Untersuchung der Katalyseeigenschaften und strukturellen Dynamik von Proteinen und Proteinkomplexen mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Daniel Rohrbeck
aus Hilden

Düsseldorf, Mai 2014

aus dem Institut für
Molekulare Physikalische Chemie und Elektrochemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Claus A. M. Seidel
Korreferent: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 26. August 2014

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

_____ _____

Datum, Ort Unterschrift

Für meine Eltern,

die immer an mich geglaubt haben!

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Zusammenfassung

Die Funktionalität von Proteinen ist abhängig von Struktur und Flexibilität. Diese befinden sich dabei in einer kontinuierlichen Bewegung zwischen verschiedenen konformellen Zuständen vergleichbarer Energien. Bestimmte Trigger, wie Liganden, beeinflussen dieses Gleichgewicht, indem sie konformelle Strukturänderungen des Proteins induzieren. Grundlegende Proteindynamiken sind die Scharnier- und Scherbewegungen, jedoch existieren auch komplexere Bewegungsabläufe, wie Domäneninteraktionen mit verschiedenen aktiven Zentren oder partieller Entfaltung. Untersuchungen dieser konformellen Änderungen und deren Dynamik liefern Rückschlüsse auf den funktionellen Ablauf. Für diese Arbeit wurde mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden die strukturelle Dynamik von Proteinen an vier verschiedenen Modellsystemen untersucht.

Ein Vertreter der Liganden-induzierten Scharnierbewegung ist die homodimere Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus dem hyperthermophilen *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT). Es wurden Cystein-Proteinvarianten zur Fluoreszenzmarkierung gefunden, die ein dynamisches Proteinkonstrukt aufzeigten. Die Magnesium-induzierte Scharnierbewegung des Enzyms liegt bei Raumtemperatur im Mikrosekunden-Bereich und wurde mit einer Kombination aus *Photon Distribution Analysis* und Fluoreszenzkreuzkorrelation verifiziert. Somit war es möglich, ein dynamisches Modell der Katalyse für ssAnPRT zu entwickeln.

Die Nukleotid-bindende Domäne (NBD) des aus *Lactococcus lactis* stammenden integralen Membranproteins *Lactococcal multidrug resistance protein A* (LmrA) ist ein weiterer Vertreter von Proteinen der Scharnierbewegung. Zudem wurde für die Transmembran-Domäne (TMD) eine Scherbewegung vermutet. Dynamische Strukturänderungen während des Transportzyklus von Substraten konnten gezeigt werden. Ein Modell des Transportmechanismus ist weiterhin unbekannt.

Das *Postsynaptic Density Protein 95* (PSD-95) gehört zu den Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen. Aufgrund seiner Eigenschaft als Gerüstprotein ist es ein hochdynamisches Proteinkonstrukt, dessen vernetzende Eigenschaften mit anderen Proteinen ein wichtiges Element der Signaltransduktion ist. Mit Hilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie und der damit assoziierten Spezies-selektiven Fluoreszenzkreuzkorrelation konnte die Proteindynamik quantifiziert und ein Modell der Domänenverknüpfungen etabliert werden.

Im letzten Teilprojekt wurde am Lysozym des T4 Phagen der strukturelle und dynamische Entfaltungsprozess untersucht. Während der Harnstoff-induzierten Denaturierung konnten Intermediatzustände nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden Hinweise auf den sogenannten *„communication link“* zwischen Helix A und E der N- und C-terminalen Subdomänen gefunden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei vollständiger Denaturierung das Protein nicht strukturlos ist, sondern eine neue Sekundär-strukturlose Tertiär- oder Quartärstruktur existiert.

Summary

The functionality of proteins depends on the structure and flexibility. They are thereby a part of a continuous movement between different conformational states of comparable energies. Certain triggers, such as ligands, influence this balance by inducing conformational structural changes of the protein. Basic protein dynamics are the hinge and shear motions, although more complex movement sequences such as domain interactions with different active centres or partial unfolding exist.

The analysis of these conformational changes und their dynamics allows for conclusions about the functional process. For the analysis the structural dynamics of proteins has been analysed with fluorescence spectroscopic methods in four different model systems.

One representative of the ligands induced hinge motion is the homodimeric anthranilate phosphoribosyl transferase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT). Cysteine protein variants for fluorescent labelling were found, which indicate a dynamic protein construct. The magnesium induced hinge motion of the enzyme is in the range of microseconds at room temperature und was verified by a combination of Photon Distribution Analysis and Fluorecence-Crosscorrelation. Hence, it was possible to develop a dynamic model of the catalysis for ssAnPRT.

The nucleotide-binding domain (NBD) of the integral membrane protein Lactococcal multidrug resistance protein A (LmrA), which stems from *Lactococcus lactis*, is another representative of proteins of hinge motions. In addition to this, a shear motion was suspected for the transmembrane domain (TMD). Dynamic structural changes during the transport cyclus of the substrates could be shown. However, a model of the transport mechanism is still unknown.

The *postsynaptic density protein 95* (PSD-95) belongs to the membrane-associated guanylate kinases. Due to its characteristic as a scaffold protein it is a highly dynamic protein construct whose linking characteristic with other proteins is an important element of signal transduction. By means of the single molecule fluorescence spectroscopy and the species-selective fluorescence cross-correlation associated with it, the protein dynamic was quantified and a model of domain connections was established.

In the last sub-project the aim was to analyse the structural and dynamic unfolding process at the lysozyme of phage T4. During urea-induced denaturation intermediate states have

been suggested. Furthermore, indications of the so-called *"communication link"* between helix A and E of the N- and C-terminal sub-domains were detected. It has also been established that the protein is not without structure upon complete denaturing, as a new tertiary or quaternary structure without secondary structure exists.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I

Summary III

Inhaltsverzeichnis V

Abkürzungsverzeichnis IX

Abbildungsverzeichnis XI

Tabellensverzeichnis XV

1. Einleitung 1

1.1 Proteindynamik 3

1.2 Domänendynamik bei kurzen Linkern 7

1.2.1 Modellsystem I: Katalytische Konformationsänderungen der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase 7

1.2.2 Modellsystem II: Transportmechanismus des *Lactococcal Multidrug Resistance* Proteins *A* 11

1.3 Domänenbewegungen mit längeren Linkern 13

1.3.1 Modellsystem III: Strukturelle Linkerdynamik des *Postsynaptic Density* Proteins *95* 13

1.4 Strukturelle Dynamik bei chemisch-induzierter Entfaltung 16

1.4.1 Modellsystem IV: Lysozym des T4-Bakteriophagen 16

2. Theoretische Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie 18

2.1 Lumineszenz 18

2.2 Quantenmechanische Beschreibung der Fluoreszenz 19

2.3 Fluoreszenzquantenausbeute 20

2.4 Fluoreszenzlebensdauer 21

2.5 Förster Resonanz Energietransfer 22

2.5.1 Überlappungsintegral 23
2.5.2 Orientierungsfaktor 24
2.5.3 Förster-Radius und Transfereffizienz 25
2.6 Fluoreszenzanisotropie 27
3 Material und Methoden 32
3.1 Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden 32
3.1.1 Materialien 32
3.1.2 Übersicht der molekularbiologischen und Proteinchemischen Methoden 37
3.1.3 Spezieller Methodenteil für Modellsystem I: 50
Anthranilat- Phosphoribosyltransferase 50
3.1.4 Spezieller Methodenteil für Modellsystem IV: T4 Lysozym 59
3.2 Spektroskopische Methoden 66
3.2.1 Bestimmung der Protein- und Farbstoffkonzentration mit Spektralphotometrie 66
3.2.2 Sekundärstrukturanalyse mit Circulardichroismus 69
3.2.3 Methoden der Fluoreszenzspektroskopie 71
3.2.4 Simulation der Zugänglichkeit von gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen an Proteinen 97
4 Ergebnisse 101
4.1 Modellsystem I: Untersuchungen zur katalytischen Konformationsänderung der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase 101
4.1.1 Fluoreszenzmarkierung 101
4.1.2 Fluoreszenzquantenausbeuten des Akzeptors 104
4.1.3 Dynamik des Monomer-/Dimer-Gleichgewichtes der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase 104
4.1.4 Untersuchung der Konformationsänderung nach Substratzugabe 109

4.1.5 Kinetische und chromatographische Charakterisierung von ssAnPRT(N162C, K280C)DA ... 118

4.1.6 Erstellung neuer Varianten der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase ... 120

4.1.7 Untersuchung der Konformationsdynamik von ssAnPRT-S14C-S254C während der Katalyse ... 126

4.1.8 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchung von ssAnPRT(S14C, S254C) ... 129

4.1.9 Zusammenfassung ... 153

4.2 Modellsystem II: Untersuchung der konformalen Zustände des ABC-Transporters *Lactococcal Multidrug Resistance Protein A* ... 158

4.2.1 Fluoreszenzmarkierung von LmrA ... 158

4.2.2 Stabilisierung von LmrA mittels Detergenz ... 159

4.2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der verschiedenen Stadien des Transportmechanismus ... 161

4.2.4 Zusammenfassung ... 167

4.3 Modellsystem III: Untersuchungen zur strukturellen Dynamik von *Postsynaptic Density Protein 95* ... 170

4.3.1 Übersicht der untersuchten Domänen-Interaktionen in PSD-95 ... 170

4.3.2 Analyse der Messdaten ... 171

4.3.3 Computerunterstützte Untersuchung der lokalen Flexibilitäten der betrachteten Domänen ... 180

4.3.4 Analyse der Domänen-Dynamiken ... 182

4.3.5 Lokalisierung von PDZ3 relativ zu GuK und SH3 ... 192

4.3.6 Zusammenfassung ... 194

4.4 Modellsystem IV: Untersuchungen zur Proteinfaltung anhand von T4 Lysozym ... 198

4.4.1 Fluoreszenzmarkierung von T4L ... 198

4.4.2 Zirkularer Dichroismus bei verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen ... 199

4.4.3 Untersuchung der Strukturänderung mit Ensemble-Fluoreszenztitrationen ... 204

4.4.4 Untersuchung des Denaturierungsverlaufes der T4L-Variante S44pAcF+R119C mit eTCSPC 210

4.4.5 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchung der T4L-Variante S44pAcF+R119C(DA) 213

4.4.6 Zusammenfassung 215

5 Schlussbemerkung 221

6 Literaturverzeichnis 224

7 Danksagung 231

8 Anhang 233

8.1 DNA- und Proteinsequenzen 233

8.1.1 Primer 233

8.1.2 Plasmid- und Proteinsequenzen von ssAnPRT-Varianten 235

8.1.3 Plasmid- und Proteinsequenzen von T4L-Varianten 251

8.2 Abstände aus dem AV-Modell für ssAnPRT 254

8.3 Gleichungen 258

9 Veröffentlichungen und Manuskripte 259

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
A	Absorption
α	Crosstalk
A488	Alexa 488
A594	Alexa 594
A647	Alexa 647
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AS	Anthranilsäure
B_G	Hintergrundsignal der grünen Kanäle
B_R	Hintergrundsignal der roten Kanäle
bp	Basenpaar
c	Konzentration
c_n	Polynome der FRET-Linien
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	Rotationsdiffusionskoeffizient
DA-	Donor/Akzeptor- (FRET-Paar)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleic acid)*
dyn. L-korr.	dynamisch Linker korrigiert
E	Transfereffizienz
ε	Extinktionskoeffizient
E. coli	*Escherichia coli*
f	Korrekturfaktor
F	Fluoreszenz
F_A	Akzeptorfluoreszenz
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
F_D	Donorfluoreszenz
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
Φ_{FA}	Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptor
$\Phi_{FD(0)}$	Fluoreszenzquantenausbeute des Donorfluorophors ohne Akzeptor
g_G	Detektionseffizienz der grünen Kanäle
g_R	Detektionseffizienz der roten Kanäle
$G(t_C)$	Korrelationsfunktion
ΔG^0	freie Enthalpie
HF	highFRET (FRET mit hoher Transfereffizienz)
I	Intensität
IC	internal conversion
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
ISC	Intersystem crossing
J	spektrales Überlappungsintegral
k	Geschwindigkeitskonstante
kan	Kanamycin
κ^2	Orientierungsfaktor

l	Liter
LF	lowFRET (FRET mit kleiner Transfereffizienz)
LB-Medium	*lysogeny broth*-Medium
L_{Linker}	Linker-Länge
M	Molar
MFD	Multiparameterfluoreszenzdetektion
MF	middleFRET (FRET mit mittlerer Transfereffizienz)
n	Brechungsindex
N_A	Avogadro-Konstante
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
N-Terminus	Amino-Terminus
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
P	Wahrscheinlichkeitsverteilung
P_F	Fluoreszenzpolarisation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Probability Distribution Analysis
pdb	Proteindatenbank
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
PSD-95	Postsynaptic Density Protein 95
r	Anisotropie
ρ	Rotationskorrelationszeit
R_0	Förster-Radius
R_{DA}	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
R_{Dye}	Radius des Chromophors [Å]
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute
ρ	Rotationskorrelationszeit
s	Sekunde
S	Signal
S_n	Singulettzustände
SDS	Natriumdodecylsulfat
S_G	Signal in den grünen Kanälen
SMD	single molecule multiparameter fluorescence detection
smFRET	single molecule FRET
S_R	Signal in den roten Kanälen
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
t_d	Diffusionszeit
τ	Fluoreszenzlebensdauer in Nanosekunden
$\tau_{D(0)}$	Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Nanosekunden
$\tau_{D(A)}$	Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors in Nanosekunden
VHF	veryhighFRET lowFRET (FRET mit sehr hoher Transfereffizienz)
w_{Linker}	Linker-Breite

