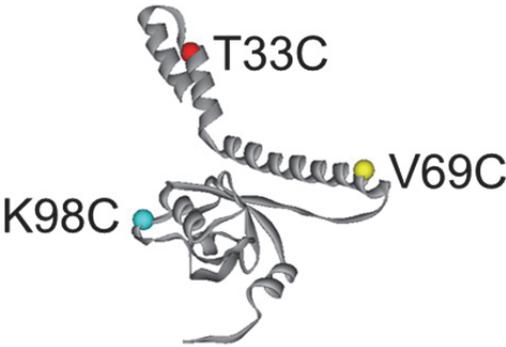
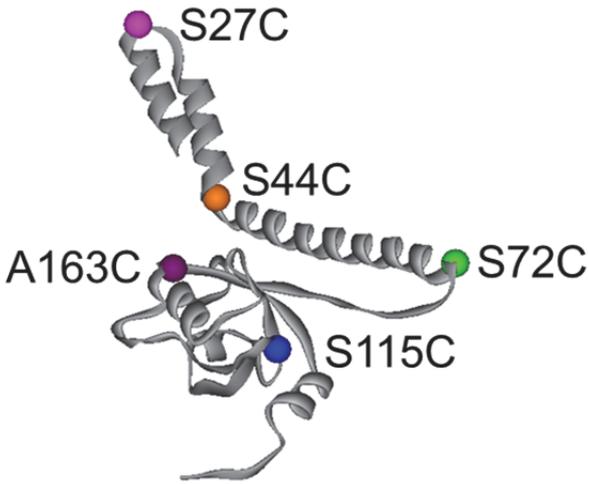
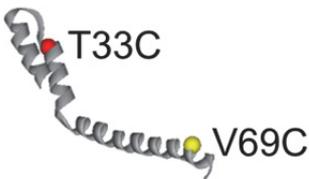
Die Klonierung des *D*Lin-7-Gens in die Plasmide mit den verschiedenen Löslichkeitstags brachte nur bedingt Erfolg. Das GST- und das TRX-Fusionskonstrukt wurden während der Expression weiterhin in inclusion bodies eingelagert und waren somit unlöslich. Das NUS-Konstrukt und das malE-Konstrukt befanden sich nach dem Zellaufschluss im Gegensatz dazu teilweise bzw. vollständig im löslichen Überstand. Nach der Aufreinigung über den His-Tag ergaben sich durch die Analyse des SDS-Gels neue Probleme. In den einzelnen Elutionsfraktionen befanden sich neben dem gesuchten Protein noch 2-3 weitere Proteine mit unterschiedlicher Größe. Die gleichzeitige Elution von der His-Tag-Säule ließ darauf schließen, dass verschieden große His-getaggte Proteine (z.B. Dimere und Degradationsprodukte) vorliegen. Die Variation in der Temperatur während der Expression lieferte das gleiche Ergebnis. Daraufhin wurde das Konstrukt über den malE-Tag aufgereinigt. Aber auch hier gab es keine gute Auftrennung der 3-4 Proteinbanden im Elutionspeak. Erst im dritten Versuch über eine Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von Superdex 200 gelang die Auftrennung der verschieden großen Proteine. Jedoch war die gewonnene Proteinkonzentration von ca. 10 μ M zu wenig um dieses Protein mit Farbstoff zu markieren. Weitere Versuche, die Ausbeute an Protein durch Variationen in der Expression (Wahl der kompetenten Zellen, Anzucht- und Expressionstemperatur) zu erhöhen, brachten keinen nennenswerten Erfolg. Daher wurde beschlossen alle weiteren Versuche mit den Löslichkeitstags zu beenden und sich stattdessen mit der denaturierenden Aufreinigung zu befassen. Die Wahl fiel dabei auf das *D*Lin-7-Konstrukt mit dem C-terminalen 6xHis-Tag. Der Vorteil gegenüber dem *D*Lin-7 mit dem N-terminalen 6xHis-Tag ist, dass bei der C-terminalen Variante das *D*Lin-7 zuerst katalysiert wird und dann erst der Tag folgt. Somit ist es bei der C-terminalen His-Tag-Aufreinigung sehr wahrscheinlich, dass wenn ein His-getaggtes Protein an die Ni-NTA-Matrix bindet, dann ein Protein in seiner gesamten Länge inkl. Tag vorliegt. Im umgekehrten Fall gibt nur die Analyse des SDS-Gels durch das Auftreten der richtigen Proteinbande im Gel Auskunft darüber, ob das Protein in seiner gesamten Größe vorhanden ist. Im folgenden Teil wird auf die Generierung der neuen *D*Lin-7-Konstrukte genauer eingegangen, bei denen neben den bekannten Punktmutationen (AS-Position 33, 69 und 98) auch weitere Mutationen im *D*Lin-7-Gen vorgenommen wurden.

5.3 *DLin-7*-Varianten mit N-terminalen Poly-Histidin-Tag

5.3.1 Durchführung

5.3.1.1 Umklonierung in pET-22b(+)

Das pET-22b(+)-Plasmid zeichnet sich durch einen C-terminalen 6xHis-Tag aus. Die Konstrukte 1-18 enthalten jeweils das vollständige *DLin-7*-Genom (195 AS), während die Konstrukte 19-21 nur die L27-Domäne (AS 1-73) beinhalten. Mit Hilfe der entsprechenden Primer (siehe Abschnitt 3.11.2) und dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) wurden die Varianten generiert.

Konstrukt	<i>DLin-7</i> -Variante	Homologiemodell (aus 2.6) mit markierten Positionen
1	Wildtyp	
2	T33C	
3	V69C	
4	K98C	
5	T33C-V69C	
6	T33C-K98C	
7	V69C-K89C	
8	S27C	
9	S44C	
10	S72C	
11	S115C	
12	A163C	
13	S27C-S72C	
14	S27C-S115C	
15	S27C-A163C	
16	S44C-S72C	
17	S44C-S115C	
18	S72C-A163C	
19	T33C (L27, 1-73)	
20	V69C (L27, 1-73)	
21	T33C-V69C (L27, 1-73)	

In Abb. 36 sind die verschiedenen PCR-Produkte dargestellt. Dabei sind fünf verschiedene Annealing-Temperaturen (Spur 1-5: 1 = 61,8 °C, 2 = 62,7 °C, 3 = 63,6 °C, 4 = 64,4 °C, 5 = 65,3 °C) pro Variante getestet worden, um sicher zu sein, dass der Primer spezifisch an das DNA-Template bindet.

PCR *D*Lin-7-Inserts

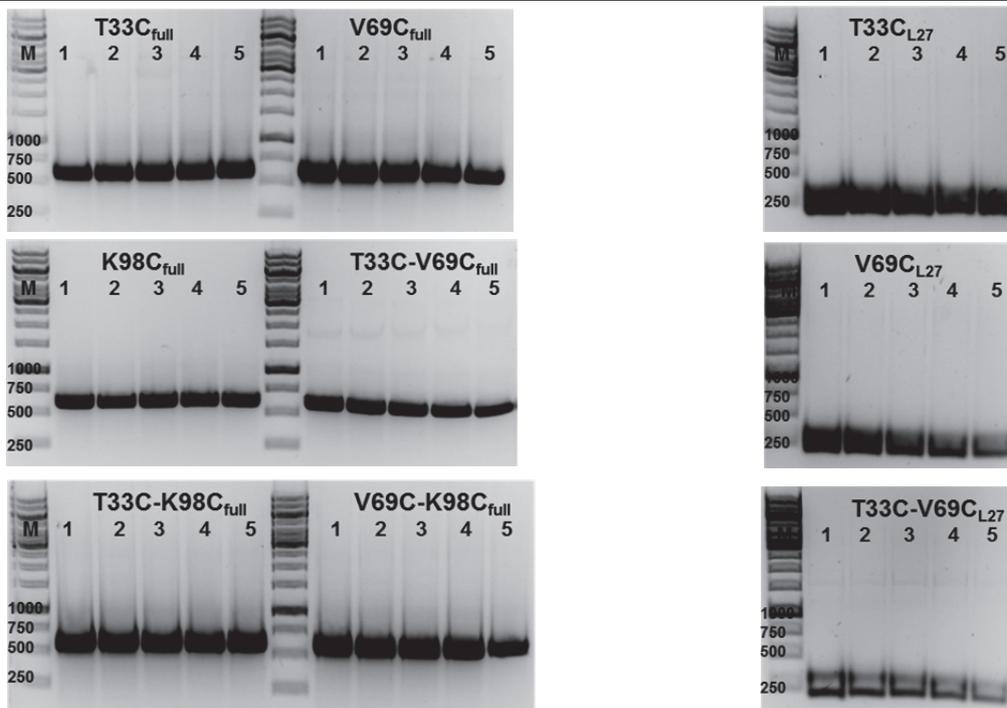


Abb. 36 Agarosegele von amplifizierten *D*Lin-7-Inserts: Für jede Variante wurde die PCR mit fünf verschiedenen Annealing-Temperaturen (Spur 1-5: 1 = 61,8 °C, 2 = 62,7 °C, 3 = 63,6 °C, 4 = 64,4 °C, 5 = 65,3 °C) durchgeführt. Die „full“-Inserts (linke Spalte) bestehen aus 585 bp und die „L27“-Inserts (rechte Spalte) aus 219 bp.

Anschließend wurden die verschiedenen amplifizierten DNA-Fragmente enzymatisch an ihren Schnittstellen verdaut und mit dem linearisierten pET-22b(+)-Vektor ligiert. Abb. 37 zeigt ein Kontrollagarosegel nach der Mutagenese und der anschließenden Midi-Präparation. Bei jeder Variante ist eine klar erkennbare Plasmid- und Insert-Bande im Gel zu erkennen. Jede Einzel- und Doppelvariante wurde vor Beginn der Expression via Sequenzierung überprüft.

Einzelvarianten

Doppelvarianten

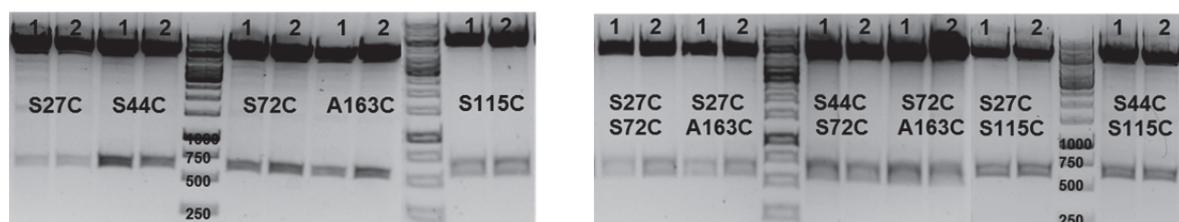


Abb. 37 Kontrollagarosegele nach Mutagenese: Die mutagenisierten Plasmide wurden nach der Midi-Präp mit den Enzymen *Nde*I und *Hind*III doppelt verdaut. Die Inserts mit einer Größe von 585 bp liegen alle zwischen der 500er und 750er Markerbande. Die Mutationen wurden per Sequenzierung bestätigt.

5.3.1.2 Expression der *DLin-7*-His-Varianten

Die Anzucht der 2 bis 6 l Kulturen erfolgte bei 37 °C und die Expression nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 30 °C. Nach 4 h erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (30 min bei 10.000 g). Die Zellpellets wurden bis zur ihrer Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.3.1.3 Denaturierende Aufreinigung mittels ÄKTaprime™ plus und HisTrap™ FF Säule

Die verwendeten Puffer für die Lysis und Elution sowie für die Dialyse sind im Abschnitt 4.2.9 aufgelistet und die Aufreinigung erfolgte wie in 5.2.2.3 beschrieben.

5.3.1.4 Wahl des Donor- und Akzeptorfarbstoffes

Im Zuge der Prozessoptimierung und der Verbesserung der Markierungseffizienz wurde eine *DLin-7*-Variante mit jeweils drei Donor- und drei Akzeptorfarbstoffen (Abschnitt 3.12) markiert. Zusätzlich wurde getestet, ob bei Doppelvarianten die Reihenfolge der Farbstoffmarkierung (1. Schritt: Donormarkierung, 2. Schritt: Akzeptormarkierung oder umgekehrt) einen Einfluss auf die Markierungseffizienz hat. Die Markierung erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt 4.2.9.

5.3.1.5 Einzelmolekül-Multiparameterfluoreszenzdetektion (sMFD)

Im Gegensatz zu 5.1.1.7 (sMFD-Messungen der *DLin-7*-Varianten mit C-terminalen His-Tag) wurden die verdünnten Proteinlösungen (<200 pM) in einem Nunc Lab-Tek II Chambered Coverglass (Thermo Scientific) gemessen.

5.3.2 Ergebnisse

5.3.2.1 Aufreinigung der *D*Lin-7-His-Varianten

5.3.2.1.1 Native Aufreinigung

Die *D*Lin-7-S72C-Einzelvariante wurde in einem 2 l Ansatz in BL21 kompetenten Zellen bei 37 °C angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0.5 induziert (1mM IPTG) und anschließend für 4 h bei 30 °C exprimiert. In Abb. 38 A ist eine kräftige Proteinbande nach 4 h bei 23 kDa zu erkennen.

	Tris-HCl	NaCl	Imidazol	pH
Lysispuffer	50 mM	300 mM	-	7.5
Elutionspuffer	50 mM	300 mM	500 mM	7.5

Das geerntete Zellpellet wurde in 25 ml Lysispuffer inkl. Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert, für 1 h auf Eis inkubiert und 3x für 45 sec sonifiziert. Die Suspension wurde für 15min bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand (20 ml) über Leitung A auf eine 5 ml HisTrap™ FF Säule beladen. Abb. 38 zeigt das Aufreinigungsprofil: Beladung der Säule (140-160 ml), Waschschrift (160-230 ml), einen großen Elutionpeak (Fraktion 2-4) und einen breiten bzw. flachen Peak (Fraktion 9-48). Für die Elution wurde ein Stufengradient von 0 - 20 % B (230-265 ml) und von 20 - 100% B (265-360 ml) gefahren. Die eluierten Fraktionen sind mittels SDS-PAGE analysiert worden (Abb. 38 B).

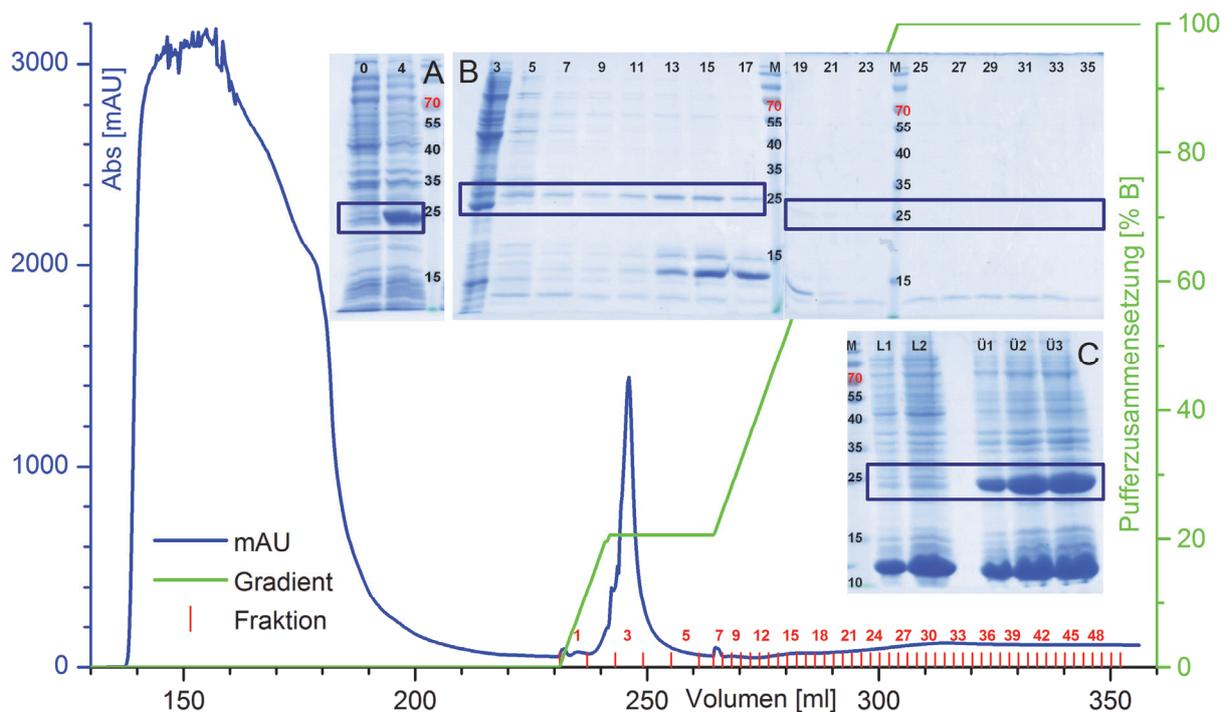


Abb. 38 Native His-Tag-Aufreinigung von *D*Lin-7-S72C: Das Aufreinigungsprofil zeigt bei 20% B einen großen Peak. Während der zweiten Stufe des Gradienten erfolgt nur eine breite, flache Elution. (A) SDS-PAGE: Expression bei 30 °C zum Zeitpunkt 0 h und 4 h. (B) SDS-PAGE mit den eluierte Fraktionen 3-35. (C) SDS-PAGE: Vergleich unterschiedlicher Mengen an nativem Überstand (L1 und L2) mit dem Überstand vom mit Harnstoff behandeltem Pellet (Ü1-Ü3).

Da die Proteinbanden im Gel nur sehr schwach waren, wurde das Zellpellet in 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol und 6 M Urea, pH 8.0 resuspendiert, sonifiziert und anschließend erneut zentrifugiert. Die Probenauftragung (unterschiedliche Mengen an nativem Überstand und an Überstand von mit Harnstoff behandeltem Pellet) auf dem Gel (Abb. 38 C) zeigten, dass *DLin-7-S72C* in Form von inclusion bodies im Zellpellet eingelagert wurde. Daher erfolgte die nächste Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen, um das produzierte Zielprotein nutzen zu können.

5.3.2.1.2 Denaturierende Aufreinigung

Die Expressions- und die Aufreinigungsbedingungen wurden beibehalten, allerdings die Pufferbedingungen wie folgt geändert:

	Tris-HCl	NaCl	Urea	Imidazol	pH
Lysispuffer	50 mM	300 mM	6 M	-	7.5
Elutionspuffer	50 mM	300 mM	6 M	500 mM	7.5
Dialysepuffer	150 mM	-	2 M	-	7.5

Der Imidazolgradient wurde linear von 0 – 100% B über 10 Säulenvolumen (50 ml) gewählt (siehe Abb. 39). Anschließend folgten die Vereinigung der Fraktionen 10-17 und der Pufferaustausch über Nacht bei 4 °C gegen den Dialysepuffer. Die Kontrolle nach der Dialyse via SDS-PAGE zeigte eine starke Proteinbande ohne Verunreinigungen (siehe SDS-PAGE in Abb. 39). Die spektroskopisch bestimmte Proteinkonzentration lag bei 28 µM.

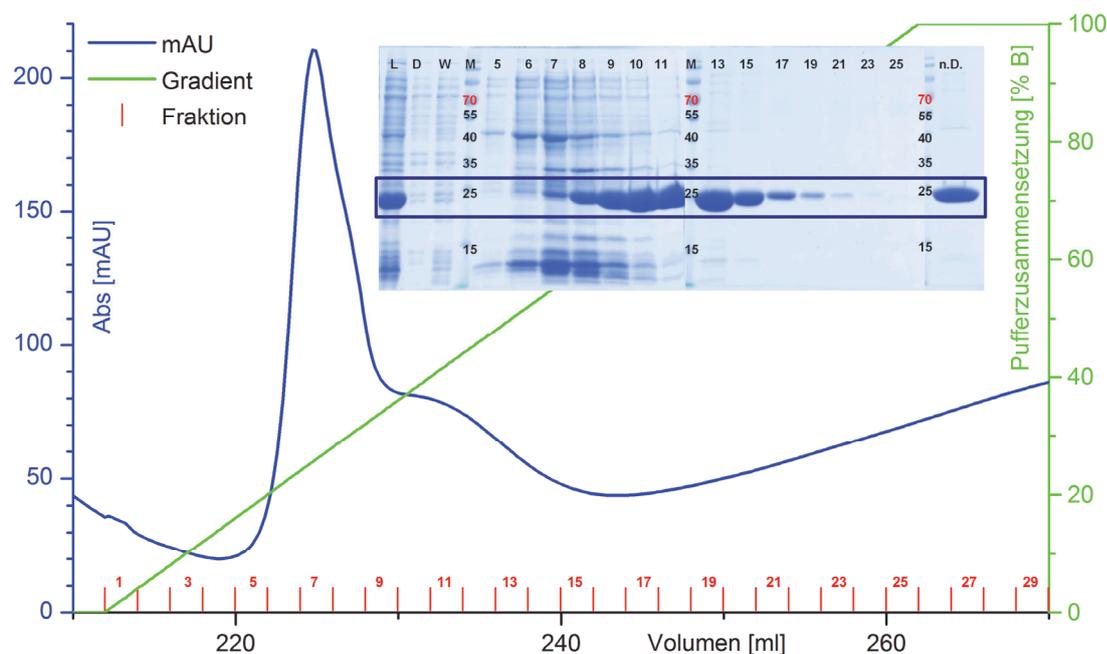


Abb. 39 Denaturierende His-Tag-Aufreinigung von *DLin-7-S72C*: Auf dem Kontrollgel (SDS-PAGE) sind neben dem Überstand (Load, L), Durchfluss (D), Wasch (W) und den eluierenden Fraktionen auch die vereinigten Fraktionen 10-17 (Schulter nach dem Peak) nach der Dialyse (n. D.) aufgetragen. Diese zeigten keine Verunreinigungen.

5.3.2.1.3 Farbstoffmarkierung der *DLin-7-S72C*-Einzelvarianten mit A488 und A647

Die Einzelvariante *DLin-7-S72C* wurde jeweils mit dem Donor A488 und mit dem Akzeptor A647 markiert. Dazu wurden im ersten Schritt 2.5 ml Protein [28µM] mit 4.7 µl β-ME [20mM] zur Reduktion der Disulfidbrücken versetzt und für 1h bei RT auf dem Stuart® Rotator SB3 inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der PD-10-Säule um den Verdünnungs- (2.5/3.5) und den Rückgewinnungsfaktor (0.9) korrigiert, bevor jeweils im 5x Überschuss A488 bzw. A647 dazu gegeben wurde. Die Kopplungsreaktion erfolgte bei RT für 2-3 h auf dem Stuart® Rotator SB3. Die Proben wurden anschließend für 2 min bei 13.000 g zentrifugiert. Es bildete sich kein Pellet, so dass der gesamte Markierungsansatz auf die HiPrep™ 26/10 Desalting Column geladen wurde (Abb. 40). Dabei wurde markiertes Protein von überschüssigem freien Farbstoff getrennt. Nach der Gelfiltration wurde der Markierungsgrad spektroskopisch bestimmt (18 µM *DLin-7-S72C* zu 96% mit A488 und 26 µM *DLin-7-S72C* zu 60% mit A647 markiert). Die verwendeten Pufferbindungen sind im Abschnitt 4.2.9 beschrieben.

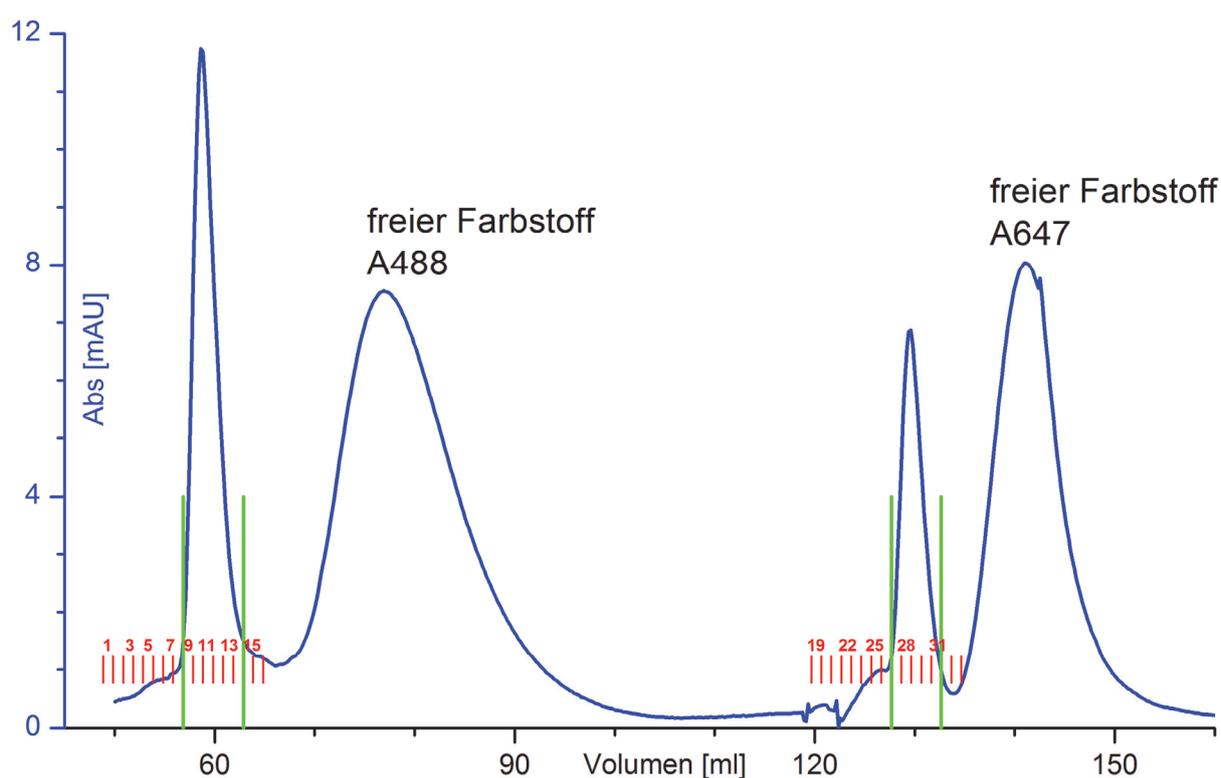


Abb. 40 Gelfiltration: *DLin-7-S72C* mit 5x Überschuss an A488 und an A647. Der erste Peak (Fraktion 9–13) stellt mit A488 markiertes Protein dar gefolgt vom freien A488 Farbstoff. Der dritte Peak (Fraktion 27–31) beinhaltet mit A647 markiertes Protein gefolgt von freiem A647 Farbstoff. Spektroskopische Bestimmung des Markierungsgrades ergaben: 18µM *DLin-7-S72C* zu 96% mit A488 und 26µM *DLin-7-S72C* zu 60% mit A647 markiert. Pufferbedingungen: 150 mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 7.5.

5.3.2.1.4 Farbstoffmarkierung von *D*Lin-7-Doppelvarianten mit A488 und A647

Nach erfolgreicher Expression, His-Tag-Aufreinigung und Pufferaustausch über die PD-10 wurden die *D*Lin-7-Doppelvarianten sequentiell markiert. Dabei wurde getestet, ob die Reihenfolge des Farbstoffes einen Einfluss auf den Markierungsgrad hat. Im ersten Schritt wurde mit dem ersten Farbstoff (0.8x) und im zweiten Schritt mit dem komplementären Farbstoff (10x) markiert. Dabei wurde nach dem Schema in Abb. 17 vorgegangen (siehe Abschnitt 4.2.9).

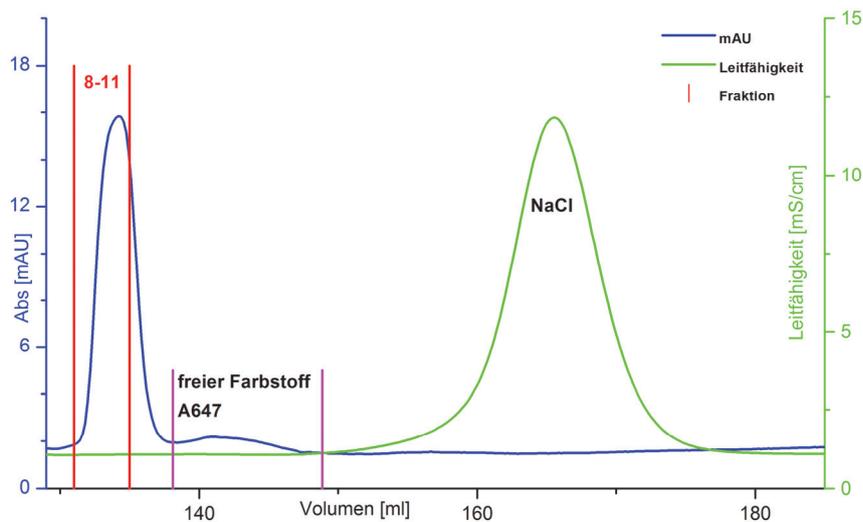


Abb. 41 Gelfiltration (Desalting 26/10) von *D*Lin-7-T33C-K98C: Markiertes Protein (Fraktion 8-11) konnte von freiem A647-Farbstoff getrennt werden. (Puffer: 20mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.24).

Abb. 41 zeigt die Trennung zwischen markiertem Protein (Fraktion 8-11) und dem freien Farbstoff. Das Signal des freien Farbstoffes ist gering, da mit einem 0.8x Unterschuss markiert wurde. Das Kochsalz konnte ebenfalls sauber getrennt werden. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden im nächsten Schritt über einen Ionenaustauscher gegeben um eine Auftrennung zwischen unmarkierten, einfach- und doppelt-markierten Protein zu erzielen (siehe Abb. 42). Das Fraktionen, die das einfachmarkierte Protein enthielten wurden im nächsten Schritt im 10x Überschuss markiert und anschließend der überschüssige Farbstoff über eine Gelfiltration getrennt (siehe Abb. 43).

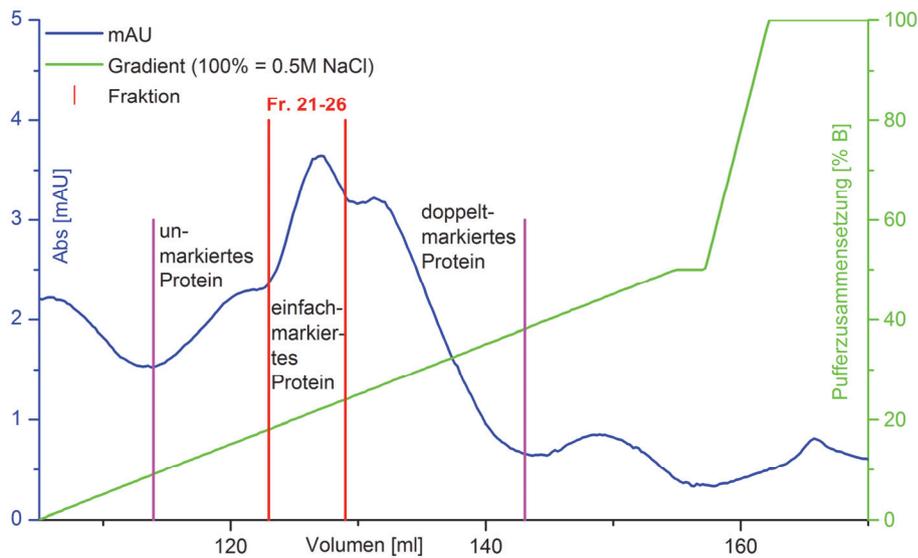


Abb. 42 Ionenaustauscher (Capto Q) von DLin-7-S27C-S72C [0.8x A647]: Auftrennung von unmarkiertem, einfach markiertem und doppelt markiertem Protein. Fraktionen 21-26 wurden vereinigt und mit 10x A488 im nächsten Schritt markiert. (Puffer A: 20mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.25; Puffer B: 20mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2M Urea, pH 8.32)

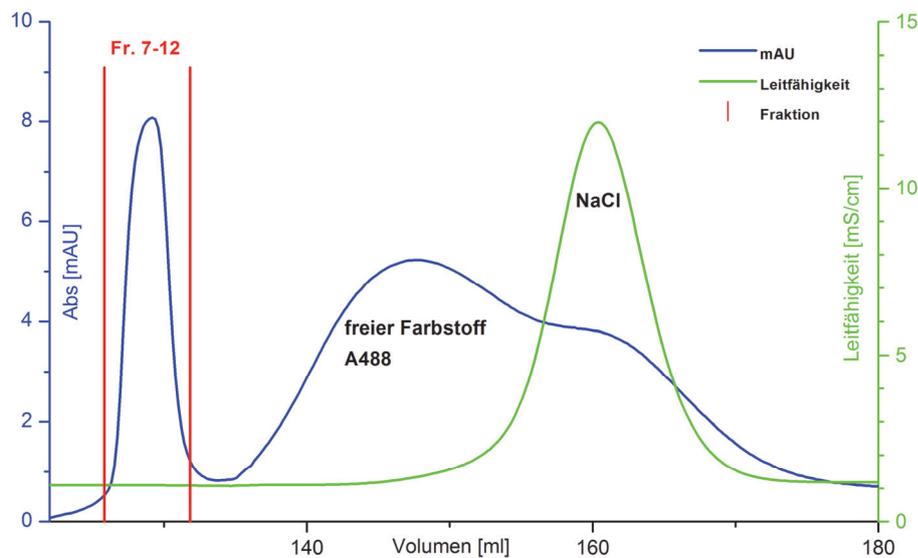


Abb. 43 Gelfiltration (Desalting 26/10) von DLin-7-T33C-K98C [0.8x A647, 10x A488]: Trennung zwischen doppelt markiertem Protein und dem freien Farbstoff A488. (Puffer: 20mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.24)

Basierend auf den Ergebnissen der Markierungsgrade (Tab. 11) wurde die Reihenfolge für die Farbstoffmarkierung für die Doppelvarianten festgelegt: 0.8x Akzeptor und anschließend 5x Donor. Ein weiteres Argument für die Wahl dieser Reihenfolge war die bessere Auftrennung über die Anionenaustauschersäule (Capto Q) aufgrund der höheren Ladung des Akzeptors gegenüber dem Donor.

S27C-S72C	0.8x A647	5x A488	Summe
96 μ M [4 ml]	94 %	36 %	130 %

S27C-S72C	0.8x A488	5x A647	Summe
64 μ M [4ml]	50 %	45 %	95 %

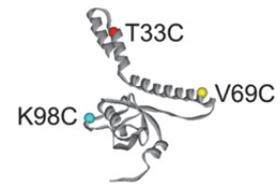
Tab. 11 Markierungsgrade nach sequenzieller Farbstoffmarkierung: Im ersten Fall wurde erst mit Akzeptor und anschließend mit Donor und im zweiten Fall umgekehrt markiert. Sowohl die Summe der Markierung als auch die effektivere Trennung der einzelnen Fraktionen (unmarkiert, einfach markiertes und doppelt markiertes Protein) während des Anionenaustauscherslaufes sprachen für die erste Reihenfolge der Farbstoffe beim sequentiellen Markieren.

In Kooperation mit Marcel Lagedroste wurden im Zuge seiner Bachelor-Arbeit (Lagedroste 2011) u.a. die folgende *D*Lin-7-His-Varianten markiert und erste Einzelmolekülmessungen durchgeführt:

Einzelvariante	Konz	A488
T33C	10 μ M	31 %
V69C	7 μ M	86 %
K98C	14 μ M	86 %

Einzelmutante	Konz	A647
T33C	12 μ M	24 %
V69C	103 μ M	15 %
K98C	9 μ M	71 %

Doppelvariante	Konz	A647	A488	Summe
T33C-V69C	0.7 μ M	---	---	---
T33C-K98C	2.3 μ M	91 %	107 %	198 %
V69C-K98C	3.9 μ M	62 %	76 %	138 %



Tab. 12 Markierungsgrade für *D*Lin-7-His-Varianten: Die jeweiligen Einzel- und Doppelvarianten an den Positionen T33C, V69C und K98C. Der Markierungsgrad der Doppelmutante *D*Lin-7-T33C-V69C konnte aufgrund eines zu schwachen Absorptionssignals nicht bestimmt werden.

5.3.2.2 SMD-Optimierung mit A647 als Akzeptor und A488 als Donor

Zur Verbesserung der Datenqualität der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wurden verschiedene Messbedingungen getestet: (1) Der Einfluss und Wirkungsgrad von denaturierenden Substanzen (GdHCl und Harnstoff), (2) Variation der Anregungsleistung am Objektiv und (3) der Einfluss von Trolox als Reduktionsmittel auf den eventuell photooxidierten Farbstoff.

5.3.2.2.1 6 M GdHCl vs. 6 M Harnstoff

Um den maximalen Abstand zwischen den beiden Farbstoffen zu detektieren, erfolgte eine Denaturierung der Doppelvariante *DLin-7-T33C-K98C* und der Einzelvarianten *DLin-7-T33C* und *DLin-7-V69C* jeweils in 6 M GdHCl und 6 M Harnstoff. Die Leistung (Power) am Objektiv betrug 160 μ W.

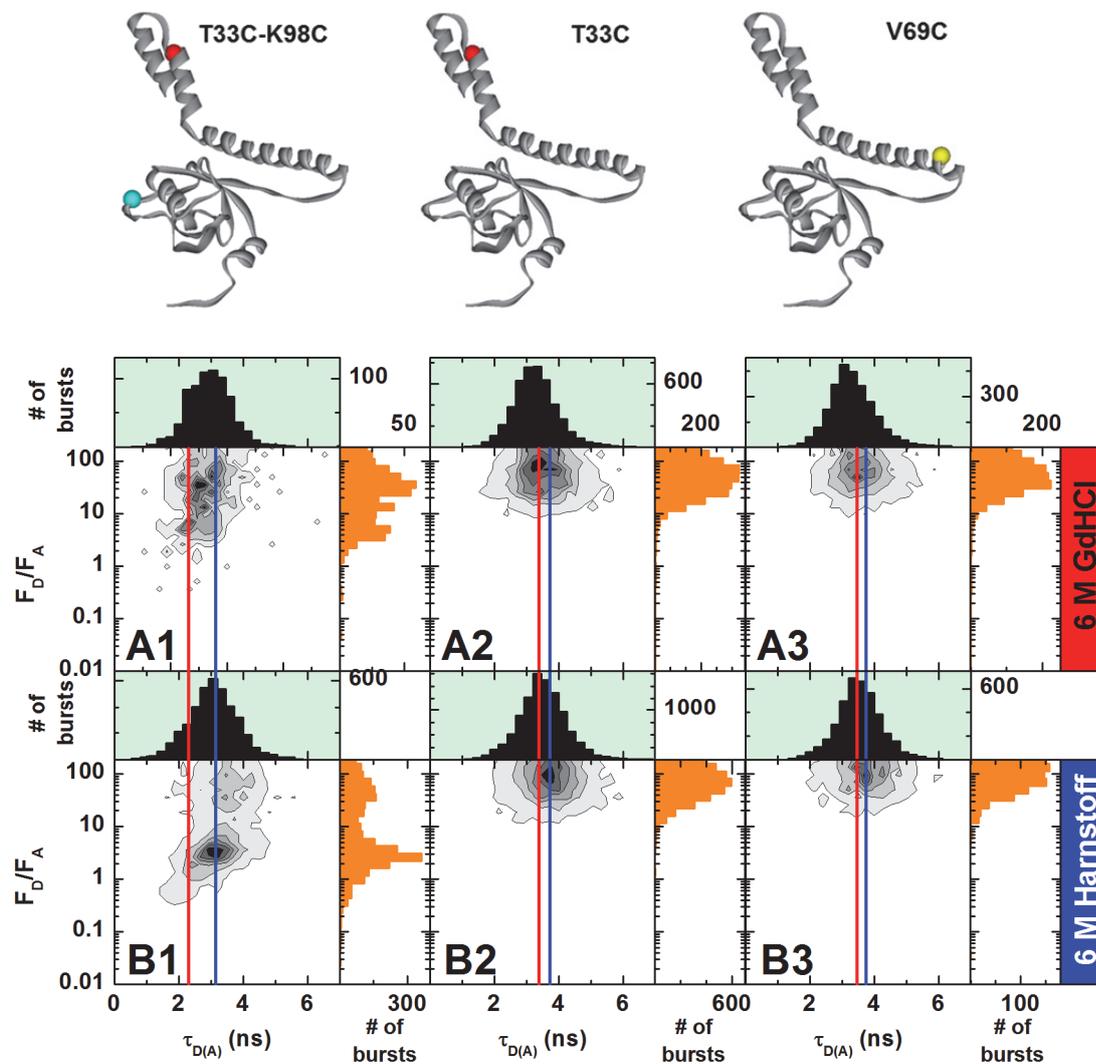


Abb. 44 Vergleich 6 M GdHCl gegen 6 M Harnstoff: Die Doppelvariante *DLin-7-T33C-K98C* (1) [0.8x A647 - 10x A488] und die beiden Einzelvarianten *DLin-7-T33C* (2) [5x A488] und *DLin-7-V69C* (3) [5x A488] wurden jeweils in 6M GdHCl (A1-A3) und 6M Harnstoff (B1-B3) vermessen. In allen 6 Fällen wurde F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ aufgetragen. Die roten Linien verlaufen durch das Zentrum der FRET-Population der GdHCl- und die blauen Linien durch das der Harnstoff-Messungen. (Puffer 1 = 6M GdHCl, 50mM Tris, 300mM NaCl, pH 7,5, Puffer 2 = 6M Urea, 50mM Tris, 300mM NaCl, pH 7.5)

In der ersten Spalte von Abb. 44 sind die SMD-Daten der doppelt markierten Variante dargestellt. Im 2D-Plot F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ (A1, *DLin-7-T33C-K98C* in 6 M GdHCl) sind die Hintergrund korrigierten Daten aufgetragen. Der Übergang zwischen Donor-only- und der FRET-Population ist fließend, wogegen bei der Messung in 6 M Harnstoff (B1) sowohl Donor-only als auch die FRET-Population klar erkennbar sind. Die senkrechten Linien durch A1 und B1 geben jeweils die am häufigsten auftretende Fluoreszenzlebensdauer an. Da die rote Linie links neben der blauen Linie bzw. bei kürzeren Lebensdauern liegt, wird ersichtlich, dass in 6 M GdHCl die Konformation von *DLin-7* kompakter ist als in 6 M Harnstoff. Den gleichen Effekt lieferten die Messungen der beiden Einzelvarianten. Zudem zeigten die längeren Donorlebensdauern von *DLin-7-T33C* (A2, B2) und *DLin-7-V69C* (A3, B3), dass Harnstoff den Donor weniger stark löscht. Allerdings war die Hintergrundzählrate in der reinen GdHCl-Pufferlösung deutlich höher als beim reinen Harnstoffpuffer. Eine Reinigung der Puffer durch Aktivkohle ergab keinen signifikanten Unterschied, wodurch die Denaturierung weiter mit Harnstoff durchgeführt wurde, um die Messergebnisse nicht durch ein starkes Hintergrundsignal zu verfälschen.