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die Ebenen der Proteinarchitektur 2
Abbildung 1-2: Formen der funktionalen Domänenbewegung in Proteinen. 4
Abbildung 1-3: Beschreibung der supertertiären Struktur 5
Abbildung 1-4: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Proteindynamiken 6
Abbildung 1-5: Aufbau einer Monomeruntereinheit der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase 8
Abbildung 1-6: Positionen der Substrate und *SAXS*-Konformationen des AnPRT-Homodimers 10
Abbildung 1-7: Möglicher Transportmechanismus in LmrA 12
Abbildung 1-8: Struktur des *Postsynaptic Density* Proteins *95* 14
Abbildung 1-9: Makromolekularer PSD-95-Komplex 15
Abbildung 1-10: Röntgenkristallstruktur von T4 Lysozym mit gebundenen Substrat 17
Abbildung 2-1: Jablonski-Diagramm 19
Abbildung 2-2: Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfers im Jablonski-Diagramm 22
Abbildung 2-3: Veranschaulichung des Überlappungsintegrals 23
Abbildung 2-4: Graphische Darstellung des Orientierungsfaktors κ^2 25
Abbildung 2-5: Graphische Darstellung der Transfereffizienz E in Abhängigkeit des Distanzverhältnisses R_{DA}/R_0 27
Abbildung 2-6: Prinzipielle Funktionsweise von Polarisationsmessungen. 28
Abbildung 2-7: Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit vom Winkel θ und Veranschaulichung der Verteilung der Übergangsdipolmomente 30
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion 38
Abbildung 3-2: Einbringen von Punktmutationen 39
Abbildung 3-3: Prinzip der *overlap extension* PCR 40
Abbildung 3-4: Prinzip der Elekrophorese zur Mengen- und Größenbestimmung von Biomolekülen 41
Abbildung 3-5: Prinzip der Integration von künstlichen Aminosäuren in die T4L-Proteinstruktur 45
Abbildung 3-6: Chromatographische Verfahren. 47
Abbildung 3-7: Kopplungsmöglichkeiten von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine. 49
Abbildung 3-8: Plasmid-Karte des pQE40-Vektors. 50
Abbildung 3-9: Eluat-Säule-Kreislauf zur Markierung von ssAnPRT 58
Abbildung 3-10 Plasmid-Karte von pET11a 59
Abbildung 3-11: Aufbau und Funktionsweise eines Zweistrahlabsorptionsphotometers 66
Abbildung 3-12: Absorptionsspektren einer ssAnPRT-Proteinvariante 67
Abbildung 3-13: Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie: Messaufbau und Spektren. 70
Abbildung 3-14: Apparativer Aufbau des Fluorimeters Fluorolog®-3 72
Abbildung 3-15: Prinzip der Zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) 75
Abbildung 3-16: Schematischer elektronischer Aufbau für die TCSPC 76
Abbildung 3-17: Experimenteller SMD-Aufbau und Datenregistrierung 79

Abbildung 3-18: Illustration von dynamischem PDA 88
Abbildung 3-19: Schematische Darstellung des Einflusses der Partikelgröße auf die Korrelationsfunktion 90
Abbildung 3-20: Einfluss der Partikelzahl im Detektionsvolumen auf die Korrelationsfunktion..... 91
Abbildung 3-21: Simulierte FCS-Kurve 92
Abbildung 3-22: Prinzip der Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie 95
Abbildung 3-23: Prinzip der Spezies-selektiven Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie 96
Abbildung 3-24: Parameter in der AV-Simulation 98
Abbildung 3-25: Veranschaulichung der Bestimmung des mittleren Abstandes zwischen Donor und Akzeptor-Farbstoff 99
Abbildung 4-1: Struktur und Fluoreszenzverhalten von *Bodipy® FL* 103
Abbildung 4-2: Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_{FA} mittels eTCSPC 104
Abbildung 4-3: Ermittlung der Dissoziationskonstanten von ssAnPRT(K280C)+A488 106
Abbildung 4-4 Untersuchung des dynamischen Monomerenaustausches anhand homodimerem ssAnPRT(S14C, S254C)DA ohne Substrate 108
Abbildung 4-5: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von ssAnPRT(E5C, K280C)DA unter Einzelmolekülbedingungen 110
Abbildung 4-6: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von homodimerem ssAnPRT(N162C, K280C)-DA 113
Abbildung 4-7: PDA der smFRET-Untersuchung von ssAnPRT(N162C, K280C)DA 116
Abbildung 4-8: PDA von unterschiedlichen Zeitfenstern der smFRET-Untersuchung von ssAnPRT(N162C, K280C)DA 117
Abbildung 4-9: Messung der enzymatischen Aktivität von ssAnPRT 119
Abbildung 4-10: Chromatographische Analyse von unmarkiertem ssAnPRT(N162C, K280C) 120
Abbildung 4-11: Expressionskontrolle einiger neuen ssAnPRT-Varianten mittels SDS-PAGE nach 18 Stunden Inkubation 121
Abbildung 4-12: Untersuchung der Hitzebeständigkeit der ssAnPRT-Doppelcystein-Varianten 122
Abbildung 4-13: Aufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C) ohne Hitzeschritt..... 123
Abbildung 4-14: Fehlerhafte Promotorsequenz im Expressionsvektor pQE40 124
Abbildung 4-15: Expression und Aufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C)..... 125
Abbildung 4-16: Simulation des zugänglichen Volumens von Fluoreszenzfarbstoffen an ssAnPRT-S14C-S254C126
Abbildung 4-17: Vergleich von offener und geschlossener ssAnPRT(S254C)DA-Konformation..... 127
Abbildung 4-18: Zuordnung der unter Einzelmolekülbedingungen identifizierten Fluoreszenzpopulationen in S14C-S254C(A488; A647) 130
Abbildung 4-19 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchungen von ssAnPRT(S14C, S254C)DA 132
Abbildung 4-20: PDA der smFRET-Untersuchung von ssAnPRT(S14C, S254C)DA..... 134
Abbildung 4-21: PDA-Zeitfensteranalyse von ssAnPRT(S14C, S254C)DA 136
Abbildung 4-22 Fluoreszenz(kreuz)korrelation von ssAnPRT(S14C, S254C)DA unter verschiedenen Substratbedingungen..... 139
Abbildung 4-23 Vergleich der enzymatischen Aktivität von ssAnPRT(S14C, S254C) bei unterschiedlichen Temperaturen..... 141

Abbildung 4-24 Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von ssAnPRT(S254C)DA 143
Abbildung 4-25 Dynamische PDA von ssAnPRT(S254C)DA mit festen Relaxationszeiten 146
Abbildung 4-26 Dynamische PDA als Drei-Zustandsmodell von ssAnPRT(S254C)DA 148
Abbildung 4-27 Geometrische Struktursimulation von ssAnPRT(S254C)DA 150
Abbildung 4-28 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchungen von monomerem ssAnPRT(S14C, I36E, M47D,S254C)DA 152
Abbildung 4-29 Zusammenfassung der kinetischen Beschreibung des Katalyseweges von ssAnPRT 156
Abbildung 4-30: Fluoreszenzmarkierung an LmrA 159
Abbildung 4-31: Untersuchung der Affinität der Fluoreszenfarbstoffe zum Detergenz und zu wildtypischen LmrA mit smFRET 160
Abbildung 4-32: Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung an LmrA(S282C)DA 163
Abbildung 4-33: Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung an LmrA(A573C)DA 166
Abbildung 4-34: Integration eines integralen Membranproteins in ein nanoskalides Phospholipid-Doppelschichtsystem 169
Abbildung 4-35: Schematische Zeichnung von PSD-95 171
Abbildung 4-36: Datenaufbereitung der MFD(PIE)-Messungen anhand PSD-95(S510C, K591C)DA 172
Abbildung 4-37: Fluoreszenzanisotropie (PIE) des an PSD-95 gekoppelten Akzeptorfluoreszenzfarbstoffes 174
Abbildung 4-38: Selektion der Photonen für die Generierung der SCCF für die PIE-Messungen 179
Abbildung 4-39: Bestimmung lokaler Flexibilitäten von PSD-95 durch simulierte thermische Entfaltung 181
Abbildung 4-40: Analyse der Dynamiken zwischen den PDZ-Domänen 2 und 3 183
Abbildung 4-41: Analyse der Dynamiken zwischen PDZ3 und SH3 185
Abbildung 4-42: Analyse der Dynamiken zwischen PDZ3 und GuK 187
Abbildung 4-43: Analyse der Dynamiken zwischen SH3 und GuK (PSD-95(S510C+K591C)DA) 189
Abbildung 4-44: Analyse der Dynamiken zwischen SH3 und GuK (PSD-95(H477C+K591C)) 191
Abbildung 4-45: Fluoreszenzmarkierungspositionen der PSD-Varianten zur Bestimmung der *loop*-Dynamik .. 191
Abbildung 4-46: Lokalisierung der PDZ 3-Domäne relativ zu den Domänen GuK und SH3 193
Abbildung 4-47: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen 195
Abbildung 4-48: Modellsysteme für dynamische FRET-Zustände 197
Abbildung 4-49: Fluoreszenzmarkierung von T4L 199
Abbildung 4-50: Bestimmung der Elliptizität von wildtypischen T4L mittels Zirkular-Dichroismus 200
Abbildung 4-51: Mathematische Anpassung des sigmoidalen Verlaufs der Messdaten aus Abbildung 4-50 B . 201
Abbildung 4-52: Vergleich der Elliptiztäten zwischen fluoreszentmarkiertem und unmarkiertem T4L(S44pAcF, R119C) 202
Abbildung 4-53: Zweistufiger Denaturierungsprozess in T4L(R8pAcF, P86C) 203
Abbildung 4-54: Überprüfung der Qualität des Homogenisierungsvorganges 205
Abbildung 4-55: Einfluss des Harnstoff-haltigen Probenpuffers auf das Fluoreszenzsignal 206
Abbildung 4-56: Einfluss des Harnstoff-haltigen Probenpuffers auf die Helligkeit der Fluorophore von T4L(S44pAcF, R119C)DA 208

Abbildung 4-57: Untersuchung auf mehrere struktureller Zustände in T4 Lysozym mit Ensemble-Fluoreszenztitration. 209
Abbildung 4-58: Spektroskopische Daten aus eTCSPC von T4L(S44pAcF, R119C)DA 212
Abbildung 4-59: Untersuchung des Entfaltungsprozesses von T4L(S44pAcF, R119C)DA mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie 214
Abbildung 4-60: Stabilisierung von Helix A durch die C-terminale Subdomäne in T4L 217
Abbildung 4-61: Modellbeschreibung des Entfaltungsprozesses bei von T4L(S44pAcF, R119C)DA 219
Abbildung 4-62: Einfluss von Harnstoff auf Poly(N-isopropylacrylamid) 220

Tabellensverzeichnis

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien 32
Tabelle 3-2: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung 33
Tabelle 3-3: Verwendete *Lifescience*-Produkte 34
Tabelle 3-4: Verwendete *E.coli*-Bakterienstämme mit Genotyp 34
Tabelle 3-5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele 43
Tabelle 3-6: Spektroskopische Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe 48
Tabelle 3-7: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für das Kontrollplasmid *pWhitescript 4.5-kb* und pQE40-ssAnPRT 51
Tabelle 3-8: Reaktionsparameter für den PCR-Automaten für das Einbringen von Punktmutationen in pQE40-AnPRT (WPA) 52
Tabelle 3-9: Einstellungen am FPLC-System *Äkta Prime plus* der Firma GE Healthcare für die Aufreinigung von Varianten der Anthranilat-Phosphoribosytransferase 56
Tabelle 3-10: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für das Einbringen von Mutationen in T4-Lysozym 60
Tabelle 3-11: Reaktionsparameter für den PCR-Automaten (WPA) 60
Tabelle 3-12: Zusammensetzung den Fragment-PCR-Ansatz für die T4L-Variante R8Amber 61
Tabelle 3-13: Reaktionsparameter für die Fragment-PCR für die T4L-Variante R8Amber 61
Tabelle 3-14: Zusammensetzung den Hybrid-PCR-Ansatz für die T4L-Variante R8Amber 62
Tabelle 3-15: Reaktionsparameter für die Hybrid-PCR für die T4L-Variante R8Amber 62
Tabelle 3-16: Parameter für *Äkta Prime plus* der Firma GE Healthcare für die Aufreinigung von T4L-Varianten 64
Tabelle 3-17: Homogenisierungs- und Titrationsprozedur für Denaturierungsstudien mit Hilfe der Ensemble-Fluoreszenztitration 74
Tabelle 3-18: Referenz-Fluoreszenzquantenausbeuten. 77
Tabelle 3-19 Kalibriermessungen für die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie 80
Tabelle 3-20: Parameter für die AV-Simulation. 98
Tabelle 4-1 Ergebnis der Fluoreszenzmarkierung verschiedener ssAnPRT-Varianten je Protomer 102
Tabelle 4-2 Fluoreszenzmarkierung von ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. 102
Tabelle 4-3: Berechnung des C_β-Abstandes und der simulierten Abstandsänderung zwischen offener und geschlossender Konformation aus dem AV-Modell in ssAnPRT(N162C, K280C) 111
Tabelle 4-4 Parameter für die Photon Distribution Analysis (PDA) der Analysen aus Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 118
Tabelle 4-5: Neu generierte Cystein-Varianten der Anthranilat-Phosphoribosytransferase 121
Tabelle 4-6 Proteinausbeute verschiedener ssAnPRT-Varianten nach vollständiger Aufreinigung. 124
Tabelle 4-7: Quantifizierung der simulierten Abstandsänderung im AV-Modell zwischen offener und geschlossener Konformation in ssAnPRT(S14C, S254C) 128
Tabelle 4-8: Fluoreszenzlebensdauern von LmrA(S282C)DA aus eTCSPC 161