5.3.2.2 Variation der Anregungsleistung am Objektiv

Die Doppelvariante *DLin-7-V69C-K98C* markiert mit A647 und A488 wurde in Anwesenheit von 500 nM unmarkiertem *DLin-7-V69C-K98C* in nativen Puffer bei drei verschiedenen Leistungen am Objektiv (171 μ W (A), 66 μ W (B) und 37 μ W (C)) gemessen (Abb. 45).

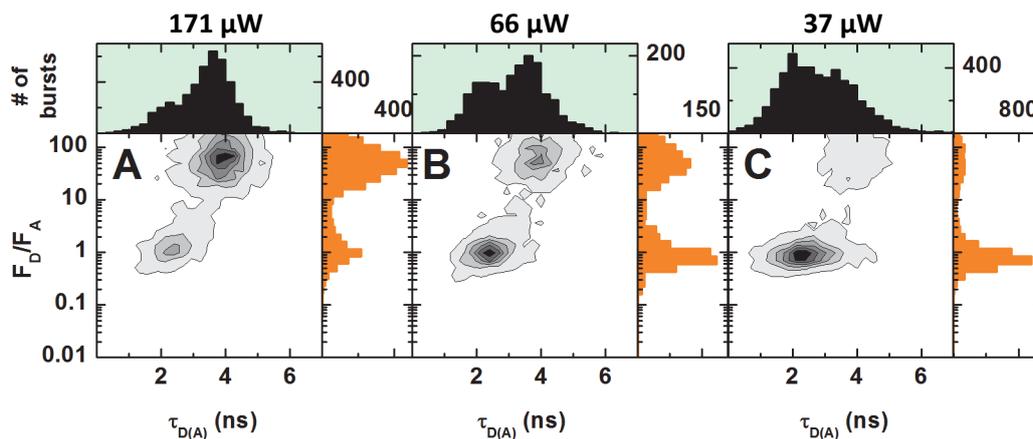


Abb. 45 Leistungsserie: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung der Doppelvariante *DLin-7-V69C-K98C* [0.8x A647 - 10x A488] im nativen-Puffer (Puffer 2) mit jeweils 500 nM unmarkiertem *DLin-7-V69C-K98C* bei 171 μ W (A), 66 μ W (B) und 37 μ W (C) Leistung am Objektiv. Puffer 1 = 6 M Urea, 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5, Puffer 2 = 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5

Die F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragungen der Doppelvariante *DLin-7-V69C-K98C* in Anwesenheit von 500 nM unmarkiertem Protein zeigt in allen drei Messungen jeweils zwei klar abgegrenzte Populationen. Eine Donor-only-Population bei 4 ns und eine FRET-Population bei ca. 2 ns. Die jeweiligen Populationen ändern sich mit der Leistungsreduzierung. Mit sinkender Leistung nimmt die

Donor-only-Population immer weiter ab und die FRET-Population zu. Dieses Verhalten lässt sich mit dem Bleichen des Akzeptorfarbstoffes erklären. Die Folgemessungen wurden daher bei niedriger Leistung am Objektiv (34 – 38 μW) durchgeführt.

5.3.2.2.3 Trolox

Die Leistungsreduzierung des Lasers und die damit verbundene Verringerung des Akzeptorbleichens führte wie in Abschnitt 5.3.2.2.2 beschrieben zu einer großen FRET-Population. Zur Überprüfung, ob das Reduktionsmittel Trolox diesen Effekt sogar noch verstärkt, wurde die Doppelvariante *D*Lin-7-V69C-K98C bei 37 μW mit und ohne Trolox gemessen. Es wurde eine gesättigte Troloxlösung (10 mM) angesetzt und anschließend 50x (200 μM) in den jeweiligen Puffern verdünnt. Die F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung in Abb. 46 zeigt, dass im Fall A (kein Trolox) die Donor-only-Population eine Fluoreszenzlebensdauer von 3 - 5 ns besitzt. Zudem ist die Form der Häufigkeitsverteilung der FRET-Populationen asymmetrisch mit einem kleinen Ausläufer zu niedrigeren FRET-Effizienzen, was ein Zeichen für Akzeptorphotobleichen sein kann. Im Fall B (mit Trolox) ist der Anteil der Donorpopulation deutlich reduziert und die Häufigkeitsverteilung der FRET-Population ist sehr symmetrisch. Folglich findet durch die Zugabe von Trolox im Puffer eine zusätzliche Stabilisierung des Akzeptors statt, wodurch noch weniger Akzeptorbleichen auftritt.

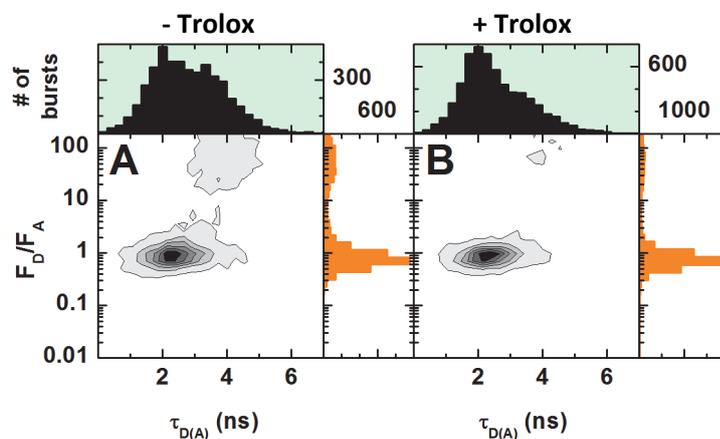


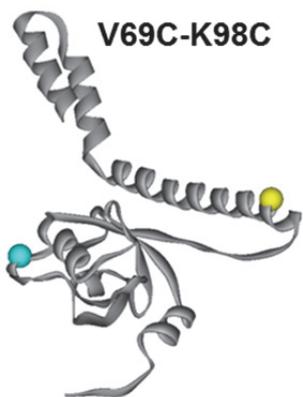
Abb. 46 Trolox-Einfluss: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung der Doppelvariante *D*Lin-7-V69C-K98C [0.8x A647 - 10x A488] im nativen Puffer mit jeweils 500nM unmarkiertem *D*Lin-7-V69C-K98C; links ohne Trolox (A) und rechts mit 200 μM Trolox (B). Die Pufferbedingungen und Verdünnungsschritte sind im Anhang beschrieben.

Durch die Anpassung der Laserleistung und durch den Einsatz von Trolox konnte die Qualität der Messungen gesteigert werden. Im folgenden Abschnitt wird überprüft, ob durch den Einsatz von verschiedenen Donor- und Akzeptorfarbstoffen die Datenqualität noch weiter gesteigert werden kann.

5.3.2.3 Farbstoffmarkierung mit optionalen Donor- & Akzeptorfluorophoren

Im Einzelmolekül-FRET-Experiment ist die Wahl von Farbstoffen und Markierungspositionen essentiell. Artefakte durch Photobleichen, sterische Hinderungen oder chemische Wechselwirkungen mit der unmittelbaren Umgebung der Farbstoffe erschweren die Interpretation der Ergebnisse erheblich. Zudem führt das Photobleichen der Farbstoffe zur Verzerrung der FRET-Population. Da eine SMD-Messung im Schnitt 60-90 min dauert, ist ebenfalls darauf zu achten, dass das Ausfallen und die Aggregation des untersuchten Proteins ausgeschlossen werden können.

Im Folgenden wurden die Doppelcysteinvariante *DLin-7-V69C-K98C* mit neun verschiedenen Farbstoffkombinationen (siehe Tab. 13) sequentiell markiert. Da in Testmarkierungen die Auftrennung der verschiedenen Proteine (un-, einfach und doppelt markiert) aufgrund der höheren Ladung der Akzeptorfarbstoffe im Gegensatz zu den einfach geladenen Donorfarbstoffen erfolgreicher war, wurde V69C-K98C zuerst mit 0.8x Akzeptor- und anschließend mit 5x Donor-Farbstoff markiert.

 <p>V69C-K98C</p>	Donorfarbstoffe	Akzeptorfarbstoffe
	Bodipy FL	Alexa 594 (A594)
	Alexa 488 (A488)	Alexa 647 (A647)
	Atto 488	Atto 647 N

Tab. 13 *DLin-7-V69C-K98C* und die verschiedenen Donor- und Akzeptorfluoreszenzfarbstoffe

Das Ergebnis der verschiedenen Farbstoffmarkierungen ist in Tab. 14 dargestellt. Ein Markierungsgrad größer als 100% ist möglich, da in *DLin-7-V69C-K98C* zwei freie Cysteine vorhanden sind. Der maximale Markierungsgrad beträgt dadurch 200%.

Der Markierungsgrad von Akzeptor A594 mit den drei verschiedenen Donoren lag in keinem der drei Fälle über 100%. Die Kombinationen mit A647 als Akzeptor lieferten mit Bodipy FL (160%) und mit A488 (132%) als Donoren dagegen die höchsten Markierungsgrade. Die Kopplungseffizienz vom Akzeptorfarbstoff Atto 647 N an die beiden Cysteine war äußerst gering (nur 4% und kleiner), wodurch keine verwendbaren Proben für eine FRET-Messung hergestellt werden konnten. Nach der Farbstoffmarkierung klebte Atto 647 N förmlich an der 26/10 Desalting Säule. Eine mögliche Erklärung für die schlechte Markierungseffizienz ist die positive Ladung von Atto 647 N. Alle anderen

Farbstoffe sind entweder neutral oder negativ geladen. Durch die positive Ladung kann es zu Wechselwirkungen kommen, die sterisch die Reaktion zwischen Maleimid und dem Schwefel vom Cystein verhindert.

		V69C-K98C		Markierungsgrad			
		Akzeptor	Donor	0.8x A	5x D	Summe	Konzentration
1-1	A594	Bodipy FL	36%	45%	81%	6.7µM	
1-2		A488	20%	35%	55%	8.3µM	
1-3		Atto488	19%	26%	45%	6.3µM	
2-1	A647	Bodipy FL	49%	111%	160%	5.4µM	
2-2		A488	32%	100%	132%	4.0µM	
2-3		Atto488	26%	58%	84%	3.5µM	
3-1	Atto 647 N	Bodipy FL	4%	158%	162%	3.6µM	
3-2		A488	1%	107%	108%	5.2µM	
3-3		Atto488	0.4%	62%	62.4%	10.6µM	

Tab. 14 Markierungsgrade der einzelnen Farbstoffkombinationen: Neben dem Markierungsgrad für den Akzeptor und den Donor ist zusätzlich auch die Summe und die Proteinkonzentration angegeben. Da bei einer Doppelvariante zwei Cysteine markiert werden können liegt der maximale Markierungsgrad bei 200%.

Abb. 47 zeigt SMD-Messungen, bei denen die DLin-7-Variante V69C-K98C (VK) mit unterschiedlichen Akzeptor- und Donorfarbstoffen markiert wurde. Als Akzeptoren wurden A594 und A647 und als Donoren Bodipy FL, A488 und Atto 488 verwendet. Aufgetragen wurde jeweils das Signal des Grün zu Rot Verhältnisses (S_G/S_R) gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors ($\tau_{D(A)}$). Die jeweiligen Farbstoffkombinationen (Zeile 1-6) wurden zunächst alleine gemessen (Spalte 1). Alle sechs Farbstoffkombinationen zeigen eine Donor-Only Population (Bodipy FL = 6 ns, A488 = 4 ns, A488 = 4.2 ns) und eine FRET-Population (A594 = 2 - 3 ns, A647 = 3 ns). Beim direkten Vergleich mit der zweiten Messung mit Trolox-Zusatz (Spalte 2) verschiebt sich das Gleichgewicht von der Donor-Only- zur FRET-Population. Wenn doppelt markiertes VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM unmarkiertem VK (Spalte 3) gemessen wird, werden die Peaks der HF-Populationen noch schmaler. Im letzten Fall wurde doppelt markiertes VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM Sdt-L (Spalte 4) gemessen. Die FRET-Änderung durch Zugabe des Bindungspartners ist sichtbar. Die FRET-Peaks verbreitern sich im Vergleich zur Spalte 3 wieder.

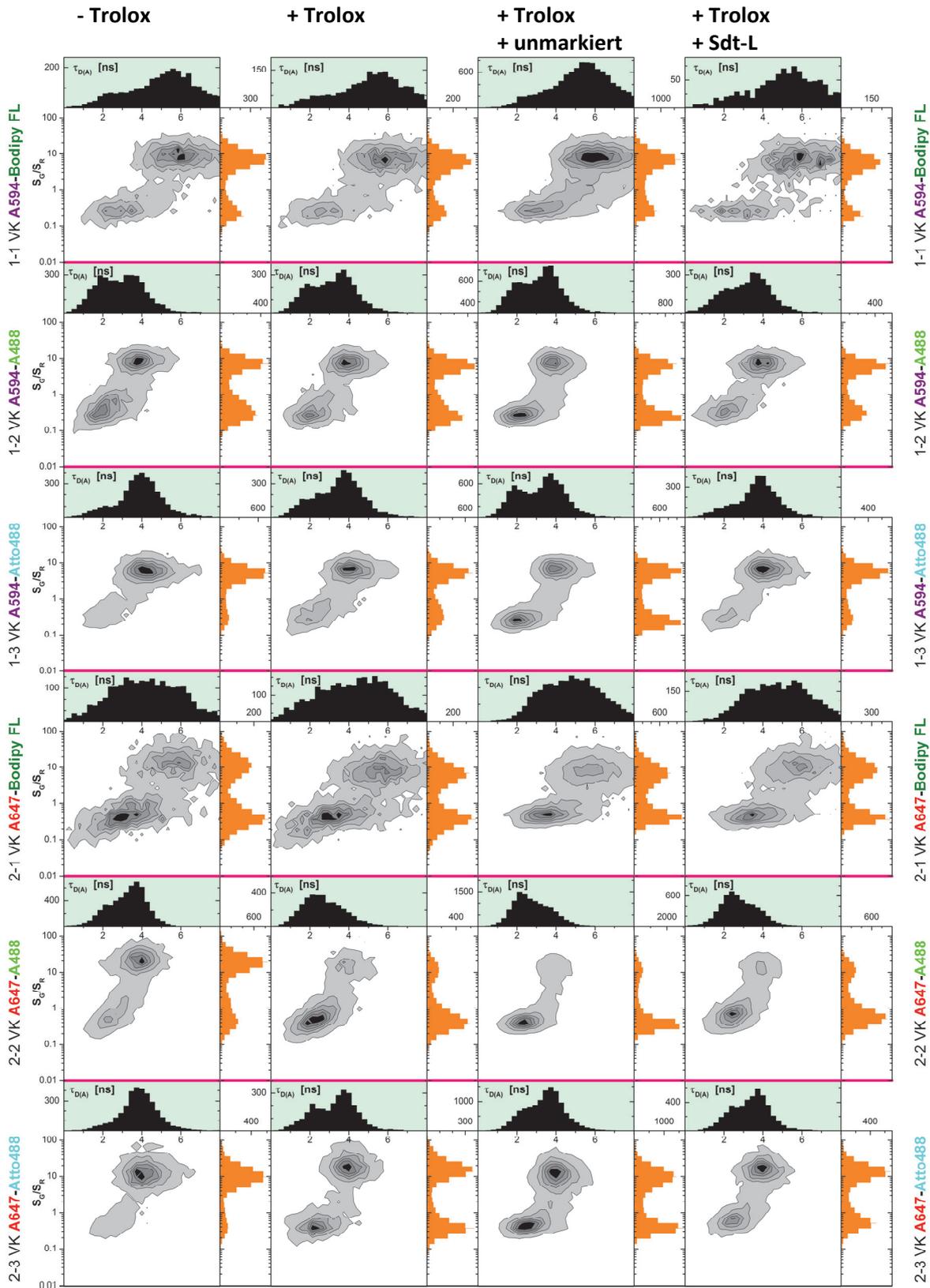


Abb. 47 S_0/S_R vs $\tau_{D(A)}$ für 6 Farbstoffkombinationen (A-D): V69C-K98C (VK) mit den beiden Akzeptoren A594 und A647 und den drei Donoren Bodipy FL, A488 und Atto 488. Die Nummerierungen beziehen sich auf Tab. 14. Zeile 1 = 1-1 VK mit A594-Bodipy FL, Zeile 2 = 1-2 VK mit A594-A488, Zeile 3 = 1-3 VK mit A594-Atto 488, Zeile 4 = 2-1 VK mit A647-Bodipy FL, Zeile 5 = 2-2 VK mit A647-A488, Zeile 6 = 2-3 VK mit A647-Atto 488. Spalte 1: VK ohne Trolox-Zusatz, Spalte 2: VK mit Trolox-Zusatz, Spalte 3: VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM unmarkiertem VK, Spalte 4: VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM Sdt-L.

Um die endgültige Auswahl für den Donor- und den Akzeptorfarbstoff festzulegen, werden im Folgenden die beiden Farbstoffkombinationen mit den höchsten Markierungsgraden genauer betrachtet. Diese haben die Farbstoffkombinationen 2-1 A647-Bodipy FL (Abb. 47 Zeile 4, Detailansicht Abb. 48) mit einem Markierungsgrad von 160 % und 2-2 A647-A488 (Abb. 47 Zeile 5, Detailansicht Abb. 49) mit einem Markierungsgrad von 132%.

5.3.2.3.1 SMD-Messungen: *DLin-7-V69C-K98C* mit A647 als Akzeptor und Bodipy FL als Donor

In Abb. 48 sind die Einzelmolekülergebnisse der Probe *DLin-7-V96C-K98C* (VK), markiert mit A647 (A) und Bodipy FL (D) dargestellt, wobei VK ohne Trolox (Spalte 1), VK mit Trolox (Spalte 2), VK mit Trolox und 500 nM unmarkiertem VK (Spalte 3) und VK mit Trolox und 500 nM Sdt-L gemessen wurde. Zeilenweise erfolgte die Auftragung verschiedener Einzelmolekülparameter: S_G/S_R vs. T_G-T_R (Zeile 1), S_G/S_R vs. $\tau_{D(A)}$ (Zeile 2), $r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$ (Zeile 3) und S_G/S_R vs. Messzeit (Zeile 4). Der A-D-Markierungsgrad betrug 160 % (49 % A, 111 % D).

Betrachtet man die S_G/S_R vs. T_G-T_R Auftragungen (Zeile 1), so ist in allen vier Fällen eine annähernd symmetrische Verteilung der Populationen um den Wert Null ersichtlich. Gebleichte Moleküle wurden demnach nicht gemessen, da diese eine asymmetrische Verteilung zur Folge hätte. Diese wären im positiven T_G-T_R -Bereich (0-6) und im S_G/S_R -Bereich 1-10 lokalisiert gewesen.

Die S_G/S_R vs. $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 2) zeigt in der ersten Messung eine Donor-Only Population mit zentraler Lage bei 6 ns und eine breite HF-Population bei 1 – 5 ns. Durch die Zugabe von Trolox (Spalte 2) verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der HF-Population. Trolox in Kombination mit unmarkiertem VK-Protein führt zur einer horizontalen Ausrichtung von HF, was auf ein dynamisches Verhalten schließen lässt. Die Kombination aus Trolox und Bindungspartner führt ebenfalls zu einer Lagenänderung von HF.

Die Streulicht korrigierte Anisotropieverteilung des Donors ($r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$, Spalte 3) ändert sich in allen vier Messungen nicht signifikant. Die mittlere Farbstoff-Beweglichkeit ist somit konstant.

Trägt man S_G/S_R vs. Messzeit (Zeile 4) auf, so erkennt man, dass es für die ersten beiden Messungen sowohl für die Donor-Only- als auch für die HF-Population in den ersten 1000 s zu einem Intensitätsverlust kommt. Anschließend bleibt die Intensität bis zur Beendigung der Messung jedoch konstant. Der Intensitätsabfall tritt allerdings nicht bei der Zugabe von unmarkiertem Protein auf. Beide Signale sind über die komplette Messdauer konstant. Beim Bindungspartner Sdt-L tritt der Abfall im ersten Teil der Messung allerdings wieder auf und bleibt erst im Folgenden stabil.

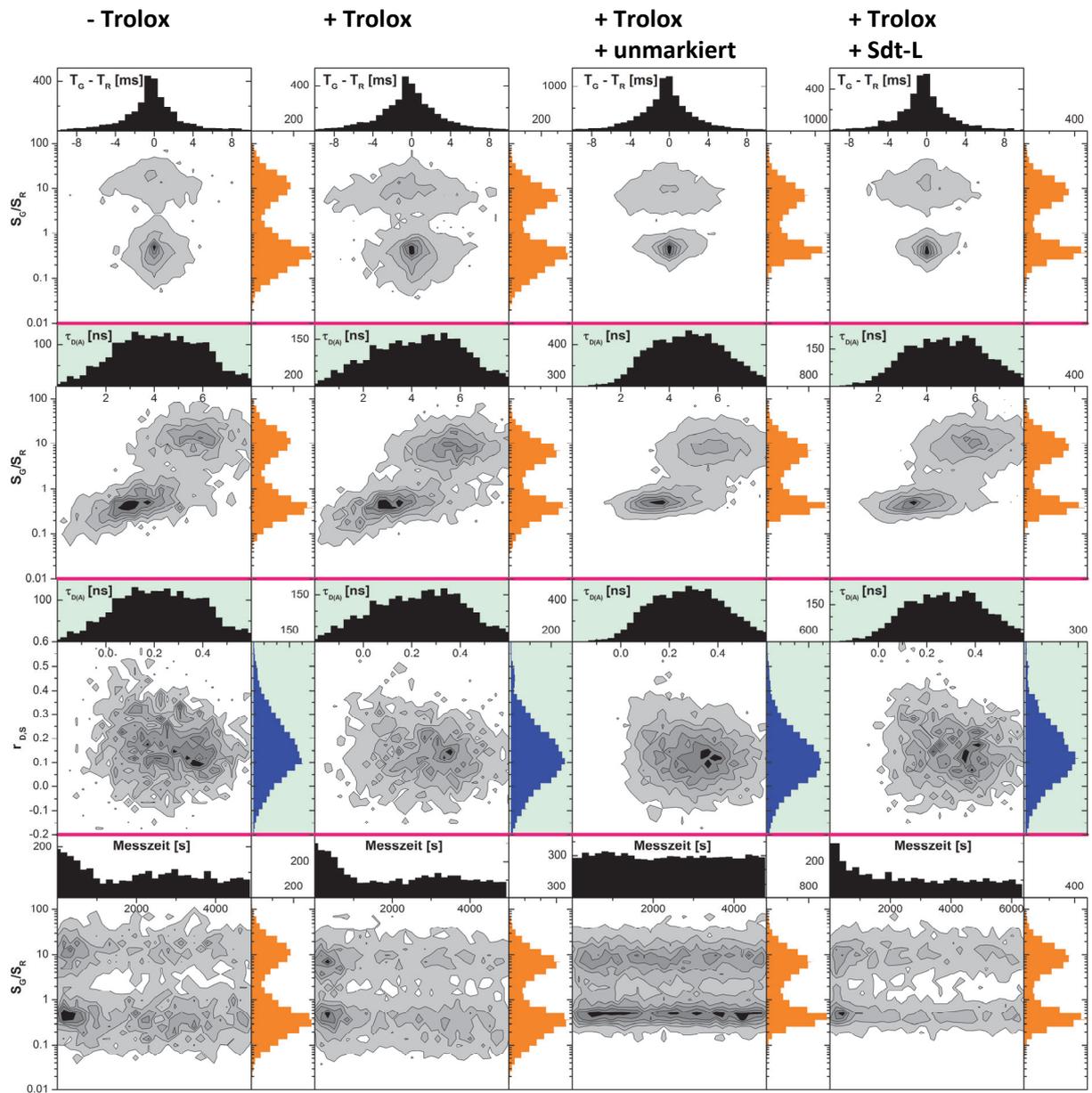


Abb. 48 Probe 2-1 = DLin-7-V69C-K98C (VK) mit A647 als Akzeptor- und Bodipy FL als Donorfarbstoff: Zeile 1 = S_G/S_R vs. $T_G - T_R$, Zeile 2 = S_G/S_R vs. $\tau_{D(A)}$, Zeile 3 = $r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$, Zeile 4 = S_G/S_R vs. Messzeit, Spalte 1 = VK ohne Trolox-Zusatz, Spalte 2 = VK mit Trolox-Zusatz, Spalte 3 = VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM unmarkiertem VK, Spalte 4 = VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM Sdt-L

5.3.2.3.2 SMD-Messungen: *DLin-7-V69C-K98C* mit A647 als Akzeptor und A488 als Donor

Die Abb. 49 zeigt die Einzelmolekülergebnisse der Probe *DLin-7-V96C-K98C* (VK), markiert mit A647 (A) und A488 (D), wobei VK ohne Trolox (Spalte 1), VK mit Trolox (Spalte 2), VK mit Trolox und 500 nM unmarkiertem VK (Spalte 3) und VK mit Trolox und 500 nM Sdt-L gemessen wurde. Zeilenweise erfolgte die Auftragung verschiedener Einzelmolekülparameter: S_G/S_R vs. T_G-T_R (Zeile 1), S_G/S_R vs. $\tau_{D(A)}$ (Zeile 2), $r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$ (Zeile 3) und S_G/S_R vs. Messzeit (Zeile 4). Der A-D-Markierungsgrad lag bei 132 % (32 % A, 100 % D).

In der ersten der vier Messungen erkennt man bei Betrachtung der S_G/S_R vs. T_G-T_R Auftragungen (Zeile 1), eine asymmetrische Verteilung. In diesem Fall wurden einzelne Moleküle gebleicht, so dass neben der Donor-Only- und HF-Population noch eine weitere Population im positiven T_G-T_R -Bereich (0-6) und im S_G/S_R -Bereich (1-10) lokalisiert wird. In den verbliebenen drei Messungen traten keine gelöschten Moleküle auf.

Die S_G/S_R vs. $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 2) zeigt in den ersten drei Messungen die gleichen Effekte wie die Abb. 48 mit dem Farbstoffpaar A647-Bodipy FL. Der einzige Unterschied ist aufgrund des anderen Donors die veränderte Lage der Donor-Only-Population, die in diesem Fall für A488 bei 4 ns liegt. Die Kombination aus Trolox und Bindungspartner führt in der vierten Messung allerdings, abweichend zum anderen Farbstoffpaar, zu einer eher diagonalen, somit eher statischen Lageveränderung der HF-Population.

Die bereits gelöschten Moleküle haben auch einen Einfluss auf die Streulicht korrigierte Anisotropieverteilung ($r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$, Spalte 3). Das Protein allein ohne Zusätze weicht von den anderen drei Messungen ab, in denen die mittlere Farbstoffbeweglichkeit konstant ist.

Bei der Auftragung von S_G/S_R vs. Messzeit (Zeile 4) kommt es ebenfalls zu dem vorher bereits beschriebenen Intensitätsabfall (Abb. 48) im Anfangsbereich mit konstant stabilen Verlauf bis zum Messende. Die Intensitätenverteilung in der dritten Messung (inkl. Trolox und unmarkiertem VK) ist durchgehend stabil. Das Intensitätsprofil in Messung 4 gleicht denen aus Messung 1 und 2.

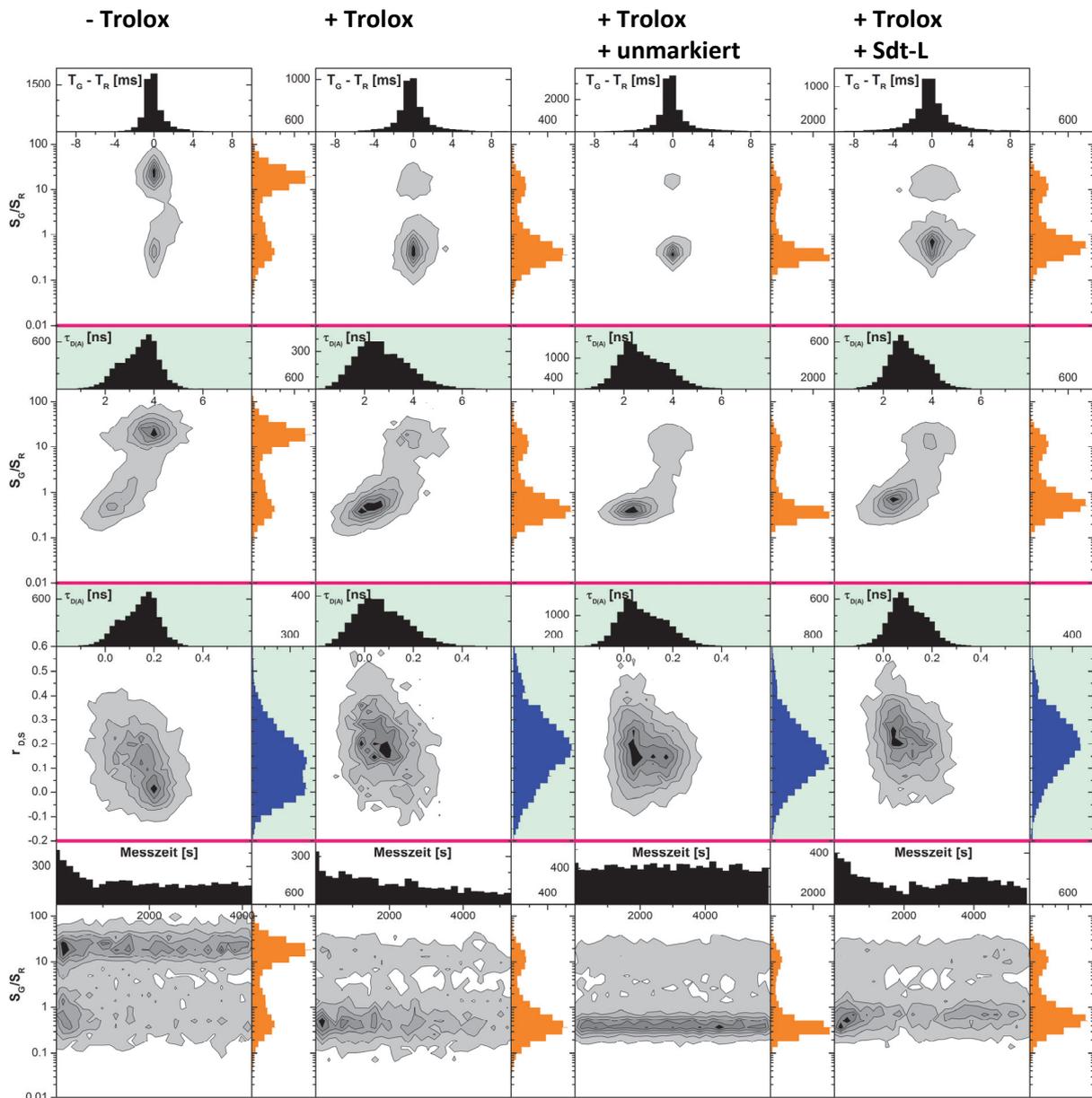


Abb. 49 Probe 2-2 = DLin-7-V69C-K98C (VK) mit A647 als Akzeptor- und A488 als Donorfarbstoff: Zeile 1 = S_G/S_R vs. $T_G - T_R$, Zeile 2 = S_G/S_R vs. $\tau_{D(A)}$, Zeile 3 = $r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$, Zeile 4 = S_G/S_R vs. Messzeit [s], Spalte 1 = VK ohne Trolox-Zusatz, Spalte 2 = VK mit Trolox-Zusatz, Spalte 3 = VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM unmarkiertem VK, Spalte 4 = VK mit Trolox-Zusatz und 500 nM Sdt-L

Aufgrund der längeren Donorlebensdauer von Bodipy FL (5.7 ns) im Gegensatz zu Alexa 488 (4.1 ns), der damit verbundenen besseren Sichtbarkeit der FRET-Änderungen bei den verschiedenen 2D-Auftragungen und der höheren Photostabilität des Akzeptors (Trolox-Effekt) in diesem FRET-Paar wurde das A-D-Paar A647-Bodipy FL für die Farbstoffmarkierung der anderen DLin-7-Varianten gewählt. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit wurde im nächsten Schritt eine Titration von DLin-7 mit seinem Bindungspartner Std-L durchgeführt.

5.3.2.4 Affinitätsmessungen mittels FCS

Vergleichend zu 5.1.2.3 wurde erneut eine Titration von DA-markierten (Bodipy FI, A647) *DLin-7-S27C-S115C* mit Sdt-L durchgeführt, um die Dissoziationskonstante K_D des Komplexes zu bestimmen. Die Analyse der Einzelmoleküldaten erfolgte dabei mittels FCS unter Verwendung von Gleichung 5-4.

$G_{\text{diff}}(t_c) = 1 + \frac{1}{N} * \left(\begin{aligned} & f * \left(1 + \frac{t_c}{t_{d1}}\right)^{-1} * \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 * \frac{t_c}{t_{d1}}\right)^{-\frac{1}{2}} \\ & + (1 - f) \left(1 + \frac{t_c}{t_{d2}}\right)^{-1} * \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 * \frac{t_c}{t_{d2}}\right)^{-\frac{1}{2}} \end{aligned} \right) * \left(1 - T + t * e^{\left(-\frac{t_c}{\tau_T}\right)}\right)$	Gleichung 5-4
--	------------------

t_{d1} und t_{d2} sind die Diffusionszeiten, f die Fraktion von t_{d1} , t_c die Korrelationszeit, N die Anzahl der Moleküle im Fokus, T die Tripletfraktion und τ_T die Lebenszeit des Tripletzustandes. Die $1/e^2$ Radien in x , y und z Richtung werden durch ω_0 und z_0 beschrieben.

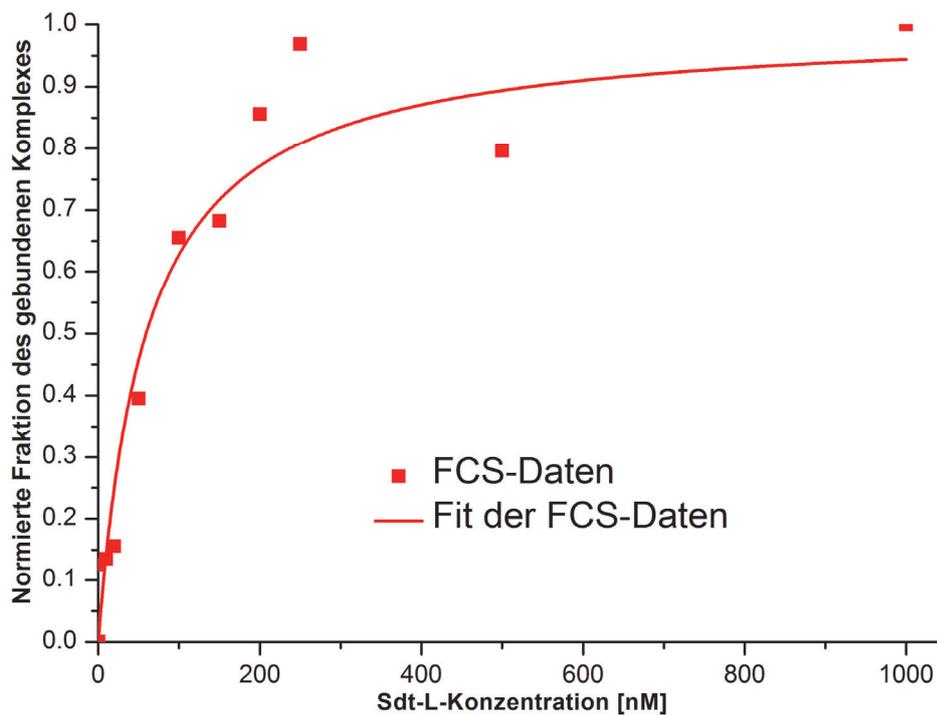


Abb. 50 *DLin-7-S27C-S115C*-Titration mit Sdt-L: Auftragung der normalisierten Fraktionen des gebundenen Komplexes vs. Sdt-L-Konzentration (0,2, 1, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 500 und 1000, jeweils in nM). Die FCS-Daten (rote Quadrate) wurden mit Hilfe der hyperbolische Langmuir Bindungsisotherme (rote Linie) gefittet und so die Dissoziationskonstante $K_D = 59 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$ mit $\Theta_{a,\text{min}} = 1$ bestimmt.

Die Ergebnisse der FCS-Analyse sind in Abb. 50 dargestellt. Dabei wurden die normierten Fraktionen des gebundenen Komplexes gegen die Sdt-L-Konzentration in nM aufgetragen. Unter Verwendung der hyperbolischen Langmuir Bindungsisotherme $\Theta_a = \Theta_{a,\min} + (1-\Theta_{a,\min})[S]/(K_D + [S])$ für die Bildung des 1:1 Komplexes konnte die Dissoziationskonstante $K_D = 59 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$ mit $\Theta_{a,\min} = 1$ bestimmt werden. Der gebundene Komplex besitzt eine kürzere Diffusionszeit als das freie *DLin-7*. Dies lässt sich durch den hydrodynamischen Radius erklären. Der gebundene Komplex liegt somit kleiner bzw. kompakter vor als das freie *DLin-7*, welches aufgrund seiner beweglichen L27-Domäne einen großen hydrodynamischen Radius einnimmt. Die Titration ist komplex, da die Zugabe von Sdt-L die *DLin-7*-Dynamik beeinflusst. Das Bindungsverhalten von *DLin-7* und Sdt-L lässt sich durch das Prinzip „Faltung durch Bindung“ beschreiben (Tompa et al. 2008):



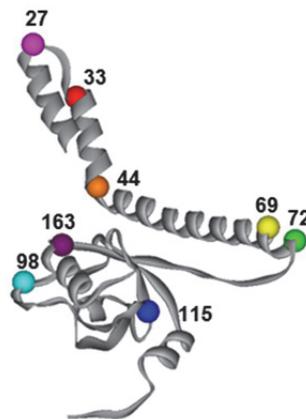
Durch das Bindungsverhalten konnte die Funktionsfähigkeit aller beteiligten Moleküle nachgewiesen werden. Dies war ein kritischer Punkt: Bei der nativen Farbstoffmarkierung war die Handhabung aufgrund der Aggregatbildung von *DLin-7* das größte Problem. Unter denaturierender Farbstoffmarkierung bestand die Gefahr, die Funktionsfähigkeit bei der Rückfaltung in den nativen Puffer durch Dialyse zu verlieren, was allerdings durch die Titration erfolgreich widerlegt werden konnte.

5.3.2.5 SMD-Messungen mit A647 als Akzeptor und Bodipy FL als Donor

Alle *D*Lin-7-Doppelvarianten wurden mit A647 als Akzeptor und mit Bodipy FL als Donor markiert und im Einzelmolekülexperiment gemessen. Tab. 15 zeigt neben dem *D*Lin-7-Homologiemodell mit all seinen Punktmutationen auch die Doppelvarianten für den Intra-Domänen-FRET und die Doppelvarianten für den Inter-Domänen-FRET. Im Folgenden wurde jede *D*Lin-7-Doppelvariante alleine (Messung A), mit 500 nM unmarkiertem Protein (Messung B) und mit 500 nM Sdt-L (Messung C) gemessen. Weitere Angaben zu den Messbedingungen befinden sich im Anhang (Pufferbedingungen siehe Tab. 49, Proteinkonzentration und Markierungsgrade siehe Tab. 50, Harnstoffkonzentration siehe Tab. 51 und die Mischprozeduren für die Messungen siehe Tab. 52 - Tab. 56)

Intra-Domänen-FRET

	S27C	-	S72C	
	T33C	-	V69C	
	S44C	-	S72C	



Inter-Domänen-FRET

	S27C	-	S115C	
	S27C	-	A163C	
	T33C	-	K98C	
	S44C	-	S115C	
	V69C	-	K98C	
	S72C	-	A163C	

Tab. 15 Intra- und Inter-Domänen-FRET: In der Mitte ist das Homologiemodell von *D*Lin-7 mit all seinen Mutationen in Form von farbigen Kugeln dargestellt. S27C (Pink), T33C (Rot), S44C (Orange), V69C (Gelb), S72C (Grün), K98C (Hellblau), S115C (Dunkelblau) und A163C (Violett). Links sind die drei Doppelvarianten aufgelistet, in denen es zu Intra-Domänen-FRET kommt, und rechts die sechs Doppelvarianten mit Inter-Domänen-FRET.

Zur Erstellung der 2D-Histogramme in den Kapiteln 5.3.2.5.1 (Abb. 51 - Abb. 53) und 5.3.2.5.2 (Abb. 54 - Abb. 59) wurden die Parameter in Tab. 16 verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde immer die Gleiche Perrin-Gleichung verwendet.

Für alle <i>D</i>Lin-7-His-Varianten:			Perrin-Gleichung, $r_{D,S} = (0.38)/(1+x/2.2)$
$R_0 = 57 \text{ \AA}$	$\tau_{D(0)} = 5.7 \text{ ns}$	$\phi_{FD(0)} = 0.94 \text{ ns}$	statisch L-korr. FRET-Linie (siehe Gleichung 4-11)
Det.-Eff. Rot (g_R) = 1.0	$k_f = 0.165 \text{ ns}^{-1}$	$\phi_{FA} = 0.33 \text{ ns}$	dynamisch L-korr. FRET-Linie (siehe Gleichung 4-13)

T33C-V69C, T33C-K98C und V69C-K98C	Det.-Eff. Grün (g_G) = 0.45
S27C-S72C, S44C-S72C, S27C-S115C, S27C-A163C, S44C-S115C, S72C-A163C	Det.-Eff. Grün (g_G) = 0.65

Tab. 16 Parameter zur Erstellung der 2D-Histogramme

5.3.2.5.1 Intra-Domänen-FRET

Die beiden Mutationen der *D*Lin-7-Variante befinden sich in der gleichen Domäne. Daher wird der FRET, der zwischen den beiden Positionen gemessen wird, als Intra-Domänen-FRET bezeichnet.

5.3.2.5.1.1 *D*Lin-7-S27C-S72C

In der *D*Lin-7-S27C-S72C-Variante befinden sich die S27C-Mutation zwischen der ersten und zweiten α -Helix der L72-Domäne und die S72C-Mutation am Ende der dritten α -Helix der L72-Domäne. In Abb. 51 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung auf der statischen Linker-korrigierten FRET-Linie (L-korr., Blau). Zusätzlich sind zwei dynamische (dyn.) L-korr. FRET-Linien mit jeweils zwei Grenzzuständen eingezeichnet. Diese wurden aus den seTCSPC- (rote Kurve) und aus den eTCSPC-Daten (grüne Kurve) entnommen. In Abb. 51 B wurde die doppelt markierte Probe zusammen mit 500 nM unmarkiertem Protein gemessen. Die FRET-Population verschiebt sich auf die rote dyn.-L-korr. FRET-Linie. *D*Lin-7 zusammen mit 500 nM Sdt-L (Abb. 51 C) resultiert in einer Verschiebung zu geringerem FRET (obere horizontal gestrichelte Linie). Die Population liegt zwischen der statischen L-korr. (Blau) und den dyn. L-korr. FRET-Linie.

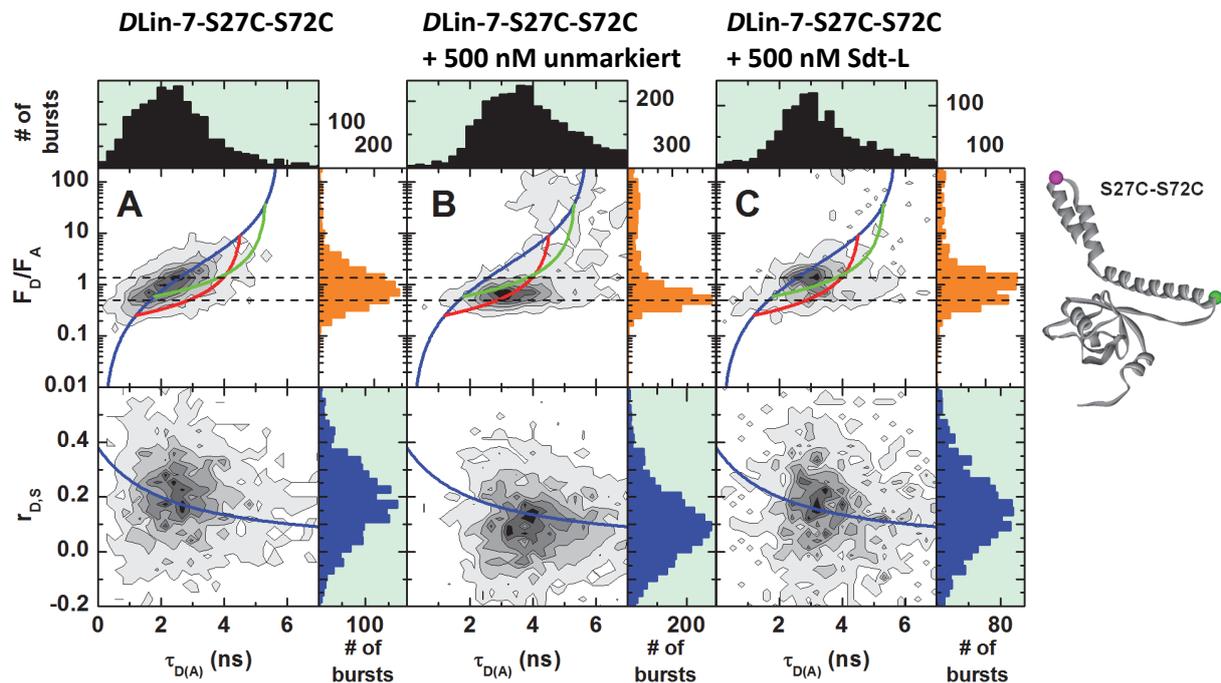


Abb. 51 Intra-Domänen-FRET *D*Lin-7-S27C-S72C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,s}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 17 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 52.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 9.7 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4-0.7 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0319*x^3)+(0.3528*x^2)+0.0277*x-0.0211))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 4.5 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.5+1/1.2-(3.1353*x-9.6538)/(4.5*1.2))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.8 \text{ ns}, \tau_2 = 5.3 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/5.3+1/1.8-(2.2603*x-6.6849)/(5.3*1.8))-1/5.7))$	

Tab. 17 Parameter und Gleichungen zu Abb. 51

5.3.2.5.1.2 DLin-7-T33C-V69C

In der DLin-7-T33C-V69C-Variante befinden sich die T33C-Mutation am Anfang der zweiten α -Helix und die V69C-Mutation am Ende der dritten α -Helix der L72-Domäne. In Abb. 52 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung breitverteilt auf der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau). Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die dyn. L-korr. FRET-Linie (Abb. 52 B, Rot). Die Interaktion von DLin-7-T33C-T69C mit Sdt-L führt zu einer FRET-Verringerung. Das Zentrum der FRET-Population liegt dicht am ersten Grenzzustand der dyn. L-korr. FRET-Linie (Grün) bei 1.8 ns (Abb. 52 C). Die Anisotropie ist bei allen drei Messungen breit verteilt. Im dritten Fall ist sie allerdings leicht erhöht, bedingt durch die Komplexbildung zwischen DLin-7 und Sdt-L.

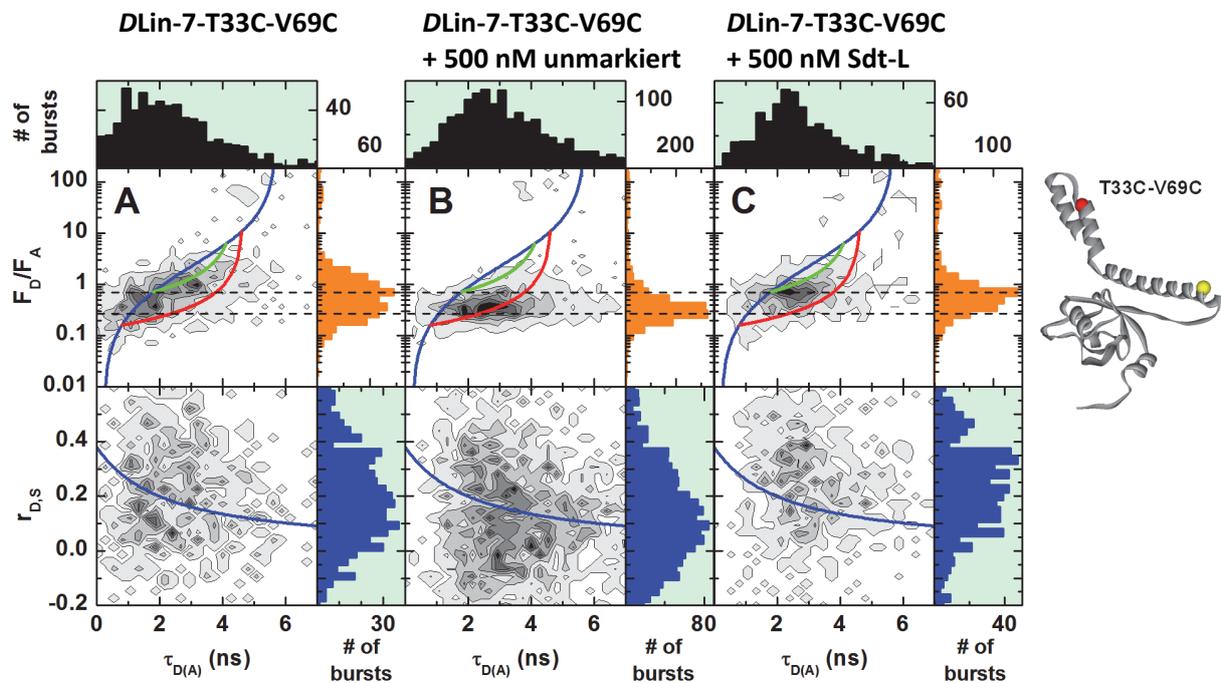


Abb. 52 Intra-Domänen-FRET DLin-7-T33C-V69C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,s}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 18 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 53.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 8.3 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4 - 0.7 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0251*x^3)+(0.2729*x^2)+0.2737*x-0.0737))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 0.8 \text{ ns}, \tau_2 = 4.6 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.6+1/0.8-(2.9632*x-9.0502)/(4.6*0.8))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.8 \text{ ns}, \tau_2 = 4.1 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.1+1/1.8-(1.9636*x-4.0412)/(4.1*1.8))-1/5.7))$	

Tab. 18 Parameter und Gleichungen zu Abb. 52

5.3.2.5.1.3 DLin-7-S44C-S72C

In der DLin-7-S44C-S72C-Variante befinden sich die S44C-Mutation zwischen der zweiten und dritten α -Helix und die S72C-Mutation am Ende der dritten α -Helix der L72-Domäne. In Abb. 53 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung breitverteilt auf der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau). Zusätzlich ist eine Donor-only-Population mit einer Lebensdauer von ca. 5.5 ns zu erkennen (obere horizontale gestrichelte Linie). Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die dyn. L-korr. FRET-Linie (Abb. 53 B, Rot) und der Anteil an der Donor-only-Population verringert sich. Die Zugabe von Sdt-L (Abb. 53 C) führt diesmal allerdings nicht zu einer Verschiebung der FRET-Population in Richtung der statischen L-korr. FRET-Linie, sondern bleibt in ihrer Lage im direkten Vergleich zu Messung B fast unverändert. Die Anisotropie verringert sich sowohl durch Zugabe von unmarkiertem Protein als auch durch Sdt-L-Zugabe im direkten Vergleich zur Messung A.

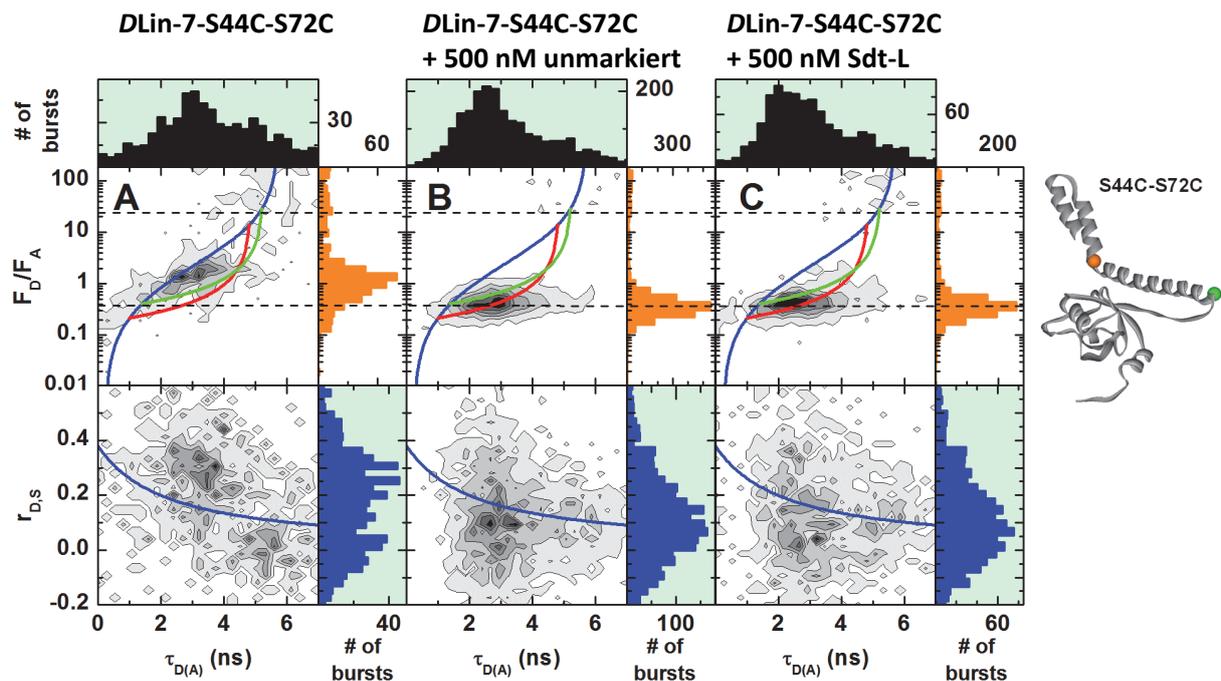


Abb. 53 Intra-Domänen-FRET DLin-7-S44C-S72C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,s}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 19 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 53.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 8.8 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4 - 0.6 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0274*x^3)+(0.2990*x^2)+0.1954*x-0.0646))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 1.0 \text{ ns}, \tau_2 = 4.8 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.8+1/1.0-(2.8913*x-9.0928))/(4.8*1.0))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.4 \text{ ns}, \tau_2 = 5.2 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/5.2+1/1.4-(2.317*x-6.8542))/(5.2*1.4))-1/5.7))$	

Tab. 19 Parameter und Gleichungen zu Abb. 53

5.3.2.5.2 Inter-Domänen-FRET

Die Mutationen der *DLin-7*-Varianten befinden sich in zwei verschiedenen Domänen. Daher wird der FRET, der zwischen den beiden Positionen gemessen wird, als Inter-Domänen-FRET bezeichnet.

5.3.2.5.2.1 *DLin-7-S27C-S115C*

In der *DLin-7-S27C-S115C*-Variante befinden sich die S27C-Mutation zwischen der ersten und zweiten α -Helix der L72-Domäne und die S115C-Mutation in der Mitte der PDZ-Domäne. In Abb. 54 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung zwischen der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau) und den dyn. L-korr. FRET-Linien. Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die dynamischen L-korr. FRET-Linien (Abb. 54 B). Durch die Zugabe von Sdt-L (Abb. 54 C) ändert sich die Lage der FRET-Population nicht, allerdings tritt eine zweite Population im Bereich des zweiten Grenzzustandes (4.5 ns) der roten dyn. L-korr. FRET-Linie auf (obere gestrichelte Linie). Bei Betrachtung der Anisotropie in Messung A liegt die Population oberhalb der blauen Kurve. Im Vergleich zu Messung B ist sie kleiner, da die Population auf der Linie liegt. In Messung 3 ist die Population wieder zu größeren Anisotropiewerten verschoben.

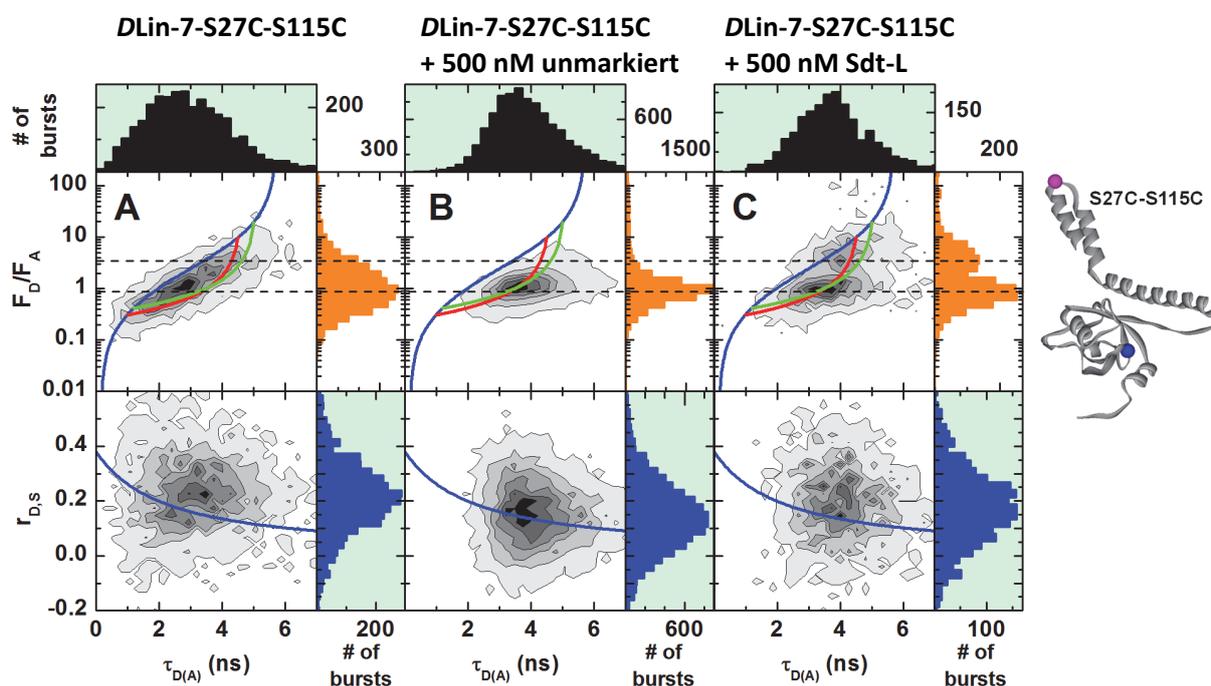


Abb. 54 Inter-Domänen-FRET *DLin-7-S27C-S115C*: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,S}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 20 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 54.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 7.0 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4 - 0.7 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0201*x^3)+(0.2137*x^2)+0.4443*x-0.0682))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 1.0 \text{ ns}, \tau_2 = 4.5 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.5+1/1.0-(2.0246*x-4.6300))/(4.5*1.0))-1/5.7)$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 5.0 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/5.0+1/1.2-(1.8573*x-4.2938))/(5.0*1.2))-1/5.7)$	

Tab. 20 Parameter und Gleichungen zu Abb. 54

5.3.2.5.2.2 DLin-7-S27C-A163C

In der DLin-7-S27C-A163C-Variante befinden sich die S27C-Mutation zwischen der ersten und zweiten α -Helix der L72-Domäne und die A163C-Mutation am Ende der PDZ-Domäne. In Abb. 55 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung zwischen der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau) und den dyn. L-korr. FRET-Linien. Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die dynamischen L-korr. FRET-Linien (Abb. 55 B). Allerdings ändert sich die Lage im F_D/F_A -1D-Plot nicht (untere gestrichelte Linie). Durch die Zugabe von Sdt-L (Abb. 55 C) ändert sich die Lage der FRET-Population nicht, allerdings tritt eine zweite Population im Bereich des zweiten Grenzzustandes (4.8 ns) der roten dyn. L-korr. FRET-Linie auf (obere gestrichelte Linie). Bei Betrachtung der Anisotropie in Messung A liegt die Population oberhalb der blauen Kurve. Im Vergleich zu Messung B ist sie kleiner, da die Population auf der Linie liegt. In Messung 3 ist die Population wieder zu größeren Anisotropiewerten verschoben.

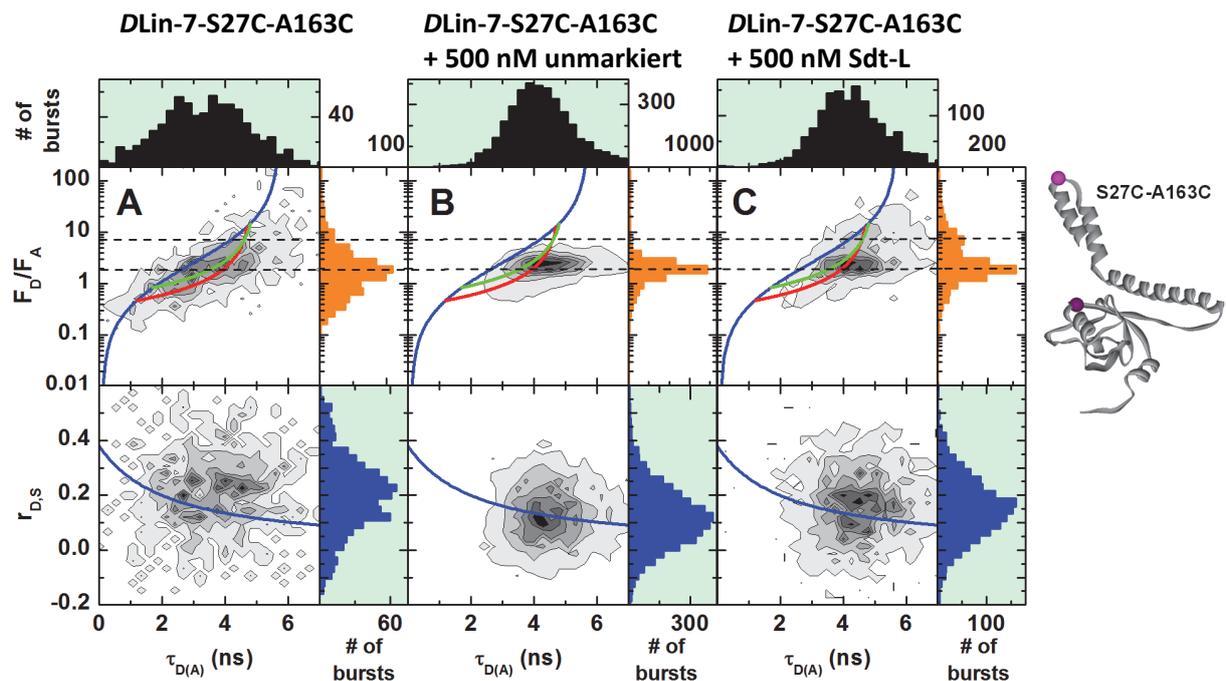


Abb. 55 Inter-Domänen-FRET DLin-7-S27C-A163C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,S}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 21 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 54.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 6.2 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4 - 0.5 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0171*x^3)+(0.1806*x^2)+0.5357*x+0.0550))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 4.7 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.7+1/1.2-(1.6488*x-3.0610)/(4.7*1.2))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.7 \text{ ns}, \tau_2 = 4.8 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.8+1/1.7-(1.4771*x-2.3015)/(4.8*1.7))-1/5.7))$	

Tab. 21 Parameter und Gleichungen zu Abb. 55

5.3.2.5.2.3 DLin-7-T33C-K98C

In der DLin-7-T33C-K98C-Variante befinden sich die T33C-Mutation am Anfang der zweiten α -Helix der L72-Domäne und die K98C-Mutation am Anfang der PDZ-Domäne. In Abb. 56 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung zwischen der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau) und den dyn. L-korr. FRET-Linien. Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die dyn. L-korr. FRET-Linien zu längeren Lebenszeiten (Abb. 56 B). Die Änderung in zu höheren F_D/F_A -Werten ist dagegen nur gering (obere gestrichelte Linie). Durch die Zugabe von Sdt-L (Abb. 56 C) ändert sich die Lage der FRET-Population leicht erneut zu längeren Lebenszeiten und geringerem FRET. Die Population liegt in der $r_{D,S}$ vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung auf der Perrin-Kurve. In Messung B liegt der Hauptteil der Population darunter und in Messung C darüber.

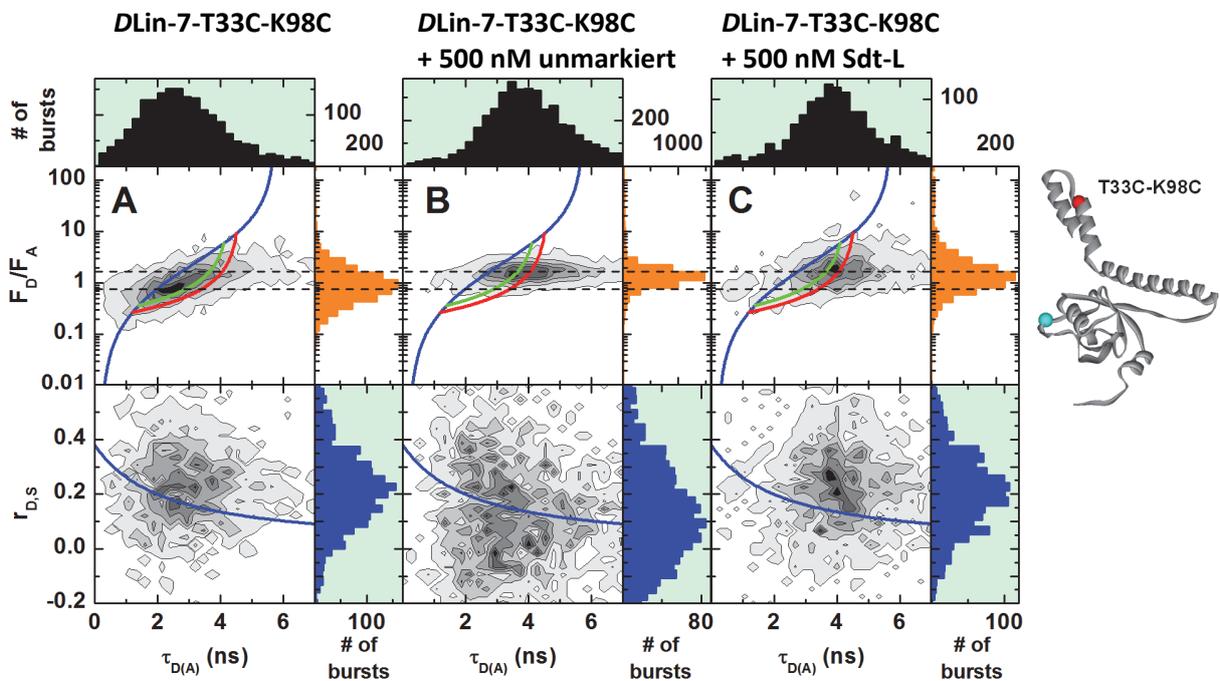


Abb. 56 Inter-Domänen-FRET DLin-7-T33C-K98C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,S}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 22 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 53.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 6.2 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.2 - 0.5 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0303*x^3)+(0.3337*x^2)+0.0879*x-0.0402))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 4.5 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.5+1/1.2-(2.9474*x-8.8054)/(4.5*1.2))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.4 \text{ ns}, \tau_2 = 4.1 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.1+1/1.4-(2.7167*x-7.1305)/(4.1*1.4))-1/5.7))$	

Tab. 22 Parameter und Gleichungen zu Abb. 56

5.3.2.5.2.4 DLin-7-S44C-S115C

In der DLin-7-S44C-S115C-Variante befinden sich die S44C-Mutation zwischen der zweiten und dritten α -Helix der L72-Domäne und die S115C-Mutation in der Mitte der PDZ-Domäne. In Abb. 57 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung verteilt auf der dynamischen L-korr. FRET-Linie (Grün) mit den beiden Grenzwerten 1.4 ns und 3.9 ns, die aus den eTSCPC-Messungen ermittelt wurden. Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die rote dyn. L-korr. FRET-Linie (Abb. 57 B). Der Anteil an FRET-Populationen mit längerer Lebenszeit hat sich im Vergleich zur Messung A verringert (obere gestrichelte Linie). Die Zugabe von Sdt-L zeigt den gleichen Effekt wie die Zugabe von unmarkiertem Protein. Der Anteil der Donor-only-Population hat sich im Vergleich zu Messung A und B erhöht. Die Anisotropie ist in Messung A am größten. In B und C ist sie jeweils kleiner.

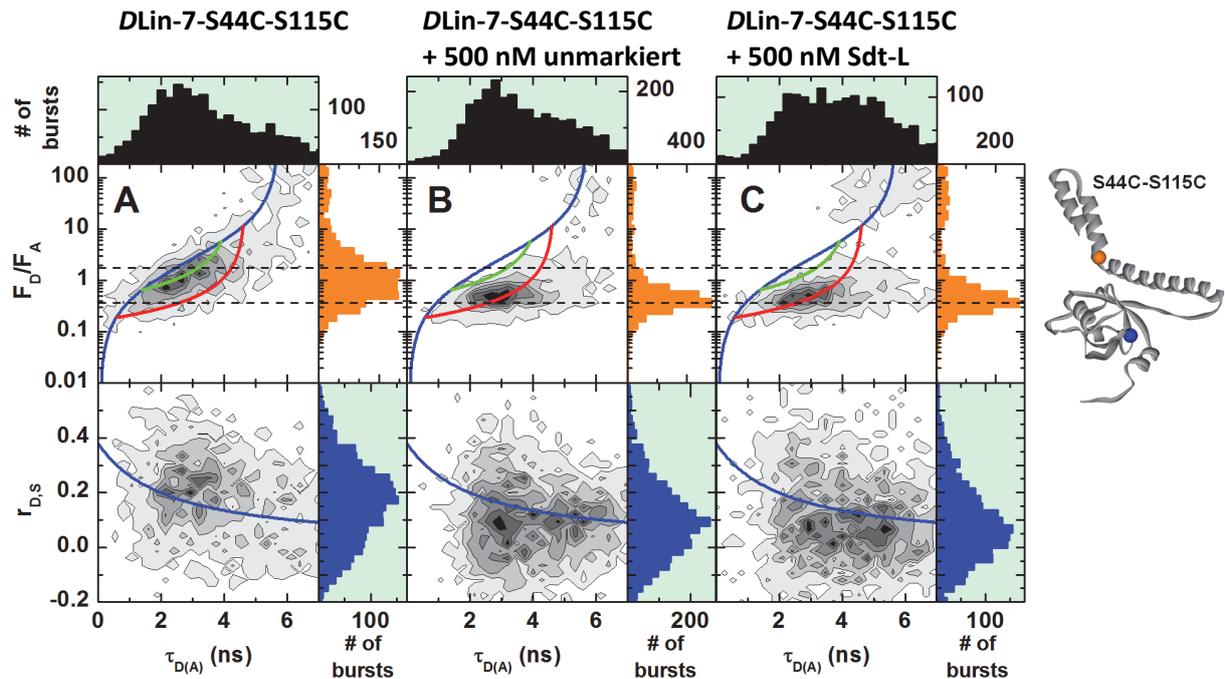


Abb. 57 Inter-Domänen-FRET DLin-7-S44C-S115C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,S}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 23 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 54

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 5.5 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4 - 0.6 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0146*x^3)+(0.1522*x^2)+0.6119*x-0.0422))-1)$	
dyn. L-korr. (seTSCPC) $\tau_1 = 0.6 \text{ ns}, \tau_2 = 4.6 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.6+1/0.6-(1.7894*x-3.6396)/(4.6*0.6))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTSCPC) $\tau_1 = 1.4 \text{ ns}, \tau_2 = 3.9 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/3.9+1/1.4-(1.4642*x-1.8497)/(3.9*1.4))-1/5.7))$	

Tab. 23 Parameter und Gleichungen zu Abb. 57

5.3.2.5.2.5 DLin-7-V69C-K98C

In der DLin-7-V69C-K98C-Variante befinden sich die V69C-Mutation am Ende der dritten α -Helix der L72-Domäne und die K98C-Mutation am Anfang der PDZ-Domäne. In Abb. 58 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung zwischen der grünen und roten L-korr. FRET-Linie. Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich das Zentrum der FRET-Population nicht. Der Anteil an den FRET-Spezies mit einer sehr kurzen Lebenszeit (<2 ns) verringert sich allerdings sichtbar (Abb. 58 B, untere gestrichelte Linie). Die Zugabe von Sdt-L führt in der dritten Messung (Abb. 58 C) zu keiner signifikanten FRET-Änderung. Die Anisotropie weist nur in Messung A Lebenszeiten <2 ns auf. Die Verteilung in Messung B und C ist auch hier annähernd gleich.

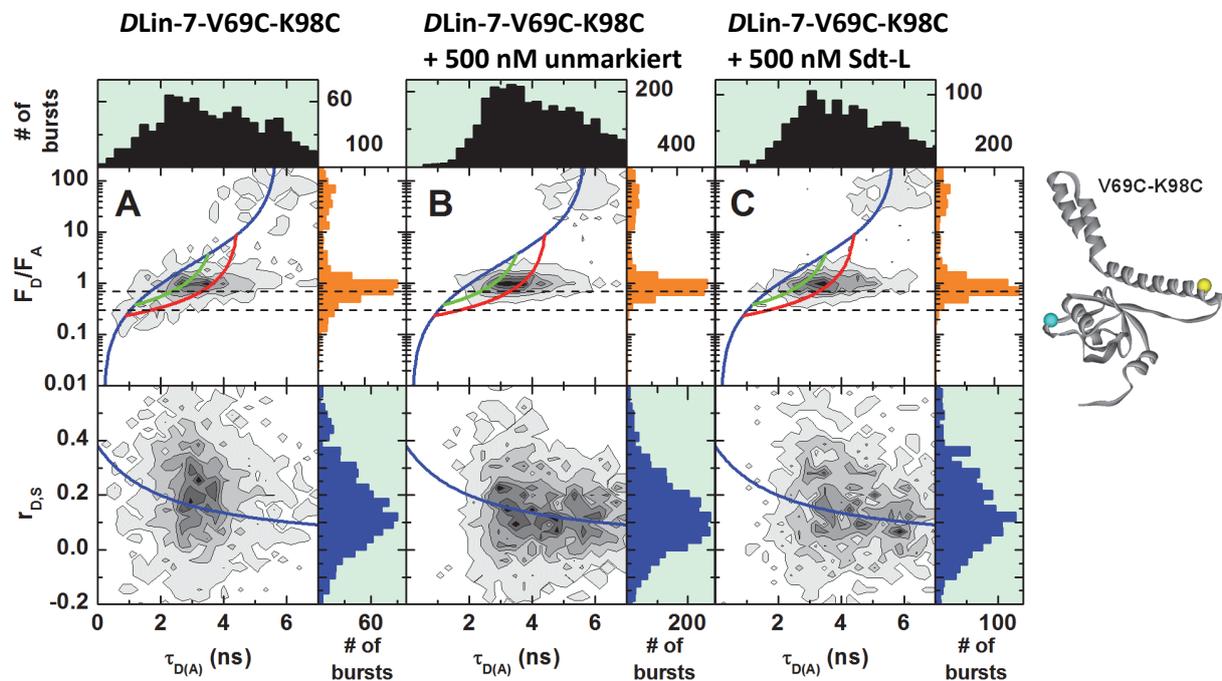


Abb. 58 Inter-Domänen-FRET DLin-7-V69C-K98C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,s}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 24 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 56.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 7.5 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.3 - 0.5 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0219*x^3)+(0.2354*x^2)+0.3831*x-0.0738))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 0.9 \text{ ns}, \tau_2 = 4.4 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.4+1/0.9-(2.3460*x-5.9449))/(4.4*0.9))-1/5.7)$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 3.5 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/3.5+1/1.2-(2.1375*x-4.0855))/(3.5*1.2))-1/5.7)$	

Tab. 24 Parameter und Gleichungen zu Abb. 58

5.3.2.5.2.6 DLin-7-S72C-A163C

In der DLin-7-S72C-A163C-Variante befinden sich die S72C-Mutation am Ende der dritten α -Helix der L72-Domäne und die A163C-Mutation am Ende der PDZ-Domäne. In Abb. 59 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung zwischen der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau) und den dyn. L-korr. FRET-Linien. Zusätzlich tritt eine große Donor-only-Population im Bereich von 5.7 ns auf. Die Zugabe von unmarkiertem Protein bewirkt das Verschwinden dieser Donor-only-Population und eine Fokussierung der FRET-Population auf die dynamischen FRET-Linien mit einer sehr schmalen F_D/F_A -Verteilung um 1 (Abb. 59 B, untere gestrichelte Linie). Durch die Zugabe von Sdt-L (Abb. 59 C) tritt die Donor-only-Population erneut wieder auf. Die FRET-Verteilung ist zusätzlich breiter verteilt und zentriert sich in einer dritten kleineren Population im Bereich des zweiten Grenzzustandes der roten FRET-Linie bei 4.7 ns (obere gestrichelte Linie). Die Population der Anisotropie liegt nur in Messung A oberhalb der Perrin-Kurve. In Messung B und C liegt sie auf ihr bzw. leicht drunter.

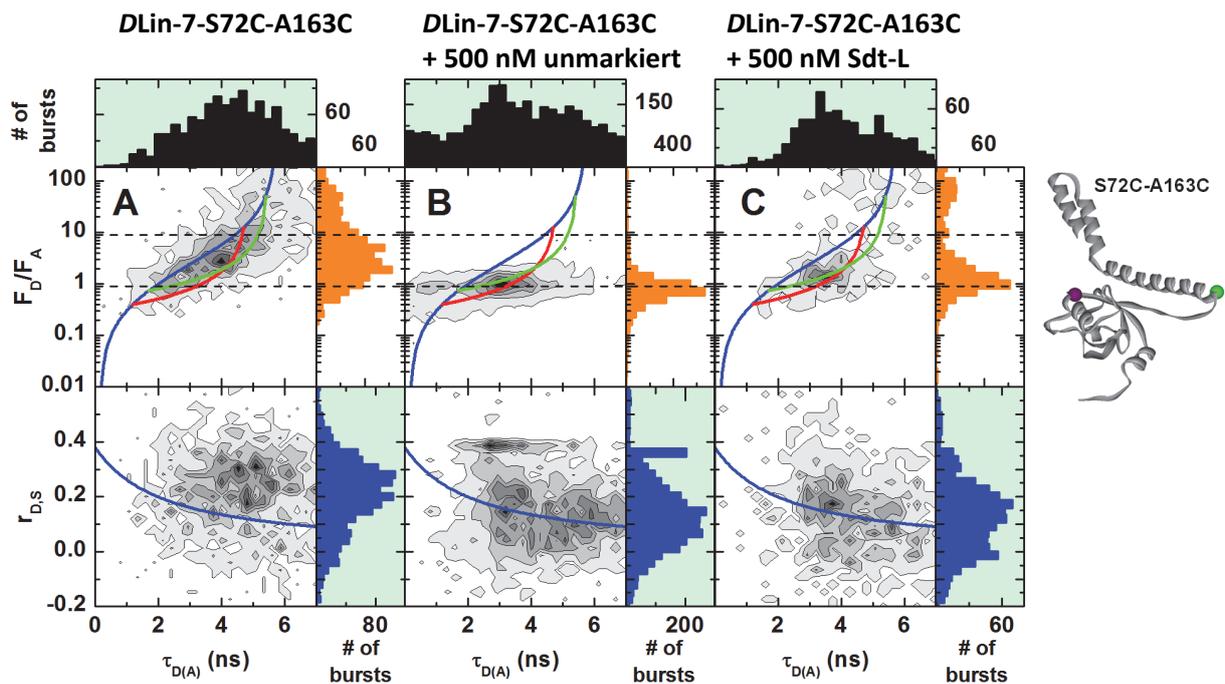


Abb. 59 Inter-Domänen-FRET DLin-7-S72C-A163C: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung (Zeile 1) und Anisotropie $r_{D,S}$ gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung inkl. Perrin-Gleichung (Zeile 2). Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 25 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 54.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 7.2 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4 - 3.0 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0208*x^3)+(0.2223*x^2)+0.4203*x-0.0708))-1)$	
dyn. L-korr. (seTSCPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 4.7 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.7+1/1.2-(1.9357*x-4.4143))/(4.7*1.2))-1/5.7)$	
dyn. L-korr. (eTSCPC) $\tau_1 = 1.7 \text{ ns}, \tau_2 = 5.4 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/5.4+1/1.7-(1.6393*x-3.4542))/(5.4*1.7))-1/5.7)$	

Tab. 25 Parameter und Gleichungen zu Abb. 59

5.3.2.5.3 DLin-7-S27C-S115C mit BSA

Um zu testen, ob die Verschiebung der FRET-Population in Richtung der dyn. L-korr. FRET-Linien durch Zugabe von unmarkiertem DLin-7 einen spezifischen Effekt darstellt, wurde BSA in gleicher Konzentration eingesetzt. In der DLin-7-S27C-S115C-Variante befinden sich die S27C-Mutation zwischen der ersten und zweiten α -Helix der L72-Domäne und die S115C-Mutation in der Mitte der PDZ-Domäne. In Abb. 60 A liegt die FRET-Population in der F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung zwischen der statischen L-korr. FRET-Linie (Blau) und den dyn. L-korr. FRET-Linien. Durch die Zugabe von unmarkiertem Protein verschiebt sich die FRET-Population auf die dynamischen L-korr. FRET-Linien (Abb. 60 B). Durch die Zugabe von 500 nM BSA (Abb. 60 C) ändert sich die Lage der FRET-Population nicht. Unmarkiertes Protein und BSA haben somit den gleichen Effekt auf das markierte DLin-7. Beide sorgen dafür, dass durch Stoßreaktionen das markierte Protein ständig in Bewegung bleibt und keine eindeutige Struktur einnehmen kann.