Tabelle 4-9: Fluoreszenzlebensdauern von LmrA(A573C)DA aus eTCSPC 165
Tabelle 4-10: Ermittelte Fluoreszenzlebensdauern und -quantenausbeuten aus seTCSPC 176
Tabelle 4-11: Ermittelte Fluoreszenzlebensdauern und -quantenausbeuten aus eTCSPC 177
Tabelle 4-12: Bestimmung der FRET-Abstände aus eTCSPC 192
Tabelle 4-13: Zusammenfassung der Übergangsparameter von T4L(R8pAcF, P86C) nach Street et al. (2008) .. 204
Tabelle 4-14: Fluoreszenzlebensdauern der T4L-Variante S44pAcF+R119C(DA) aus eTCSPC der Proben für die Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchung bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen 210
Tabelle 8-1: Verwendete Primer für die Erstellung neuer ssAnPRT-Varianten 233
Tabelle 8-2: Verwendete Primer für die Erstellung von T4L-Varianten 234
Tabelle 8-3: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 254
Tabelle 8-4: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 254
Tabelle 8-5: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 254
Tabelle 8-6: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 255
Tabelle 8-7: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 255
Tabelle 8-8: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 255
Tabelle 8-9: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 256
Tabelle 8-10: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 256
Tabelle 8-11: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 256
Tabelle 8-12: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell 257

1. Einleitung

Proteine erfüllen eine Vielzahl an biologischen Funktionen. Diese aus Aminosäuren aufgebauten Makromoleküle katalysieren chemische Reaktionen, transportieren Ionen und Moleküle, erkennen Botenstoffe, werden für die Signaltransduktion eingesetzt oder dienen dem Aufbau biologischer Strukturen. Aufgrund der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der für den Aufbau der Proteinstruktur verantwortlichen Aminosäuren lassen sich daher „biomolekulare Maschinen" für jeden Funktionsbereich eines biologischen Organismus generieren. Die Sequenz der unterschiedlichen Aminosäuren wird *Primärstruktur* des Proteins genannt. Aufgrund von Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander erhält das Protein seine räumliche Struktur. Die *Sekundärstruktur* beschreibt dabei die lokale räumliche Anordnung der Aminosäurereste. Die bevorzugten Strukturen sind dabei die α-Helix und das β-Faltblatt, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Stickstoff der Aminogruppe und des Carbonyl-Sauerstoffs stabilisiert werden. Unter der *Tertiärstruktur* versteht man hingegen die räumliche Anordnung der gesamten Polypeptidkette. Ihr stabilisierender Effekt beruht auf nichtkovalente Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte, Salzbrücken, Wasserstoffbrücken) und dem sogenannten *hydrophoben Effekt*. Da sich die Wasser-Moleküle nicht am Netzwerk der Wasserstoffbrücken des Proteins beteiligen können, formieren sie sich in Lösung um das Proteingerüst herum. Der damit eintretende Entropieverlust durch die erhöhte Ordnung des Wassers wird durch die Aggregation von hydrophoben Seitenketten im Protein weitgehend kompensiert. Aus diesem Grund sind die hydrophoben Reste der Aminosäure meistens im Inneren des Proteins angeordnet, während sich die polaren Reste in Richtung der Proteinoberfläche zeigen. Einige Proteine bestehen aus mehreren Monomeruntereinheiten, deren Anordnung als *Quartärstruktur* zusammengefasst wird. Wasserstoffbrücken und kovalente Disulfidbrücken stabilisieren diese Komplexe.

Mit dieser Einteilung in *Primär-, Sekundär-, Tertiär-* und *Quartärstruktur* wurde eine einfache Begriffsbildung etabliert, um generelle Eigenschaften, sowie Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Proteinstrukturen zu beschreiben. Fortschritte in der Strukturbiologie zeigen jedoch, dass diese Ausdrucksweise nicht das volle Spektrum an Proteinstrukturen zeigt. Insbesondere sei hier die „*supertertiary structure*" (engl., „*Supertertiäre Struktur*") bei

komplexen Multidomänen- und *intrinsically disordered*-Proteinen („*intrinsic disorder*“, engl., „*innere Unordnung*“) erwähnt Diese sind charakterisiert durch ein Ensemble verschiedener Domänenkonformationen und ungeordneten *Linker*-Regionen, deren Dynamik mit ihrer Funktionalität einhergehen (Tompa; 2012).

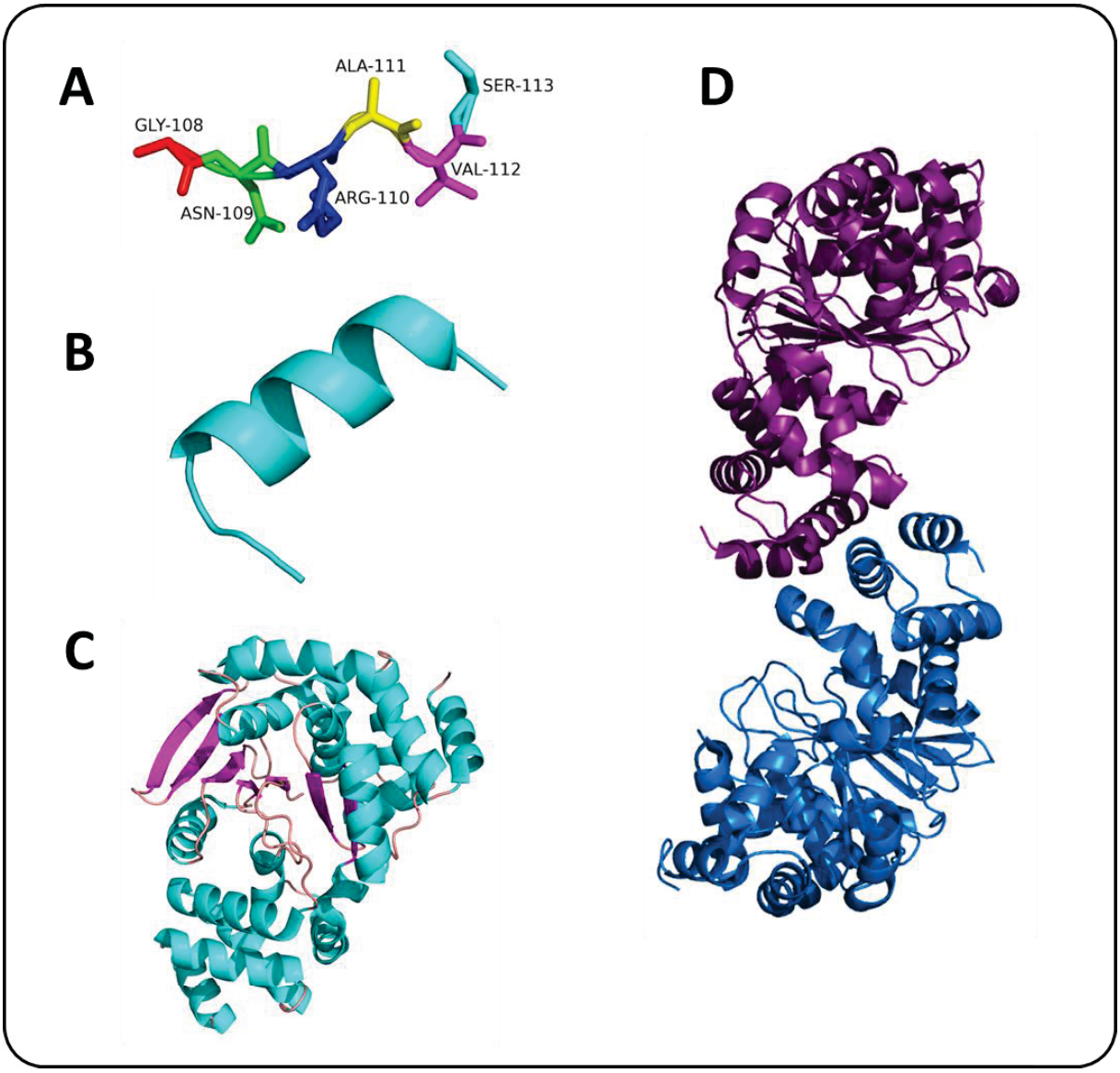


Abbildung 1-1: Die Ebenen der Proteinarchitektur. Dargestellt sind Primär-(A), Sekundar-(B), Tertiär-(C) und Quartärstruktur (D) der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (ssAnPRT). Als Senkundärstruktur (B) wurde Beispielhaft eine α-Helix dargestellt. Die verschiedenen Sekundärstrukturen sind in der Tertiärstruktur (C) farblich hervorgehoben. Wie aus (D) erkennbar, existiert AnPRT in *Sulfolobus solfataricus* als Homodimer.

Proteine sind daher keine statischen, sondern dynamische Systeme (Frauenfelder, *et al.*; 1991). Mit Hilfe der Röntgenkristallographie sind viele Proteine in ihrer Struktur bekannt, die molekularen Abläufe infolge ihrer dynamischen Funktionalität sind aber weitgehend ungeklärt. Daher hat sich diese Arbeit schwerpunktmäßig mit der Untersuchung der

verschiedenen Arten der Proteindynamik beschäftigt. Um Proteine bei ihrer Arbeit auf molekularer Ebene betrachten zu können, sind simultane Beobachtungen aller beteiligten Atome in Raum und Zeit erforderlich. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie bietet hierfür einen Lösungsansatz. Mit ihrer Hilfe sollen konformelle Änderungen von Proteinstrukturen unter nativen und denaturierenden Bedingungen untersucht, sowie strukturelle Dynamiken identifiziert und quantifiziert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Arten der Proteinbewegung sind im folgenden Kapitel beschrieben.

1.1 Proteindynamik

Proteine können als Ensemble von kompakten hydrophoben Einheiten (vom Englischen „*compact hydrophobic units*“, *CHUs*) bezeichnet werden, die durch unstrukturierte Peptidketten (vom Englischen „*loops*“, engl.) miteinander verbunden sind (Teague; 2003). Diese *CHUs* wirken wie starre Körper (vom englischen „*rigid bodies*“), die sich in Bezug zueinander bewegen (Ma*, et al.*; 2002). Besitzt das Protein ein Liganden-bindendes Zentrum (aktives Zentrum), so besteht dieses meist aus mehreren aktiven Aminosäuresten, die sich vorwiegend in den *loops* oder über mehrere Domänen verteilt aufhalten. Die Energiebarriere zur Bindung des Liganden und der Übergänge zwischen den Proteinkonformationen sollte dabei möglichst gering sein. Dazu müssen Proteine Regionen der Instabilität aufweisen, damit die Enzymfunktion nicht beeinträchtigt wird (Shoichet*, et al.*; 1995).

Die (Liganden-induzierte) **Scharnierbewegung** (vom englischen „*hinge bending*“, Abbildung 1-2 A) ist eine weit verbreitete Art der funktionalen Konformationsänderung von Proteinen (Gerstein; 1994, Lesk*, et al.*; 1984, McCammon; 1984, Teague; 2003). Sie verläuft senkrecht zur Ebene der Domänengrenzfläche und kennzeichnet sich durch eine relativ große Veränderung des Hauptkettenwinkels für wenige Aminosäuren im Proteingerüst. Das aktive Zentrum für eine allosterische Modulation des Proteins befindet sich häufig in dieser „Scharnierregion“.

Eine weitere weit verbreitete Form der Konformationsänderung ist die (Liganden-induzierte) **Scherbewegung** (vom englischen „*shear motion*“, Abbildung 1-2 B), deren Domänenbewegung parallel zu den Grenzflächen verläuft. Die Scherbewegung resultiert durch eine Verkettung vieler kleiner Bewegungen von eng gepackten Domänen.

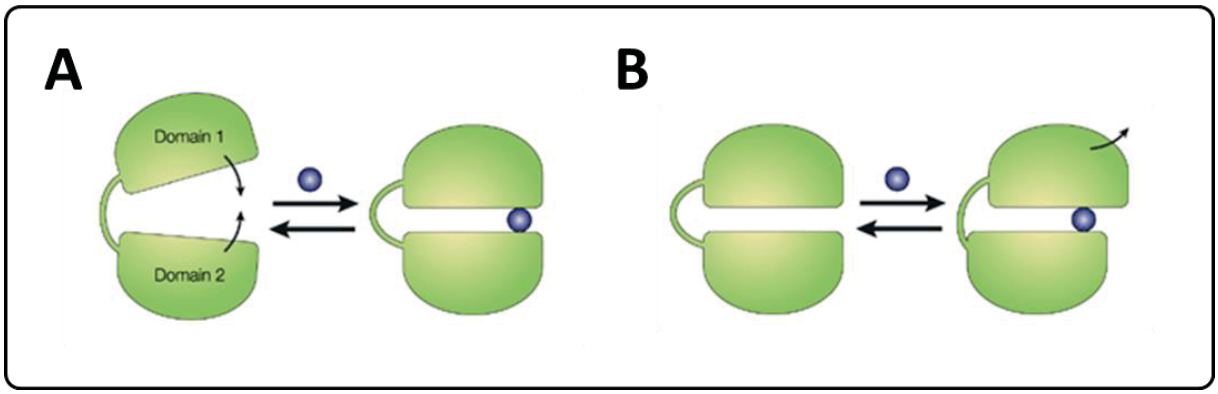


Abbildung 1-2: Formen der funktionalen Domänenbewegung in Proteinen. (A) Die Liganden-induzierte Scharnierbewegung verläuft senkrecht zur Ebene der Domänengrenzfläche. Die Scharnierregion wird dabei nur von wenigen Aminosäuren gebildet. **(B)** Die Liganden-induzierte Scherbewegung verläuft hingegen parallel zu den Grenzflächen und kennzeichnet sich durch mehrere kleine Bewegungen dichtgepackter Domänen. Abbildung aus Teague (2003), *Nature Reviews Drug Discovery*.

Gerüstproteine (vom Englischen „*scaffold proteins*“) unterscheiden sich in ihrer Funktionsweise von Enzymen, deren Dynamik durch kurze *Linker* hauptsächlich Scharnier- und Schwerbewegungen zuzuordnen ist. Sie dienen in erster Linie der Signaltransduktion, zum Beispiel bei der Weiterleitung von äußeren Reizen an der Zellmembran ins Zellinnere. Dabei können mehrere solcher Proteine zu einer Signalkaskade zusammengeschlossen und deren Signalübertragung verstärkt werden (Signalamplifikation). Die Dynamik der Gerüstproteine besteht aus einer Interaktion zwischen den im Protein befindlichen Domänen, die zusammen über meist langen *Linkern* ein **supertertiäres Strukturensemble** bilden (Tompa; 2012). Aufgrund dieser Eigenschaft sind mehrere native Zustände (N, N‘, N‘‘) des Proteins möglich (Abbildung 1-3). Daher unterscheidet sich die supertertiäre Struktur signifikant von der einfachen Tertiärstruktur mit einem nativen Zustand N, da diese nur durch eine Vielzahl an konformellen Zuständen beschrieben werden kann.

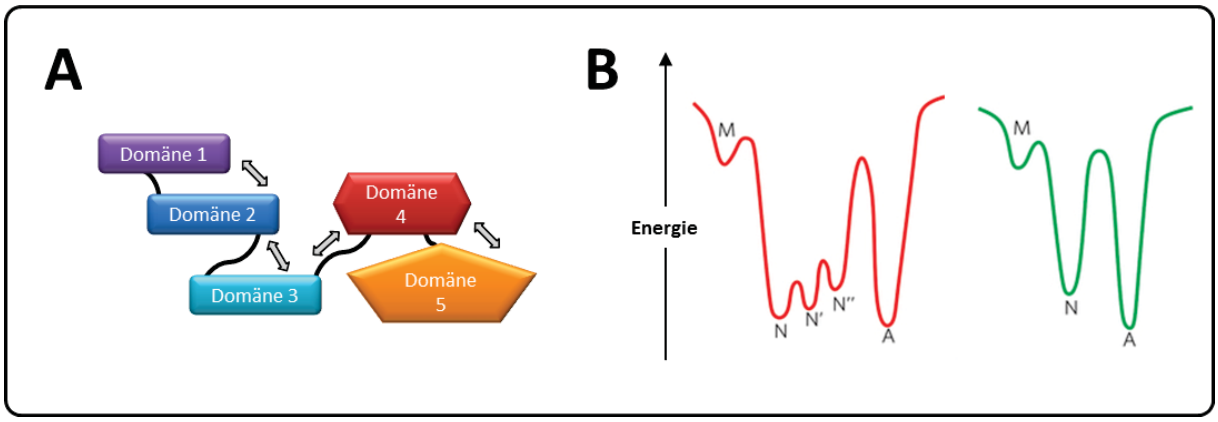


Abbildung 1-3: Beschreibung der supertertiären Struktur. (A) Gerüstproteine bestehen aus mehreren Domänen, die über *loops* miteinander verbunden sind. Durch die flexible Anordnung sind mehrere native Zustände des Proteins möglich. **(B)** Dadurch ergeben sich für Multidomänenproteine komplexere Energielandschaft für den Faltungsprozess mit mehreren nativen Energieminima (N, N‘, N‘‘, M: missgefaltendes Protein, A: Aggregat, roter Faltungstrichter), als in der klassischen Betrachtungsweise (grüner Faltungstrichter). Abbildung B aus Tompa (2012), *Nature Chemical Biology*.

Die **chemisch-induzierte Entfaltung** der Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Harnstoff oder Guanidiniumchlorid unterscheidet sich deutlich von den bereits erwähnten Strukturdynamik. Der Prozess der chemischen Denaturierung ist bis heute nicht vollständig geklärt, dennoch gibt es Hinweise auf stabilisierende Interaktionen des Denaturierungsmittels mit dem Proteinrückgrat (Sagle*, et al.*; 2009). Zudem werden Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid als chaotrope Substanzen, die geordnete Wasserstoffbrückenbindungen im Wasser stören, in Verbindung mit dem Denaturierungsprozess gebracht (Holz; 2004).

Die hier beschriebenen Formen der Proteindynamik wurden mit verschiedenen Modellproteinen in dieser Arbeit untersucht. Die Proteinsysteme und deren untersuchte Dynamik werden in den folgenden Kapiteln beschrieben. Eine Übersicht über die untersuchten Systeme ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

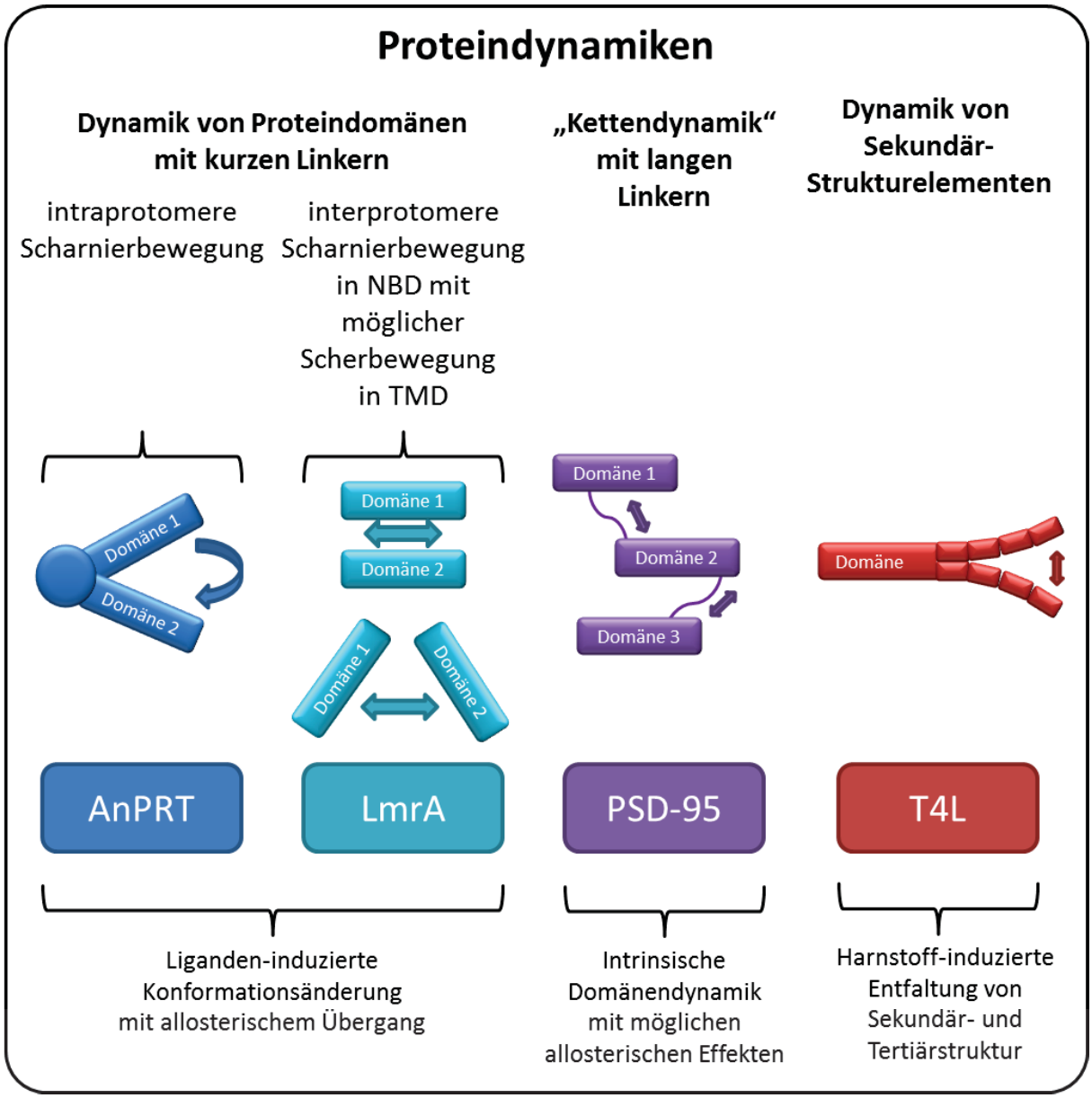


Abbildung 1-4: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Proteindynamiken. Zu den untersuchten Proteinen gehören die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT) aus *Sulfolobus solfataricus*, Lactococcal multidrug resistance protein A (LmrA) aus *Lactococcus lactis*, *Postsynaptic Density Protein 95* (PSD-95) aus der Gruppe der membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGuK) und das Lysozym des T4-Phagen (T4L).

1.2 Domänendynamik bei kurzen Linkern

1.2.1 Modellsystem I: Katalytische Konformationsänderungen der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

Fragestellung. Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT) aus dem hyperthermophilen *Sulfolobus solfataricus* (Brock*, et al.*; 1972) katalysiert innerhalb der Biosynthese des Tryptophans die Mg^{2+}-abhängige Übertragung der Ribose-5-Phosphateinheit aus 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) auf Anthranilat (AS) zu Phosphoribosyl-anthranilat (PRA) und Pyrophosphat (PP_i) (Sinha*, et al.*; 2001). Ausgehend von der Röntgenkristallstruktur (Abbildung 1-6 A und B) existieren zwei Bindetaschen für die Anthranilsäure, jedoch nur eine für das PRPP. Der Abstand zwischen dem C1-Atom der Riboseeinheit von PRPP und dem N-Atom der nächstgelegenen Anthranilsäure (AS I) beträgt 8,6 Å, der Abstand zu AS II beträgt sogar 14,6 Å. Beide Distanzen sind zu groß für eine nukleophile Substitutionsreaktion zwischen den beiden Edukten. Daher muss die Monomereinheit eine Strukturänderung vollziehen, um den Abstand zwischen den Substraten zu verringern. Aus *Small Angle X-Ray Scattering* (SAXS)-Messungen (Abbildung 1-6 C) wurde eine Form der „Scharnierbewegung“ vorhergesagt (Marino*, et al.*; 2006), die in diesem Teilaspekt dieser Arbeit untersucht wurde.

System. In Abbildung 1-5 A ist eine Röntgenkristallstruktur eines Protomers von ssAnPRT dargestellt (Ivens*, et al.*; 2001, Mayans*, et al.*; 2002). Diese Monomeruntereinheit besteht aus einer N-terminalen α-helikalen Domäne (α1 bis α4, α8 bis α9), gefolgt von einer C-terminalen α/ß-Domäne mit einem zentralem ß-Faltblatt (ß1 bis ß7) sowie einer Anordnung von α-Helices (α5 bis α7, α10 bis α15). Die Kopf-an-Kopf-Verknüpfung beider Monomeruntereinheiten erfolgt über die N-terminale α-helikalen Domäne durch die hydrophoben Reste der Helices α1, α3 und α8. Das aktive Zentrum des Proteins befindet sich zwischen den beiden Domänen in der sogenannten Scharnierregion (Abbildung 1-5 B), in der zwei Anthranilsäure-Moleküle (AS I und AS II) und PRPP lokalisiert werden konnten (Marino*, et al.*; 2006). Die Bindetaschen für die Anthranilsäure werden aus den Aminosäuren Asn-109, Ala-150, His-154, Met-157, und Arg-164 (erste Bindetasche, AS I), sowie aus Ala-78, Gly-79, His-107, Gly-108, Asn-109, Gly-177, und Pro-178 (zweite Bindetasche, AS II) gebildet. Die

Bindetasche für den PRPP/Magnesium-Komplex besteht aus Gly-79, Asp-83, Asn-89, Thr-92, Lys-106, Asp -223 und Glu-224.