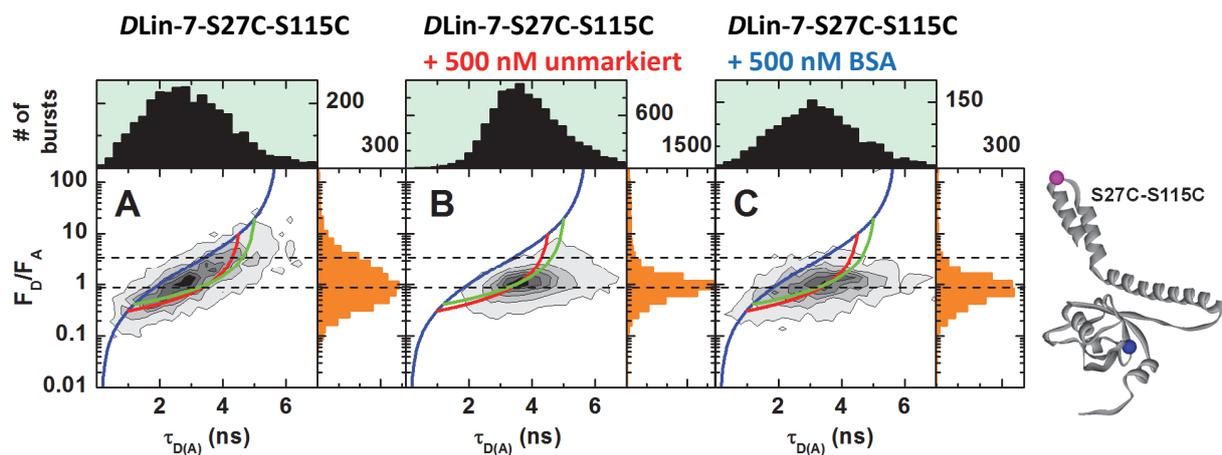


Abb. 60 Inter-Domänen-FRET DLin-7-S27C-S115C inkl. BSA-Messung: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung. (A) und (B) entspricht Abb. 54 (A) und (B). In (C) wurde DLin-7-S27C-S115C zusammen mit 500 nm BSA gemessen. Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 26 und für weitere Details siehe im Anhang Tab. 49 - Tab. 51 und Tab. 54 - Tab. 55.

FRET-Linie	Farbe	Gl.	$\sigma = 9.7 \text{ \AA}$	B_G und $B_R = 0.4-0.7 \text{ kHz}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.94/0.33)/((5.7/((-0.0319*x^3)+(0.3528*x^2)+0.0277*x-0.0211))-1)$	
dyn. L-korr. (seTCSPC) $\tau_1 = 1.2 \text{ ns}, \tau_2 = 4.5 \text{ ns}$	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/4.5+1/1.2-(3.1353*x-9.6538)/(4.5*1.2))-1/5.7))$	
dyn. L-korr. (eTCSPC) $\tau_1 = 1.8 \text{ ns}, \tau_2 = 5.3 \text{ ns}$	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.165/(0.33*((1/5.3+1/1.8-(2.2603*x-6.6849)/(5.3*1.8))-1/5.7))$	

Tab. 26 Parameter und Gleichungen zu Abb. 60

5.3.2.5.4 *D*Lin-7-S27C-S115C mit modifizierten FRET-Linien

Abb. 61 zeigt die F_D/F_A vs. $\tau_{D(A)}$ -Auftragung, bei denen die Daten in (A), (B) und (C) jeweils identisch mit Abb. 54 A sind. In die jeweiligen 2D-Histogramme wurden die verschiedenen FRET-Linien eingezeichnet: statische FRET-Linie (Cyan), statische L-korr. FRET-Linie (Blau), dynamische FRET-Linie (Rot) und die dynamische L-korr. FRET-Linie (Grün). Zusätzlich erfolgte in Abb. 61 C die Darstellung der dynamischen FRET-Linie mit einem geänderten $\sigma = 11$ (Gelb). Aus Gründen der Übersicht wurden die jeweiligen Grenzzustände für die dynamischen FRET-Linien mit senkrecht gestrichelten Linien bei den entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern dargestellt. Für die Berechnung der FRET-Linien wurden einige Parameter abweichend von den Herstellerangaben geändert ($R_0 = 57 \text{ \AA}$, $\phi_{FD(0)} = 0.84 \text{ ns}$, $\phi_{FA} = 0.4 \text{ ns}$, $g_G = 0.65$, $g_R = 1.0$, $k_f = 0.1318 \text{ ns}^{-1}$, $\sigma = 7.0 \text{ \AA}$ bzw. 11.0 \AA , $\langle \tau_{D(0)} \rangle = 5,7 [5.9 \text{ ns} (0.82), 2.2 \text{ ns} (0.11), 0.3 \text{ ns} (0.07)]$). Eine genaue Beschreibung der jeweiligen FRET-Linien ist in Tab. 27 aufgeführt. Die Modifizierung wurde nur für diese eine *D*Lin-7-Doppelvariante-S27C-S115C durchgeführt, um exemplarisch die Lagen der verschiedenen FRET-Linien zu erklären.

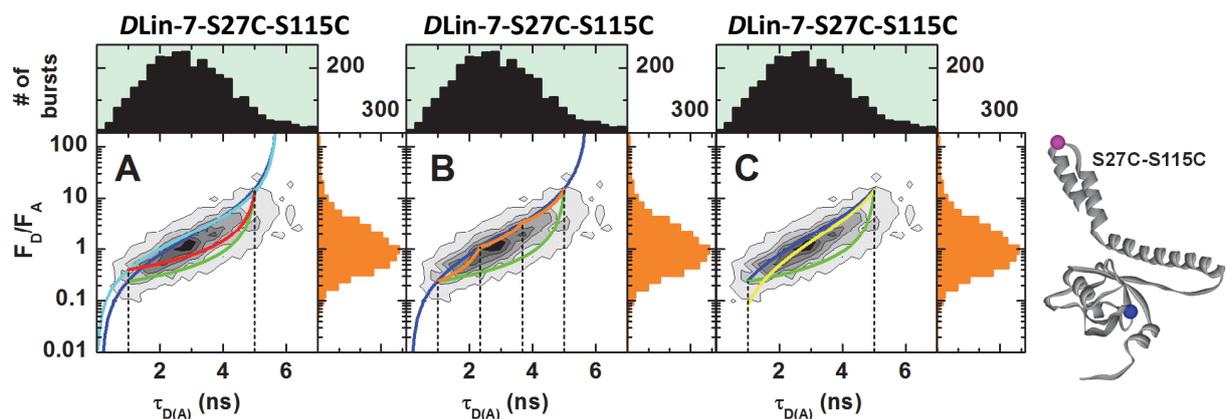


Abb. 61 Inter-Domänen-FRET *D*Lin-7-S27C-S115C mit modifizierten FRET-Linien: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ bei denen die Daten in (A), (B) und (C) jeweils identisch mit Abb. 54 A sind. Zur Erklärung der FRET-Linien siehe Tab. 27. Die Grenzzustände sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Verwendete Parameter: $R_0 = 57 \text{ \AA}$, $\phi_{FD(0)} = 0.84 \text{ ns}$, $\phi_{FA} = 0.4 \text{ ns}$, $g_G = 0.65$, $g_R = 1.0$, $k_f = 0.1318 \text{ ns}^{-1}$, $\sigma = 7.0 \text{ \AA}$ bzw. 11.0 \AA , $\langle \tau_{D(0)} \rangle = 5,7 [5.9 \text{ ns} (0.82), 2.2 \text{ ns} (0.11), 0.3 \text{ ns} (0.07)]$

In Abb. 61 A schneiden sich die statische- (Cyan) und dynamische- (Rot) FRET-Linie sowie die statische L-korr. (Blau) und die dyn. L-korr. (Grün) FRET-Linie in den Grenzzuständen $\tau_1 = 1.0 \text{ ns}$ und $\tau_2 = 5.0 \text{ ns}$. Abb. 61 B zeigt erneut die beiden L-korr. FRET-Linien (stat. & dyn) sowie zusätzlich drei orangene dyn. L-korr. FRET-Linien mit insgesamt vier Grenzzuständen ($\tau_1 = 1.0 \text{ ns}$, $\tau_2 = 2.33 \text{ ns}$, $\tau_3 = 3.667 \text{ ns}$, $\tau_4 = 5.0 \text{ ns}$). In Abb. 61 C wurde die statische L-korr. FRET-Linie (Blau) mit einem größeren $\sigma = 11$ neu berechnet (Gelb) und zusammen mit den Grenzzuständen $\tau_1 = 1.0 \text{ ns}$ und $\tau_2 = 5.0 \text{ ns}$ aufgetragen.

(A) FRET-Linie	Farbe	Gl.	B_G und $B_R = 0.4 - 0.7$ kHz	$\sigma = 7.0 \text{ \AA}$
statische	Cyan	4.10	$F_D/F_A = x \cdot 5.7 \cdot 0.1318 / ((5.7-x) \cdot 0.4)$	
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.7517/0.4) / ((5.7014 / ((-0.0217 \cdot x^3) + (0.2001 \cdot x^2) + 0.5791 \cdot x - 0.0963)) - 1)$	
dynamische $\tau_1 = 1.0$ ns, $\tau_2 = 5.0$ ns	Rot	4.12	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/4.5 + 1/1.0 - x / (1.0 \cdot 4.5)) - 1/5.7))$	
dynamische L-korr. $\tau_1 = 1.0$ ns, $\tau_2 = 5.0$ ns	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/5.0 + 1/1.0 - (1.7171 \cdot x - 3.5722) / (1.0 \cdot 5.0)) - 1/5.7014))$	
(B) FRET-Linie	Farbe	Gl.	B_G und $B_R = 0.4 - 0.7$ kHz	$\sigma = 7.0 \text{ \AA}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.7517/0.4) / ((5.7014 / ((-0.0217 \cdot x^3) + (0.2001 \cdot x^2) + 0.5791 \cdot x - 0.0963)) - 1)$	
dyn. L-korr. (1 nach 2) $\tau_1 = 1.0$ ns, $\tau_2 = 2.33$ ns	Orange	4.13	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/2.33 + 1/1.0 - (1.9119 \cdot x - 2.2419) / (1.0 \cdot 2.33)) - 1/5.7014))$	
dyn. L-korr. (2 nach 3) $\tau_1 = 2.33$ ns, $\tau_2 = 3.667$ ns	Orange	4.13	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/3.667 + 1/2.33 - (1.3197 \cdot x - 1.1748) / (2.33 \cdot 3.667)) - 1/5.7014))$	
dyn. L-korr. (3 nach 4) $\tau_1 = 3.667$ ns, $\tau_2 = 5.0$ ns	Orange	4.13	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/5.0 + 1/3.667 - (1.0409 \cdot x + 0.1544) / (3.667 \cdot 5.0)) - 1/5.7014))$	
dyn. L-korr. (1 nach 4) $\tau_1 = 1.0$ ns, $\tau_2 = 5.0$ ns	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/5.0 + 1/1.0 - (1.7171 \cdot x - 3.5722) / (1.0 \cdot 5.0)) - 1/5.7014))$	
(C) FRET-Linie	Farbe	Gl.	B_G und $B_R = 0.4 - 0.7$ kHz	$\sigma = 7.0 \text{ \AA}$
statische L-korr.	Blau	4.11	$F_D/F_A = (0.7517/0.4) / ((5.7014 / ((-0.0217 \cdot x^3) + (0.2001 \cdot x^2) + 0.5791 \cdot x - 0.0963)) - 1)$	
statische L-korr. $\sigma = 11.0 \text{ \AA}$	Gelb	4.11	$F_D/F_A = (0.7517/0.4) / ((5.7014 / ((-0.0393 \cdot x^3) + (0.4052 \cdot x^2) - 0.0142 \cdot x - 0.1077)) - 1)$	
dyn. L-korr. $\tau_1 = 1.0$ ns, $\tau_2 = 5.0$ ns	Grün	4.13	$F_D/F_A = 0.1318 / (0.4 \cdot ((1/5.0 + 1/1.0 - (1.7171 \cdot x - 3.5722) / (1.0 \cdot 5.0)) - 1/5.7014))$	

Tab. 27 Parameter und Gleichungen zu Abb. 61

Basierend auf Abb. 61 B, in der drei orangene dyn. L-korr. FRET-Linien mit insgesamt vier Grenzzuständen eingezeichnet sind, wurde im nächsten Abschnitt eine gefilterte FCS-Analyse durchgeführt.

5.3.2.5.5 DLin-7-S27C-S115C fFCS-Analyse

Für ein dynamisches Zweizustandssystem, ohne Berücksichtigung der Tripletkinetik, kann das Modell der Spezies-Autokorrelationsfunktion (SACF) $G^{(1,1)}(t_c)$ und der Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion (SCCF) $G^{(i,m)}(t_c)$ wie folgt beschrieben werden (Felekyan et al. 2013):

$G^{(1,1)}(t_c) = 1 + \frac{1}{N} * G_{diff}(t_c) * [1 + SAC^{(1,1)}(t_c)]$	Gleichung 5-5
$G^{(2,2)}(t_c) = 1 + \frac{1}{N} * G_{diff}(t_c) * [1 + SAC^{(2,2)}(t_c)]$	Gleichung 5-6
$G^{(1,2)}(t_c) = 1 + \frac{1}{N} * G_{diff}(t_c) * [1 + SCC^{(1,2)}(t_c)]$	Gleichung 5-7

Die korrespondierenden kinetischen Terme sind durch Gleichung 5-8 bis Gleichung 5-10 definiert:

$SAC^{(1,1)}(t_c) = K * \exp\left(-\frac{t_c}{t_R}\right)$	Gleichung 5-8
$SAC^{(2,2)}(t_c) = K * \exp\left(-\frac{t_c}{t_R}\right)$	Gleichung 5-9
$SCC^{(1,2)}(t_c) = -\exp\left(-\frac{t_c}{t_R}\right)$	Gleichung 5-10

Die Selektion der einzelnen Populationen, die für die Analyse verwendet wurden, sind in Abb. 62 dargestellt. (A) zeigt die gesamte Verteilung im 2D-Histogramm, (B) die selektierte Low-FRET-Population für die Spezies-Autokorrelationsfunktion $G^{(1,1)}$ und (C) die very High-FRET-Population für die Spezies-Autokorrelationsfunktion $G^{(2,2)}$.

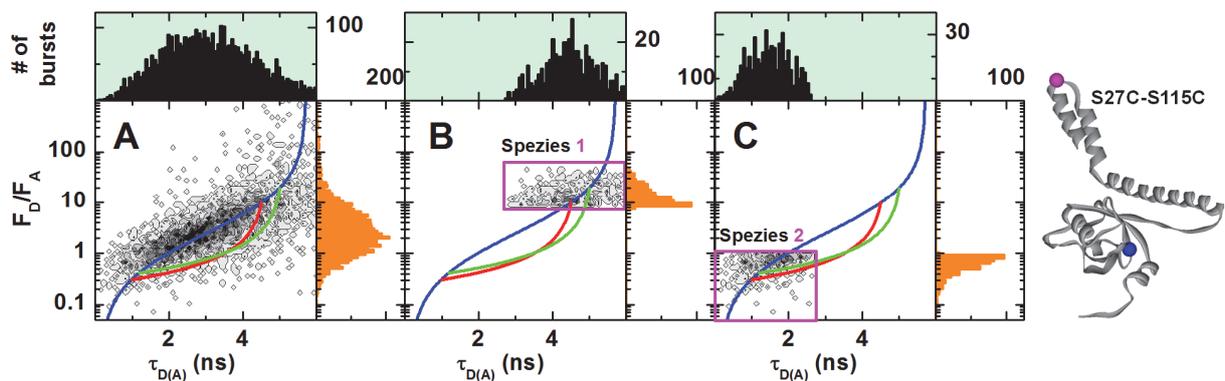
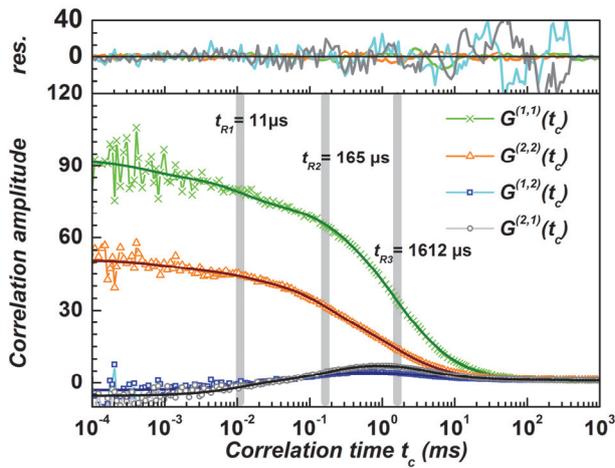
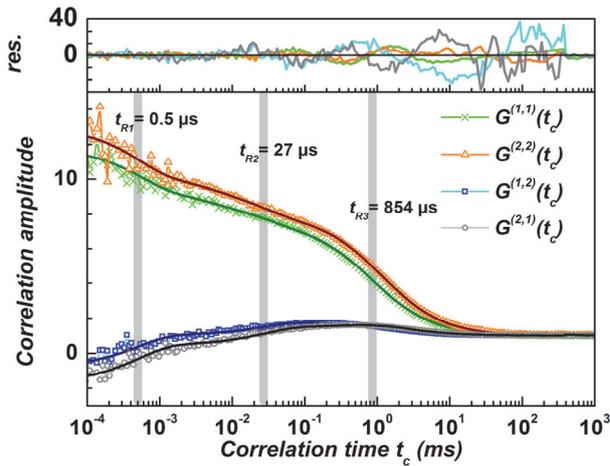


Abb. 62 Populationsselektion für fFCS: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung von DLin-7-S27C-S115C: (A) zeigt die gesamte Verteilung im 2D-Histogramm, (B) die selektierte Low-FRET-Population für die Spezies-Autokorrelationsfunktion $G^{(1,1)}$ (rosa Box) und (C) die very High-FRET-Population für die Spezies-Autokorrelationsfunktion $G^{(2,2)}$ (rosa Box). Für weitere Details siehe Abb. 54.

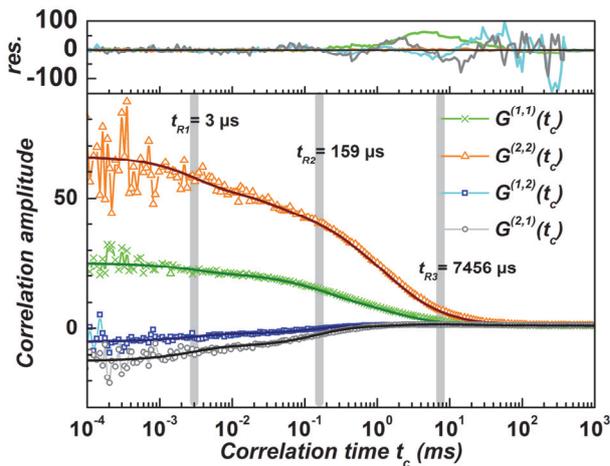
Abb. 63 zeigt die Ergebnisse der fFCS-Analyse für die drei Einzelmolekülmessungen: (A) *DLin-7-S27C-S115C*, (B) *DLin-7-S27C-S115C* mit 500 nM unmarkiertem *DLin-7-S27C-S115C* und (C) *DLin-7-S27C-S115C* mit 500 nM Sdt-L. Es wurden jeweils die Autokorrelationskurven für Spezies 1 (species autocorrelation curve, SAC(1) in Grün $G^{(1,1)}$), die Autokorrelationskurve für Spezies 2 (SAC(2) in Orange $G^{(2,2)}$) und die Kreuzkorrelationskurven für den Austausch zwischen 1 nach 2 (species cross correlation, SCC(1-2) in Blau $G^{(1,2)}$) bzw. 2 nach 1 (SCC(2-1) in Grau $G^{(2,1)}$) eingezeichnet. Zusätzlich sind neben den Graphen die drei kinetischen Relaxationszeiten t_{R1-R3} und ihre Anteile tabellarisch aufgeführt. Aus Gründen der Übersicht wurden diese Relaxationszeiten als senkrechte graue Balken in die jeweiligen Graphen eingefügt. Beim Vergleich der Zeiten von (A) mit (B) wird deutlich, dass durch Zugabe von unmarkiertem *DLin-7-S27C-S115C* die jeweiligen drei Relaxationszeiten kürzer werden. Wird hingegen Sdt-L zu *DLin-7-S27C-S115C* gegeben, verlängern sich die korrespondierenden Relaxationszeiten wieder. Unmarkiertes Protein und der Bindungspartner haben somit unterschiedliche Einflüsse auf die Grenzzustände und deren Relaxationszeiten. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass sich in (A) die multiplen Zustände im langsamen Austausch befinden. In (B) wird dieser Austausch dramatisch beschleunigt. Fast alle Moleküle befinden sich im schnellen Austausch (> 90 %) und die beiden Grenzzustände sind unterscheidbar. In (C) tritt eine deutliche Verlangsamung auf, die durch die Bildung einer statischen Population (35 %) begründet ist. Diese Population entspricht dem Bindungskomplex von *DLin-7* mit Std-L. Die restlichen Anteile entsprechen weitgehend den Anteilen aus (B). Die Bindung eines funktionsfähigen *DLin-7* an Std-L konnte somit erfolgreich nachgewiesen werden.

A DLin-7-S27C-S115C

t_{R1} [μ s]	x_1
11	0.28
t_{R2} [μ s]	x_2
165	0.39
t_{R3} [μ s]	x_3
1612	0.33

B DLin-7-S27C-S115C + 500 nM unmarkiertes DLin-7-S27C-S115C

t_{R1} [μ s]	x_1
0.5	0.65
t_{R2} [μ s]	x_2
27	0.3
t_{R3} [μ s]	x_3
854	0.05

C DLin-7-S27C-S115C + 500 nM Sdt-L

t_{R1} [μ s]	x_1
3	0.31
t_{R2} [μ s]	x_2
159	0.34
t_{R3} [μ s]	x_3
7456	0.35

Abb. 63 fFCS-Analyse von DLin-7-S27C-S115C: Auftragung der Korrelationsamplitude vs. Korrelationszeit t_c [ms]. (A) DLin-7-S27C-S115C, (B) DLin-7-S27C-S115C mit 500 nM unmarkiertem DLin-7 und (C) DLin-7-S27C-S115C mit 500 nM Sdt-L. $G^{(1,1)}$ (Grün), $G^{(2,2)}$ (Orange), $G^{(1,2)}$ (Blau) und $G^{(2,1)}$ (Grau). Zusätzlich sind die drei kinetischen Relaxationszeiten t_{R1-R3} und ihre Anteile tabellarisch aufgeführt.

5.3.2.6 AV-Simulation

Unter Verwendung der in Abschnitt 2.7 beschriebenen Parameter wurde die AV-Simulation für jede Doppelvariante durchgeführt. Als Donorfarbstoff diente Bodipy FL und als Akzeptorfarbstoff A647. In Tab. 28 sind die Ergebnisse aufgelistet. Dabei sind drei verschiedene Abstände angegeben. R_{mp} ist der mittlere Abstand zwischen den mittleren Farbstoffpositionen. $\langle R_{DA} \rangle$ ist der mittlere Abstand der Farbstoffpositionen, welcher mit den Messergebnissen der eTCSPC vergleichbar ist. Die Erwartungswerte der Breite der Donor-Akzeptor-Verteilungen werden durch σ beschrieben. Die experimentelle Bestimmung von σ kann über die eTCSPC-Messungen erfolgen. $\langle R_{DA} \rangle_E$ ist der FRET-gewichtete mittlere Abstand, der mit den Messergebnissen aus der PDA-Analyse vergleichbar ist.

<i>D</i> Lin-7-Varianten mit Bodipy FL & A647	R_{mp} [Å]	$\langle R_{DA} \rangle$ [Å]	σ [Å]	$\langle E \rangle$ ($R_0 = 57 \text{ Å}$)	$\langle R_{DA} \rangle_E$ [Å]	$C\alpha$ - $C\alpha$ [Å]
S27C-S72C	57.3	58.6	9.7	0.48	57.9	59.0
S27C-S115C	61.2	62.4	7.0	0.39	61.6	53.4
S27C-A163C	30.1	32.1	6.2	0.95	34.4	35.4
T33C-V69C	51.6	53.3	8.3	0.59	53.5	47.9
T33C-K98C	35.9	37.9	9.4	0.87	41.3	33.9
S44C-S72C	48.6	50.2	8.8	0.66	51.1	43.4
S44C-S115C	49.8	51.5	5.5	0.64	51.7	34.9
V69C-K98C	54.4	56.0	7.5	0.53	55.8	46.8
S72C-A163C	42.8	44.2	7.2	0.79	45.5	41.5

Tab. 28 AV-Simulation der Abstände zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor: Bodipy FL diente als Donor- und A647 als Akzeptorfluorophor. R_{mp} = Abstand zwischen den mittleren Farbstoffpositionen, $\langle R_{DA} \rangle$ ist der mittlere Abstand der Farbstoffpositionen (vergleichbar mit eTCSPC-Ergebnissen, Orange), $\langle R_{DA} \rangle_E$ ist der FRET-gewichtete mittlere Abstand (vergleichbar mit den PDA-Ergebnissen, Blau).

Die unspezifische Farbstoffmarkierung der beiden Cysteine führt im Extremfall zu einer Mischung aus $\text{Pos1}_{\text{Donor}}\text{-Pos2}_{\text{Akzeptor}}$ und $\text{Pos1}_{\text{Akzeptor}}\text{-Pos2}_{\text{Donor}}$ markierten Molekülen. Um einen durch diese Mischung bedingten Effekt auf die FRET-Messungen auszuschließen, wurde die AV-Simulation für beide Moleküle ($\text{Pos1}_{\text{Donor}}\text{-Pos2}_{\text{Akzeptor}}$ und $\text{Pos1}_{\text{Akzeptor}}\text{-Pos2}_{\text{Donor}}$) durchgeführt. Die Ergebnisse der AV-Simulation sind in Tab. 29 (Farbstoffpaar A488 und A594), Tab. 30 (Farbstoffpaar A488 und A647) und Tab. 31 (Farbstoffpaar Bodipy FL und A647) aufgeführt. Diese sind mit den Messergebnissen aus eTCSPC und seTCSPC vergleichbar. In allen Fällen zeigen die Simulationsergebnisse nur minimale Abweichungen in den zu erwarteten Abständen ($\sim 0.3 \text{ Å}$). Es ist somit nicht davon auszugehen, dass sich eine mögliche Mischung der jeweiligen Markierungspositionen auf die experimentellen Messergebnisse auswirkt.

		eTCSPC	eTCSPC	smFRET/PDA	
D (A488)	A (A594)	$\langle R_{DA} \rangle$	$R_{DA\sigma}$	$\langle R_{DA} \rangle_E$	$R_0 = 60$
T33C	V69C	54.7	9.8	55.3	
V69C	T33C	55.0	9.8	55.6	
T33C	K98C	39.6	10.9	43.7	
K98C	T33C	39.2	10.7	43.3	
V69C	K98C	58.5	8.6	58.7	
K98C	V69C	58.5	8.5	58.4	

Tab. 29 AV-Simulation für A488 als Donor- und A594 als Akzeptorfarbstoff (Angaben in Å).

		eTCSPC	eTCSPC	smFRET/PDA	
D (A488)	A (A647)	$\langle R_{DA} \rangle$	$R_{DA\sigma}$	$\langle R_{DA} \rangle_E$	$R_0 = 56$
T33C	V69C	54.7	10.0	54.6	
V69C	T33C	54.8	10.1	54.7	
T33C	K98C	39.4	11.0	43.1	
K98C	T33C	39.2	10.8	42.8	
V69C	K98C	58.5	8.9	57.7	
K98C	V69C	58.3	8.8	57.6	

Tab. 30 AV-Simulation für A488 als Donor- und A647 als Akzeptorfarbstoff (Angaben in Å).

		eTCSPC	eTCSPC	smFRET/PDA	
D (Bodipy FL)	A (A647)	$\langle R_{DA} \rangle$	$R_{DA\sigma}$	$\langle R_{DA} \rangle_E$	$R_0 = 57$
T33C	V69C	54.1	8.9	54.2	
V69C	T33C	53.7	9.1	54.0	
T33C	K98C	38.4	10.1	42.1	
K98C	T33C	38.1	9.8	41.6	
V69C	K98C	57.4	8.0	57.0	
K98C	V69C	56.6	8.4	56.3	
S27C	S72C	59.0	10.5	58.1	
S72C	S27C	59.1	10.5	58.3	
S27C	S115C	62.3	7.7	61.3	
S115C	S27C	63.0	8.2	61.9	
S27C	A163C	32.5	6.8	35.1	
A163C	S27C	33.6	7.1	36.2	
S44C	S72C	50.9	9.5	51.7	
S72C	S44C	50.4	9.6	51.4	
S44C	S115C	52.3	6.0	52.5	
S115C	S44C	52.2	6.3	52.5	
S72C	A163C	44.8	8.2	46.4	
A163C	S72C	45.1	7.9	46.6	

Tab. 31 AV-Simulation für Bodipy FL als Donor- und A647 als Akzeptorfarbstoff (Angaben in Å).

Der erwartete Abstand ist unabhängig von der jeweiligen Farbstoffposition. Eine nicht-spezifische Farbstoffmarkierung der D_{Lin-7}-Varianten führt somit zu keiner Verzerrung der seTCSPC und eTCSPC-Ergebnisse.

5.3.2.7 eTCSPC- & seTCSPC-Ergebnisse

5.3.2.7.1 Formaler Fit der eTCSPC-Daten

Sowohl von den *D*Lin-7-Einzelvarianten als auch von den *D*Lin-7-Doppelvarianten wurden eTCSPC-Messungen, wie in 4.3.6 beschrieben, durchgeführt. Formal wurden alle zeitaufgelösten Fluoreszenzintensitäten $F(t)$ durch eine multiexponentielle Modellfunktion mit drei Lebensdauern $\tau_{(i)}$ und drei Spezies $x_{(i)}$ beschrieben (Gleichung 4-14). Die Ergebnisse sind in Tab. 32 aufgelistet. Ein minimales χ^2 von 1.0-1.2 zeigt, dass die Modellfunktion mit drei Komponenten ausreichend für die Beschreibung der Messdaten ist.

Einzelvariante	D markiert	$\tau_{D(0),1}$	x_1	$\tau_{D(0),2}$	x_2	$\tau_{D(0),3}$	x_3	χ^2
S27C	Bodipy FL	5.9	0.82	2.2	0.11	0.3	0.07	1.02
T33C		5.9	0.76	2.2	0.11	0.4	0.14	1.08
S44C		5.8	0.81	2.7	0.13	0.5	0.07	1.04
V69C		5.7	0.34	1.5	0.20	0.4	0.46	1.13
S72C		5.7	0.83	2.2	0.11	0.2	0.06	1.06
K98C		6.0	0.80	1.4	0.08	0.4	0.12	1.06
S115C		5.8	0.73	2.8	0.20	0.6	0.07	1.02
A163C		6.1	0.95	0.0	0.00	2.2	0.06	1.02
Doppelvariante	A & D markiert	$\tau_{D(A),1}$	x_1	$\tau_{D(A),2}$	x_2	$\tau_{D(A),3}$	x_3	χ^2
S27C-S72C	A647-Bodipy FL	5.6	0.74	2.2	0.14	0.4	0.12	1.06
S27C-S115C		5.4	0.58	2.1	0.23	0.4	0.18	1.10
S27C-A163C		5.4	0.63	2.3	0.22	0.4	0.15	1.10
T33C-V69C		5.4	0.42	2.3	0.29	0.4	0.29	1.16
T33C-K98C		5.7	0.57	2.2	0.19	0.4	0.25	1.07
S44C-S72C		5.6	0.66	2.3	0.18	0.4	0.15	1.09
S44C-S115C		5.7	0.88	1.6	0.06	0.2	0.06	1.07
V69C-K98C		5.5	0.31	2.1	0.25	0.4	0.44	1.18
S72C-A163C		5.6	0.82	2.0	0.11	0.3	0.07	1.11

Tab. 32 eTCSPC eines formalen Fits (Gleichung 4-13) der zeitaufgelösten Fluoreszenz: Proben wurden 1:10 verdünnt, d.h. die finale Harnstoffkonzentration betrug 200 mM. Die Proteinkonzentrationen lagen final im Bereich von 0.3 – 3 μ M.

5.3.2.7.2 Globaler Fit der eTCSPC-Daten und Berechnung der Spezies-gemittelten $\langle \tau_{D(A),x} \rangle$

Zur Interpretation der zeitaufgelösten Fluoreszenz des Donors in Anwesenheit des Akzeptors wurde dies in der Anpassung der Messdaten durch einen globalen Fit der Donorfluoreszenz in An- und Abwesenheit des Akzeptorfarbstoffes berücksichtigt (Details siehe 4.3.6). Mit Hilfe der beiden erhaltenen Abstände $\langle R_{DA,1} \rangle$ und $\langle R_{DA,2} \rangle$ und unter Verwendung von Gleichung 4-15 konnten die Spezies-gemittelten Fluoreszenzlebensdauern $\langle \tau_{D(A),1} \rangle_x$ und $\langle \tau_{D(A),2} \rangle_x$ und ihre jeweiligen Anteile berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Tab. 33 aufgeführt. Parallel wurden beide Position des Donorfarbstoffes in der Doppelvariante berechnet, um abschätzen zu können, ob eine Position basierend auf den Fitergebnissen vom Donor bevorzugt, bzw. begünstigt wird. Die entsprechende Position in der jeweiligen Doppelvariante ist farblich hervorgehoben.

FRET-Probe	eTCSPC	Spezies-gemittelt			Spezies-gemittelt			χ^2_r	
	D-Position	$\langle R_{DA,1} \rangle$ [Å]	$\langle \tau_{D(A),1} \rangle_x$ [ns]	x_1	$\langle R_{DA,2} \rangle$ [Å]	$\langle \tau_{D(A),1} \rangle_x$ [ns]	x_2		x_{DOnly}
S27C-S72C	S27C	44.5	1.4	0.06	84.2	5.3	0.55	0.39	1.04
	S72C	37.4	0.8	0.16	72.5	4.6	0.11	0.73	1.38
S27C-S115C	S27C	45.6	1.5	0.24	76.6	4.9	0.49	0.28	1.14
	S115C	38.8	0.9	0.24	77.1	4.9	0.32	0.44	1.13
S27C-A163C	S27C	43.4	1.3	0.18	74.4	4.8	0.51	0.31	1.04
	A163C	45.2	1.5	0.29	80.2	5.1	0.67	0.04	1.09
T33C-V69C	T33C	45.0	1.5	0.26	66.3	4.0	0.40	0.33	1.11
	V96C	42.5	1.2	0.00	64.6	3.8	0.23	0.77	20.81
T33C-K98C	T33C	43.6	1.3	0.16	70.8	4.4	0.23	0.61	1.10
	K98C	40.91	1.1	0.16	65.7	3.9	0.30	0.54	1.15
S44C-S72C	S44C	40.7	1.1	0.18	81.6	5.2	0.41	0.40	1.07
	S72C	32.5	0.5	0.26	68.7	4.3	0.21	0.53	1.07
S44C-S115C	S44C	40.2	1.0	0.00	63.7	3.7	-0.04	1.04	6.91
	S115C	0.3	0.0	-0.92	54.3	2.6	1.82	0.10	1.10
V69C-K98C	V69C	42.2	1.2	0.00	64.5	3.8	0.31	0.69	6.39
	K98C	37.7	0.8	0.39	60.3	3.3	0.34	0.26	1.06
S72C-A163C	S72C	22.6	0.2	0.20	107.3	5.8	0.51	0.29	1.30
	A163C	43.7	1.4	0.11	86.8	5.4	0.79	0.10	1.22

Tab. 33 eTCSPC-Ergebnisse: Spezies-gemittelte Fluoreszenzlebensdauern und ihre Anteile (nach Gleichung 4-15). Für die FRET-Proben wurde jeweils die Donor-Position an beiden möglichen Positionen in den DLin-Doppelvarianten berechnet. Die grau-grün hervorgehobenen Felder geben die bevorzugte Position des Donors an. Für die Doppelvariante S44C-S115C konnte kein zufriedenstellender Fit berechnet werden.

5.3.2.7.3 Globaler Fit der eTCSPC-Daten und Berechnung der Fluoreszenz-gemittelten $\langle\tau_{D(A)}\rangle_f$

Die unter Verwendung eines globalen Fits in 5.3.2.7.2 erhaltenen Abstände $\langle R_{DA,1}\rangle$ und $\langle R_{DA,2}\rangle$ wurden mit Hilfe von Gleichung 4-16 dazu benutzt die Fluoreszenz-gemittelten Fluoreszenzlebensdauern $\langle\tau_{D(A),1}\rangle_f$ und $\langle\tau_{D(A),2}\rangle_f$ und ihre jeweiligen Anteile zu berechnen. Die Anwendung des globalen Fits ermöglicht es zusätzlich, die so erhaltenen Abstände $\langle R_{DA,1}\rangle$ und $\langle R_{DA,2}\rangle$ direkt mit dem aus der AV-Simulation stammenden Abstand $\langle R_{DA}\rangle_{AV}$ zu vergleichen. In Tab. 34 sind die drei Abstände für jede DLin-7-Doppelvariante farblich hervorgehoben.

FRET-Probe	eTCSPC	Fluoreszenz-gemittelt			Fluoreszenz-gemittelt			$\langle R_{DA}\rangle_{AV}$ [Å]
	D-Position	$\langle R_{DA,1}\rangle$ [Å]	$\langle\tau_{D(A),1}\rangle_f$ [ns]	$x_{1,FRET}$	$\langle R_{DA,2}\rangle$ [Å]	$\langle\tau_{D(A),2}\rangle_f$ [ns]	$x_{2,FRET}$	
S27C-S72C	S27C	44.5	1.8	0.10	84.2	5.3	0.90	58.6
	S72C	37.4	1.1	0.60	72.5	4.7	0.40	
S27C-S115C	S27C	45.6	1.9	0.32	76.6	4.9	0.68	62.4
	S115C	38.8	1.2	0.43	77.1	5.0	0.57	
S27C-A163C	S27C	43.4	1.7	0.27	74.4	4.8	0.73	32.1
	A163C	45.2	1.8	0.30	80.2	5.2	0.70	
T33C-V69C	T33C	45.0	1.8	0.39	66.3	4.1	0.61	53.3
	V96C	42.5	1.6	0.00	64.6	4.0	1.00	
T33C-K98C	T33C	43.6	1.7	0.41	70.8	4.5	0.59	37.9
	K98C	40.9	1.4	0.34	65.7	4.1	0.66	
S44C-S72C	S44C	40.7	1.4	0.30	81.6	5.2	0.70	50.2
	S72C	32.5	0.8	0.56	68.7	4.3	0.44	
S44C-S115C	S44C	40.2	1.4	0.00	63.7	3.9	1.00	51.5
	S115C	0.3	0.0	-1.02	54.3	2.8	2.02	
V69C-K98C	V69C	42.2	1.5	0.00	64.5	3.9	1.00	56.0
	K98C	37.7	1.2	0.54	60.3	3.5	0.46	
S72C-A163C	S72C	22.6	0.3	0.28	107.3	5.8	0.72	44.2
	A163C	43.7	1.7	0.12	86.8	5.4	0.88	

Tab. 34 eTCSPC-Ergebnisse: Vergleich der Abstandsverteilung $\langle R_{DA}\rangle$ und gemittelte Fluoreszenz-gewichtete Lebensdauern $\langle\tau_{D(A)}\rangle_f$ (berechnet nach Gleichung 4-16) mit den Abständen aus der AV-Simulation (aus Tab. 28). Für die FRET-Proben wurde jeweils die Donor-Position an beiden möglichen Positionen in den DLin-Doppelvarianten berechnet. Die grau-grün hervorgehobenen Felder geben die bevorzugte Position des Donors und die jeweiligen Abstände an.