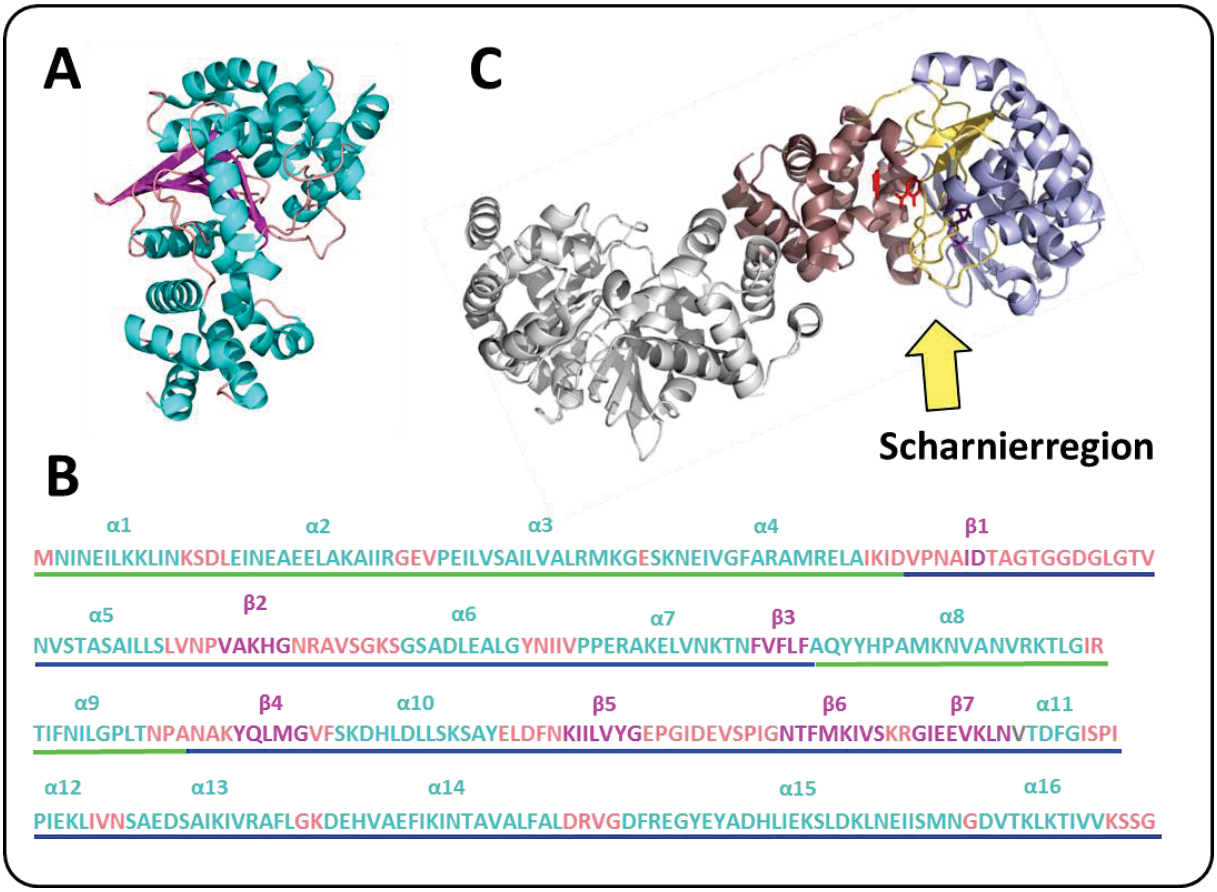


Abbildung 1-5: Aufbau einer Monomeruntereinheit der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (ssAnPRT). (A) Architektur der Sekundärstruktur (hellblau: α-Helix, violett: β-Faltblatt, hellrot: loop; PDB-ID: 1O17). **(B)** Proteinsequenz von ssAnPRT in der entsprechenden farblichen Kennzeichnung von (A). **(C)** Das Protomer besteht aus zwei Subdomänen (rotviolett und blauviolett), zwischen denen die Scharnierregion (hellgelb) lokalisiert ist.

Zielsetzung. Durch gezielte Mutagenese zur anschließenden Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels Thiol-Maleimid-Chemie über Cysteine wurde in dieser Arbeit die konformationelle Änderung während der Katalyse fluoreszenzspektroskopisch unter Einzelmolekülbedingungen (smFRET) untersucht. Zielsetzung dieses Teilbereiches ist das Auffinden einer geeigneten ssAnPRT-Cystein-Variante, die den Nachweis der Scharnierbewegung der Protomere erbringt. Zu diesem Zweck wurden ssAnPRT-Varianten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Sterner (Universität Regensburg), als auch auf eigens durch Punktmutation hergestellten Mutanten untersucht. Gleichzeitig wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie, und der damit einhergehenden Bestimmung der Diffusionszeiten der fluoreszenzmarkierten ssAnPRT-Varianten, der

Monomerisierungsprozess bei zunehmender Verdünnung erforscht (Rohrbeck; 2007). Eine Monomerisierung durch Änderung der Ladungsverhältnisse an der Kopf-an-Kopf-Verknüpfung von ssAnPRT wurde ebenfalls mit der Variante I36E+M47D (Schwab*, et al.*; 2008) realisiert (Abbildung 1-6 B). Für diese Arbeit war es außerdem erforderlich neue Fluoreszenzmarkierungsstrategien zu entwickeln, da aufgrund der Änderung der chemischen Umgebung durch Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen in die Protein/Puffer-Lösung Präzipitation auftrat. Nach Etablierung geeigneter Simulationsmodelle zur Bestimmung von Farbstoffabständen (AV-Modell, engl. *accessible volume*) wurden die ssAnPRT-Varianten auf die zu erwartenden Abstandsänderungen der Fluoreszenzfarbstoffe untersucht. Dadurch war es möglich, den Fokus gezielt auf Varianten zu lenken, die die größte konformelle Änderung des Proteins aufzeigen. Mit Hilfe der *Photon Distribution Analysis*, sowie der Fluoreszenz-Kreuzkorrelation wurde des Weiteren untersucht, ob Strukturdynamiken von ssAnPRT bei Raumtemperatur identifiziert und quantifiziert werden können.

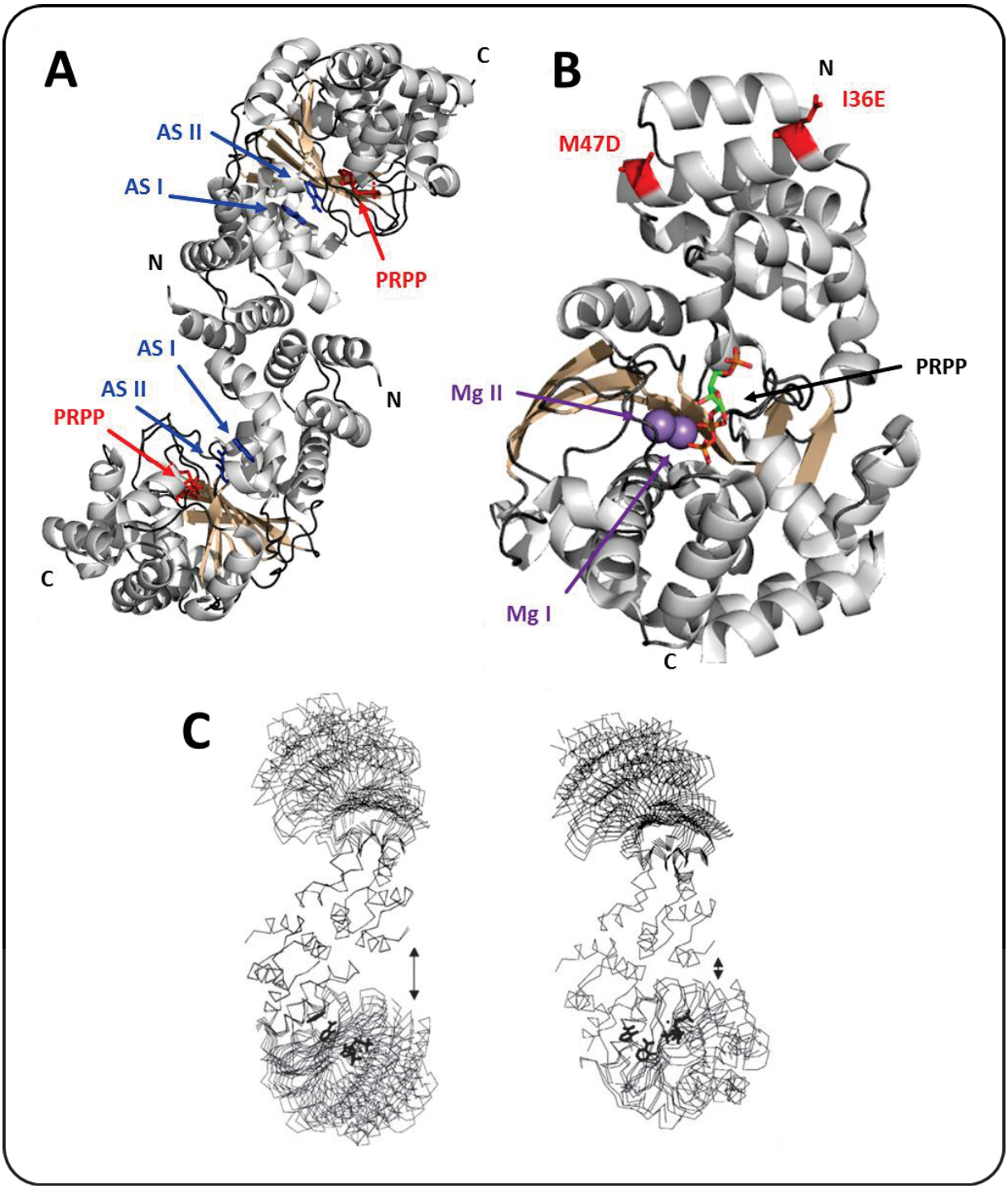


Abbildung 1-6: Positionen der Substrate und *SAXS*-Konformationen des AnPRT-Homodimers. (A) Pro Untereinheit befinden sich zwei Moleküle Anthranilsäure (AS I und AS II) sowie ein Molekül PRPP. Der Abstand zwischen dem C1-Atom der Riboseeinheit von PRPP und den N-Atomen von AS I und AS II beträgt 8,6 Å bzw. 14,6 Å (Marino*, et al.*; 2006). **(B)** Durch den Austausch der Aminosäure Isoleucin durch Glutaminsäure an Position 36 (I36E), sowie der Austausch von Methionin durch Asparaginsäure an Position 46 (M47D) konnte die Kopf-an-Kopf-Verknüpfung der Monomeruntereinheiten soweit beeinflusst werden, dass eine Monomerisierung realisiert werden konnte (Schwab*, et al.*; 2008). Die Abbildung zeigt außerdem die katalytisch aktiven Magnesium-Ionen. Abbildung nach *Abbildung 3* der Dissertation von Dr. Thomas Schwab (Schwab; 2010). **(C)** SAXS-Messungen zeigten, dass in Anwesenheit der Substrate eine Konformationsänderung des ssAnPRT-Protomers erkennbar ist. Abbildung aus Marino et al. (2006), *Journal of Biological Chemistry*.

1.2.2 Modellsystem II: Transportmechanismus des *Lactococcal Multidrug Resistance* Proteins *A*

Motivation. Ein weiterer Vertreter von Proteinen mit Liganden-induzierter Scharnierbewegung ist das aus *Lactococcus lactis* stammende integrale Membranprotein Lactococcal multidrug resistance protein A (LmrA). LmrA ist ein Vertreter der großen Proteinfamilie der ATP binding cassette (ABC) Transporter, die ein breites Spektrum strukturell nicht verwandter hydrophober Substanzen aktiv aus der Zelle heraus zu transportieren vermag (Dean*, et al.*; 2001). Dabei stellt es aufgrund seiner funktionalen Austauschbarkeit mit dem humanen P-Glykoprotein (P-gp) ein geeignetes Modellsystem zur strukturellen Untersuchung dieser medizinisch relevanten Klasse von ABC-Transportern dar (Van Veen*, et al.*; 1998). Der Transportmechanismus dieser Proteinfamilie ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Eine weitere Erforschung dieses Transportmechanismus, sowie der damit verbundenen Multiarzneimittelresistenz (vom Englischen *„multidrug resistance", MDR*), könnte Arzneimittel für die Chemotherapie von Krebspatienten entscheidend verbessern (Dean*, et al.*; 2001). Dieses Teilprojekt soll einen Beitrag dazu leisten.

System. Ein ABC-Transporter setzt sich allgemein aus zwei Transmembran-Domänen (TMDs) und zwei Nukleotid-bindenden Domänen (NBDs) zusammen (Higgins*, et al.*; 1986). Liegen TMDs und NBDs zu einem Protein als Dimer vor, so werden diese wie LmrA als „half-size"-Transporter bezeichnet (Lubelski*, et al.*; 2004, Van Veen*, et al.*; 2000). Es wird davon ausgegangen, dass das Substrat von der inneren in die äußere Lipidschicht oder direkt in den extrazellulären Raum transportiert wird (Bolhuis*, et al.*; 1996). Für P-gp wurden während des Transportvorganges drei metastabile Zustände beobachtet: den nicht-energetisierten, den ATP-gebundenen und den post-hydrolytischen Zustand (Rosenberg*, et al.*; 2001). Diese Zustände konnten mit Hilfe der Totalreflexion-Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR) auch für LmrA identifiziert werden (Grimard*, et al.*; 2001). Es wird ferner vermutet, dass LmrA zwei allosterisch gekoppelte Substratbindestellen mit unterschiedlicher Affinität besitzt. Der vermutete Transportzyklus von Substraten ist in Abbildung 1-7 gezeigt. Der nicht-energetisierte Grundzustand von LmrA ist dabei in Abbildung 1-7 I dargestellt. Sobald das Substrat an das aktive Zentrum bindet, löst eine ATP-Kopplung die Dimerisierung der NBD in Form einer Scharnierbewegung aus (Zaitseva*, et al.*; 2006). Die interprotomere Scharnierbewegung wird dabei den zwei Monomeruntereinheiten gebildet. Gleichzeitig wird

in Folge dessen eine konformationelle Änderung der TMD induziert. Diese konformationelle Änderung durch die α-Helices in der TMD erzeugt einen Translokationskanal für das Substrat. Die Form der Proteinbewegung ist weitgehend unbekannt, jedoch ist durch die kompakte Anordnung der α-Helices eine Scher- oder scherähnliche Bewegung unter Beteiligung der α-Helices 5 und 6 (Ecker*, et al.*; 2004) anzunehmen. Während oder nach der ATP-Hydrolyse bewegt sich das Substrat in das extrazelluläre Medium. Die Abspaltung der Phosphatgruppe des ATPs induziert wahrscheinlich eine erneute Konformationsänderung, wodurch das NBD-Dimer dissoziiert. Die Dissoziation von ADP aus der NBD stellt den Grundzustand des Enzyms unter Relaxation der Konformation wieder her.

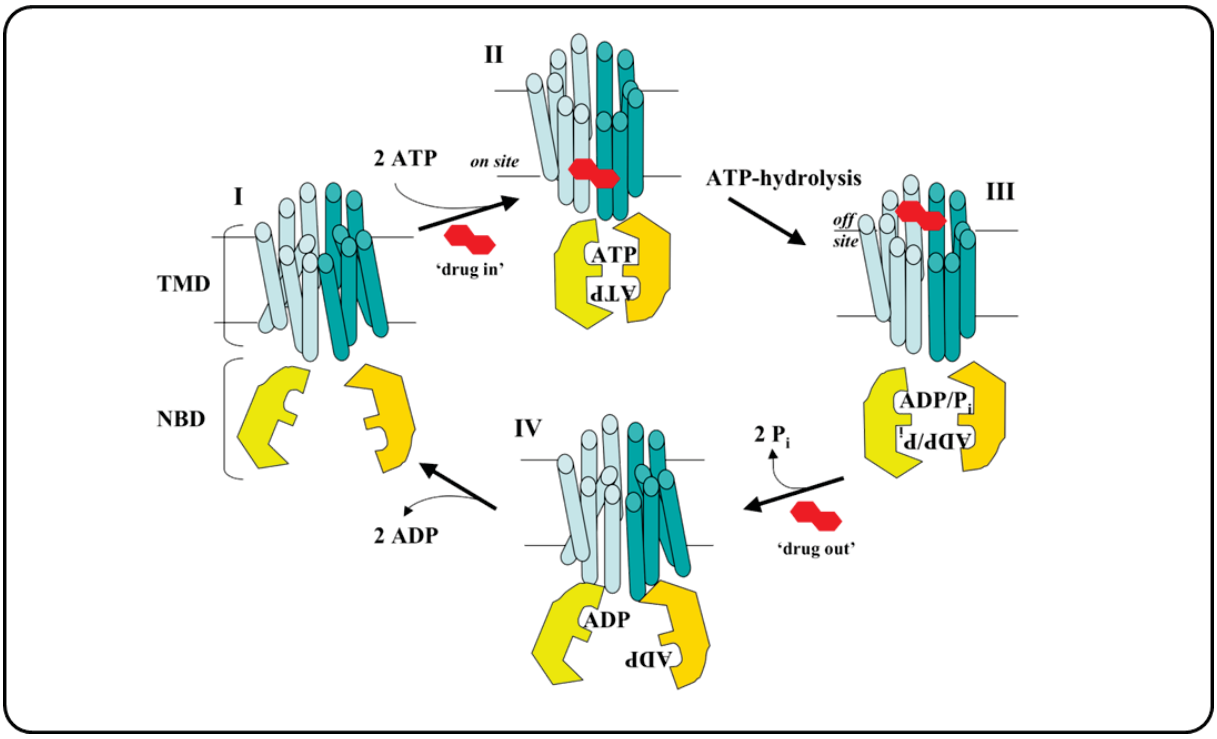


Abbildung 1-7: Möglicher Transportmechanismus in LmrA. Die Darstellung des Transportmechanismus ist in van Veen et al. (1998) beschrieben. Ein Substratmolekül („drug“) wird unter Verbrauch von zwei ATP-Molekülen zu ADP an der Nukleotidbindenden Domäne (NBD) durch die Transmembrandomäne (TMD) transportiert. Die strukturelle Konformationen II und III wurden für die Einzelmolekül-spektroskopischen Untersuchungen mit Hilfe von ATP, bzw. ADP, $MgSO_4$ und BeF_x, fixiert. Die Abbildung wurde von Prof. Dr. Lutz Schmitt, Institut für Biochemie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Zielsetzung. Um konformationelle Änderungen während des katalytischen Transportes fluoreszenzspektroskopisch zu verfolgen, wurden durch gezielte Mutagenese Cysteine in die Proteinstruktur zur anschließenden Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels Thiol-Maleimid-Chemie eingebaut. Die verschiedenen strukturellen Stadien des Transportzyklus wurden dabei mit Hilfe von ATP, beziehungsweise ADP/BeF_X „eingefroren“, und mit

Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopischen Methoden untersucht. Zielsetzung dieses Teilprojektes war die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von konformellen Änderungen und Proteindynamiken, um Rückschlüsse auf den Transportmechanismus zu erlangen. Eine Herausforderung stellte dabei die Fluoreszenzmarkierung von LmrA dar, die in Kooperation mit dem Institut für Biophysikalische Chemie der Goethe Universität Frankfurt am Main realisiert wurde. Dabei wurden Bedingungen untersucht, unter denen eine Stabilisierung von fluoreszenzmarkiertem LmrA bei gleichzeitig akzeptablem Fluoreszenzsignal zum Untergrund-Verhältnis realisiert werden kann.

1.3 Domänenbewegungen mit längeren Linkern

1.3.1 Modellsystem III: Strukturelle Linkerdynamik des *Postsynaptic Density* Proteins *95*

Fragestellung. Die Zielsetzung von McCann et al. (2012) war die Entwicklung eines generellen Modells zur Beschreibung der Supertertiärstruktur von Multidomänenproteine. Zu diesem Zweck wurden Varianten des von *Postsynaptic Density Proteins 95* (PSD-95) aus der Familie der *Membrane Associated Guanylate Kinases* (MAGuKs) mit insgesamt 65 verschiedenen FRET-Abständen ein statisch ausgemitteltes Bild der supertertiären Struktur ermittelt. Dabei wurde bestätigt, dass sich die fünf Domänen von PSD-95 in zwei unabhängige Supramodule, PDZ1-PDZ2 und PDZ3-SH3-GuK, organisieren. Eine ähnliche strukturelle Organisation wurde auch für die MAGuK-Homologen SAP97 und SAP102 gefunden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die PDZ3-Domäne eine bevorzugte Orientierung zur SH3- und GuK-Domäne besitzt. Während McCann et al. (2012) sich schwerpunktmäßig mit dem Strukturmodell von PSD-95 beschäftigte, soll sich diese Arbeit auf die Dynamik der Domänen innerhalb der supertertiären Struktur fokussieren.

System. Die Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGuK) sind Gerüstproteine an zellularen Knotenpunkten, die eine variable Anzahl an PDZ-Domänen, sowie eine SH3- und eine katalytisch inaktive Guanylat-Kinase-Domäne besitzen (Anderson; 1996, González-Mariscal*, et al.*; 2000, Yaffe; 2002). Diese dienen der Interaktion mit anderen Proteinen und sind durch die gebildeten vernetzten Multiproteinkomplexe daher wichtige Elemente bei der

Signaltransduktion. Zu dieser Proteinfamilie gehört PSD-95 (engl. *postsynaptic density protein 95*) mit insgesamt drei PDZ-Domänen (Abbildung 1-8). PSD-95 befindet sich in der postsynaptischen Region des Dendriten einer Nervenzelle und bildet ein Netzwerk zusammen mit Rezeptoren und Ionenkanälen, sowie aus weiteren Signalproteinen (Abbildung 1-9). Die Domänen von PSD-95 bieten daher eine variable Plattform für die Interaktion mit weiteren Proteinen. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der *Hook region* (engl., Hakenregion) in der SH3-Domäne zu, die durch die Aminosäuren 491 bis 533 gebildet wird. Die α-Helix, gebildet aus den Aminosäuren 491 bis 508, scheint eine domierende Proteinregion zur Interaktion mit anderen Proteinen wie zum Beispiel Calmodulin (CaM) Kinase II (Hoskins*, et al.*; 1996) und der damit verbundenen Oligomerisierung von MAGuKs (McGee*, et al.*; 2001) zu sein.

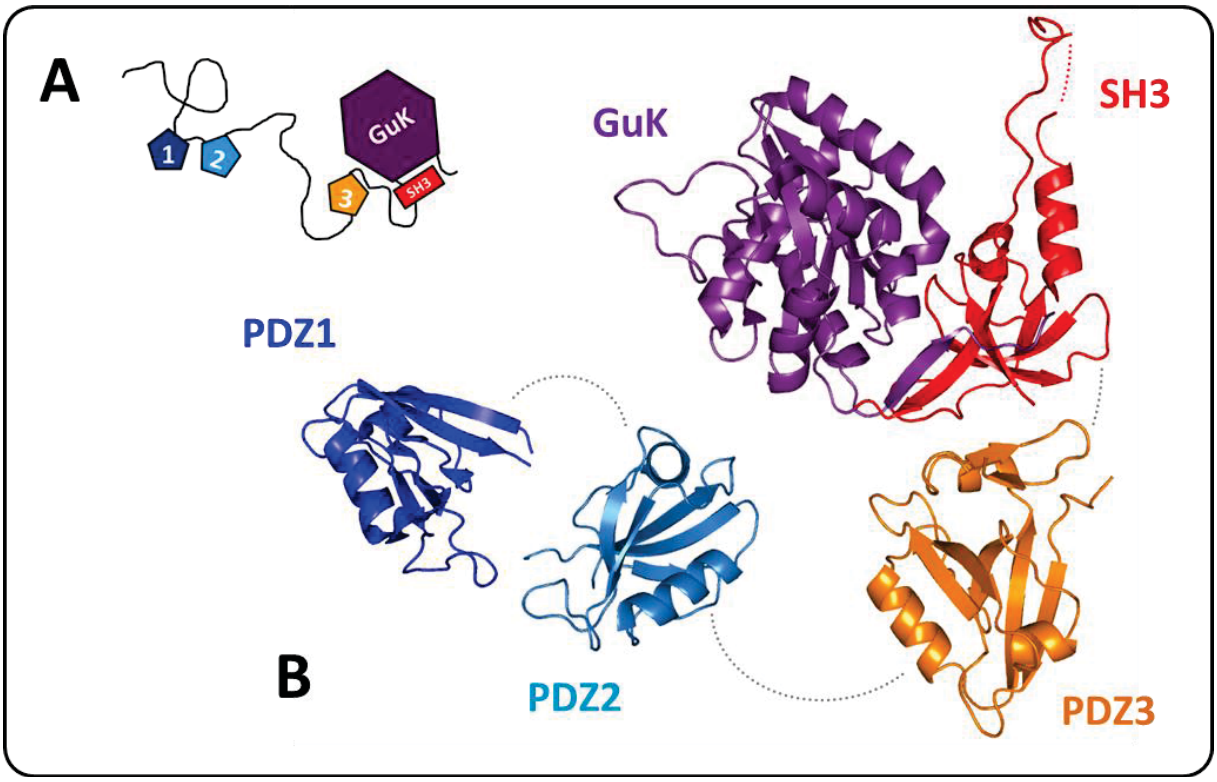


Abbildung 1-8: Struktur des *Postsynaptic Density* Proteins *95.* (A) Schematische Darstellung von PSD-95. **(B)** Röntgenkristallstrukturen der Domänen PDZ1 (blau, PDB-ID: 1IU2), PDZ2 (cyan, 1QLC), PDZ3 (orange, 1BFE) und SH3+GuK (rot, bzw. violett, 1JXO) in einer möglichen Anordnung zueinander. Proteinsequenz: http://www.uniprot.org/uniprot/P78352.