5.3.2.7.4 Vergleich der Fluoreszenzlebenszeiten aus seTCSPC- und eTCSPC

In Tab. 35 sind $\tau_{D(A),1}$ und $\tau_{D(A),2}$ aus der seTCSPC mit den $\langle \tau_{D(A),1} \rangle_f$ und $\langle \tau_{D(A),2} \rangle_f$ aus eTCSPC gegenüber gestellt. Beim direkten Vergleich fällt auf, dass die jeweiligen Lebenszeiten aus den verschiedenen Messmethoden um ~ 0.5 ns voneinander abweichen. Ein möglicher Effekt dafür könnte sowohl die unterschiedliche DLin-7-Proteinkonzentration als auch die unterschiedliche Harnstoffkonzentration während der verschiedenen Messungen sein. Darüber hinaus wurden die Messdaten aus seTCSPC durch einen formalen und die Messdaten aus eTCSPC durch einen globalen Fit beschrieben.

		seTCSPC (SMD)		eTCSPC	
FRET	DLin-7-Doppelvariante	$\tau_{D(A),1}$	$\tau_{D(A),2}$	$\langle \tau_{D(A),1} \rangle_f$	$\langle \tau_{D(A),2} \rangle_f$
Intra-Domänen-FRET	S27C-S72C	1.2	4.5	1.8	5.3
	T33C-V69C	0.8	4.6	1.8	4.1
	S44C-S72C	1.0	4.8	1.4	5.2
Inter-Domänen-FRET	S27C-S115C	1.0	4.5	1.2	5.0
	S27C-A163C	1.2	4.7	1.7	4.8
	T33C-K98C	1.2	4.5	1.4	4.1
	S44C-S115C	0.6	4.6	1.4	3.9
	V69C-K98C	0.9	4.4	1.2	3.5
	S72C-A163C	1.2	4.7	1.7	5.4

Tab. 35 Vergleich von $\tau_{D(A),i}$ und $\langle \tau_{D(A),i} \rangle_f$, Angaben in ns

5.3.3 Diskussion

5.3.3.1 L27-Domäne

Die L27-Domäne wurde erstmals in *C. elegans* identifiziert. Die Proteine Lin-2 und Lin-7 interagieren über eine homologe Region in beiden Proteinen, der sogenannten L27-Domäne nach Lin-2/Lin-7. Diese Domäne existiert einfach in Lin-7 und doppelt in Lin-2 (Doerks et al. 2000). Die zwei hintereinander liegenden L27-Domänen in Lin-2 werden als L27N und L27C bezeichnet. Die L27-Domäne von Lin-7 bindet an die L27C-Domäne von Lin-7. Abb. 64 zeigt verschiedene L27-Domänen-Tetramer Komplexe. In allen drei Fällen bilden jeweils Helix 1 und 2 der einen L27-Domäne ein Bündel mit Helix 1 und 2 aus der zweiten L27-Domäne. Die jeweiligen dritten Helices bilden ein zweites Bündel und formen somit das Tetramer.

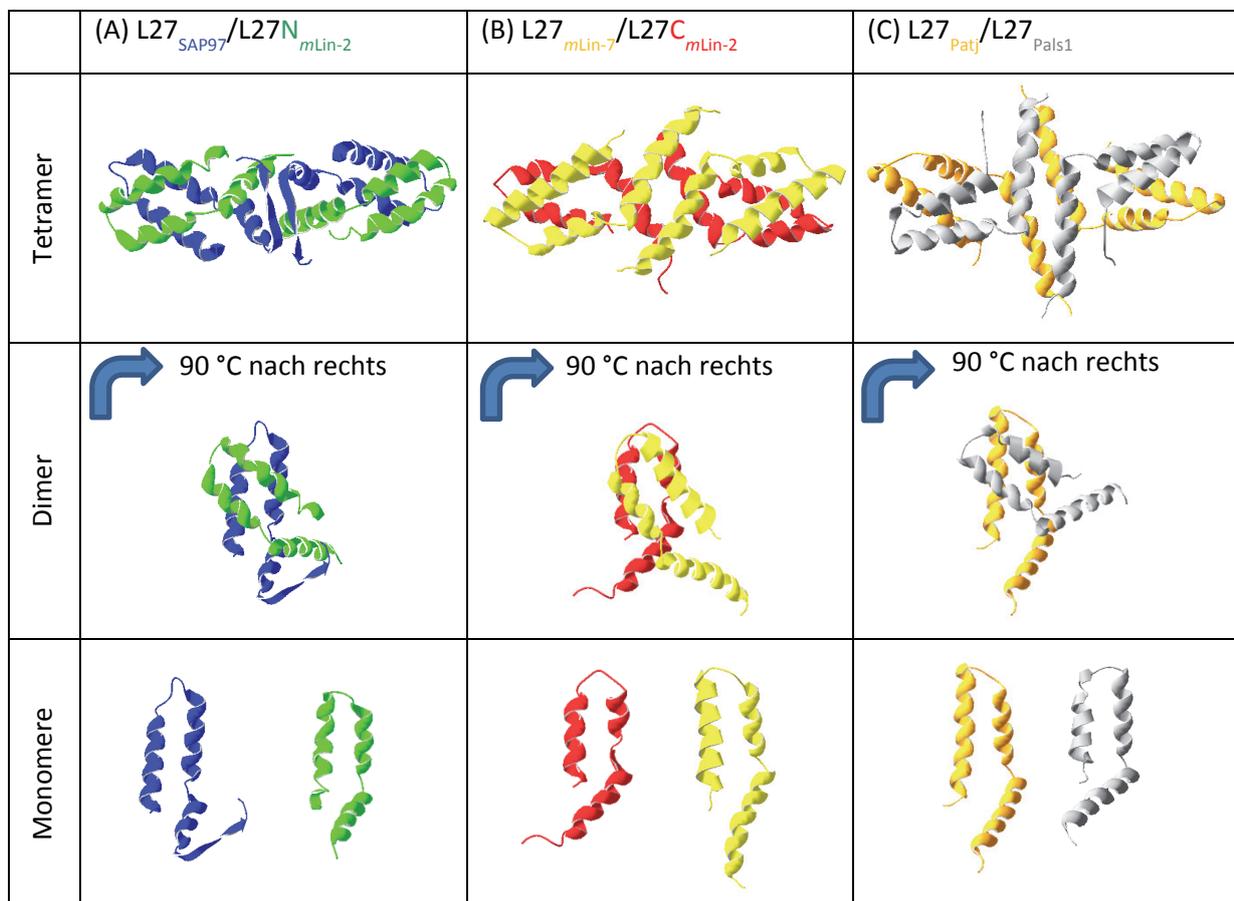


Abb. 64 L27-Domänen-Tetramer Komplexe: (A) SAP97/mLin-2-Tetramerkomplex mit der L27-Domäne von SAP97 in Blau und der L27-Domäne von mLin-2 in Grün [1RSO], (B) mLin-2/mLin-7-Tetramerkomplex mit der L27-Domäne von mLin-2 in Rot und der L27-Domäne von mLin-7 in Gelb [1Y74] und (C) L27_{Patj}/L27_{Pals1} [1Y76] mit der L27-Domäne von Patj in Orange und der L27-Domäne von Pals1 in Grau. In den eckigen Klammern sind die dazugehörigen PDB-Datenbankeinträge notiert. Entnommen für (A) aus (Feng et al. 2004) und für (B) und (C) aus (Feng et al. 2005).

Verschiedene NMR- und CD-Studien (Harris et al. 2002; Feng et al. 2005) haben gezeigt, dass die L27-Domäne ohne Bindungspartner ungeordnet bzw. unstrukturiert vorliegt. Erst durch das Auftreten des Interaktionspartners bildet die L27-Domäne ihre Form aus. In den beiden L27-Domänen gibt es

zusätzlich zwei Schlüsselpositionen (keystone position), die einen Einfluss auf die Bindefähigkeit der beiden L27-Domänen besitzen. Abb. 65 zeigt schematisch ein L27-Dimer. Dabei ist das dritte Residuum in der zweiten Helix die elektrostatische keystone position und das zweite Residuum in der dritten Helix die hydrophobe bzw. polare keystone position. Es existieren zwei verschiedene Typen von L27-Domänen: Jeweils ein A-Typ (positiv geladen und hydrophob) bildet mit dem B-Typ (negativ geladen und polar) ein Dimer aus. Die L27-Domäne aus Lin-7 ist ein A-Typ und die L27C-Domäne aus Lin-2 ein B-Typ (Petrosky et al. 2005). Die homologen Positionen der keystone positions in der L27-Domäne von *DLin-7* sind K34 und F46 und die Cysteinmutationen liegen z.B. in den Einzelvarianten (*DLin-7-T33C* und *DLin-7-S44C*) nur ein bis zwei Residuen von diesen entfernt.

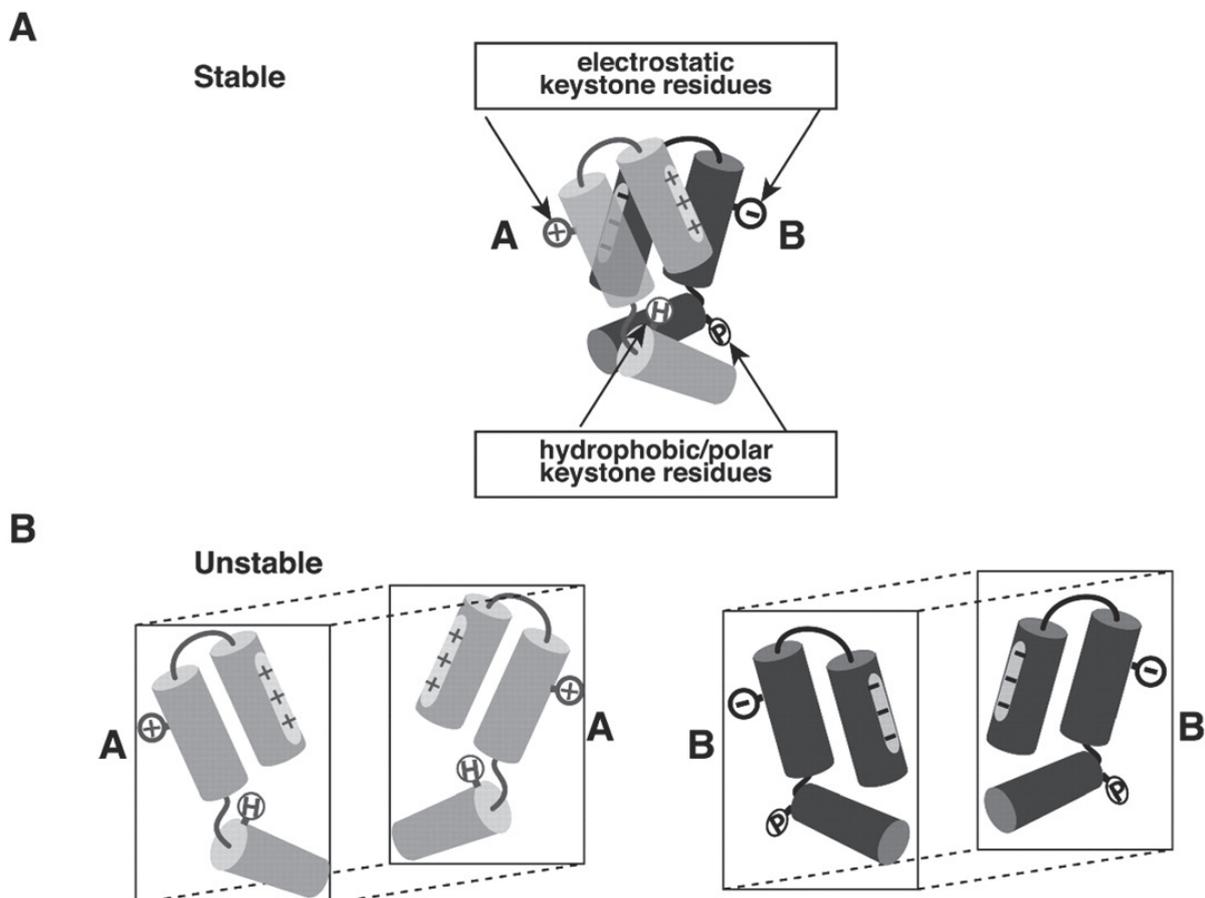


Abb. 65 L27-Dimere: Modell mit den beiden Schlüsselpositionen (keystone residues) in den L27-Domänen, die eine Formation eines Heterodimeres bevorzugen (A) und die Bildung eines Homodimer (B) missbilligen. Die Abbildung wurde aus (Petrosky et al. 2005) entnommen.

Im folgenden Abschnitt werden die unterschiedlichen Positionen in den FRET-Paaren diskutiert. Dabei wird sowohl auf den Inter- als auch auf den Intra-Domänen-FRET eingegangen. Zusätzlich werden die statischen und dynamischen Möglichkeiten der drei verschiedenen Helices der L27-Domäne von *DLin-7* betrachtet.

5.3.3.2 Vergleich der Intra-Domänen-FRET-Messungen

Die insgesamt vier verschiedenen Mutationen beeinflussen abhängig von ihrer Lage in der L27-Domäne das FRET-Verhalten der Varianten. S27C liegt zwischen der ersten und zweiten Helix, T33C am Anfang der zweiten Helix, S44C zwischen Helix 2 und Helix 3, V69C fast am Ende der dritten Helix und S72C direkt am Ende der dritten Helix. Beim Vergleich von C1 und C2 mit C3 (Abb. 66) fällt auf, dass die FRET-Änderungen in den ersten beiden Messungen deutlich größer ausfallen als bei C3. Helix 1 und 2 sind demnach viel flexibler und erlauben den *D*Lin-7-Varianten ein dynamisches Verhalten in ihrer Strukturbildung. Im dritten Fall (*D*Lin-7-S44C-S72C, C3) finden sich beide Mutationen in der dritten Helix. Es ist keine FRET-Änderung im direkten Vergleich mit B3 (*D*Lin-7-S44C-S72C mit unmarkiertem *D*Lin-7-S44C-S72C) zu erkennen, was auf eine starre und weniger flexible Struktur der dritten Helix hinweist.

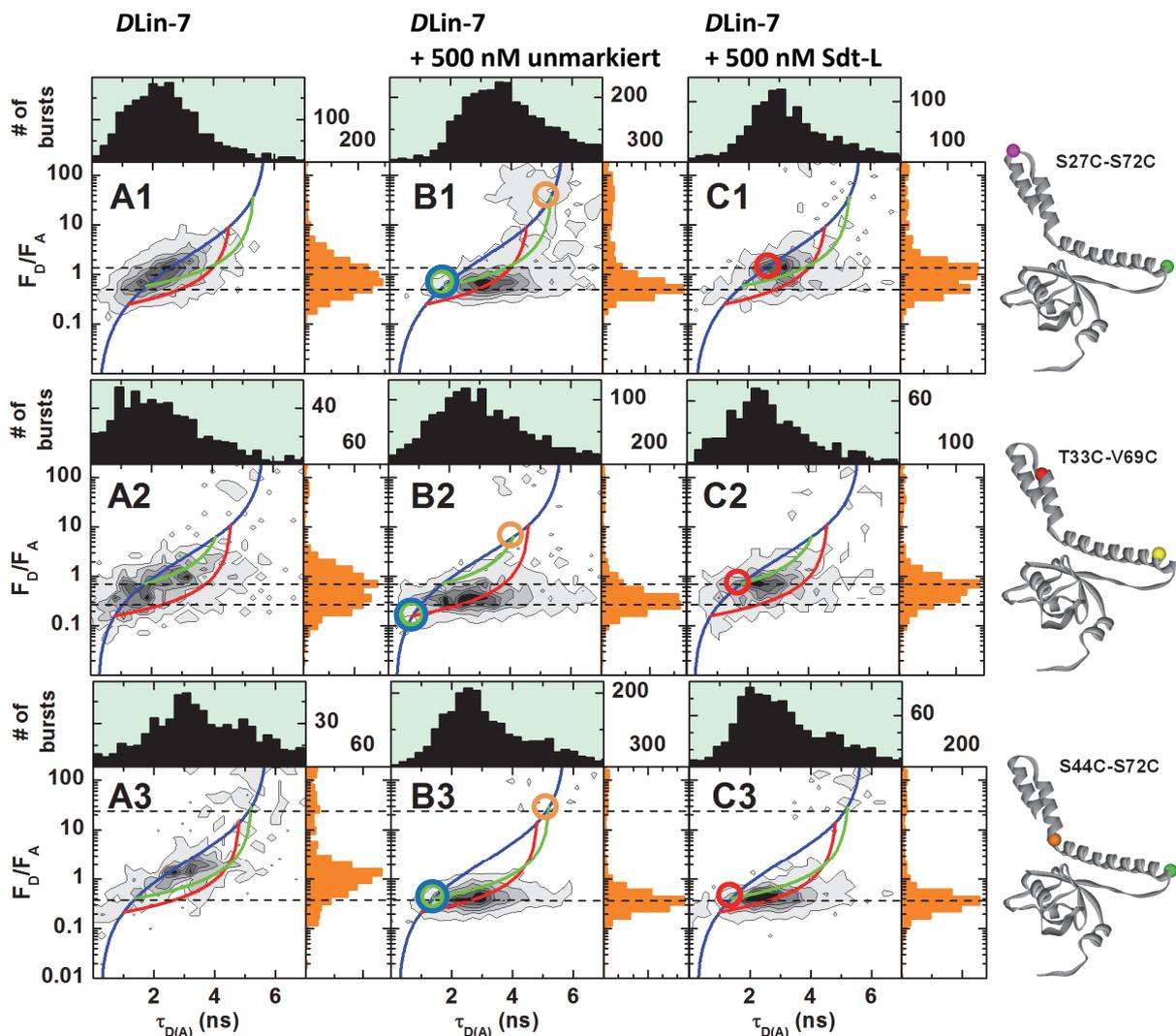


Abb. 66 Intra-Domänen-FRET-Vergleich: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung von *D*Lin-7-S27C-S72C (A1, B1, C1 aus Abb. 51), *D*Lin-7-T33C-V69C (A2, B2, C2 aus Abb. 52) und *D*Lin-7-S44C-S72C (A3, B3, C3 aus Abb. 53),

5.3.3.3 Vergleich der Inter-Domänen-FRET-Messungen

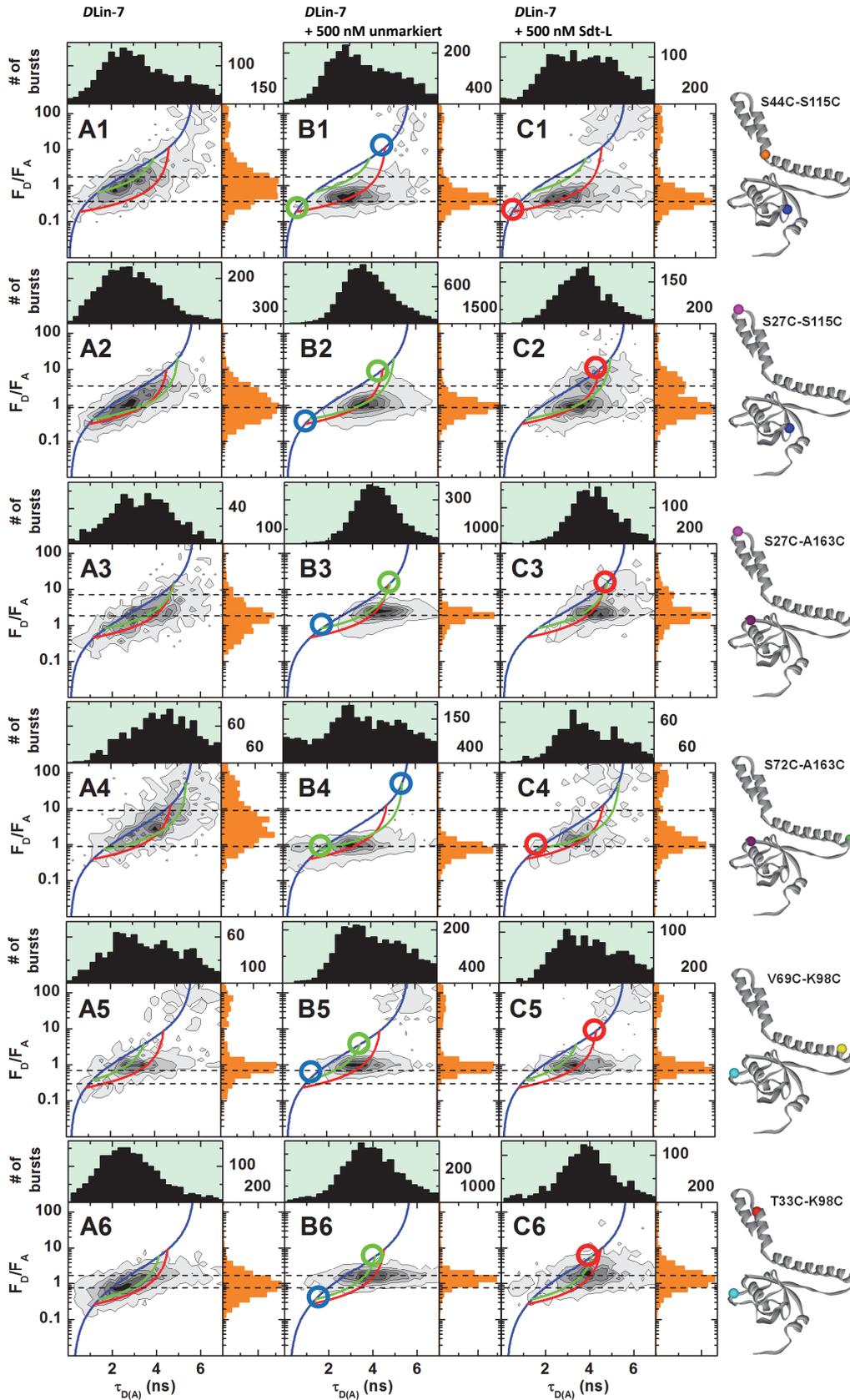


Abb. 67 Inter-Domänen-FRET-Vergleich: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung von *DLin-7*-S44C-S115 (A1-C1 aus Abb. 57), *DLin-7*-S27C-S115 (A2-C2 aus Abb. 54), *DLin-7*-S27C-A163 (A3-C3 aus Abb. 55), *DLin-7*-S72C-A163C (A4-C4 aus Abb. 59), *DLin-7*-V69C-K98C (A5-C5 aus Abb. 58) und *DLin-7*-T33C-K98C (A6-C6 aus Abb. 56)

DLin-7-S44C-S115C (Zeile 1) vs. DLin-7-S27C-S115C (Zeile 2)

Bei der Betrachtung der ersten beiden Zeilen aus Abb. 67 liegt die in beiden Varianten konstante Position S115C in der PDZ-Domäne. Der Vergleich richtet sich auf einen eher starren Teil (Position S44C, A1-C1) und einen flexiblen Teil (Position S27C, A2-C2). Die Verschiebung der FRET-Population in Richtung dyn. L-korr. FRET-Linie (Vergleich A1 mit B1 und C1) indiziert eine zusätzliche Beweglichkeit des Linkers zwischen der L27- und der PDZ-Domäne. Die große FRET-Änderung nach Zugabe des Bindungspartners (Vergleich A2 mit C2) weist auf eine Zustandsänderung mit größeren Abständen hin.

DLin-7-S27C-S115C (Zeile 2) vs. DLin-7-S27C-A163C (Zeile 3)

Position 27 befindet sich zwischen Helix 1 und Helix 2 in der L27-Domäne. Wie bereits in 5.3.3.1 beschrieben, ist dieser Bereich für die Interaktion mit Stardust sehr wichtig. Die korrespondierenden zwei anderen Positionen befinden sich in der PDZ-Domäne. Beiden Messungen findet die größte FRET-Änderung statt (C2 und C3 in Abb. 67). Da die PDZ-Domäne als relativ kompakt und starr gilt, erfolgt die FRET-Änderung durch die Ausbildung der L27-Domäne und der damit verbundenen Abstandsänderung zwischen den einzelnen Positionen. Unabhängig vom Liganden wird die FRET-Population in Richtung dyn. L-korr. FRET-Linie verschoben.

DLin-7-S27C-A163C (Zeile 3) vs. DLin-7-S72C-A163C (Zeile 4)

In diesem Vergleich der Doppelcysteinvarianten ist A163C, welche sich in der PDZ-Domäne befindet, konstant gehalten. S27C liegt zwischen der ersten und zweiten Helix und S72C am Ende der dritten Helix der L27-Domäne. In Abb. 67 kann die Verschiebung beim Vergleich von markiertem Protein (A3) mit markiertem Protein und Bindungspartner (C3) durch den flexiblen Bereich zwischen den beiden Helices erklärt werden. Dadurch, dass sich bei DLin-7-S72C-A163C, durch die Zugabe des Bindungspartners (Vergleich A4 mit B4 und C4), die FRET-Population sich auf der dyn. L-korr. FRET-Linie ebenfalls zu größeren Abständen verschiebt, wurde gezeigt, dass auch der Linker zwischen den beiden Domänen zumindest leicht flexibel ist.

DLin-7-S72C-A163C (Zeile 4) vs. DLin-7-V69C-K98C (Zeile 5)

In diesen Varianten ist keine Mutation identisch. Allerdings liegen die beiden vergleichbaren Positionen (V69C und S72C) nur drei Aminosäuren voneinander entfernt. Der Anteil der very High-FRET-Population (< 1 ns, Vergleich B4 mit C4) verringert sich, wenn anstelle von unmarkiertem Protein der Bindungspartner Sdt-L hinzugegeben wird. Eine mögliche Erklärung wäre ein Bleichen (quenching) des Fluoreszenzfarbstoffes an dieser Position. Dieser Effekt tritt beim Vergleich der

zweiten Variante (B5 mit C5) nicht auf, was auf eine bessere Zugänglichkeit an der Position K98C vermuten lässt.

DLin-7-V69C-K98C (Zeile 5) vs. DLin-7-T33C-K98C (Zeile 6)

Bei diesen Doppelcysteinvarianten wurde K98C konstant gehalten. Die zweiten Mutationen befinden sich zum einen am Anfang der zweiten bzw. am Ende der dritten Helix der L27-Domäne. Die Messungen zeigen nur eine schwache bis marginale Verschiebung zu längeren Abständen. Dieser Effekt ist bei anderen DLin-7-Varianten deutlich stärker ausgeprägt.

Die Ergebnisse der Einzelmolekülexperimente (Intra- und Inter-Domänen-FRET) sind mit Blick auf die Beweglichkeit der einzelnen Domänen (L27- Helix 1-3 und PDZ-Domäne) in Tab. 36 zusammengefasst. Dabei werden die Änderungen zwischen DLin-7 mit unmarkiertem Protein und DLin-7 mit Sdt-L betrachtet.

		L27-Domäne		PDZ-Domäne		
		Helix 3				
		69	72	98	115	163
L27-Domäne	27		D→S <u>1.8</u> , 5.3		D→S 1.2, <u>5.0</u>	D→S 1.7, <u>4.8</u>
Helix 1 & 2	33	D→S <u>1.8</u> , 4.1		D→S 1.4, <u>4.1</u>		
	44		D <u>1.4</u> , 5.2		D <u>1.4-3.9</u>	
L27-Domäne	69			D 1.2, <u>3.5</u>		
Helix 3	72					D→S 1.7, <u>5.4</u>

Tab. 36 Übersicht der SMD-Messergebnisse: Dargestellt sind alle DLin-7-Positionen und die Lage innerhalb des Proteins. Betrachtet werden alle Doppelcysteinvarianten (Gelb) und deren Änderungen zwischen DLin-7 mit unmarkiertem Protein und DLin-7 mit Sdt-L. (D→S) zeigt eine Änderung der FRET-Population an, die von der dyn. L-korr. FRET-Linie (D) auf die statische L-korr. FRET-Linie (S) verschoben wurden. (D) allein bedeutet keine Änderung, aber die Lage der FRET-Population befindet sich weiterhin auf der dyn. L-korr. FRET-Linie. Zusätzlich sind die Fluoreszenzlebensdauern der beiden Grenzzustände in ns angegeben, wobei die unterstrichenen Fluoreszenzlebensdauern den Hauptanteil der FRET-Population angeben.

In sechs von neun *DLin 7*-Doppelvarianten findet eine Verschiebung der FRET-Population von der dyn. L-korr. FRET-Linie in Richtung statischer L-korr. FRET-Linien statt ($D \rightarrow S$). In den anderen drei Fällen ändert sich die Lage auf der dyn. L-korr. FRET-Linie nicht (D). Zusätzlich sind die Fluoreszenzlebensdauern des jeweiligen Grenzzustandes angegeben. Es konnte gezeigt werden, dass sich im Falle von Intra-Domänen-FRET (S27C-S72C und T33C-V69C) sich die Fluoreszenzlebensdauer bei Bindung von Sdt verkürzt. Dies lässt auf eine Verschiebung des Gleichgewichtes hin zum kompakteren L27-Konformer schließen. In den Inter-Domänen-FRET-Varianten zwischen der Helix 1 und Helix 2 der L27- und der PDZ-Domäne verschiebt sich das Gleichgewicht bei der Bindung von Sdt in Richtung des statischen Grenzzustandes mit der längeren Fluoreszenzlebensdauer. Bindet Sdt an Inter-Domänen-FRET-Varianten, die zwischen der zweiten und dritten Helix der L27-Domäne und der PDZ-Domäne (S44C-S72C, S44C-S115C, V69C-S72C) liegen, so ändert sich die Lage der dynamischen FRET-Population nicht. Je größer der Abstand der Farbstoffankerpositionen innerhalb der Primärsequenz zueinander ist, desto mehr verschiebt sich das Gleichgewicht der Populationen bei Sdt-Bindung in Richtung des Grenzzustandes mit der längeren Fluoreszenzlebensdauern. Dies bestätigt die Aussage, dass Helix 1 und Helix 2 in der L27-Domäne ohne Bindungspartner am beweglichsten sind, während die PDZ-Domäne relativ starr und strukturiert vorliegt..

5.3.3.4 Strukturmodelle von DLin-7 im gebundenen und ungebundenen Zustand

Die Fluoreszenzlebenszeiten der Grenzzustände in ns aus 5.3.2.7.4 (siehe Tab. 35) wurden gemäß ihrer Amplitude in den Einzelmolekülmessungen zugeordnet. Dabei wurde zwischen Haupt- (H), Neben- (N) und gebundener Zustand (G) unterschieden (siehe Abb. 68). Die Natur des Zustandes mit großem F_D/F_A war zuerst unklar und wird später diskutiert.

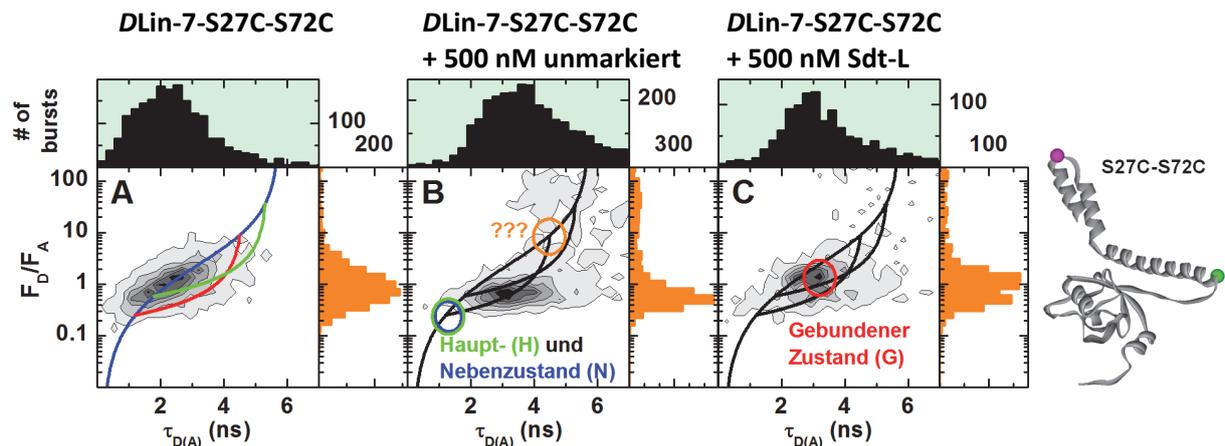


Abb. 68 Haupt-, Neben- und gebundener Zustand: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung von DLin-7-S27C-S72C (A, B und C aus Abb. 51). Zusätzlich sind in (B) der Hauptzustand H (Grün) und der Nebenzustand N (Blau) und in (C) der gebundene Zustand G (Rot) eingezeichnet.

Die Identifizierung des Komplexzustandes erfolgte aufgrund der beobachteten Verschiebung bei Sdt-L-Zugabe. Lag die Population nach der Verschiebung auf der statischen L-korr. FRET-Linie, so wurde die Fluoreszenzlebensdauer an dieser Position gewählt. Verschob sich die Population dagegen auf der dyn. L-korr. FRET-Linie wurde die Fluoreszenzlebensdauer des am naheliegendsten Grenzzustandes, der von beiden dyn. L-korr. FRET-Linien möglich war, gewählt. Die Berechnung der experimentellen Abstände (R_{Exp}) für die drei Zustände (Haupt-, Neben- und gebundener Zustand) erfolgte nach Gleichung 2-6 mit $R_0 = 57 \text{ \AA}$ und $\tau_0 = 5.7 \text{ ns}$. Sie ist in Tab. 37 zusammengefasst.

		Hauptzustand H			Nebenzustand N			Gebundener Zustand G		
		Chi2r = 1.23			Chi2r = 2.42			Chi2r = 1.33		
DLin-7-Variante		τ_H	R_{Exp}	R_{Modell}	τ_N	R_{Exp}	R_{Modell}	τ_G	R_{Exp}	R_{Modell}
Intra-Domänen-FRET	S27C-S72C	1.8	50	58	1.8	50	57	2.8	57	59
	T33C-V69C	0.8	42	46	0.8	42	45	1.8	50	47
	S44C-S72C	1.4	47	50	1.4	47	51	1.4	47	49
Inter-Domänen-FRET	S27C-S115C	4.5	71	58	1.0	44	54	4.5	71	63
	S27C-A163C	4.8	75	57	1.7	49	47	4.8	75	57
	T33C-K98C	4.1	67	61	1.4	47	56	4.1	67	63
	S44C-S115C	0.6	40	51	4.6	72	54	0.6	40	53
	V69C-K98C	3.5	62	57	1.2	46	56	4.7	74	57
	S72C-A163C	1.7	49	45	5.4	92	46	1.2	46	46

Tab. 37 Parameter der Haupt-, Neben- und gebundenen Zustände: Die DLin-7-Varianten sind nach Intra- und Inter-Domänen-FRET sortiert, wovon jede einen Haupt-, Neben- und den gebundenen Zustand besitzt. Zusätzlich sind für die verschiedenen Zustände die Fluoreszenzlebensdauern in ns und die beiden Abstände R_{Exp} und R_{Modell} (experimentell und aus dem Modell bestimmt) in \AA angegeben.

Um Strukturmodelle zu generieren, die im Einklang mit den beobachteten Abständen stehen, wurden die Torsionswinkel der folgenden Aminosäuren 27-32, 43-45, 74-82, 172-177 und 183-190 zufällig, innerhalb der für Peptidbindung erlaubten Winkel (Ramachandran-Diagramm), variiert (Abb. 69 A).

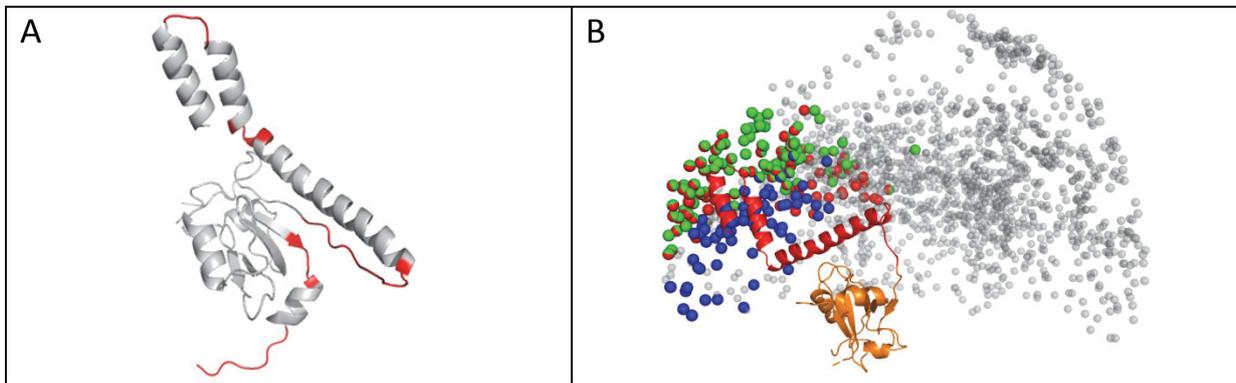


Abb. 69 Strukturmodelle von *DLin-7*: (A) Die Torsionswinkel der rot eingefärbten Aminosäuren wurden geändert. (B) Die Abtastung des Konformationsraumes durch das C α -Atom der Aminosäure 28 ist in Form von grauen Kugeln dargestellt (1610 Probestrukturen). Die farbigen Kugeln stellen die Konformationen dar, die im Einklang mit den experimentellen Daten stehen: 120 grüne (Hauptzustand), 67 blaue (Nebenzustand) und 110 rote Strukturen (gebundener Zustand).

Anschließend wurden diese mit den experimentellen Daten der Haupt-, Neben- und gebundenen Zustände aus Tab. 37 mittels FPS (FRET positioning system) (Kalinin et al. 2012) nach Modellgüte gefiltert. Die Modellgüte beschreibt dabei, wie gut die experimentellen Daten mit den berechneten Modellen übereinstimmen. Dabei wurde eine Unsicherheit in der Bestimmung des Abstandes von 15 % angenommen. Die Abb. 70 zeigt die Ergebnisse der FRET-Strukturmodelle (FSM). Die L27-Domänen sind dabei unterschiedlich eingefärbt: Hauptzustand (Grün), Nebenzustand (Blau) und Komplexzustand (Rot). Die PDZ-Domäne ist in allen drei Fällen Orange dargestellt. Zusätzlich ist das Homologiemodell aus 2.6 (grau-weiß) abgebildet, wobei die PDZ-Domäne des Homologiemodells auf die PDZ-Domäne der FRET-Strukturmodelle ausgerichtet wurde.

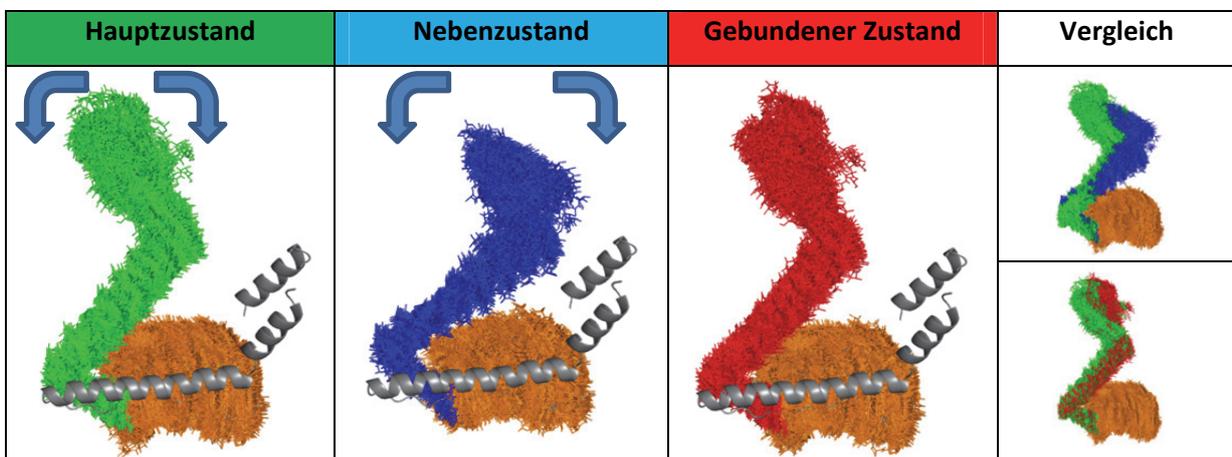


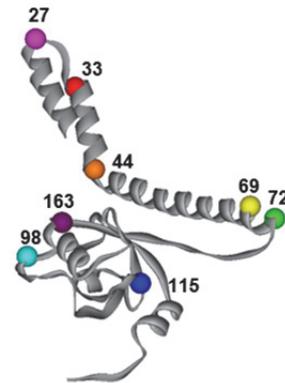
Abb. 70 Alignment der verschiedenen Zustände mit dem Homologiemodell: Die L27-Domäne sind in Grün (Hauptzustand), Blau (Nebenzustand) und in Rot (gebundener Zustand) und die PDZ-Domäne in Orange eingefärbt. Die L27-Domäne des *DLin7*-Homologiemodells ist in Grau dargestellt. Die PDZ-Domänen der beiden Modelle sind jeweils zueinander ausgerichtet worden. Die blauen Pfeile deuten die Richtung der möglichen Bewegung der L27-Domäne an. Vergleichend wurden Haupt- und Nebenzustand sowie Haupt- und gebundener Zustand übereinander gelegt.

Der Hauptzustand und der gebundene Zustand ähneln sich am stärksten, während der Nebenzustand die größte Übereinstimmung mit dem Homologiemodell besitzt. Die Stellungen bzw. Positionen der einzelnen Helices unter-einander können im Allgemeinen leicht abweichen, da während der Simulation davon ausgegangen wird, dass sich die Helices wie starre Körper verhalten, wodurch keine Verkrümmung möglich ist.

Hauptzustand		L27-Domäne		PDZ-Domäne		
		69	72	98	115	163
L27-Domäne	27		8		-13	-18
	33	4		-6		
	44		3		11	
	69			-5		
	72					-4

Nebenzustand		L27-Domäne		PDZ-Domäne		
		69	72	98	115	163
L27-Domäne	27		7		10	-2
	33	3		9		
	44		4		-18	
	69			10		
	72					-46

Gebundener Zustand		L27-Domäne		PDZ-Domäne		
		69	72	98	115	163
L27-Domäne	27		2		-8	-18
	33	-3		-4		
	44		2		13	
	69			-17		
	72					0



Tab. 38 Vergleich der Abstände in Å zwischen den experimentellen und den Modellradien: Die Differenzen zwischen den verschiedenen Positionen (Grau) wurden jeweils für den Haupt-, Neben- und den gebundenen Zustand berechnet und farblich markiert (Differenz kleiner Fünf = Grün, Fünf – Zwölf = Gelb, größer Zwölf = Rot). Das Homologiemodell mit seinen gesamten Mutationspositionen ist zusätzlich dargestellt.

In Tab. 38 wurde die Differenz zwischen den experimentellen und den Modellradien für jede Doppelvariante in Å aufgetragen. Differenzen kleiner Fünf wurden Grün, zwischen Fünf und Zwölf Gelb und größer als Zwölf Rot eingefärbt. Für den gebundenen Zustand ist die Übereinstimmung zwischen dem Struktur- und dem Homologiemodell am größten. Ein möglicher Fehler der Simulation liegt darin begründet, dass bevorzugt offene Konformere generiert werden. Im *DLin-7*-Fall stimmen die Simulationsergebnisse mit den Messergebnissen allerdings sehr gut überein.

Für die Analyse des Zustandes mit großem F_D/F_A , wurde folgende Hypothese aufgestellt: Für den Intra-Domänen-FRET, der nur innerhalb der L27-Domäne stattfindet, gibt es noch einen weiteren vierten, ungefalteten Zustand U, der in Abb. 71 Orange markiert ist. In Inter-Domänen-FRET-Messungen tritt dieser Zustand auch auf, ist allerdings nicht bzw. nur als Donor only sichtbar.

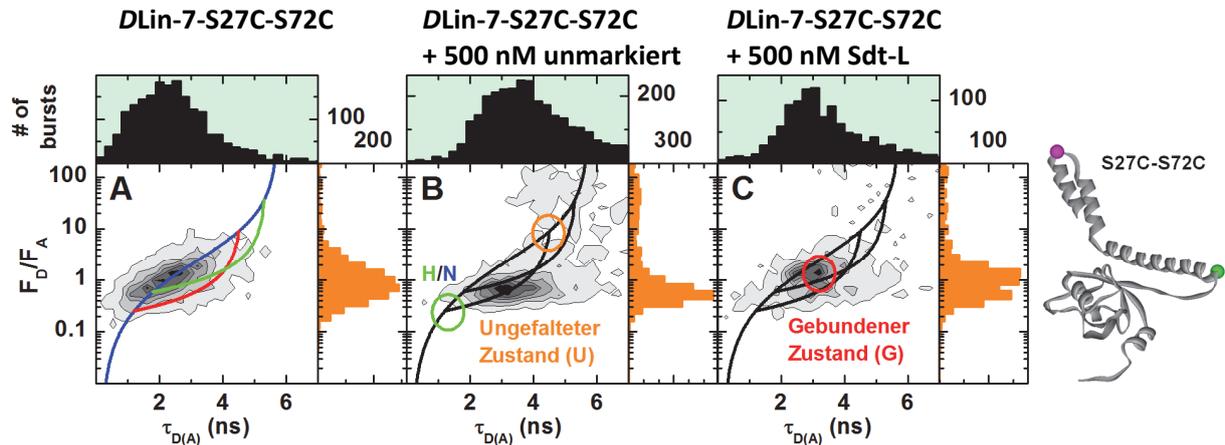


Abb. 71 Vierter ungefalteter Zustand bei der L27-Domäne: F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$ Auftragung von *DLin-7-S27C-S72C* (A, B, C aus Abb. 51). Zusätzlich sind in (B) der Hauptzustand H (Grün), der Nebenzustand N (Blau), der ungefaltete Zustand U (Orange) und in (C) der gebundene Zustand G (Rot) eingezeichnet.

Für diesen Zustand wurden ebenfalls Strukturmodelle berechnet und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 39 zusammengefasst. Aufgrund der großen Differenz zwischen dem Struktur- und dem Homologiemodell war es nicht möglich eine gefaltete Struktur für diesen Zustand zu simulieren. Die FRET-Daten für die L27-Domäne sind mit einem gefalteten Zustand nicht vereinbar (siehe Tab. 39 rechts). Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die L27-Domäne ohne Bindungspartner ungefaltet vorliegt (siehe schematische Darstellung in Tab. 39).

		Ungefalteter Zustand U			
		τ_U	R_{Exp}	R_{Modell}	
Intra-Domänen-FRET	<i>DLin-7</i> -S27C-S72C	5.3	88	58	
	T33C-V69C	4.1	67	46	
	S44C-S72C	5.2	84	51	

		L27-Domäne	
		U	S72C
L27-Domäne	S27C		-30
	T33C	-21	
	S44C		-33

Tab. 39 Parameter des ungefalteten Zustandes: Zu den drei *DLin-7*-Intra-Domänen-FRET-Varianten sind sowohl die Fluoreszenzlebensdauern in ns und der Abstand R_{Exp} in Å angegeben. Da es kein Modell für diesen Zustand gibt, wurde R_{Modell} aus dem Hauptzustand (Grün) verwendet und die Differenz zwischen diesem und R_{Exp} bestimmt (rechte Matrix). Der Cartoon zeigt die *DLin-7*-Struktur mit einer L27-Domäne (Blau, ungefaltet) und einer PDZ-Domäne (Rot, gefaltet).

Anschließend wurde das Strukturmodell des gebundenen Zustandes auf den *mLin-2/mLin-7*-Domänenkomplex (PDB-Eintrag 1Y74) ausgerichtet, um die gefundenen FRET-basierten *DLin-7*-Modelle mit anderen L27-Domänenkomplexen zu vergleichen. Abb. 72 zeigt das Tetramer dieses Alignments. Es konnte somit gezeigt werden, dass das berechnete Strukturmodell keine sterischen Hinderungen beinhaltet und dass durch die Ausrichtung der L27- und der PDZ-Domänen die beiden Monomere jeweils übereinander zu liegen kommen. Damit ist es möglich, dass diese sich zum einen gegenseitig stabilisieren und zum anderen genügend Raum geben, um weitere Interaktionen eingehen zu können.

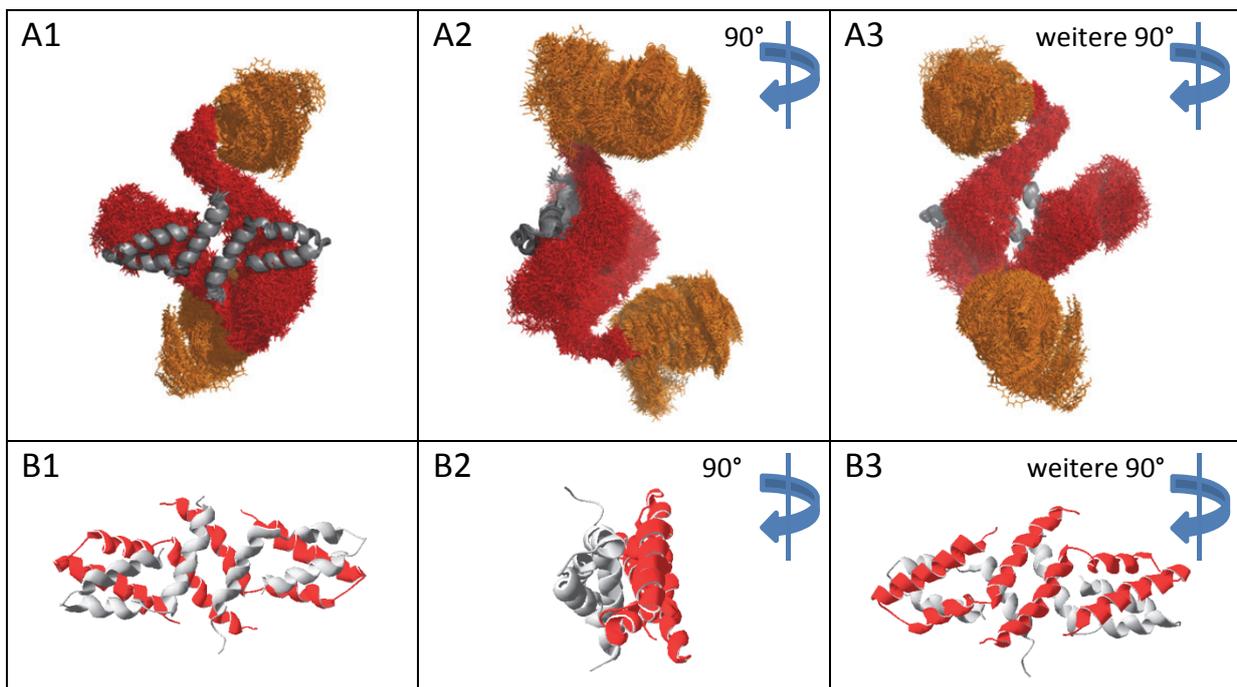


Abb. 72 Alignment zwischen Strukturmodell und dem *mLin-2/mLin-7*-Domänenkomplex (1Y74): In A1 – A3 wurde das Strukturmodell des gebundenen Zustandes auf den Domänenkomplex ausgerichtet. Dabei erfolgte von A1 nach A2 und von A2 nach A3 eine Drehung des Alignments um 90° im Uhrzeigersinn. B1 – B3 stellt nur den Domänenkomplex mit *mLin-2* in Grau und *mLin-7* in Rot mit analoger Drehung dar.

Die gewonnenen Ergebnisse, die durch die Messdaten und die Strukturmodelle generiert wurden, werden im folgenden Schema mit insgesamt vier Zuständen zusammengefasst (Abb. 73). Die fFCS-Ergebnisse aus Abschnitt 5.3.2.5.5 zeigen, dass das Gleichgewicht von H zu N schnell (μ s-Zeitbereich) sein muss, hingegen das Gleichgewicht [H/N] zu U deutlich langsamer (ms-Zeitbereich) ist.

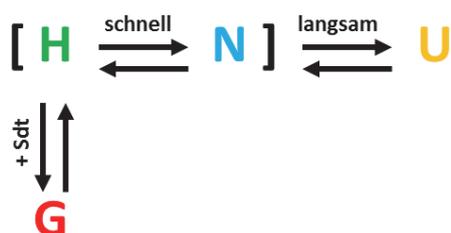


Abb. 73 Bindungs- und Faltungsgleichgewicht mit seinen Komponenten: Hauptzustand (H), Nebenzustand (N), ungefalteter Zustand (U) und gebundener Zustand (G).

DLin-7 zeigt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen verschiedenen strukturellen Zuständen. Der Charakter des Zustandes reicht von statischer zur dynamischen Unordnung (disorder) und von segmentaler zur vollen Unordnung. Dieses Phänomen wurde als 'Unschärfe' (fuzziness) definiert (Tompä et al. 2008). metaPrDOS ist ein Webinterface, das ungeordnete Bereiche von Aminosäuresequenzen nicht direkt vorhersagt, sondern prognostiziert die ungeordneten Bereiche durch die Integration der Ergebnisse aus acht verschiedenen Vorhersage-Systemen (Ishida et al. 2008). Das metaPrDOS-Ergebnis zeigt für *DLin-7* sowohl geordnete als auch ungeordnete Bereiche (Abb. 74). Die Vorhersage suggeriert intermediates Verhalten: *DLin-7* ist weder vollkommen gefaltet noch ungefaltet, sondern die Struktur ist flexible mit einer Tendenz zu gefalteten Zuständen. Dieses Ergebnis spiegelt das aufgestellte Bindungs- und Faltungsgleichgewicht wieder.

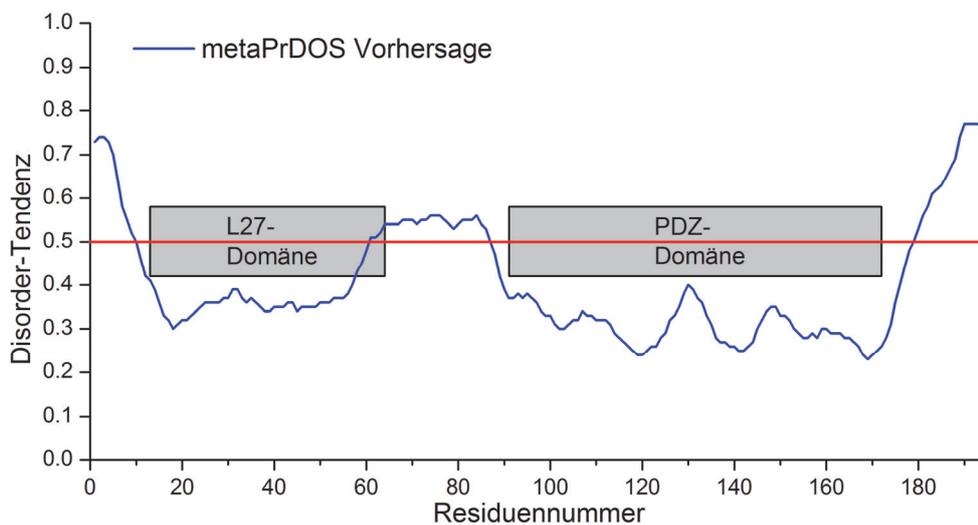


Abb. 74 metaPrDOS Vorhersage: Aufgetragen wurde die Disorder-Tendenz gegen die Residuenummer. *DLin-7* zeigt Bereiche auf, die eine Tendenz besitzen sowohl geordnet als auch ungeordnet zu sein.

Bemerkenswert ist ebenso die Übereinstimmung, dass der ungefaltete Zustand U die geringer populierte Spezies darstellt (siehe Abb. 71 B). Die Existenz von ungefalteten Zuständen erklärt die enormen experimentellen Schwierigkeiten bei der Handhabung von *DLin-7*. Es ist bekannt, dass die transiente Population von ungefalteten Zuständen zu Aggregationen führt (Neudecker et al. 2012).

DLin-7 ist ein Musterbeispiel dafür, wie Konformere eines Proteins durch ihren Bindungspartner beeinflusst werden können. Dieser allosterischer Effekt ist ein wichtiger Aspekt für die Bildung lokaler Komplexe mit Gerüstproteinen, die essentiell für die Zellpolarität in der Embryonalentwicklung sind.

6 Zusammenfassung

Die Zelldifferenzierung wird am häufigsten durch Multiproteinkomplexe reguliert, wobei die räumliche Nähe der Komponenten die biologische Funktion ermöglicht. Es gibt ein großes Interesse an der Isolierung der einzelnen beteiligten Komponenten sowie an der Bestimmung, wie ihre Interaktion die Differenzierung reguliert. Die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion ermöglicht heutzutage die direkte Beobachtung molekularer Prozesse auf Einzelmolekülebene.

6.1 Molekularbiologische Aspekte

Unter molekular- und proteinbiologischen Gesichtspunkten stellte sich die Handhabung von *DLin-7* aufgrund von Aggregatbildung als schwierig heraus. Im ersten Schritt wurde das Protein unter nativen Bedingungen aufgereinigt und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, Einzelmolekülmessungen durchgeführt und erste Ergebnisse gewonnen (siehe 5.1). Die Vermeidung von Aggregatbildung konnte durch verschiedene Löslichkeitstags nicht verhindert werden (siehe 5.2). Unter denaturierenden Bedingungen gelang es schließlich, sowohl *DLin-7* verbessert aufzureinigen als auch den Markierungsgrad deutlich zu erhöhen. Durch Variation der Farbstoffmoleküle, die Variation der Anregungsleistung und durch Zugabe von Trolox konnte die Qualität der Einzelmolekülmessung gesteigert werden (siehe 5.3). Es gelang somit die erfolgreiche Etablierung der *DLin-7*-Handhabung.

6.2 Ergebnisse der C-terminalen Poly-Histidin-Tag-Varianten

In dieser Arbeit wurde die Sdt / *DLin-7* Interaktion untersucht. In Einzelmolekülexperimenten zeigte das *DLin-7*-Protein zwei Konformationszustände. Gemäß einem strukturellen Homologiemodell wurde ein Zustand als gefaltet und der andere als entfalteter Zustand definiert. Die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA) zeigte, dass die Abstandsverteilung der beiden Konformationen breiter als der Grenzwert des experimentellen shot-noise war. Die Umwandlung zwischen den beiden Zuständen liegt im Bereich von wenigen Millisekunden. Es wurde die Frage untersucht, ob dieser molekularbiologisch flexible Bindungsprozess möglich ist. Die Zugabe des Bindungspartners Sdt führte zu einer Verbreiterung der beobachteten Förster-Resonanz-Energietransfer-(FRET)-Effizienzverteilung. Die Analyse mittels PDA mit einem dynamischen Zweizustandsmodell zeigte einen Anstieg bei der Faltungsrate von *DLin-7*. Dieser kinetische Effekt lässt vermuten, dass die Bindereaktion über einen induzierten Fit (induced fit) Mechanismus und nicht über ein Schlüssel-Schloss-System verläuft, d.h. Bindung und die Konformationsfaltung sind gekoppelt. Die gewonnenen Ergebnisse unter nativen Bedingungen zeigten bereits eine erste Tendenz für das System. Aufgrund der Aggregationsprobleme und dem geringen Markierungsgrad der Proben war es nötig die Ergebnisse durch Aufreinigung und Farbstoffmarkierung unter denaturierenden Bedingungen zu validieren.

6.3 Bindungsverhalten mit Sdt-L (C- und N-terminalen Poly-Histidin-Tag-Varianten)

Die Sdt-L-Titrations beider Poly-Histidin-Tag-Varianten waren reproduzierbar. Durch das Bindungsverhalten konnte die Funktionsfähigkeit aller beteiligten Moleküle nachgewiesen werden. Dies war ein kritischer Punkt: Bei der nativen Farbstoffmarkierung war die Handhabung aufgrund der Aggregatbildung von *D*Lin-7 das größte Problem. Unter denaturierender Farbstoffmarkierung bestand die Gefahr, die Funktionsfähigkeit bei der Rückfaltung in den nativen Puffer durch Dialyse zu verlieren, was allerdings durch die Titration erfolgreich widerlegt werden konnte.

Die jeweiligen Komplexdissoziationskonstanten lagen im Bereich von $K_D = 150 \pm 60$ nM bzw. 59 ± 10 nM. Die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten sind durch die Absorptionsprobleme während der verschiedenen Messungen zu erklären. Die Titration selbst ist komplex, weil die Zugabe von Sdt-L die *D*Lin-7-Dynamik beeinflusst. Das Bindungsverhalten von *D*Lin-7 und Sdt-L lässt sich durch das Prinzip „Faltung durch Bindung“ besser verstehen (Tompa et al. 2008):



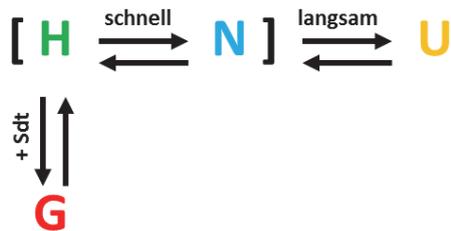
Die Interpretation der Daten war durch die Überlagerung von Bindung und Faltung schwierig. Allerdings liefern beide *D*Lin-7-Varianten (C- und N-terminalen Poly-Histidin-Tag) die gleichen Ergebnisse und somit bestätigen sich die Einzelmolekül- und Titrationsergebnisse gegenseitig.

6.4 Ergebnisse der N-terminalen Poly-Histidin-Tag-Varianten

Es konnte gezeigt werden, dass sich im Falle von Intra-Domänen-FRET (S27C-S72C und T33C-V69C) sich die Fluoreszenzlebensdauer bei Bindung von Sdt verkürzt. Dies lässt auf eine Verschiebung des Gleichgewichtes hin zum kompakteren L27-Konformer schließen. In den Inter-Domänen-FRET-Varianten zwischen der Helix 1 und Helix 2 der L27- und der PDZ-Domäne verschiebt sich das Gleichgewicht bei der Bindung von Sdt in Richtung des statischen Grenzzustandes mit der längeren Fluoreszenzlebensdauer. Bindet Sdt an Inter-Domänen-FRET-Varianten, die zwischen der zweiten und dritten Helix der L27-Domäne und der PDZ-Domäne (S44C-S72C, S44C-S115C, V69C-S72C) liegen, so ändert sich die Lage der dynamischen FRET-Population nicht. Je größer der Abstand der Farbstoffankerpositionen innerhalb der Primärsequenz zueinander ist, desto mehr verschiebt sich das Gleichgewicht der Populationen bei Sdt-Bindung in Richtung des Grenzzustandes mit der längeren Fluoreszenzlebensdauern. Dies bestätigt die Aussage, dass Helix 1 und Helix 2 in der L27-Domäne ohne Bindungspartner am beweglichsten sind, während die PDZ-Domäne relativ starr und strukturiert vorliegt.

6.5 Vergleich der Ergebnisse mit dem Homologiemodell

Mit Hilfe der mittels FPS generierten Strukturmodelle konnten die Einzelmolekülergebnisse und das *DLin-7*-Homologiemodell gegenüber gestellt werden. Das Strukturmodell des Hauptzustandes entspricht dem Strukturmodell des gebundenen Zustandes, während das Strukturmodell des Nebenzustandes dem Homologiemodell am ähnlichsten ist. Mit diesem Ergebnis konnte abschließend bestätigt werden, dass *DLin-7* in unterschiedlichen Konformationen, in einem gefalteten und in einem ungefalteten Zustand (**U**), vorliegt. Der gefaltete Zustand wird dabei in den Haupt- (**H**) und Nebenzustand (**N**) unterteilt. Bei Zugabe des spezifischen Bindungspartners Sdt verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des gebundenen Zustandes (**G**), der im Vergleich zu (**H**) eine leicht geänderte Struktur aufweist. Alle Zustände konnten durch die verwendeten Methoden (Sdt-Titration, Einzelmoleküldaten, berechnete Abstände, Homologie- und Strukturmodelle) übereinstimmend bestätigt werden. Folgendes Bindungs- und Faltungsgleichgewicht wurde zusammenfassend für das untersuchte System aufgestellt und bestätigt. Das Gleichgewicht von **H** zu **N** ist schnell (μs Zeitbereich), hingegen das Gleichgewicht [**H/N**] zu **U** deutlich langsamer (ms-Zeitbereich):



DLin-7 ist somit ein Musterbeispiel dafür, wie Konformere eines Proteins durch ihren Bindungspartner beeinflusst werden können. Dieser allosterische Effekt ist ein wichtiger Aspekt für die Bildung lokaler Komplexe mit Gerüstproteinen, die essentiell für die Zellpolarität in der Embryonalentwicklung sind.

7 Summary

Cellular differentiation is frequently regulated by multiprotein complexes whereas the spatial proximity of the components facilitates their biological function. There is an immense interest in isolating the individual components involved as well as determining how their interaction regulates differentiation. Multiparameter fluorescence detection nowadays allows direct observation of molecular processes at the single-molecule level.

7.1 Molecular and biological aspects

Under molecular and protein biological point of view the handling of *DLin-7* was difficult due to aggregation. In the first step, the protein was purified under native conditions and labeled with fluorescent dyes, single-molecule-measurements were performed and first results were obtained (see 5.1). Aggregate formation could not be prevented (see 5.2) by various solubility tags. Finally, under denaturing conditions, it was possible to purify *DLin-7* and as a result the degree of labeling was increased. By using different dye molecules, variation of the excitation power and by addition of trolox, the quality of the single-molecule measurements could be increased (see 5.3) resulting in the successful establishment of *DLin-7*-handling.

7.2 Results of the C-terminal poly-histidine-tag-variants

In this work, the Sdt / *DLin-7* interaction was investigated. In single-molecule experiments, the *DLin-7* protein showed two conformational states. According to a structural homology model one of these states was identified as folded- and the other as unfolded-state. The probability distribution analysis (PDA) revealed that the distribution of the distance between two conformations was wider than the limit of the experimental shot noise. The transformation between two states was slow and in the range of a few milliseconds. It was investigated whether this molecular biological flexible bonding process is possible. The addition of the binding partner Sdt results in a broadening of the observed Förster-resonance-energy transfer-(FRET)-efficiency distribution. The PDA analysis with a dynamic two-state model showed an increase in the rate of folding *DLin-7*. This kinetic effect suggests that the binding reaction is described by an induced fit mechanism, and not as a key-lock principle, i.e. binding and conformational folding is coupled. The results obtained under native conditions already showed a first tendency for the system. Due to aggregation problems and the low degree of labeling of the samples, it was necessary to validate the results by purification and dye labeling under denaturing conditions.

7.3 Binding behavior with Sdt-L (C- and N-terminal poly-histidine-tag-variants)

The Sdt titrations of both poly-histidine-tag-variants were reproducible. The functionality of all involved molecules was confirmed using the binding behavior. Due to aggregation the handling of *DLin-7* was the biggest problem during the labeling under native conditions. The dye labeling under denaturing conditions is critical due to a possible loss of functionality during refolding into the native buffer by dialysis. However, it was successfully refuted by the titration. The respective complex dissociation constant was in the range of $K_D = 150 \pm 60$ nM to 59 ± 10 nM. The variance of dissociation constants can be explained by the absorption problems during the different measurements. The titration itself is complex, because the addition of Sdt-L influences the *DLin-7*-dynamics. The binding behavior of *DLin-7* and Sdt-L can be explained by the principle of "folding by binding" (Tomba et al. 2008)



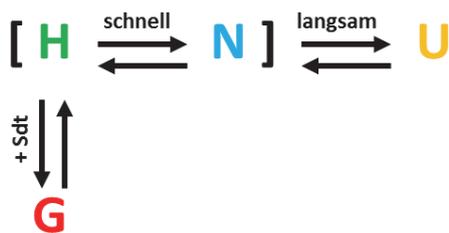
The interpretation of the data was difficult because of the superposition of binding and folding. However, both *DLin-7* variants (C- and N-terminal poly-histidine tag) give the same results and thus the single-molecule and titration results confirm each other.

7.4 Results of the N-terminal poly-histidine-tag-variants

It was shown that in the case of intra-domain-FRET (S27C-S72C and T33C-V69C) that the binding of Sdt shortens the fluorescence lifetime of the donor-dyes. This suggests a shift of the equilibrium towards a compact L27-conformer. In the inter-domain FRET variants a shift towards static states with longer fluorescence lifetime is observed. Binding of Sdt to Inter-domain-FRET-variations between the second and third helix of the L27-domain and the PDZ-domain (S44C-S72C, S44C-S115C, and S72C-V69C) does not change the position of the dynamic the FRET-population. The longer the distance between of the dye positions in the primary-sequence the more pronounced the equilibrium population is shifted upon Sdt-binding towards the state with the longer fluorescence lifetime. This confirms that helix 1 and helix 2 in the L27 domain without binding partner are very flexible while the PDZ-domain is relatively rigid and structured.

7.5 Comparison of the results with the homology model

With the help of structural models generated by the FPS the single-molecule results and the *DLin-7* homology model could be compared. The structural model of the main-state corresponds to the structural model of the bound-state, while the structural model of the sub-state is most similar to the homology model. This result finally confirms that *DLin-7* is present in various conformations, in a folded- and an unfolded-state (**U**). The folded state is divided into the main- (**H**) and the minor-state (**N**). In addition, the specific binding partner Sdt shifts the equilibrium toward a bound-state (**G**), which has a slightly different structure compared to (**H**). All states were confirmed by the used methods (Sdt-titration, single molecule data, calculated distances, homology and structural models). Conclusive the following binding- and folding-equilibrium is postulated and confirmed experimentally. The balance of **H** to **N** is fast (μs time range), while the equilibrium [**H/N**] to **U** is significantly slower (millisecond time range):



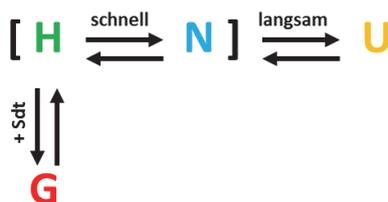
Thus, *DLin-7* is a prime example of how the conformers of a protein can be influenced by their binding partners. This allosteric effect is an important aspect for the formation of local complexes with scaffold-proteins that are essential for cell polarity in embryonic development.

8 Zusammenfassung (einseitig)

Die Zelldifferenzierung wird am häufigsten durch Multiproteinkomplexe reguliert, wobei die räumliche Nähe der Komponenten die biologische Funktion ermöglicht. Es gibt ein großes Interesse an der Isolierung der einzelnen beteiligten Komponenten sowie an der Bestimmung, wie ihre Interaktion die Differenzierung reguliert. Die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion ermöglicht heutzutage die direkte Beobachtung molekularer Prozesse auf Einzelmolekülebene.

In *Drosophila melanogaster* befindet sich der untersuchte Komplex in der subapikalen Region (SAR) von embryonalen Epithelien und besteht aus den vier Proteinen DPATJ, DLin-7, Stardust (Sdt) und Crumbs (Crb). Das Gerüstprotein Sdt enthält zwei aufeinander folgende L27-Domänen, die die Interaktion mit DPATJ und DLin-7 durch ihre L27-Domänen vermitteln. Das Transmembranprotein Crb bindet an die PDZ-Domäne von Sdt mit seinem zytoplasmatischem Ende.

In dieser Arbeit wurde die Sdt / DLin-7 Interaktion untersucht. DLin-7 wurde zuerst nativ aufgereinigt und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Vermeidung von Aggregatbildung konnte durch verschiedene Löslichkeitstags nicht verhindert werden. Unter denaturierenden Bedingungen gelang es schließlich, sowohl DLin-7 verbessert aufzureinigen als auch den Markierungsgrad deutlich zu erhöhen, wodurch die Qualität der Einzelmolekülmessung gesteigert werden konnte. Die Ergebnisse von Einzelmolekülexperimenten zeigten, dass das DLin-7-Protein in unterschiedlichen Konformationen, in einem gefalteten und in einem ungefalteten Zustand (U), vorliegt. Der gefaltete Zustand wird dabei in den Haupt- (H) und Nebenzustand (N) unterteilt. Bei Zugabe des spezifischen Bindungspartners Sdt verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des gebundenen Zustandes (G), der im Vergleich zu (H) eine leicht geänderte Struktur aufweist. Alle Zustände konnten durch die verwendeten Methoden (Sdt-Titration, Einzelmoleküldaten, berechnete Abstände, Homologie- und Strukturmodelle) übereinstimmend bestätigt werden. Folgendes Bindungs- und Faltungsgleichgewicht wurde zusammenfassend für das untersuchte System etabliert. Das Gleichgewicht von H zu N ist schnell (μs Zeitbereich), hingegen das Gleichgewicht [H/N] zu U deutlich langsamer (ms-Zeitbereich):



DLin-7 ist somit ein Musterbeispiel dafür, wie Konformere eines Proteins durch ihren Bindungspartner beeinflusst werden können. Dieser allosterische Effekt ist ein wichtiger Aspekt für die Bildung lokaler Komplexe mit Gerüstproteinen, die essentiell für die Zellpolarität in der Embryonalentwicklung sind.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen ein Dankeschön aussprechen, die mich im Laufe der letzten Jahre begleitet haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Claus Seidel für die Betreuung, zahlreichen Diskussionen und für die Motivation dieses Dissertation erfolgreich abzuschließen

Prof. Dr. Elisabeth Knust für die Unterstützung im Rahmen der Zusammenarbeit im Sonderforschungsbereich SFB 590

Dr. Suren Felekyan für die Hilfe bei den Einzelmolekülmessungen und der Datenanalyse

Dr. Hugo Sanabria für die Unterstützung bei diversen Diskussionen

Thomas Peulen für die eTCSPC-Messungen, Datenauswertung und den Strukturmodellen

Dr. Simon Sindbert für die AV-Simulation

Heike Hornen für die wissenschaftliche und private Unterstützung

Markus & Dr. Lydia Richert, Stephanie Grabowski, Katharina Hemmen, Dr. Ralf Kühnemuth und Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters für das Korrekturlesen dieser Dissertation

Der gesamten Seidel-Arbeitsgruppe für den Zusammenhalt und dem guten Arbeitsklima

Prof. Dr. Georg Groth für das Zweitgutachten

Meinen Eltern sowie meiner Schwester für den familiären Rückhalt

Meiner besseren Hälfte und engen Freunden für die Unterstützung in allen Lebenslagen

10 Literaturverzeichnis

- Antonik, M., S. Felekyan, et al. (2006). "Separating Structural Heterogeneities from Stochastic Variations in Fluorescence Resonance Energy Transfer Distributions via Photon Distribution Analysis." J. Phys. Chem. B **110**(13): 6970-6978.
- Antonik, M., S. Felekyan, et al. (2006). "Separating Structural Heterogeneities from Stochastic Variations in Fluorescence Resonance Energy Transfer Distributions via Photon Distribution Analysis." The Journal of Physical Chemistry B **110**(13): 6970-6978.
- Assémat, E., E. Bazellères, et al. (2008). "Polarity complex proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1778**(3): 614-630.
- Bachmann, A., F. Grawe, et al. (2008). "Drosophila Lin-7 is a component of the Crumbs complex in epithelia and photoreceptor cells and prevents light-induced retinal degeneration." European Journal of Cell Biology **87**(3): 123-136.
- Bachmann, A., M. Schneider, et al. (2001). "Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity." Nature **414**(6864): 638-643.
- Bachmann, A., M. Timmer, et al. (2004). "Cell type-specific recruitment of Drosophila Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97." Journal of Cell Science **117**(10): 1899-1909.
- Berger, S. (2001). Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie. Spektroskopie und photochemische Kinetik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie. Göttingen, Georg-August-Universität Dissertation.
- Berger, S., N. A. Bulgakova, et al. (2007). "Unraveling the Genetic Complexity of Drosophila stardust During Photoreceptor Morphogenesis and Prevention of Light-Induced Degeneration." Genetics **176**(4): 2189-2200.
- Bhat, M. A., S. Izaddoost, et al. (1999). "Discs Lost, a Novel Multi-PDZ Domain Protein, Establishes and Maintains Epithelial Polarity." Cell **96**(6): 833-845.
- Bimboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Research **7**(6): 1513-1523.
- Bohmer, M., F. Pampaloni, et al. (2001). "Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection." Review of Scientific Instruments **72**(11): 4145-4152.
- Borg, J.-P., S. W. Straight, et al. (1998). "Identification of an Evolutionarily Conserved Heterotrimeric Protein Complex Involved in Protein Targeting." Journal of Biological Chemistry **273**(48): 31633-31636.
- Bulgakova, N. A., Ö. Kempkens, et al. (2008). "Multiple domains of Stardust differentially mediate localisation of the Crumbs-Stardust complex during photoreceptor development in Drosophila." Journal of Cell Science **121**(12): 2018-2026.
- Butz, S., M. Okamoto, et al. (1998). "A Tripartite Protein Complex with the Potential to Couple Synaptic Vesicle Exocytosis to Cell Adhesion in Brain." Cell **94**(6): 773-782.
- Chelur, D., O. Unal, et al. (2008). "Fusion Tags for Protein Expression and Purification." BioPharm International.
- Cheong, R. and A. Levchenko (2008). "Wires in the soup: quantitative models of cell signaling." Trends in Cell Biology **18**(3): 112-118.
- Doerks, T., P. Bork, et al. (2000). "L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7." Trends in Biochemical Sciences **25**: 317-318.
- Eggeling, C., J. Schaffer, et al. (2001). "Homogeneity, Transport, and Signal Properties of Single Ag Particles Studied by Single-Molecule Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering." The Journal of Physical Chemistry A **105**(15): 3673-3679.
- Ehrenberg, M. and R. Rigler (1974). "Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations." Chemical Physics **4**(3): 390-401.

- Enderlein, J. and I. Gregor (2005). "Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy." Review of Scientific Instruments **76**(3): 033102-033102-033105.
- Fallert-Müller, A., 2004 (2004). Lexikon der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Felekyan, S., H. Sanabria, et al. (2013). Chapter Two - Analyzing Förster Resonance Energy Transfer with Fluctuation Algorithms. Methods in Enzymology. Y. T. Sergey, Academic Press. **Volume 519**: 39-85.
- Feng, W., J.-F. Long, et al. (2004). "The tetrameric L27 domain complex as an organization platform for supramolecular assemblies." Nat Struct Mol Biol **11**(5): 475-480.
- Feng, W., J.-f. Long, et al. (2005). "A unified assembly mode revealed by the structures of tetrameric L27 domain complexes formed by mLin-2/mLin-7 and Patj/Pals1 scaffold proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(19): 6861-6866.
- Funke, L., S. Dakoji, et al. (2005). "Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions." Annual Review of Biochemistry **74**(1): 219.
- Fuxreiter, M., P. Tompa, et al. (2007). "Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs." Bioinformatics **23**(8): 950-956.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, et al. (2003). "ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." Nucleic Acids Research **31**(13): 3784-3788.
- GE Healthcare (2007). Instructions PD-10 Desalting Columns
- Grünberg, R., M. Nilges, et al. (2006). "Flexibility and Conformational Entropy in Protein-Protein Binding." Structure **14**(4): 683-693.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-2723.
- Ha, T., T. Enderle, et al. (1996). "Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(13): 6264-6268.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580.
- Harris, B. Z., S. Venkatasubrahmanyam, et al. (2002). "Coordinated Folding and Association of the LIN-2, -7 (L27) Domain. AN OBLIGATE HETERODIMERIZATION MODULE INVOLVED IN ASSEMBLY OF SIGNALING AND CELL POLARITY COMPLEXES." J. Biol. Chem. **277**(38): 34902-34908.
- Harris, B. Z., S. Venkatasubrahmanyam, et al. (2002). "Coordinated Folding and Association of the LIN-2, -7 (L27) Domain: AN OBLIGATE HETERODIMERIZATION MODULE INVOLVED IN ASSEMBLY OF SIGNALING AND CELL POLARITY COMPLEXES." Journal of Biological Chemistry **277**(38): 34902-34908.
- Henzler-Wildman, K. and D. Kern (2007). "Dynamic personalities of proteins." Nature **450**(7172): 964-972.
- Hong, Y., B. Stronach, et al. (2001). "Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts." Nature **414**(6864): 634-638.
- Ishida, T. and K. Kinoshita (2008). "Prediction of disordered regions in proteins based on the meta approach." Bioinformatics **24**(11): 1344-1348.
- Izaddoost, S., S.-C. Nam, et al. (2002). "Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres." Nature **416**(6877): 178-183.
- Jo, K., R. Derin, et al. (1999). "Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a Family of Mammalian LIN-7 Homologs Enriched at Brain Synapses in Association with the Postsynaptic Density-95/NMDA Receptor Postsynaptic Complex." The Journal of Neuroscience **19**(11): 4189-4199.
- Johnson, K., F. Grawe, et al. (2002). "Drosophila Crumbs Is Required to Inhibit Light-Induced Photoreceptor Degeneration." Current Biology **12**(19): 1675-1680.

- Joo, C., S. A. McKinney, et al. (2006). "Real-Time Observation of RecA Filament Dynamics with Single Monomer Resolution." Cell **126**(3): 515-527.
- Kaech, S. M., C. W. Whitfield, et al. (1998). "The LIN-2/LIN-7/LIN-10 Complex Mediates Basolateral Membrane Localization of the *C. elegans* EGF Receptor LET-23 in Vulval Epithelial Cells." Cell **94**(6): 761-771.
- Kalinin, S., S. Felekyan, et al. (2007). "Probability Distribution Analysis of Single-Molecule Fluorescence Anisotropy and Resonance Energy Transfer." The Journal of Physical Chemistry B **111**(34): 10253-10262.
- Kalinin, S., S. Felekyan, et al. (2008). "Characterizing Multiple Molecular States in Single-Molecule Multiparameter Fluorescence Detection by Probability Distribution Analysis." The Journal of Physical Chemistry B **112**(28): 8361-8374.
- Kalinin, S. and L. B. Å. Johansson (2004). "Energy Migration and Transfer Rates Are Invariant to Modeling the Fluorescence Relaxation by Discrete and Continuous Distributions of Lifetimes." The Journal of Physical Chemistry B **108**(9): 3092-3097.
- Kalinin, S., T. Peulen, et al. (2012). "A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling." Nat Meth **9**(12): 1218-1225.
- Kamberov, E., O. Makarova, et al. (2000). "Molecular Cloning and Characterization of Pals, Proteins Associated with mLin-7." Journal of Biological Chemistry **275**(15): 11425-11431.
- Kapusta, P., M. Wahl, et al. (2007). "Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy." Journal of Fluorescence **17**(1): 43-48.
- Kopp, J. and T. Schwede (2004). "The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models." Nucl. Acids Res. **32**(suppl_1): D230-234.
- Kühnemuth, R. and C. A. M. Seidel (2001). "Principles of Single Molecule Multiparameter Fluorescence Spectroscopy." Single Molecules **2**(4): 251-254.
- Lagedroste, M. (2011). Untersuchung der Dynamik und Struktur von Lin-7 aus *Drosophila melanogaster* mittels Fluoreszenzspektroskopie. Institut für Molekulare Physikalische Chemie II. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. Bachelor-Thesis.
- Lakowicz, J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Kluwer.
- Letunic, I., R. R. Copley, et al. (2004). "SMART 4.0: towards genomic data integration." Nucleic Acids Research **32**(suppl 1): D142-D144.
- Li, Y., D. Karnak, et al. (2004). "Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes." EMBO J **23**: 2723-2733.
- Lottspeich F., E. J. W. (2006). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag.
- Magde, D., E. Elson, et al. (1972). "Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy." Physical Review Letters **29**(11): 705-708.
- Makarova, O., M. H. Roh, et al. (2003). "Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1)." Gene **302**(1–2): 21-29.
- Malicki, J. and W. Driever (1999). "oko meduzy mutations affect neuronal patterning in the zebrafish retina and reveal cell-cell interactions of the retinal neuroepithelial sheet." Development **126**(6): 1235-1246.
- Margittai, M., J. Widengren, et al. (2003). "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(26): 15516-15521.
- Maus, M., M. Cotlet, et al. (2001). "An Experimental Comparison of the Maximum Likelihood Estimation and Nonlinear Least-Squares Fluorescence Lifetime Analysis of Single Molecules." Analytical Chemistry **73**(9): 2078-2086.