Die Domänen in PSD-95 sind außerdem meist mit intrinsischen ungeordneten „Linkern“ (unstrukturierte, verknüpfende Proteinbereiche, engl. *loops*) verbunden. Diese *loops* sind ein wesentliches Merkmal bei der Signalübertragung, da bei einer niedrigen Gesamtkonzentration des Proteins eine temporäre hohe lokale Proteinkonzentration

aufgrund der Verknüpfung realisiert werden kann. Aus weiteren Studien ist ebenfalls bekannt, dass je nach Länge (Gerber, *et al.*; 1994) und Sequenz (Uversky, *et al.*; 2005) der Domänen-verknüpfenden Peptidkette, sowie die Reihenfolge der Domänenverknüpfung einen signifikanten Einfluss auf die Strukturaktivität hat (Qian, *et al.*; 2006, Wu, *et al.*; 2000). Somit ist es für supertertiäre Strukturproteine möglich, durch Variation in Sequenz und Struktur sich an Funktion und die zellulare Umgebung anzupassen.

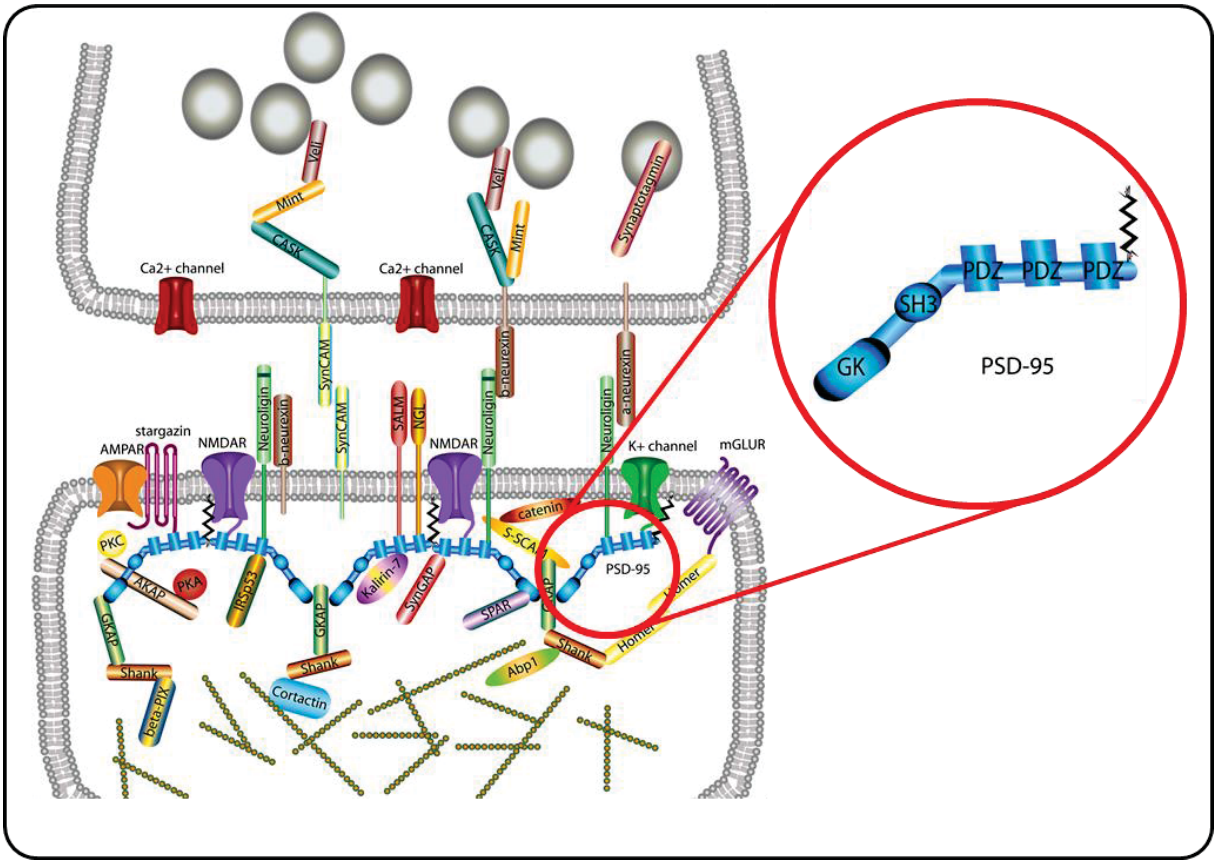


Abbildung 1-9: Makromolekularer PSD-95-Komplex. Dargestellt ist die molekulare Organisation einer glutamatergen Synapse mit den wichtigsten Proteininteraktionen. PSD-95 ist in der postsynaptischen Membranregion lokalisiert und bildet ein multimeres Gerüst zusammen mit anderen Signalproteinen. Abbildung aus Keith und El-Husseini (2008), *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Keith, et al.; 2008).

Zielsetzung. Die einzelnen Domänen und Sequenzeinheiten von PSD-95 wurden bereits hinreichend untersucht und in der Literatur beschrieben (Kim, *et al.*; 2004, McGee, *et al.*; 2001, Vogrig, *et al.*; 2011). Daher wurde in dieser Arbeit in Kooperation mit Prof. Dr. Mark Bowen, Institut für Pharmakologische Wissenschaften, Physiologie und Biophysik der Stony Brook Universität (New York, USA) die supertertiäre Struktur von vollständigem PSD-95 in Lösung mit Hilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der strukturellen Dynamiken zwischen den verschiedenen Domänen und deren Quantifizierung. Zu diesem Zweck wurde eine zweifarbige Fluoreszenzanregung für die Einzelmolekül-spektroskopischen Untersuchungen vorgenommen werden, um eindeutig den Anteil des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers zu identifizieren. Mit *sub-ensemble time-correlated single photon counting* (seTCSPC), eine Variante der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung, wurden die Fluoreszenzlebensdauern der dynamischen Grenzzustände der FRET-Population verifiziert. Mit Hilfe der *spezies-selektiven Fluroeszenzkreuzkorrelation* konnten Domänen- und *loop*-Dynamiken weiter verifiziert und quantifiziert werden.

1.4 Strukturelle Dynamik bei chemisch-induzierter Entfaltung

1.4.1 Modellsystem IV: Lysozym des T4-Bakteriophagen

Ein essenzieller Schritt im Infektionszyklus der T4-Bakteriophage ist die Synthese von Lysozym. Zu Beginn der Infektion durchbricht der T4-Phage die Zellmembran von *Escherichia coli* mit T4-Lysozym enzymatisch, wodurch die Phagen-DNA in die Zelle injiziert werden kann. Dazu wird die β-1,4-glykosidische Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und des N-Acetylglucosamins von Peptidoglykanen der Bakterienzellwand über ein Oxocarbenium-ähnliches Intermediat gespalten (Tsugita*, et al.*; 1968). Nach Vermehrung der Phagen innerhalb der Wirtszelle wird in einem letzten Schritt die Zelle so gesteuert, das Lysozym zu synthetisieren, um so die Zellmembran von innen zu zerstören. Auf diese Weise können die neuen T4-Phagen freigesetzt werden. T4-Lysozym besteht aus 164 Aminosäuren angeordnet in zwei Subdomänen, die mit einer langen Alpha-Helix miteinander verbunden sind (Matthews*, et al.*; 1974, Matthews*, et al.*; 1981). Das aktive Zentrum zwischen den beiden Domänen bildet zahlreiche Wasserstoff-Brückenbindungen zum Substrat aus, wovon die Glutaminsäure in Position 11, Asparaginsäure in Position 20, sowie Threonin in Position 26 den katalytischen Bereich darstellen (Kuroki*, et al.*; 1993).

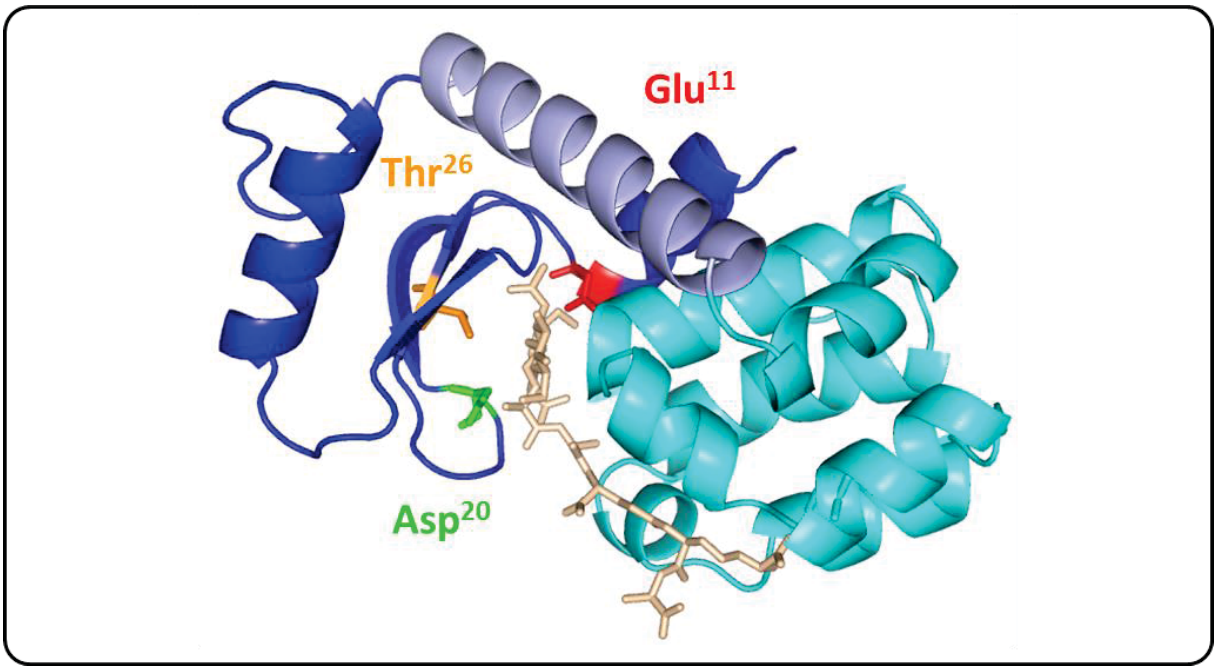


Abbildung 1-10: Röntgenkristallstruktur von T4 Lysozym mit gebundenen Substrat. Das Enzym besteht aus zwei Domänen (blau- und cyan), die über eine lange α-Helix (hellviolett) miteinander verbunden sind. Der katalytisch aktive Bereich bildet sich aus Glutaminsäuren in Position 11 (Glu^{11}, rot), Asparaginsäure in Position 20(Asp^{20}, grün), sowie Threonin in Position 26 (Thr^{26}, orange).

T4 Lysozym ist ein gut untersuchtes und in der Literatur beschriebenes System. Aus diesem Grund und seiner Stabilität gegenüber Schwankungen des pH-Wertes und Präzipitation eignete es sich als Modellenzym für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Ziel dieses Teilprojekt war es, den Entfaltungsprozess der Proteinstruktur mittels Harnstoff spektroskopisch zu verfolgen. Neben dem Einsatz Fluoreszenz-spektroskopischer Methoden wurde die Elliptizität mittels Zirkular-Dichroismus während der Denaturierung bestimmt. Aus den Ergebnissen beider Messmethoden sollte ein besseres Verständnis für den Entfaltungsprozess in Proteinen gewonnen werden.

2. Theoretische Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Die theoretische Bearbeitung dieses Kapitels erfolgte mit Hilfe von „Principles of Fluorescence Spectroscopy“ von Joseph R. Lakowicz (Lakowicz; 2006) und „Modern Biophysical Chemistry“ von Peter J. Walla (Walla; 2009). Für vertiefende Einblicke in die theoretischen Grundlagen seien dem Leser an dieser Stelle diese Bücher empfohlen. Die darüber hinaus verwendete Literatur ist separat angegeben.