- McCann, J. J., L. Zheng, et al. (2012). "Supertertiary structure of the synaptic MAGuK scaffold proteins is conserved." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(39): 15775-15780.
- Mekler, V., E. Kortkhonjia, et al. (2002). "Structural Organization of Bacterial RNA Polymerase Holoenzyme and the RNA Polymerase-Promoter Open Complex." Cell **108**(5): 599-614.
- Michel, D., J.-P. Arsanto, et al. (2005). "PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells." Journal of Cell Science **118**(17): 4049-4057.
- Nakagawa, T., K. Futai, et al. (2004). "Quaternary Structure, Protein Dynamics, and Synaptic Function of SAP97 Controlled by L27 Domain Interactions." Neuron **44**(3): 453-467.
- Nam, S.-C. and K.-W. Choi (2006). "Domain-specific early and late function of Dpatj in Drosophila photoreceptor cells." Developmental Dynamics **235**(6): 1501-1507.
- Neudecker, P., P. Robustelli, et al. (2012). "Structure of an Intermediate State in Protein Folding and Aggregation." Science **336**(6079): 362-366.
- Omori, Y. and J. Malicki (2006). "oko meduzy and Related crumbs Genes Are Determinants of Apical Cell Features in the Vertebrate Embryo." Current Biology **16**(10): 945-957.
- Pellikka, M., G. Tanentzapf, et al. (2002). "Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis." Nature **416**(6877): 143-149.
- Petrosky, K. Y., H. D. Ou, et al. (2005). "A General Model for Preferential Heterooligomerization of LIN-2/7 Domains: MECHANISM UNDERLYING DIRECTED ASSEMBLY OF SUPRAMOLECULAR SIGNALING COMPLEXES." Journal of Biological Chemistry **280**(46): 38528-38536.
- Qiagen (2003). The QIAexpressionist - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.
- Radivojac, P., L. M. Iakoucheva, et al. (2007). "Intrinsic Disorder and Functional Proteomics." Biophysical journal **92**(5): 1439-1456.
- Rehm, H. (2002). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag.
- Renner, A. (2005). Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Interaktion von Dlin-7 mit Stardust Institut für Molekulare Physikalische Chemie II. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Diplom-Thesis.
- Richard, M., F. Grawe, et al. (2006). "DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the Drosophila eye." Developmental Dynamics **235**(4): 895-907.
- Richard, M., R. Roepman, et al. (2006). "Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies." Human Molecular Genetics **15**(suppl 2): R235-R243.
- Roh, M. H., S. Fan, et al. (2003). "The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells." Journal of Cell Science **116**(14): 2895-2906.
- Rohr, S., N. Bit-Avrágim, et al. (2006). "Heart and soul/PRKCi and nagie oko/Mpp5 regulate myocardial coherence and remodeling during cardiac morphogenesis." Development **133**(1): 107-115.
- Rothwell, P. J., S. Berger, et al. (2003). "Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase:primer/template complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(4): 1655-1660.
- Saiki, R., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.

- Schweinberger, E. (2002). Multidimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie von fluoreszenzmarkierten BiomolekülenSpektroskopie und photochemische Kinetik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie. Göttingen, Georg-August-Universität Dissertation.
- Simske, J. S., S. M. Kaech, et al. (1996). "LET-23 Receptor Localization by the Cell Junction Protein LIN-7 during *C. elegans* Vulval Induction." Cell **85**(2): 195-204.
- Sindbert, S., S. Kalinin, et al. (2011). "Accurate Distance Determination of Nucleic Acids via Förster Resonance Energy Transfer: Implications of Dye Linker Length and Rigidity." Journal of the American Chemical Society **133**(8): 2463-2480.
- Sisamakos, E., A. Valeri, et al. (2010). Chapter 18 - Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection. Methods in Enzymology. G. W. Nils, Academic Press. **Volume 475**: 455-514.
- Stetak, A., E. F. Hoier, et al. (2006). "Cell fate-specific regulation of EGF receptor trafficking during *Caenorhabditis elegans* vulval development." EMBO J **25**(11): 2347-2357.
- Straight, S. W., J. N. Pieczynski, et al. (2006). "Mammalian Lin-7 Stabilizes Polarity Protein Complexes." Journal of Biological Chemistry **281**(49): 37738-37747.
- te Velthuis, A., J. Admiraal, et al. (2007). "Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes." BMC Evolutionary Biology **7**(1): 129.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucl. Acids Res. **22**(22): 4673-4680.
- Tompa, P. and M. Fuxreiter (2008). "Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions." Trends in Biochemical Sciences **33**(1): 2-8.
- Tompa, P. and M. Fuxreiter (2008). "Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions." Trends in Biochemical Sciences **33**(1): 2-8.
- Van der Meer, B., G. Coker III, et al. (1999). "YS (1994) Resonance energy transfer: theory and data." VCH, New York.
- Walker, J. M. E. (2005). The Proteomics Protocols Handbook. New Jersey, Humana Press.
- Widengren, J., V. Kudryavtsev, et al. (2006). "Single-Molecule Detection and Identification of Multiple Species by Multiparameter Fluorescence Detection." Analytical Chemistry **78**(6): 2039-2050.

11 Anhang

Messbedingen zu Abb. 44

Probe	Probenpuffer
pET-22b(+)-DLin-7 [0.8x A647 - 10x A488]	20 mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.3
Harnstoffpuffer (HP)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 6M Urea, pH 7.5
GdHCl-puffer (GdHCl-P)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 6M GdHCl, pH 7.5

Tab. 40 Pufferbedingungen der Proben (siehe Abb. 44)

Variante	Proteinkonzentration		Markierungsgrad		Summe	Abb.
	unmarkiert	markiert	A647	A488		
T33C-K98C	-	2.3 µM	91.1%	107.0%	198.1%	Abb. 44
T33C	-	10.4 µM	-	30.7%	-	
V69C	-	6.7 µM	-	85.9%	-	

Tab. 41 Proteinkonzentration und Markierungsgrad (siehe Abb. 44)

Messung A1-A3	Schritt	Verdünnung	Volumen		Mischort
	a	1:20	19 µl GdHCl-P + 1 µl markiertes DLin-7		Eppendorfgefäß
	b	1:10	99 µl GdHCl-P + 1 µl aus a		Eppendorfgefäß
	c		500 µl GdHCl-P		Nunc-Kammer
T33C-K98C	d1	1:34	15 µl aus b in c	Abb. 44 A1	Nunc-Kammer
T33C [4x A488]	d2	1:84	6 µl aus b in c	Abb. 44 A2	
V69C [5x A488]	d3	1:251	2 µl aus b in c	Abb. 44 A3	
Messung B1-B3	Schritt	Verdünnung	Volumen		Mischort
	a	1:20	19 µl HP + 1 µl markiertes DLin-7		Eppendorfgefäß
	b	1:10	99 µl HP + 1 µl aus a		Eppendorfgefäß
	c		500 µl HP		Nunc-Kammer
T33C-K98C	d4	1:26	40 µl aus b in c	Abb. 44 B1	Nunc-Kammer
T33C [4x A488]	d5	1:51	10 µl aus b in c	Abb. 44 B2	
V69C [5x A488]	d6	1:39	13 µl aus b in c	Abb. 44 B3	

Tab. 42 Verdünnungsschritte für die SMD-Messungen (siehe Abb. 44)

Messbedingen zu Abb. 45

Probe	Probenpuffer
pET-22b(+)-V69C-K98C [0.8x A647 - 10x A488]	20 mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.3
pET-22b(+)-V69C-K98C [unmarkiert]	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2M Urea, pH 7.5
Harnstoffpuffer (HP)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 6M Urea, 200 µM Trolox, pH 7.5
Messpuffer (MP)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 µM Trolox, pH 7.5

Tab. 43 Pufferbedingungen der Proben (siehe Abb. 45)

Variante	Proteinkonzentration		Markierungsgrad		Summe	Abb.
	unmarkiert	markiert	A647	A488		
V69C-K98C	46 µM	3.9 µM	61.5%	76.1%	137.61%	Abb. 45

Tab. 44 Proteinkonzentration und Markierungsgrad (siehe Abb. 45)

Messung	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort		
Abb. 45 A (171 µW)	a	1:20	19 µl HP	Eppendorfgefäß		
Abb. 45 B (66 µW)			+ 1 µl markiertes V69C-K98C			
Abb. 45 C (37 µW)			b	1:10	99 µl HP	Eppendorfgefäß
					+ 1 µl aus a	
	c		500 µl HP	Nunc-Kammer		
	d1	1:26.5	20 µl aus b in c +10 µl unmarkiertes V69C-K98C	Nunc-Kammer		

Tab. 45 Verdünnungsschritte für V69C-K98C-SMD-Messungen bei verschiedenen Leistungen (siehe Abb. 45)

Messbedingung zu Abb. 46:

Probe	Probenpuffer
pET-22b(+)-V69C-K98C [0.8x A647 - 10x A488]	20 mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.3
pET-22b(+)-DLin-7 [unmarkiert]	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2M Urea, pH 7.5
Harnstoffpuffer (HP) (+/- 200 μ M Trolox)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 6M Urea, pH 7.5
Messpuffer (MP) (+/- 200 μ M Trolox)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.5

Tab. 46 Pufferbedingungen der Proben (siehe Abb. 46)

Variante	Proteinkonzentration		Markierungsgrad		Summe	Abb.
	unmarkiert	markiert	0.8x A647	10x A488		
V69C-K98C	46 μ M	4 μ M	61.5%	76.1%	137.6%	Abb. 46

Tab. 47 Proteinkonzentration und Markierungsgrad (siehe Abb. 46)

Messung 1	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
V69C-K98C + 500 nM unmarkiertes Protein	a	1:20	18.6 μ l HP + 0.42 μ l unm. V69C-K98C [1 μ M] + 1 μ l V69C-K98C	Eppendorfgefäß
	b	1:10	96.9 μ l MP + 2.1 μ l unm. V69C-K98C [1 μ M] + 1 μ l aus a	Eppendorfgefäß
	c		500 μ l MP + 10 μ l unm. V69C-K98C [1 μ M]	Nunc-Kammer
	d	1:27	20 μ l aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 2	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
V69C-K98C + 500 nM unmarkiertes Protein + Trolox	a	1:20	18.6 μ l HP + 0.42 μ l unm. V69C-K98C [1 μ M] + 1 μ l V69C-K98C	Eppendorfgefäß
	b	1:10	96.9 μ l MP + 2.1 μ l unm. V69C-K98C [1 μ M] + 1 μ l aus a	Eppendorfgefäß
	c		500 μ l MP + 10 μ l unm. V69C-K98C [1 μ M]	Nunc-Kammer
	d	1:52	10 μ l aus b in c	Nunc-Kammer

Tab. 48 Verdünnungsschritte für V69C-K98C mit und ohne Trolox-SMD-Messungen (siehe Abb. 46)

Messbedingung zu Abb. 51 - Abb. 59 :

Probe	Probenpuffer
pET-22b(+)-DLin-7 [0.8x A647 - 5xBodipy FL]	20 mM Tris-HCl, 2M Urea, pH 8.3
pET-22b(+)-DLin-7 [unmarkiert]	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2M Urea, pH 7.5
pET-51b(+)-Sdt-L [L27N-L27C-PDZ]	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.5
Messpuffer (MP)	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 μ M Trolox, pH 7.6

Tab. 49 Pufferbedingungen der Proben (siehe Abb. 51 - Abb. 59)

DLin-7-Variante	Proteinkonzentration		Markierungsgrad		Summe	Abb.
	unmarkiert	markiert	0.8x A647	5x Bodipy FL		
S27C-S72C	100 μ M	14 μ M	36.4%	45.1%	81.5%	Abb. 51
S27C-S115C	138 μ M	23 μ M	67.0%	75.0%	142.0%	Abb. 54
S27C-A163C	107 μ M	26 μ M	65.0%	76.0%	141.0%	Abb. 55
T33C-V69C	109 μ M	3,4 μ M	56.0%	60.0%	116.0%	Abb. 52
T33C-K98C	79 μ M	3,2 μ M	108.0%	103.0%	211.0%	Abb. 56
S44C-S72C	163 μ M	4 μ M	81.0%	116.0%	197.0%	Abb. 53
S44C-S115C	90 μ M	8 μ M	35.0%	144.0%	179.0%	Abb. 57
V69C-K98C	92 μ M	3,8 μ M	94.0%	104.0%	198.0%	Abb. 58
S72C-A163C	110 μ M	4.4 μ M	29.0%	103.0%	132.0%	Abb. 59
Sdt-L (L27N-L27C-PDZ)	12 μ M					

Tab. 50 Proteinkonzentration und Markierungsgrade (siehe Abb. 51 - Abb. 59)

DLin-7-Variante	Harnstoffendkonzentration			Abb.
	Messung 1 DLin-7	Messung 2 + unmarkiert	Messung 3 + Sdt-L	
S27C-S72C	741 μ M	18.6 mM	741 μ M	Abb. 51
T33C-V69C	74 μ M	21.5 mM	74 μ M	Abb. 52
T33C-K98C				Abb. 56
S44C-S72C				Abb. 53
S27C-S115C	38 μ M	20 mM	38 μ M	Abb. 54
S27C-A163C				Abb. 55
S44C-S115C				Abb. 57
S72C-A163C				Abb. 59
V69C-K98C	38 μ M	19.8 mM	20 μ M	Abb. 58

Tab. 51 Harnstoffendkonzentration bei SMD-Messungen von verschiedenen DLin-7-Varianten (siehe Abb. 51 - Abb. 59)

Messung 1	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S72C	a	1:20	19 µl MP + 1 µl S27C-S72C	Eppendorfgefäß
	b	1:10	90 µl MP + 10 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		500 µl MP	Nunc-Kammer
	d	1:13.5	40 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 2	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S72C + 500 nM unmarkiertes Protein	a	1:20	18.8 µl MP + 0.2 µl unm. S27C-S72C [500 nM] + 1 µl S27C-S72C	Eppendorfgefäß
	b	1:10	88 µl MP + 1 µl unm. S27C-S72C [500 nM] + 10 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		495 µl MP + 5 µl unm. S27C-S72C [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:13.5	40 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 3	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S72C + 500 nM Sdt-L	a	1:20	18.2 µl MP + 0.8 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 1 µl S27C-S72C	Eppendorfgefäß
	b	1:10	85.8 µl µl MP + 4.2 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 10 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		479 µl MP + 21 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:13.5	40 µl aus b in c	Nunc-Kammer

Tab. 52 Verdünnungsschritte für S72C-S72C-SMD-Messungen (siehe Abb. 51)

Messung 1	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
T33C-V69C, T33C-K98C, S44C-S72C	a	1:20	19 µl MP + 1 µl <i>DLin-7</i>	Eppendorfggefäß
	b	1:100	99 µl MP + 1 µl aus a	Eppendorfggefäß
	c		500 µl MP	Nunc-Kammer
	d	1:13.5	40 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 2	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
T33C-V69C, T33C-K98C, S44C-S72C + 500 nM unmarkiertes Protein	a	1:20	18.8 µl MP + 0.2 µl unmarkiertes <i>DLin-7</i> [500 nM] + 1 µl <i>DLin-7</i>	Eppendorfggefäß
	b	1:100	98 µl MP + 1 µl unmarkiertes <i>DLin-7</i> [500 nM] + 1 µl aus a	Eppendorfggefäß
	c		495 µl MP + 5 µl unmarkiertes <i>DLin-7</i> [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:13.5	40 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 3	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
T33C-V69C, T33C-K98C, S44C-S72C + 500 nM Sdt-L	a	1:20	18.2 µl MP + 0.8 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 1 µl <i>DLin-7</i>	Eppendorfggefäß
	b	1:100	94.8 µl µl MP + 4.2 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 1 µl aus a	Eppendorfggefäß
	c		479 µl MP + 21 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:13.5	40 µl aus b in c	Nunc-Kammer

Tab. 53 Verdünnungsschritte für T33C-V69C- (Abb. 52), T33C-K98C- (Abb. 56) und S44C-S72C- (Abb. 53) SMD-Messungen

Messung 1	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S115C, S27C-A163C, S44C-S115C, S72C-A163C	a	1:20	19 µl MP + 1 µl DLin-7	Eppendorfgefäß
	b	1:100	99 µl MP + 1 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		500 µl MP	Nunc-Kammer
	d	1:26	20 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 2	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S115C, S27C-A163C, S44C-S115C, S72C-A163C + 500 nM unmarkiertes Protein	a	1:20	18.8 µl MP + 0.2 µl unmarkiertes DLin-7 [500 nM] + 1 µl DLin-7	Eppendorfgefäß
	b	1:100	98 µl MP + 1 µl unmarkiertes DLin-7 [500 nM] + 1 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		495 µl MP + 5 µl unmarkiertes DLin-7 [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:26	20 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 3	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S115C, S27C-A163C, S44C-S115C, S72C-A163C + 500 nM Sdt-L	a	1:20	18.2 µl MP + 0.8 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 1 µl DLin-7	Eppendorfgefäß
	b	1:100	94.8 µl µl MP + 4.2 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 10 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		479 µl MP + 21 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:26	20 µl aus b in c	Nunc-Kammer

Tab. 54 Verdünnungsschritte für S27C-S115C- (Abb. 54), S27C-A163C- (Abb. 55), S44C-S115C- (Abb. 57) und S72C-A163C- (Abb. 59) SMD-Messungen

Messung 3	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
S27C-S115C + 500 nM BSA (Stock 50 µM)	a	1:20	18.8 µl MP + 0.2 µl BSA [500 nM] + 1 µl DLin-7	Eppendorfgefäß
	b	1:100	98 µl µl MP + 0.2 µl BSA [500 nM] + 1 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		495 µl MP + 51 µl BSA [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:34	15 µl aus b in c	Nunc-Kammer

Tab. 55 Verdünnungsschritte für S27C-S115C.SMD-Messungen mit BSA (Abb. 60)

Messung 1	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
V69C-K98C	a	1:20	19 µl MP + 1 µl V69C-K98C	Eppendorfgefäß
	b	1:100	99 µl MP + 1 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		500 µl MP	Nunc-Kammer
	d	1:26	20 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 2	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
V69C-K98C + 500 nM unmarkiertes Protein	a	1:20	18.8 µl MP + 0.2 µl unm. V69C-K98C [500 nM] + 1 µl V69C-K98C	Eppendorfgefäß
	b	1:100	98 µl MP + 1 µl unm. V69C-K98C [500 nM] + 1 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		494.6 µl MP + 5.4 µl unm. V69C-K98C [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:51	10 µl aus b in c	Nunc-Kammer
Messung 3	Schritt	Verdünnung	Volumen	Mischort
V69C-K98C + 500 nM Sdt-L	a	1:20	18.2 µl MP + 0.8 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 1 µl V69C-K98C	Eppendorfgefäß
	b	1:100	94.8 µl µl MP + 4.2 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM] + 10 µl aus a	Eppendorfgefäß
	c		479 µl MP + 21 µl pET-51b(+)-Sdt-L [500 nM]	Nunc-Kammer
	d	1:51	10 µl aus b in c	Nunc-Kammer

Tab. 56 Verdünnungsschritte für V69C-K98C-SMD-Messungen (Abb. 58)

NCBI-Proteindatenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

Flybase-Datenbank <http://flybase.org/>

ExPASy's ProtParam <http://web.expasy.org/protparam/>

Proteinname	<i>D</i> Lin-7 (Wildtyp)
Molekulargewicht	21493 Da
Anzahl der Aminosäuren	195
Theoretischer pI	7.04
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
NCBI-ID	NP_651330.1
	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_651330.1
Flybase ID	FBpp0084162
	http://flybase.org/reports/FBgn0039269.html
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMSTV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVL EE MEMRFDRQRN TRRRQ
Aminosäuren-Verteilung	Ala (A) 17 8.7% Arg (R) 14 7.2% Asn (N) 7 3.6% Asp (D) 9 4.6% Cys (C) 0 0.0% Gln (Q) 8 4.1% Glu (E) 18 9.2% Gly (G) 15 7.7% His (H) 6 3.1% Ile (I) 6 3.1% Leu (L) 17 8.7% Lys (K) 13 6.7% Met (M) 5 2.6% Phe (F) 5 2.6% Pro (P) 7 3.6% Ser (S) 13 6.7% Thr (T) 10 5.1% Trp (W) 0 0.0% Tyr (Y) 4 2.1% Val (V) 21 10.8% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMSTV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen
DNA-Sequenz	ATG GCC GAT AAC GCA GAA CCA CTG ACT TTG TCC AGA GAT GTC AAA AGA TCG ATA GAG CTC TTG GAA AAG CTG CAA GCG AGT GGC GAC TTC CCT ACG ACA AAA CTG GCC GCC CTG CAA AAG GTG CTC AAC TCG GAC TTC ATG ACC TCC GTG CGG GAG GTG TAC GAG CAC GTC TAT GAG ACG GTG GAC ATC CAG GGC TCA CAC GAC GTG AGG GCA TCC GCC ACT GCC AAG GCC ACT GTG GCA GCC TTC GCA GCC AGC GAG GGG CAC GCT CAT CCC AGA GTC GTC GAG CTG CCC AAA ACG GAG GAG GGC TTG GGT TTC AAT GTA ATG GGG GGC AAG GAG CAA AAC TCG CCC ATC TAT ATA TCC CGA ATA ATA CCT GGA GGC GTG GCT GAC AGG CAT GGT GGT CTG AAA AGG GGA GAT CAA CTT TTG TCT GTG AAT GGT GTG TCT GTT GAA GGA GAA AAC CAC GAG AAG GCC GTA GAG CTA TTA AAG CAA GCT GTC GGA TCT GTA AAG CTG GTG GTA CGC TAC ACA CCC AAG GTT CTC GAG GAA ATG GAA ATG CGA TTT GAT AAG CAA CGC AAC ACA CGT CGT CGC CAA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-T33C (3-195 AS), Einzelvariante in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	23590 Da
Anzahl der Aminosäuren	215
Theoretischer pI	7.95
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RP --DNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVVLEE MEMRFDKQRN TRRRQ
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen, T33C
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGATAACGCAGAACCACTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTC TTGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTCAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAAG GTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGCTATGAGACG GTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCA GCCTTCGACGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCAAAACGGAG GAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCATCTATATATCC CGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTT TTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTA AAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAA ATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGTCGTCGCCAATAA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-V69C (3-195 AS), Einzelvariante in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	23592 Da
Anzahl der Aminosäuren	215
Theoretischer pI	7.95
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RP --DNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVVLEE MEMRFDKQRN TRRRQ
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen, V69C
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGATAACGCAGAACCACTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTC TTGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAAG GTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGCTATGAGACG GTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGACGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCA GCCTTCGACGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCAAAACGGAG GAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCATCTATATATCC CGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTT TTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTA AAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAA ATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGTCGTCGCCAATAA

Proteinname	DLin-7-K98C (3-195 AS), Einzelvariante in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	23563 Da
Anzahl der Aminosäuren	215
Theoretischer pl	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RP --DNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQ
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen, K98C
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCAGGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGATAACGCAGAACCACCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTC TTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCCGCTGCAAAAAG GTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGCTATGAGACG GTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCA GCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCTGCACGGAG GAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCATCTATATATCC CGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTT TTGCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACACGAGAAGGCCCTAGAGCTATTA AAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAA ATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGTCCCAATAA

Proteinname	DLin-7-T33C-V69C (3-195 AS), Doppelvariante in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	23594 Da
Anzahl der Aminosäuren	215
Theoretischer pl	7.88
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RP --DNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDQR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQ
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen, T33C-V69C
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCAGGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGATAACGCAGAACCACCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTC TTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACTGGCCCGCTGCAAAAAG GTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGCTATGAGACG GTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCA GCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCCAAAACGGAG GAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCATCTATATATCC CGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTT TTGCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACACGAGAAGGCCCTAGAGCTATTA AAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAA ATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGTCCCAATAA

Proteinname	DLin-7-T33C-K98C (3-195 AS), Doppelvariante in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	23565 Da
Anzahl der Aminosäuren	215
Theoretischer pl	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RP --DNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQ
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen, T33C-K98C
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCAGGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGATAACGCAGAACCACCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTC TTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACTGGCCGCCCTGCAAAAAG GTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGCTATGAGACG GTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCA GCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCTGCACGGAG GAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCATCTATATATCC CGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTT TTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTGAAGGAGAAAACCACGAGAAGCCGTAGAGCTATTA AAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAA ATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGTCCCAATAA

Proteinname	DLin-7-V69C-K98C (3-195 AS), Doppelvariante in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	23567 Da
Anzahl der Aminosäuren	215
Theoretischer pl	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RP --DNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTEKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQ
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 & F46 Keystone-Positionen, V69C-K98C
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCAGGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGATAACGCAGAACCACCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTC TTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAAG GTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGCTATGAGACG GTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCA GCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCTGCACGGAG GAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCATCTATATATCC CGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTT TTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTGAAGGAGAAAACCACGAGAAGCCGTAGAGCTATTA AAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAA ATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGTCCCAATAA

Löslichkeitsmacher

Proteinname	DLin-7-Trx-His-V69C (5-195 AS), Einzelvariante in pET-32a(+)
Molekulargewicht	36296 Da
Anzahl der Aminosäuren	333
Theoretischer pl	6.54
Extinktionskoeffizient	20065 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MSDKIIHLTD DSFDTDVLKA DGAILVDFWA EWCGPCKMIA PILDEIADEY QGKLTVAKLN IDQNPGTAPK YGIRGIPTLL LFKNGEVAAT KVGALSKGQL KEFLDANLAG SGSGHMH ^{HHH} H ^{SSG} LVPRG SGMKETAAAK FEAEPLTL ^{SR} DVKR ^{SIE} ELLE KLQASGDFPT TKLAALQKVL NSDFMTSVRE VYEHVYETVD IQGSHDCRAS ATAKATVAAF AASEGHAHPR VVELPKTE ^{EG} LGFNVMGGKE QNSPIYISRI IPGGVADRHG GLKRGDQLLS VNGVSVEGEN HEKAVELLKQ AVGSVKLVVR YTPKVLEEME MRFDKQRNTR RRQ-
Domänen	Trx 1-109 LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 126-131 L27 13-68 (151-206) DVKR ^{SIE} LEK ^{LQASGDF} P ^{TT} TKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 (239-313) EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP K34 (172) & F46 (184) Keystone-Positionen, V69C (207)
DNA-Sequenz	ATGAGCGATAAAATATTACCTGACTGACGACAGTTTGTGACACGGATGTACTCAAAGCG GACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGGGTCCGTGCAAAATGATCGCC CCGATTCGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAAC ATCGATCAAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTG CTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTG AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCAT CATCATTTCTTGGTCTGGTGGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGTGCTAAA TTCGAAGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAAGATCGATAGAGCTCTTGAA AAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAGGTGCTC AACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTCTATGAGACGGTGGAC ATCCAGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTC GCAGCCAGCGAGGGGACGCTCATCCAGAGTCTCGAGCTGCCCAAAACGGAGGAGGGC TTGGGTTTCAATGTAATGGGGGCAAGGAGCAAACCTCGCCATCTATATATCCCGAATA ATACCTGGAGCGCTGGTGCAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCT GTGAATGGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAA GCTGTGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAA ATCGGATTTGATAAGCAACGCAACACACGTCGTGCGCAATAA

Proteinname	DLin-7-GST-His-V69C (5-195 AS), Einzelvariante in pET-41a(+)
Molekulargewicht	49215 Da
Anzahl der Aminosäuren	436
Theoretischer pI	6.82
Extinktionskoeffizient	49070 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MSPILGYWKI KGLVQPTRLR LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLP EML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK KRIEAIPOID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPKSD GSTSGSGHHH HHSAGLVPR GSTAIAEPLT LSRDVKRSIE LLEKLQASGD FPTTKLAALQ KVLNSDFMTS VREVEYEHVYE TVDIQGSHTC RASATAKATV AAFAASEGHA HPRVVELPKT EGLGFNVMG KEQNSPIYI SRIIPGGVAD RHGGLKRGDQ LLSVNGVSVE GENHEKAVEL LKQAVGSVKL VVRYTPEKVLE EMEMRFDKQR NTRRRQ-
Domänen	GST = 4-219 LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 237-242 L27 13-68 (254-309) DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVEYEHVYET VDIQGSHT PDZ 101-175 (342-416) EGLGFNVMG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPE K34 (275) & F46 (287) Keystone-Positionen, V69C (310)
DNA-Sequenz	ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT TTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAA TGGCGAAACAAAAGTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGAT GGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAAC ATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTG GATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTT GATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGGAAGATCGTTTATGCATAAA ACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGAT GTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCTGGATGCGTTCCCAAATAGTTTGTATATAA AAACGTATTGAAGCTATCCCAAAAATTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCA TGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGAT GGTTCAACTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCCGGGTCTGGTGCACGC GGTAGTACTGCAATTGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCGCTGCAA AAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCAGCTCATGAG ACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTG GCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCTGCGAGCTGCCAAAACG GAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCATATATA TCCCAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAA CTTTTGTCTGTAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACCGAGAAGGCCGTAGAGCTA TTAAAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAG GAAATGGAAATGCGATTGATAAGCAACGCAACACAGCTGTCGCCAATAA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-Nus-His-V69C (5-195 AS), Einzelvariante in pET-41a(+)
Molekulargewicht	78241 Da
Anzahl der Aminosäuren	709
Theoretischer pl	4.95
Extinktionskoeffizient	37150 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	<p>MNKEILAVVE AVSNEKALPR EKIFEALESA LATATKKKYE QEIDVRVQID RKSGDFDTR RVLVVDEVTQ PTKEITLEEA RYEDESINLG DYVEDQIESV TFDRIITQTA KQVIVQKVRE AERAMVVDQF REHEGEIITG VVKVNRDNI SLDLGNNAEA VILREDMLPR ENFRPGDRVR GVLYSVRPEA RGAQLFVTRS KPEMLIELFR IEVPEIGEEV IEIKAAARDP GSRAKIAVKT NDKRIDPVGA CVGMRGARVQ AVSTELGGER IDIVLWDDNP AQFVINAMAP ADVASIVVDE DKHTMDIAVE AGNLAQAIGR NGQNVRLASQ LSGWELNVMT VDDLQAKHQA EAHAAIDTFT KYLDIDEDFA TVLVEEGFST LEELAYVPMK ELLEIEGLDE PTVEALRERA KNALATIAQA QEESLGDNKP ADDLLNLEGV DRDLAFKLAA RGVCTLEDLA EQGIDDLADI EGLTDEKAGA LIMAARNICW FGDEATSGSG HHHHHHSAGL VPRGSTAIAE PLTLSDVVKR SIELLEKLQA SGDFPTTKLA ALQKVLNSDF MTSVREVYEH VYETVDIQGS HD^CRASATAK ATVAFAFAASE GHAHPRVVEL PKTEEGLGFN VMGGKEQNSP IYISRIIPGG VADRHGGLKR GDQLLSVNGV SVEGENHEKA VELLKQAVGS VKLVVRYTEK VLEEMEMREFD KQRNTRRRQ-</p>
Domänen	<p>NUS 1-495 LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 510-515 L27 13-68 (527-582) DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 (615-689) EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTE K34 (548) & F46 (560) Keystone-Positionen, V69C (583)</p>
DNA-Sequenz	<p>ATGAACAAAGAAATTTGGCTGTAGTTGAAGCCGTATCCAATGAAAAGGCGCTACCTCGC GAGAAGATTTTGAAGCATTGGAAAGCGCGCTGGCGACAGCAACAAAGAAAAATATGAA CAAGAGATCGACCTCCGCGTACAGATCGATCGAAAAGCGGTGATTTTGACACTTTCCGT CGCTGGTTAGTTGTGATGAAGTCACCCAGCCGACCAAGGAAATCACCCCTGAAGCCGCA CGTTATGAAGATGAAAGCCTGAACCTGGCGGATTACGTTGAAGATCAGATTGAGTCTGT ACCTTTGACCGTACTACTACCCAGCGCAAAACAGGTTATCGTGCAGAAAGTCCGCTGAA GCCAAGCAGCGATGGTGGTTGATCAGTTCGTTGACACGAAAGGTGAAATCATCACCCGG GTGGTGAAGAAAGTAAACCCGCAACATCTCTCTGGATCTGGGCAACAAAGCTGAAGCC GTGATCCTGGCGAAGATATGCTGCGCGTGAAAACCTCCGCGCTGGCGACCCGCTCGT GGCTGCTCTATTCGCTTCGCGCGAAGCGGTGGCGCGCAACTGTTCTGCTCACTCGTTC AAGCCGAAATGCTGATCGAAGTTCCTGATTTGAAGTGCAGAAATCGCGCAAGAAATG ATTGAAATTAAGCAGCGGCTCGCATCCGGTTCCTGTCGCAAAATCGCGGTGAAACCC AACGATAAAGCTATCGATCCGGTAGGTGCTTGGCTAGGTATCGCTGGCGCGCGGTGTTAG GCGGTGCTACTGAAGTGGTGGCGAGCGTATCGATATCGTCTGTGGGATGATAACCCG GGCAGTTCGTTAATGCAATGGCAACCCGAGACGTTGCTTCTATCGTGGTGAATGAA GATAAACACACCATGGACATCGCGTTGAAGCCGTAATCTGGCGCAGGCGATTGGCCGT AACGTCAGAACGTCGCTTCGGCTTCGCAACTGAGCGGTTGGGAACCTCAACGTGATGACC GTTGACGACCTGCAAGCTAAGCATCAGCGGAGCGCACGCGATCGACACCTTACC AATATCTCGACATCGACGAAGACTTCGCGACTGTTCTGGTAGAAGAAGGCTTCTCGACG CTGGAAGAATTGGCCATGTGCCGATGAAAGAGCTGTTGAAATCGAAGGCCTTGTAGAG CCGACCGTTGAAGCACTGCGCGAGCGTGTAAAAATGCACTGGCCACCATGACACAGGCC CAGGAAGAAAGCCTCGGTGATAACAAACCGGCTGACGATCTGCTGAACCTTGAAGGGTGA GATCGTATTGGCATTCAAACCTGGCGCCCGTGGCGTTGTACGCTGGAAGATCTCGCC GAACAGGGCATGATGATCTGGCTGATATCGAAGGTTGACGAGCGAAAGCCGAGGCA CTGATATGGCTGCCCGTAATATTGCTGGTTCGGTGACGAAGCGACTAGTGGTCTGGT CATCACCATCACCATCACTCCGCGGTCTGGTCCACGCGGTAGTACTGCAATTGCGAAA CCACTGACTTTGCCAGAGATGCAAAAGATCGATAGAGCTCTTGGAAAAGCTGCAAGCG AGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTC ATGACCTCCGTGGCGGAGGTGTACGAGCAGCTCTATGAGACGTTGGACATCCAGGGCTCA CAGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTCGACAGCCGAG GGGCACGCTCATCCAGAGTCTGAGCTGCCAAAACCGGAGGAGGGCTTGGTTTCAAT GTAATGGGGGCAAGGAGCAAAACCTCGCCATCTATATATCCGAAATAATACCTGGAGGC GTGGCTGACAGGCTGGTGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTGTCTGTGAATGGTGTG TCTGTGAAGGAGAAAACCCAGAGAAGCGGTAGAGCTATTAAAGCAAGCTCTCGGATCT GTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGAATTTGAT AAGCAACGCAACACAGCTCTCGCCATAA</p>

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-V69C-His (5-195 AS), Einzelvariante in pET-29b(+)
Molekulargewicht	24689 Da
Anzahl der Aminosäuren	225
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	M--AEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDQR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQGT LVE RGSMAISDPN SSSVDKLAAL LEHHHHHH-
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 198-203 K34 & F46 Keystone-Positionen, V69C
DNA-Sequenz	ATGGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTCTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGG CGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGG TGTACGAGCACGTCTATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCC ACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCCAGAGTCGTGAGCTGCCAAAACGGAGGAGGG CTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCG TGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAA AACCACGAGAAGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTACACACCCAA GGTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGCCAAAGGTACCTGGTGCCAC GCGGTTCCATGGCGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACACCAC CACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-V69C-malE-His (5-195 AS), Einzelvariante in pET-29b(+)
Molekulargewicht	64081 Da
Anzahl der Aminosäuren	582
Theoretischer pl	5.99
Extinktionskoeffizient	72310 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	<p>M--AEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD^{CR} ASATAKATVA AFAASEGH AH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQGT^{LVE} RGSMDMKIEE GKLVIWINGD KGYNGLAEVG KKFEDKTGK VVTEHPDKLE EKFPQVAATG DGPDIIFWAH DRFGGYAQSG LLAEITPDKA FQDKLYPFTW DAVRYNGKLI AYPIAVEALS LIYNKDLLPN PPKTWEEIPA LDKELKAKGK SALMFNLQEP YFTWPLIAAD GGYAFKYENG KYDIKDVGVND NAGAKAGLTF LVDLIKHKHM NADTDYSIAE AAFNKGETAM TINGPWAWSN IDTSKVNIVGV TVLPTFKGQP SKPFVGVLSA GINAASPKE LAKEFLENYL LTDEGLEAVN TAVINAASGR QTVDEALKDA QTKLAAALEH HHHHH-</p>
Domänen	<p>L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 198-203 malE 206-612 K34 & F46 Keystone-Positionen, V69C</p>
DNA-Sequenz	<p>ATGGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTCTTGGAAAAGCTGCA AGCGA^gTGGCGACTTCCCTACGACAAAACGGCCGCGCTGCAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCA TGACCTCCGTGCGGGAGGTACGAGCACGCTATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGAC TGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCA TCCCAGAGTCGTCGAGCTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGG AGCAAACTCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAACACGAGAA GGCCGTAGAGCTATTAAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAAGCTGGTGGTACGCTACACCCCAAGG TTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGTCCGAAGGTACCTG GTGCCACGCGGTTCCATGGATATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGA TAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAAGATACCGGAATTAAGTCA CCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCT GACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCTGTTGGCTGAAAT CACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACG GCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTG CCGAACCCGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAA GAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACTGGCCGCTGATGCTGCTGACGGGG GTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTTGGGCGTGGATAACGCTGGC CGAAAGCGGGTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAACAAACACATGAATGCAGACACCGA TTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGCGAAACAGCGATGACCATCAACGCCCCGTGGG CATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTCAAGGGT CAACCATCCAAACCGTTTCGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAACGCCCGCAGTCCGAACAAAGA GCTGGCAAAAAGAGTTCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATGAAGGCTGGAAGCGGTTAATAAAG ACAAACCGCTGGGTGCGGTAGCGCTGAAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAGATCCGCGGATT GCCGCCACTATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCGGCTTT CTGGTATGCGGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCGCAGCGGTGCTGAGACTGTCGATGAAGCCC TGAAAGACGGCAGACTAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA</p>

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-K98C-malE-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-29b(+)
Molekulargewicht	64352 Da
Anzahl der Aminosäuren	585
Theoretischer pl	5.84
Extinktionskoeffizient	72310 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPCTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQGT LVP RGSMDMKIEE GKLVIWINGD KGYNGLAEVG KKFEDTGIK VTVEHPDKLE EKFPQVAATG DGPDIIFWAH DRFGGYAQSG LLAEITPDKA FQDKLYPFTW DAVRYNGKLI AYPIAVEALS LIYNKDLLPN PPKTWEEIPA LDKELKAKGK SALMFNLQEP YFTWPLIAAD GGYAFKYENG KYDIKDVGVN NAGAKAGLTF LVDLIKMKHM NADTDYSIAE AAFNKGETAM TINGPWAWSN IDTSKVNIVGV TVLPTFKGQP SKPFVGVLSA GINAASPKE LAKEFLENYL LTDEGLEAVN KDKPLGAVAL KSYEEELVKD PRIAATMENA QKGEIMPNIQ QMSAFWYAVR TAVINAASGR QTVDEALKDA QTKLAAALEH HHHHH-
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 198-203 malE 206-612 K34 & F46 Keystone-Positionen, K98C
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTCTGGAAAAGCTGCA AGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCG TGCGGGAGGTGTACGAGCACGTCTATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGGCATCCGCCACT GCCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTGAGCTGCCCTGCAC GGAGGAGGGCTTGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCCTCTATATATCCCGAATAATAC CTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTT GAAGGAGAAAACCACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGTACGCTA CACACCCAAAGTTCTCGAGGAAATGGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAACACACGCTCGTCGCGCAAGGTACCC TGGTGCCACGCGGTTCCATGGATATGAAAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGC TATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTACCGTTGAGCATCCGGA TAACTGGAAGAGAAATCCACAGGTTGGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTGGGCACACGACC GCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCGGACAAAGCGTTCAGGACAAGCTGTAT CCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCT GATTTATACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAAGTGA AAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCCTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGAC GGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGAGCTGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAA AGCGGGTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAATAAACAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAG AAGCTGCCTTTAATAAAGCGAACAAGCGATGACCATCAACGGCCGCTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGC AAAGTGAATTATGGTGAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGTCACCATCCAAACCGTTCTGTTGGCGTGTGAG CGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATG AAGGTCGGAAGCGGTTAATAAAGACAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTGGTG AAAGATCCGCGGATTCGCCCACTATGGAACCGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTC CGCTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGTGTGAGTGTGATGAAGCCCTGA AAGACGCGCAGACTAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

Proteinname	DLin-7-T33C-K98C-malE-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-29b(+)
Molekulargewicht	64354 Da
Anzahl der Aminosäuren	585
Theoretischer pl	5.84
Extinktionskoeffizient	72435 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPCTE EGLGFNVMMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQGT LVE RGSMDMKIEE GKLVIWINGD KGYNGLAEVG KKFEDTGIK VTVEHPDKLE EKFPQVAATG DGPDIIFWAH DRFGGYAQSGLLAEITPDKA FQDKLYPFTW DAVRYNGKLI AYPIAVEALS LIYNKDLLPN PPKTWEEIPA LDKELKAKGK SALMFNLQEP YFTWPLIAAD GGYAFKYENG KYDIKDVGVNAGAKAGLTF LVDLIKMKHM NADTDYSIAE AAFNKGETAM TINGPWAWSN IDTSKVNIGV TVLPTFKGQP SKPFVGVLSA GINAASPNKE LAKEFLENYL LTDEGLEAVN KDKPLGAVAL KSYEEELVKD PRIAATMENA QKGEIMPNIQ QMSAFWYAVR TAVINAASGR QTVDEALKDA QTKLAAALEH HHHHH-
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 198-203 malE 206-612 K34 & F46 Keystone-Positionen, T33C-K98C
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTCTTGGAAAAGCTGCA AGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCG TGCGGGAGGTGTACGAGCAGCTCTATGAGACGGTGGACATCCAGGGTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACT GCCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCCTGCAC GGAGGAGGGCTTGGGTTCAATGTAATGGGGGCAAGGAGCAAACTCGCCATCTATATATCCCGAATAATAC CTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTGTCTGTAATGGTGTGTCTGTT GAAGGAGAAAACCACGAGAAGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTA CACACCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTGATAAGCAACGCAACACACGTCGTCGCCAAGGTACCC TGGTGCCACGCGGTTCCATGGATATGAAAATCGAAGAAGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGC TATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTACCCTGAGCATCCGGA TAACTGGAAGAGAAATCCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACC GCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTCCAGGACAAGCTGTAT CCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCT GATTTATAACAAAGATCTGCTGCCAACCAGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAACTGA AAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCCTACTTACCTGGCCGCTGATTGCTGTGAC GGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGCTGGCGGTGATAACGCTGGCGCGAA AGCGGTTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCCGACG AAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGCGATGGTCCAACATCGACACCAGC AAAGTGAATTAAGTGTAAACGGTACTGCCGACCTCAAGGTCACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGTGAG CGCAGGTATTAACGCCCGCAGTCCGAACAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAATATCTGCTGACTGATG AAGGCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTG AAAGATCCGCGGATTCGCCCACTATGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTC CGTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCGCAGCGGTGCTCAGACTGTGATGAAGCCCTGA AAGACGCGCAGACTAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

Proteinname	DLin-7-V69C-K98C-malE-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-29b(+)
Molekulargewicht	64356 Da
Anzahl der Aminosäuren	585
Theoretischer pl	5.84
Extinktionskoeffizient	72435 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHD ^{CR} ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELP ^{CTE} EGLGFNVMMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP ^{KVLEE} MEMRFDKQRN TRRRQGT ^{LVE} RGSMDMKIEE GKLVIWINGD KGYNGLAEVG KFEKDTGIK VTVEHPDKLE EKFPQVAATG DGPDIIFWAH DRFGGYAQSG LLAEITPDKA FQDKLYPFTW DAVRYNGKLI AYPIAVEALS LIYNKDLLPN PPKTWEEIPA LDKELKAKGK SALMFNLQEP YFTWPLIAAD GGYAFKYENG KYDIKDVGVN NAGAKAGLTF LVDLIKMKHM NADTDYSIAE AAFNKGETAM TINGPWAWSN IDTSKVNIVG TVLPTFKGQP SKPFVGVLSA GINAASPNKE LAKEFLENYL LTDEGLEAVN KDKPLGAVAL KSYEEELVKD PRIAATMENA QKGEIMPNIQ QMSAFWYAVR TAVINAASGR QTVDEALKDA QTKLAAALEH HHHHH-
Domänen	L27 13-68 DVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHD PDZ 101-175 EGLGFNVMMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTP LVPRGS = Thrombin-Schnittstelle, 198-203 malE 206-612 K34 & F46 Keystone-Positionen, V69C-K98C
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAGCTCTTGGAAAAGCTGCA AGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTGCAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCG TGCGGGAGGTGTACGAGCAGCTCTATGAGACGGTGGACATCCAGGGTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACT GCCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAGCTGCCCTGCAC GGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAACCTCGCCATCTATATATCCCGAATAATAC CTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTAATGGTGTGTCTGTT GAAGGAGAAAACCACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTACGCTA CACACCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTGATAAGCAACGCAACACACGTCGTCGCCAAGGTACCC TGGTGCCACGCGGTTCCATGGATATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGC TATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTACCCTGAGCATCCGGA TAAACTGGAAGAGAAATCCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACC GCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTCCAGGACAAGCTGTAT CCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCT GATTTATAACAAAGATCTGCTGCCAACCAGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAACTGA AAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCCTACTTACCTGGCCGCTGATTGCTGTGAC GGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGCTGGCGGTGATAACGCTGGCGGAA AGCGGTTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAACCAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCCGACG AAGCTGCCTTTAATAAAGGGCAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGCGATGGTCCAACATCGACACCAGC AAAGTGAATTAAGTGTAAACGGTACTGCCGACCTCAAGGTCACACATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGTGAG CGCAGGTATTAACGCCCCAGTCCGAACAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAATATCTGCTGACTGATG AAGGCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTG AAAGATCCGCGGATTCGCCCACTATGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTC CGTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGCTCAGACTGTGATGAAGCCCTGA AAGACGGCGCAGACTAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

pET-22b(+)-Konstrukte mit vollständigen *D*Lin-7

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-T33C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23015 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLSNDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGAAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCAAACCGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CAGGAGAAGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-V69C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23017 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLSNDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGAAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCAAACCGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CAGGAGAAGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-K98C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	22988 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	6.87
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPCTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGAAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCTGTCGAG CTGCCCTGCACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGCAAGGAGCAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCTGCGCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-T33C-V69C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23019 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHD ^C R ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGAAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCTGTCGAG CTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGCAAGGAGCAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCTGCGCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-T33C-K98C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	22990 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pl	6.87
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPCTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAA LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGACAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCTGCACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-V69C-K98C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	22992 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pl	6.87
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPCTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAA LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGACAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCTGCACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S27C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23029 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQACGDF PTTKLAALQK VLN ^S DFM ^T SV REVYEHVYET VDIQGS ^H DVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYT ^P KVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGTGGCGGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCTGCGCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S44C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23029 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLN ^C DFM ^T SV REVYEHVYET VDIQGS ^H DVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYT ^P KVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTGCGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCTGCGCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S72C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23029 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLSNDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSVDVR ACATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPEKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATGCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCAAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S115C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23029 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLSNDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSVDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNCPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPEKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGA TAGAGCTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCG CCCTGCAAAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGC ACGTCTATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTG CCAAGGCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCG TCGAGCTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGC AAAACCTGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGCGTGGCTGACAGGCATG GTGGTCTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAG AAAACCACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGG TGGTACGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAAATGCGATTTGATAAGCAAC GCAACACACGTCGTCGCAAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACC ACTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-A163C-His (1-195 AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23045 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.23
Extinktionskoeffizient	5960 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLSNDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSVDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQCVGSVKLV VRYTPEKVVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAATGCGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S27C-S72C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23045 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQACGDF PTTKLAALQK VLSNDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSVDVR ACATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPEKVVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGTGGCGGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATGCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTGCGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGAAAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGGCGCCGACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S27C-S115C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23045 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQACGDF PTTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNCPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGTGC GGCGACTTCCCTACGACAAAAGCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCTGTCGAG CTGCCCAAACCGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S27C-A163C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23061 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQACGDF PTTKLAALQK VLNSDFMITSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQCVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAL LEHHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGTGC GGCGACTTCCCTACGACAAAAGCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCTGTCGAG CTGCCCAAACCGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAATGCGTTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S44C-S72C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23045 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNCDFM ^Y TSV REVYEHVYET VDIQGS ^D HVR ACATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAA LEHHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTGCGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATGCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCAAACCGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S44C-S115C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23045 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNCDFM ^Y TSV REVYEHVYET VDIQGS ^D HVR ASATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNCPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQAVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAA LEHHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTGCGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCAAACCGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAAC TGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAAGCTGTGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-S72C-A163C-His (1-195 AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	23061 Da
Anzahl der Aminosäuren	208
Theoretischer pI	7.22
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTTKLAALQK VLNSDFMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ACATAKATVA AFAASEGHAH PRVVELPKTE EGLGFNVMGG KEQNSPIYIS RIIPGGVADR HGGLKRGDQL LSVNGVSVEG ENHEKAVELL KQCVGSVKLV VRYTPKVLEE MEMRFDKQRN TRRRQKLAAA LEHHHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCCTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGAAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATGCGCCACTGCCAAG GCCACTGTGGCAGCCTTCGCAGCCAGCGAGGGGCACGCTCATCCCAGAGTCGTCGAG CTGCCCCAAAACGGAGGAGGGCTTGGGTTTCAATGTAATGGGGGGCAAGGAGCAAAAC TCGCCCATCTATATATCCCGAATAATACCTGGAGGCGTGGCTGACAGGCATGGTGGT CTGAAAAGGGGAGATCAACTTTTGTCTGTGAATGGTGTGTCTGTTGAAGGAGAAAAC CACGAGAAGGCCGTAGAGCTATTAAGCAATGCGTCGGATCTGTAAGCTGGTGGTA CGCTACACACCCAAGTTCTCGAGGAAATGGAATGCGATTTGATAAGCAACGCAAC ACACGTCGTCGCCAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-T33C L27-His (AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	9640 Da
Anzahl der Aminosäuren	86
Theoretischer pI	6.21
Extinktionskoeffizient	2980 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDKMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDVR ASAKLAAALE HHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCACTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACGTGAGGGCATCCGCCAAGCTTGCG GCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-V69C L27-His (AS), Einzelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	9642 Da
Anzahl der Aminosäuren	86
Theoretischer pI	6.21
Extinktionskoeffizient	2980 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDKMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDQR ASAKLAAALE HHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCACTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGACAAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCAAGCTTGCG GCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	<i>D</i> Lin-7-T33C-V69C L27-His (AS), Doppelvariante in pET-22b(+)
Molekulargewicht	9644 Da
Anzahl der Aminosäuren	86
Theoretischer pI	6.21
Extinktionskoeffizient	3105 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MADNAEPLTL SRDVKRSIEL LEKLQASGDF PTKLAALQK VLNSDKMTSV REVYEHVYET VDIQGSHDQR ASAKLAAALE HHHHHH-
DNA-Sequenz	ATGGCCGATAACGCAGAACCACTGACTTTGTCCAGAGATGTCAAAGATCGATAGAG CTCTTGGAAAAGCTGCAAGCGAGTGGCGACTTCCCTACGTGCAAACCTGGCCGCCCTG CAAAGGTGCTCAACTCGGACTTCATGACCTCCGTGCGGGAGGTGTACGAGCACGTC TATGAGACGGTGGACATCCAGGGCTCACACGACTGCAGGGCATCCGCCAAGCTTGCG GCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Proteinname	Stardust (Wildtyp)																																																																		
Molekulargewicht	139022																																																																		
Anzahl der Aminosäuren	1289																																																																		
Theoretischer pl	6.56																																																																		
Extinktionskoeffizient	65375 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm																																																																		
NCBI-ID	AAL40935.1																																																																		
	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAL40935.1																																																																		
Flybase ID	FBgn0261873																																																																		
	http://flybase.org/reports/FBgn0261873.html																																																																		
Protein-Sequenz	<p> MLSVNQDNGP HREMAVDCPD TFIARNKTPP RYPPRRPPQK HKKSTNTTTT TTITALTNND HANKMLIVAY HSSHQHEQLQ QQHPSKTSTT TTTIALDVAT QNLYNQKQQN KLEQIENYEN CLQSERNEQH EQQFEQKQKH QATTAMAATQ VAQQQTPSHK LQATLSSDPN GNSNSNNNSH IVGISSSSSS NNSSITDDFL CVVDGLYQGR KDTASPPSSA FDEVMSKHTL DSFGSIAYRH LHQHQATSN GNSSNTSNT NSNTNSNTNS NSNTNGNTSN NTAVSTKTAT VTKTGVSSSN SNSNSLNSN SSMHTSSSSS GHSSNIASAT SSSSATSSST VPDDLSLAPP GYEVSQQQQ QHLVATPVTM LPPMAKHRE LPVDVPDSFI EMVKTTPRYP PPAHLSSRGS LLSNGSASTA HTLSSMGVA PSFVTATAAA AASASAACAT TAVAAAAVSG VADGDARRVA DELNGNAKPV PPPRDLRVE KDGRLVNCSP APQLPDRRAP GNASSGSSGA TTHPLQHQOI AQIVEPTLEQ LDSIKKYQEQ LRRRREEEER IAQQNEFLRN SLRGSRKLKA LQDTATPGKA VAQQQQQATL ATQVVGVEVE AYLDPEDQPO AEQIDGYGEL IAALTRLQNO LSKSGLSTLA GRVSAHSVL ASASVAHVLA ARTAVLQRRR SRVSGPLHHS SLGLQKDIVE LLTQSNATAA IELGNLLTSH EMEGLLLAHD RIANHTDGTF SPTPTTPAI GAATGSTLSS PVAGPKRNLG MVVPPVVPV PLAQRGAMPL PRGESPPVP MPPLATMPMS MPVNLPMASAC FGTLNDQNDN IRIIQIEKST EPLGATVRNE GEAVVIGRIV RGGAAEKSGL LHEGDEILEV NGQELRGKTV NEVCALLGAM QGTLTFLIVE AGSPPSVGM GGTGSQLAG LGGHRDTAV LHVRAHFDYD PEDDLYIPCR ELGISFQKGD VLHVISREDP NWWQAYREGE EDQTLAGLIP SPSFQHOR MCLAIAEEAG LARSRGKDG SSKGATLLCA RKGRKKKKA SSEAGYPLYA TTAPDETDPE EILTYEEVAL YYPRATHKRP IVLIGPPNIG RHELQRRLMA DSERFSAAVP HTSRARREGE VPGVDYHFIT RQAFEADILA RRFVEHGEYE KAYYGTSLA IRTVVASGKI CVLNLHPQSL KLLRASDLKP YVVLVAPPSL DKLRQKLRN GEPFKEEELK DIIATARDME ARWGHFLDMI IINNDTERAY HQLLAEINSL EREPQWVPAQ WVHNNRDES </p>																																																																		
Domänen	<p> L27N 626-682 GYGELIA ALTRLQNLQSL KSGSLTLAGR VSAHSLVLAAS ASVAHVLAAR TAVLQRRRSR L27C 688-743 HHS SLGLQKDIVE LLTQSNATAA IELGNLLTSH EMEGLLLAHD RIANHTDGTF SPT PDZ 842-912 PLGATVRNE GEAVVIGRIV RGGAAEKSGL LHEGDEILEV NGQELRGKTV NEVCALLGAM QGTLTFLIVE AG SH3 942-1008 HVRAHFDYD PEDDLYIPCR ELGISFQKGD VLHVISREDP NWWQAYREGE EDQTLAGLIP SPSFQHOR GUK 1088-1261 KRP IVLIGPPNIG RHELQRRLMA DSERFSAAVP HTSRARREGE VPGVDYHFIT RQAFEADILA RRFVEHGEYE KAYYGTSLA IRTVVASGKI CVLNLHPQSL KLLRASDLKE YVVLVAPPSL DKLRQKLRN GEPFKEEELK DIIATARDME ARWGHFLDMI IINNDTERAY HQLLAEINSL E </p>																																																																		
Aminosäuren-Verteilung	<table> <tbody> <tr><td>Ala (A)</td><td>129</td><td>10.0%</td></tr> <tr><td>Arg (R)</td><td>72</td><td>5.6%</td></tr> <tr><td>Asn (N)</td><td>71</td><td>5.5%</td></tr> <tr><td>Asp (D)</td><td>54</td><td>4.2%</td></tr> <tr><td>Cys (C)</td><td>10</td><td>0.8%</td></tr> <tr><td>Gln (Q)</td><td>79</td><td>6.1%</td></tr> <tr><td>Glu (E)</td><td>77</td><td>6.0%</td></tr> <tr><td>Gly (G)</td><td>79</td><td>6.1%</td></tr> <tr><td>His (H)</td><td>46</td><td>3.6%</td></tr> <tr><td>Ile (I)</td><td>48</td><td>3.7%</td></tr> <tr><td>Leu (L)</td><td>110</td><td>8.5%</td></tr> <tr><td>Lys (K)</td><td>49</td><td>3.8%</td></tr> <tr><td>Met (M)</td><td>24</td><td>1.9%</td></tr> <tr><td>Phe (F)</td><td>18</td><td>1.4%</td></tr> <tr><td>Pro (P)</td><td>89</td><td>6.9%</td></tr> <tr><td>Ser (S)</td><td>131</td><td>10.2%</td></tr> <tr><td>Thr (T)</td><td>98</td><td>7.6%</td></tr> <tr><td>Trp (W)</td><td>5</td><td>0.4%</td></tr> <tr><td>Tyr (Y)</td><td>25</td><td>1.9%</td></tr> <tr><td>Val (V)</td><td>75</td><td>5.8%</td></tr> <tr><td>Pyl (O)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Sec (U)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> </tbody> </table>	Ala (A)	129	10.0%	Arg (R)	72	5.6%	Asn (N)	71	5.5%	Asp (D)	54	4.2%	Cys (C)	10	0.8%	Gln (Q)	79	6.1%	Glu (E)	77	6.0%	Gly (G)	79	6.1%	His (H)	46	3.6%	Ile (I)	48	3.7%	Leu (L)	110	8.5%	Lys (K)	49	3.8%	Met (M)	24	1.9%	Phe (F)	18	1.4%	Pro (P)	89	6.9%	Ser (S)	131	10.2%	Thr (T)	98	7.6%	Trp (W)	5	0.4%	Tyr (Y)	25	1.9%	Val (V)	75	5.8%	Pyl (O)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%
Ala (A)	129	10.0%																																																																	
Arg (R)	72	5.6%																																																																	
Asn (N)	71	5.5%																																																																	
Asp (D)	54	4.2%																																																																	
Cys (C)	10	0.8%																																																																	
Gln (Q)	79	6.1%																																																																	
Glu (E)	77	6.0%																																																																	
Gly (G)	79	6.1%																																																																	
His (H)	46	3.6%																																																																	
Ile (I)	48	3.7%																																																																	
Leu (L)	110	8.5%																																																																	
Lys (K)	49	3.8%																																																																	
Met (M)	24	1.9%																																																																	
Phe (F)	18	1.4%																																																																	
Pro (P)	89	6.9%																																																																	
Ser (S)	131	10.2%																																																																	
Thr (T)	98	7.6%																																																																	
Trp (W)	5	0.4%																																																																	
Tyr (Y)	25	1.9%																																																																	
Val (V)	75	5.8%																																																																	
Pyl (O)	0	0.0%																																																																	
Sec (U)	0	0.0%																																																																	

Proteinname	Sdt-L27C (672-773 AS, Sdt-S) in pQE-30 Xa																																																																		
Molekulargewicht	14236.0																																																																		
Anzahl der Aminosäuren	136																																																																		
Theoretischer pI	10.61																																																																		
Extinktionskoeffizient	---																																																																		
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RPRTAVLQRR RSRVSGPLHH SSLGLQKDIV ELLTQSNATA AIELGNLLTS HEMEGLLLAH DRIANHTDGT PSPTPTPTPA IGAATGSTLS SPVAGPKRNL GMVVVPRVDL QPSLIS-																																																																		
Domänen	L27C 688-743 HH SSLGLQKDIV ELLTQSNATA AIELGNLLTS HEMEGLLLAH DRIANHTDGT PSPT																																																																		
Aminosäuren-Verteilung	<table> <tbody> <tr><td>Ala (A)</td><td>10</td><td>7.4%</td></tr> <tr><td>Arg (R)</td><td>10</td><td>7.4%</td></tr> <tr><td>Asn (N)</td><td>4</td><td>2.9%</td></tr> <tr><td>Asp (D)</td><td>4</td><td>2.9%</td></tr> <tr><td>Cys (C)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Gln (Q)</td><td>4</td><td>2.9%</td></tr> <tr><td>Glu (E)</td><td>5</td><td>3.7%</td></tr> <tr><td>Gly (G)</td><td>15</td><td>11.0%</td></tr> <tr><td>His (H)</td><td>11</td><td>8.1%</td></tr> <tr><td>Ile (I)</td><td>6</td><td>4.4%</td></tr> <tr><td>Leu (L)</td><td>16</td><td>11.8%</td></tr> <tr><td>Lys (K)</td><td>2</td><td>1.5%</td></tr> <tr><td>Met (M)</td><td>3</td><td>2.2%</td></tr> <tr><td>Phe (F)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Pro (P)</td><td>11</td><td>8.1%</td></tr> <tr><td>Ser (S)</td><td>16</td><td>11.8%</td></tr> <tr><td>Thr (T)</td><td>11</td><td>8.1%</td></tr> <tr><td>Trp (W)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Tyr (Y)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Val (V)</td><td>8</td><td>5.9%</td></tr> <tr><td>Pyl (O)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Sec (U)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> </tbody> </table>	Ala (A)	10	7.4%	Arg (R)	10	7.4%	Asn (N)	4	2.9%	Asp (D)	4	2.9%	Cys (C)	0	0.0%	Gln (Q)	4	2.9%	Glu (E)	5	3.7%	Gly (G)	15	11.0%	His (H)	11	8.1%	Ile (I)	6	4.4%	Leu (L)	16	11.8%	Lys (K)	2	1.5%	Met (M)	3	2.2%	Phe (F)	0	0.0%	Pro (P)	11	8.1%	Ser (S)	16	11.8%	Thr (T)	11	8.1%	Trp (W)	0	0.0%	Tyr (Y)	0	0.0%	Val (V)	8	5.9%	Pyl (O)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%
Ala (A)	10	7.4%																																																																	
Arg (R)	10	7.4%																																																																	
Asn (N)	4	2.9%																																																																	
Asp (D)	4	2.9%																																																																	
Cys (C)	0	0.0%																																																																	
Gln (Q)	4	2.9%																																																																	
Glu (E)	5	3.7%																																																																	
Gly (G)	15	11.0%																																																																	
His (H)	11	8.1%																																																																	
Ile (I)	6	4.4%																																																																	
Leu (L)	16	11.8%																																																																	
Lys (K)	2	1.5%																																																																	
Met (M)	3	2.2%																																																																	
Phe (F)	0	0.0%																																																																	
Pro (P)	11	8.1%																																																																	
Ser (S)	16	11.8%																																																																	
Thr (T)	11	8.1%																																																																	
Trp (W)	0	0.0%																																																																	
Tyr (Y)	0	0.0%																																																																	
Val (V)	8	5.9%																																																																	
Pyl (O)	0	0.0%																																																																	
Sec (U)	0	0.0%																																																																	
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTCGCACCGCAGTACTGCAGCGACGACGTTCCCGCTCTCTGGTCCACTGCATCAC AGTTCCTCGGATTGCAGAAGGACATTGTGGAGCTGCTAACGCAATCGAATACGGCGCG GCCATCGAGCTGGGCAACCTGCTGACCAGCCATGAAATGGAGGGTCTGCTACTGGCCAC GATCGCATTGCCAATCACACGGATGGCAGCCCTCGCCAACGCCACGCCCACTCCGGCA ATTGGAGCGCGCACGGATCGACACTCAGCAGTCCGGTGGCTGGACCAAGAGAAATCTA GGTATGGTGGTACCCCGGTGCACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTAA																																																																		

Proteinname	Sdt-L27N+C (542-773 AS, Sdt-M) in pQE-30 Xa																																																																			
Molekulargewicht	28441.9																																																																			
Anzahl der Aminosäuren	266																																																																			
Theoretischer pI	9.34																																																																			
Extinktionskoeffizient	4470 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm																																																																			
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSGIEG RPDSEIKKYQE QLRRRREEEE RIAQQNEFLR NSLRGSRKLK ALQDTATPGK AVAQQQQAT LATQVVGVEN EAYLPDEDQP QAEQIDGYGE LIAALTRLQN QLSKSGSLSTL AGRVSAHSV IASASVAHVI AARTAVLQRR RSRVSGPLHH SSLGLQKDIV ELLTQSNTAA AIELGNLLTS HEMEGLLLAH DRIANHTDGT PSPTPTTPA IGAATGSTLS SPVAGPKRNL GMVVVPRVDL QPSLIS-																																																																			
Domänen	L27N 626-682 GYGELIA ALTRLQNQLS KSGSLTLAGR VSAHSVLAAS ASVAHVLAAR TAVLQRRRSR L27C 688-743 HHSSL GLQKDIVELL TQSNTAAIE LGNLLTSHEM EGLLLAHTRI ANHTDGTSPSP T																																																																			
Aminosäuren-Verteilung	<table> <tbody> <tr><td>Ala (A)</td><td>29</td><td>10.9%</td></tr> <tr><td>Arg (R)</td><td>20</td><td>7.5%</td></tr> <tr><td>Asn (N)</td><td>8</td><td>3.0%</td></tr> <tr><td>Asp (D)</td><td>9</td><td>3.4%</td></tr> <tr><td>Cys (C)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Gln (Q)</td><td>20</td><td>7.5%</td></tr> <tr><td>Glu (E)</td><td>16</td><td>6.0%</td></tr> <tr><td>Gly (G)</td><td>22</td><td>8.3%</td></tr> <tr><td>His (H)</td><td>13</td><td>4.9%</td></tr> <tr><td>Ile (I)</td><td>10</td><td>3.8%</td></tr> <tr><td>Leu (L)</td><td>31</td><td>11.7%</td></tr> <tr><td>Lys (K)</td><td>8</td><td>3.0%</td></tr> <tr><td>Met (M)</td><td>3</td><td>1.1%</td></tr> <tr><td>Phe (F)</td><td>1</td><td>0.4%</td></tr> <tr><td>Pro (P)</td><td>14</td><td>5.3%</td></tr> <tr><td>Ser (S)</td><td>26</td><td>9.8%</td></tr> <tr><td>Thr (T)</td><td>17</td><td>6.4%</td></tr> <tr><td>Trp (W)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Tyr (Y)</td><td>3</td><td>1.1%</td></tr> <tr><td>Val (V)</td><td>16</td><td>6.0%</td></tr> <tr><td>Pyl (O)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Sec (U)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> </tbody> </table>		Ala (A)	29	10.9%	Arg (R)	20	7.5%	Asn (N)	8	3.0%	Asp (D)	9	3.4%	Cys (C)	0	0.0%	Gln (Q)	20	7.5%	Glu (E)	16	6.0%	Gly (G)	22	8.3%	His (H)	13	4.9%	Ile (I)	10	3.8%	Leu (L)	31	11.7%	Lys (K)	8	3.0%	Met (M)	3	1.1%	Phe (F)	1	0.4%	Pro (P)	14	5.3%	Ser (S)	26	9.8%	Thr (T)	17	6.4%	Trp (W)	0	0.0%	Tyr (Y)	3	1.1%	Val (V)	16	6.0%	Pyl (O)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%
Ala (A)	29	10.9%																																																																		
Arg (R)	20	7.5%																																																																		
Asn (N)	8	3.0%																																																																		
Asp (D)	9	3.4%																																																																		
Cys (C)	0	0.0%																																																																		
Gln (Q)	20	7.5%																																																																		
Glu (E)	16	6.0%																																																																		
Gly (G)	22	8.3%																																																																		
His (H)	13	4.9%																																																																		
Ile (I)	10	3.8%																																																																		
Leu (L)	31	11.7%																																																																		
Lys (K)	8	3.0%																																																																		
Met (M)	3	1.1%																																																																		
Phe (F)	1	0.4%																																																																		
Pro (P)	14	5.3%																																																																		
Ser (S)	26	9.8%																																																																		
Thr (T)	17	6.4%																																																																		
Trp (W)	0	0.0%																																																																		
Tyr (Y)	3	1.1%																																																																		
Val (V)	16	6.0%																																																																		
Pyl (O)	0	0.0%																																																																		
Sec (U)	0	0.0%																																																																		
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGCCTGACAGCATCAAGAAATACCAGGAGCAACTGCGCCGACGACGCGAGGAGGAGGAG CGCATAGCGCAGCAAAATGAATTCCTGCGGAACAGTCTTCGTGGCTCCAGGAAGCTGAAG GCGCTTCAGGATACGGCTACGCCCGTAAAGCGGTGCCCCAGCAGCAGCAGCAGGCAACG CTGGCCACCCAGGTGGTTGGCGTGGAGAATGAGGCATATCTGCCCGACGAAGACCAGCCG CAGGCGGAACAGATCGATGGCTATGGCGAACTGATAGCGGCCCTTACCCGCTGCAAAAC CAGCTGAGCAAGAGCGGACTGAGCACGCTGGCGGGTCCGCTTTCGGCCGCCACAGTGTG CTGGCCAGCGCCAGTGTGGCCATGTCTGGCCGCTCGCACCCGAGTACTGCAGCGACGA CGTTCGCCGCTCTCTGGTCCACTGCATCACAGTTCCTCGGATTGCAGAAGGACATTGTG GAGCTGCTAACGCAATCGAATACGGCGGGCGCCATCGAGCTGGGCAACCTGCTGACCAGC CATGAAATGGAGGCTGCTACTGGCCACGATCGCATTGCCAATCACACGGATGGCAGC CCCTCGCCAACGCCACGCCACTCCGGCAATTGGAGCGGCACGGGATCGACACTCAGC AGTCCGGTGGCTGGACCAAGAGAAATCTAGGTATGGTGGTGGTACCCCGGTCGACCTG CAGCCAAGCTTAATTAGCTAA																																																																			

Proteinname	Sdt-L27N-PDZ (542-944 AS, Sdt-L) in pQE-30 Xa
Molekulargewicht	45643.7
Anzahl der Aminosäuren	434
Theoretischer pI	7.31
Extinktionskoeffizient	6085 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MRGSHHHHHH GSGSGSIEG RPDSTKKYQE QLRRRREEEE RIAQQNEFLR NSLRGSRKLK ALQDTATPGK AVAQQQQAT LATQVVGVEN EAYLPDEDQP QAEQIDGYGE LIAALTRLQN QLSKSGLSTL AGRVSAHSV LASASVAHVL AARTAVLQRR RSRVSGPLHH SSLGLQKDIV ELLTQSNATA AIELGNLLTS HEMEGLLLAH DRIANHTDGT PSPTPTPTPA IGAATGSTLS SPVAGPKRNL GMVVPPVVPV PPLAQRGAMP LPRGESPPPV FMPPLATMPM SMPVNLPMISA CFGTLNDQND NIRIIQIEKS TELGATVRN EGEAVVIGRI VRGGAAEKSG LLHEGDEILE VNGQELRGKT VNEVCALLGA MQGTLTFLIV PAGESPPSVGV MGGTTGSQLA GLGGAHRDTA VLHVRYPGST CSA-
Domänen	L27N 626-682 GYGELIA ALTRLQNQLS KSGSLTLAGR VSAHSVLAAS ASVAHVLAAR TAVLQRRSR L27C 688-743 HHSSL GLQKDIVELL TQSNATAAIE LGNLLTSHEM EGLLLAHDR I ANHTDGTSPSP T PDZ 842-912 P LGATVRNEGE AVVIGRIVRG GAAEKSGLLH EGDEILEVNG QELRGKTVNE VCALLGAMQG TLTFLIVPAG
Aminosäuren-Verteilung	Ala (A) 44 10.1% Arg (R) 28 6.5% Asn (N) 15 3.5% Asp (D) 12 2.8% Cys (C) 3 0.7% Gln (Q) 26 6.0% Glu (E) 27 6.2% Gly (G) 45 10.4% His (H) 16 3.7% Ile (I) 17 3.9% Leu (L) 46 10.6% Lys (K) 11 2.5% Met (M) 11 2.5% Phe (F) 3 0.7% Pro (P) 34 7.8% Ser (S) 34 7.8% Thr (T) 28 6.5% Trp (W) 0 0.0% Tyr (Y) 4 0.9% Val (V) 30 6.9% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%
DNA-Sequenz	ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGA AGGCCTGACAGCATCAAGAAATACCAGGAGCAACTGCGCCGACGACGCGAGGAGGAGGAG CGCATAGCGCAGCAAAATGAATTCTGCGGAACAGTCTTCGTGGCTCCAGGAAGCTGAAG GCGCTTCAGGATACGGCTACGCCCGTAAAGCGGTTGCCAGCAGCAGCAGCAGGCAACG CTGGCCACCCAGGTGGTTGGCGTGGAGAAATGAGGCATATCTGCCCGACGAAGACCAGCCG CAGGCGGAACAGATCGATGGCTATGGCGAACTGATAGCGGCCCTTACC CGCTGCAAAAC CAGCTGAGCAAGAGCGGACTGAGCACGCTGGCGGGTTCGCGTTTCGGCCGCCACAGTGTG CTGGCCAGCGCCAGTGTGGCCCATGTCTGGCCGCTCGCACCCGAGTACTGCAGCGACGA CGTCCCGCGTCTCTGGTCCACTGCATCACAGTTCCTCGGATTGCAGAAGGACATTGTG GAGCTGCTAACGCAATCGAATACGGCGCGGCCATCGAGCTGGGCAACCTGCTGACCAAGC CATGAAATGGAGGGTCTGCTACTGGCCACGATCGCATTGCCAATCACACGGATGGCCAGC CCCTCGCCAACGCCACGCCCACTCCGGCAATTGGAGCGGCGACGGGATCGACACTCAGC AGTCCGGTGGCTGGACCAAGAGAAATCTAGGTATGGTGGTGCACCGCCGCTGGTACCA CCGCCACTGGCGCAACCGGAGCAATGCCACTGCCTCGCGGGGAGTCCGCCACCGCCGGTT CCCATGCCACCACTGGTACAATGCCCATGTCCATGCCCGTTAATCTGCCGATGAGTGGC TGCTTTGGCAGCTAAACGATCAGAACGACAACATTGATATCATCCAGATCGAGAAGTCA ACGGAGCCGCTGGCGCCACAGTGCACAACGAGGGTGAGGCGGTGGTTCATCGGTAGGATT GTGCGTGGTGGAGCGCGGAGAGTGGGACTGTTGCACGAAGGTGATGAGATACTGGAG GTCAACGGTCAGGAGTTGCGTGGCAAGACGGTGAACGAAGTGTGCGCCCTGTGGGCGCC ATGCAAGGCACCCTGACCTTCCTGATCGTCCCAGCGGGTAGTCCACCGTCCGTCGGCGGT ATGGCGGAACAACGGGCACTCAACTGGCCGGTGGGTGGAGCACATCGTGACACCGCC GTGTTGACAGTACGGTACCCCGGGTGCACCTGCAGCCAAGCTTAA

Proteinname	Sdt-L27N-PDZ (542-944 AS, Sdt-L) in pET-51b(+)
Molekulargewicht	47939.1
Anzahl der Aminosäuren	454
Theoretischer pl	6.31
Extinktionskoeffizient	10095 M ⁻¹ cm ⁻¹ bei 280 nm
Protein-Sequenz	MASWSHPQFE KGADDDDKVP DPTSALEQVD SIKKYQEQLR RRREEERIA QQNEFLRNSL RGSRKLKALQ DTATPGKAVA QQQQATLAT QVVGVEVEAY LPDEDQPQAE QIDGYGELIA ALTRLQNLQSL KSGSLTLAGR VSAAHSVLAS ASVAHVLAAR TAVLQRRRSR VSGPLHHSSL GLQKDIVELL TQSNATAAIE LGNLLTSHEM EGLLLAHDR I ANHTDGTSPSP TPTPTPAIGA ATGSTLSSPV AGPKRNLGMV VPPPVVPPPL AQRGAMPLPR GESPPVPMP PLATMPMSMP VNLPMACFG TLNDQNDNIR IIQIEKSTEP LGATVRNEGE AVVIGRIVRG GAAEKSGLLH EGDEILEVNG QELRGKTVNE VCALLGAMQG TLTFILIVPAG SPPSVGVMMG TTGSQLAGLG GAHRDTAVLH VAAAGAPGFS SISAHHHHHH HHHH-
Domänen	L27N 626-682 GYGELIA ALTRLQNLQSL KSGSLTLAGR VSAAHSVLAS ASVAHVLAAR TAVLQRRRSR L27C 688-743 HHSSL GLQKDIVELL TQSNATAAIE LGNLLTSHEM EGLLLAHDR I ANHTDGTSPSP T PDZ 842-912 P LGATVRNEGE AVVIGRIVRG GAAEKSGLLH EGDEILEVNG QELRGKTVNE VCALLGAMQG TLTFILIVPAG
Aminosäuren-Verteilung	Ala (A) 51 11.2% Arg (R) 25 5.5% Asn (N) 15 3.3% Asp (D) 17 3.7% Cys (C) 2 0.4% Gln (Q) 27 5.9% Glu (E) 28 6.2% Gly (G) 41 9.0% His (H) 21 4.6% Ile (I) 17 3.7% Leu (L) 47 10.4% Lys (K) 13 2.9% Met (M) 11 2.4% Phe (F) 5 1.1% Pro (P) 36 7.9% Ser (S) 34 7.5% Thr (T) 28 6.2% Trp (W) 1 0.2% Tyr (Y) 3 0.7% Val (V) 32 7.0% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%
DNA-Sequenz	ATGGCAAGCTGGAGCCACCCGAGTTCCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGACAAGGTACCGGATCCGACGTCGGCATTGGAGCAGGT CGACAGCATCAAGAAATACCAGGAGCAACTGCGCCGACGACGCGAGGAGGAGCGCATAGCGCAGCAAAATGAATTCCTGCGGA ACAGTCTTCGTGGCTCCAGGAAGCTGAAGGCGCTTCAGGATACGGCTACGCCCGTTAAAGCGGTTGCCAGCAGCAGCAGCAGGCA ACGCTGGCCACCCAGGTGGTGGCGTGGAGAATGAGGCATATCTGCCCGACGAAAGACCAGCCGAGGCGGAAACAGATCGATGGCTA TGGCAACTGATAGCGGCCCTTACCCGCTGCAAAACAGCTGAGCAAGAGCGGACTGAGCAGCTGGCGGGTTCGCGTTTCGCGCG CCACAGTGTCTGCGCCAGCCAGTGTGGCCATGTCTGCGCCGCTCGCACCGCAGTACTGACGCGCAGCAGTTCCCGGCTCTCT GGTCCACTGCATCACAGTTCCTCGGATTCGAGAAGGACATTGTGGAGCTGCTAACGCAATCGAATACGGCGGGCCCATGAGCT GGGCAACCTGCTGACCAGCCATGAAATGGAGGGTCTGCTACTGGCCACGATCGCATGGCCAATCACACGGATGGCAGCCCTCGC CAACGCCACGCCACTCCGCAATGGAGCGGCGACGGGATCGACACTCAGCAGTCCGGTGGCTGGACCAAGAAATCTAGGT ATGGTGGTGCACCCCGCTGGTACCACCCCACTGGCGCAACGCGGAGCAATGCCACTGCCTCGCGGGGAGTCGCCACCCCGGT TCCATGCCACCACTGGCTACAATGCCATGTCCATGCCCGTTAATCTGCCGATGAGTGGCTGCTTGGCAGCCTAAACGATCAGA ACGACAACATTCGTATCATCCAGATCGAGAAGTCAACGGAGCCGCTGGGCGCCACAGTGGCAGCAGGAGGTGAGGCGGTGGTCATC GGTAGATTGTGCGTGGTGGAGCGCGGAGAAGTCCGGACTGTTCACGAAAGTGATGAGACTGGAGGTCAACCGGTGAGGATT CGGTGGCAAGACGGTGAACGAAGTGTGCGCCCTGTTGGGCGCATGCAAGGCACCTGACCTTCCGATCGTCCACGCGGTTAGTC CACCATCCGTCGGCGTGATGGCGGAACAACGGGCACTCAACTGGCCGGTTGGGTGGAGCACATGTGACACCCCGCTGTTGCAC GTAGCGGCCCGCAGGAGTCCGGGCTTCTCCTCAATTTCCGCTCATCACCACCATCATCACCATCACCACCAATAAT