2.1 Lumineszenz

Als Lumineszenz eines Stoffes wird die Emission von Licht aufgrund der Deaktivierung eines elektronisch angeregten Zustandes (S_1 oder T_1) bezeichnet. Bei der Fluoreszenz verweilt das zuvor mit elektromagnetischer Strahlung angeregte Elektron des Moleküles eine bestimmte Zeit im ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1). Die Verweilzeit im S_1-Zustand wird als mittlere Fluoreszenzlebensdauer (siehe Kapitel 2.4) bezeichnet. Die elektrische Feldkomponente des Anregungslichtes muss dabei parallel zum Übergangsdipolmoment des Moleküles sein, damit eine Absorption erfolgen kann. Da bei der Fluoreszenz der Übergang vom Grundzustand in die angeregten Zustände (und umgekehrt) ohne die Änderung des Elektronenspins erfolgt, verweilt das Elektron dort im Normalfall nur für wenige Nanosekunden (erlaubter Übergang). Eine weitere Form der Lumineszenz ist die Phosphoreszenz. Im Gegensatz zur Fluoreszenz ist dieser Übergang nicht spinerlaubt aufgrund des Übergangs des Elektrons vom Singulett- in den Triplettzustand. Da ein Übergang vom ersten angeregten Triplettzustand in den Singulett-Grundzustand ebenfalls quantenmechanisch verboten ist, kann die Verweildauer des Elektrons im ersten angeregten Triplettzustand Millisekunden bis Sekunden dauern. Farbstoffe, die Licht in Form von Fluoreszenz emittieren, werden Fluorophore genannt. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Moleküle mit ausgeprägten konjugierten π-Systemen.

2.2 Quantenmechanische Beschreibung der Fluoreszenz

Bei der quantenmechanischen Beschreibung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden weitere Vorgänge, wie zum Beispiel strahlungslose Relaxationsprozesse, berücksichtigt. Die energetische Beschreibung erfolgt typischerweise mit Hilfe eines *Jablonski*-Termschemas (Abbildung 2-1).

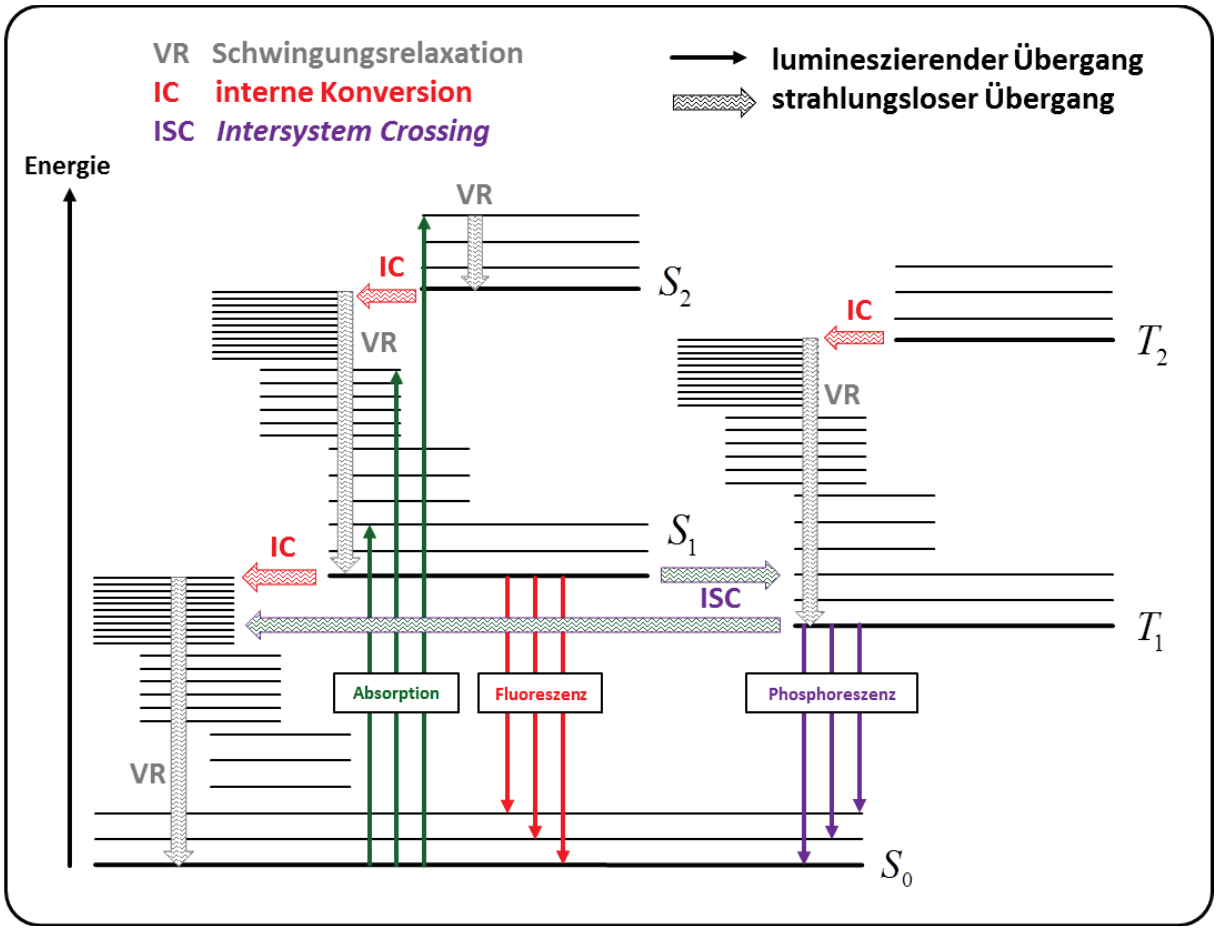


Abbildung 2-1: Jablonski-Diagramm. In der Abbildung sind die verschiedenen energetischen Wege des Elektrons nach Absorption von elektromagnetischer Strahlung dargestellt. Diese sind in Kapitel 2.2 ausführlich erläutert. Abbildung nach Klán et al. (2009).

Nach Anregung eines Elektrons in eines der Schwingungszustände der elektronisch angeregten Zuständen S_1 bis S_n erfolgt die energetische Relaxation in den untersten vibronischen Zustand (Klán*, et al.*; 2009). Die Ursache für diesen Vorgang sind hauptsächlich Stöße des angeregten Fluorophors mit den Lösungsmittelmolekülen. Von da aus kann das Elektron sofort unter Lichtemission in den Grundzustand S_0 zurückkehren. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet und folgt nach der Regel von Kasha (Kasha; 1950). Der isoenergetische, strahlungslose Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen gleicher

Multiplitzität wird als innere Umwandlung bezeichnet (IC, engl. *internal conversion*) und tritt mit großer Wahrscheinlichkeit bei Schnittpunkten zweier Potentialkurven auf. Elektronen im S_1-Zustand können ebenfalls eine Spin-Konversion durchlaufen und in den ersten angeregten Triplettzustand T_1 übergehen. Man bezeichnet diesen Vorgang als *Intersystem Crossing* (ISC). Von da aus relaxiert das Elektron wieder zurück in den thermodynamischen Grundzustand.
Aus dem *Jablonski*-Diagramm wird ersichtlich, dass die Fluoreszenz beziehungsweise Phosphoreszenz gegenüber der eingestrahlten Wellenlänge bathochrom verschoben ist (Stokesverschiebung). Die Fluoreszenzemission erfolgt meistens in höhere vibronische Zustände des S_0-Zustandes. Daher ist das Fluoreszenzemissionsspektrum eines Fluorophors meistens ein Spiegelbild des Absorptionsspektrums für den Übergang vom Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Zustand S_1, da sich die Molekülgeometrie nach der Absorption nicht wesentlich verändert.

2.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Anregung eines Fluorophors führt nicht immer zur Fluoreszenzemission, da, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, unterschiedliche Relaxationsprozesse eine Rolle spielen. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Anregung des Fluorophors zur Emission von Fluoreszenz führt, wird mit der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F beschrieben. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist das Verhältnis der Ratenkonstante der Fluoreszenz k_F zur Summe aller Geschwindigkeitskonstanten aller Relaxationsprozesse und ist daher kleiner als 1.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \ldots} < 1 \qquad \text{Gleichung 2-1}$$

Die Quantenausbeute ist fluorophorspezifisch und ebenfalls abhängig vom gewählten Lösungsmittel des Fluorophors.

2.4 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des Elektrons in den elektronisch angeregten Zuständen des Fluorophors. Existiert ein Zustand in homogener Umgebung, so kann der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz als Reaktion erster Ordnung betrachtet und mit den Geschwindigkeitskonstanten aller Relaxationsprozesse ausgedrückt werden. Für die Fluoreszenz $F(t)$ zu einem beliebigen Zeitpunkt t mit der Fluoreszenz $F(0)$ am Zeitpunkt $t = 0$ gilt:

$$F(t) = F(0)e^{-(k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \ldots)t} = F(0)e^{-t/\tau} \qquad \text{Gleichung 2-2}$$

Für die Fluoreszenzlebensdauer τ ergibt sich dann:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \ldots} = \frac{1}{k_0}. \qquad \text{Gleichung 2-3}$$

Damit entspricht die Fluoreszenzlebensdauer der Fluoreszenzintensität, bei der diese auf 1/e der Ausgangsintensität abgeklungen ist.

Eine Fluoreszenzabklingkurve kann häufig unter realen Messbedingungen nicht monoexponentiell beschrieben werden. Daher wird jeder Zerfallsprozess separat betrachtet und als Summe der einzelnen monoexponentiellen Zerfälle dargestellt:

$$F(t) = \sum_i F_i(0)e^{-\frac{t}{\tau_i}}. \qquad \text{Gleichung 2-4}$$

Eine weitere Methode zur Messung von Fluoreszenzabklingkurven ist die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl. time-correlated single-photon counting, TCSPC). Die Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauern und deren Anteile am Gesamtprozess ist die Heterogenität von entscheidender Bedeutung und soll in Kapitel 3.2.3.2 näher erläutert werden.

2.5 Förster Resonanz Energietransfer

Energie von einem angeregten Fluorophor kann auf einen anderen Fluorophor übertragen werden. Der Energietransfer erfolgt dabei strahlungslos in Folge von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Förster; 1948). Hierbei muss das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donor-Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Fluorophors energetisch überlappen. Die Reichweite dieses Energietransfers liegt bei ca. 100 Å und wird Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) genannt. Wie bereits bei der Anregung eines Fluorophors ist die Orientierung von Donor und Akzeptor zueinander, neben dem Abstand, von entscheidender Bedeutung. Der Förster Resonanz Energie Transfer ist in Abbildung 2-2 als modifiziertes Jablonski-Termschema illustriert.

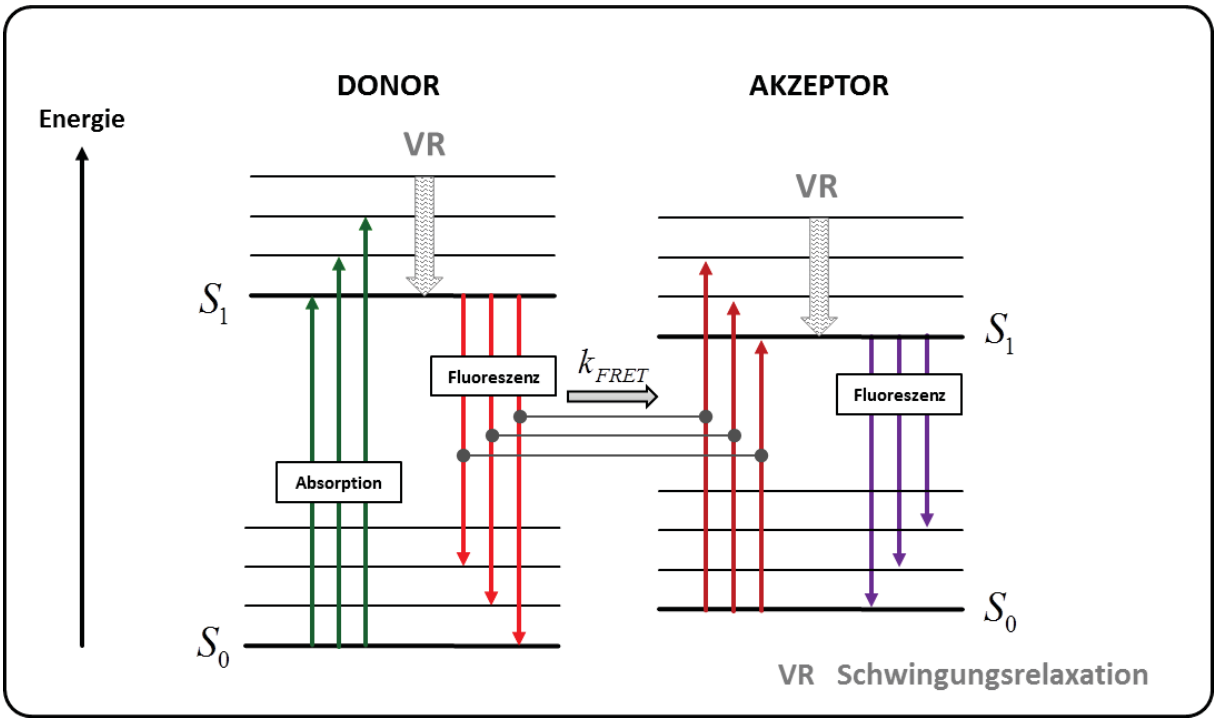


Abbildung 2-2: Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfers im Jablonski-Diagramm. Beide Farbstoffe müssen sich spektral überlappen, wie durch die roten und dunkelroten Pfeile dargestellt ist. Erst dann ist ein strahlungsloser Energietransfer durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vom Donor- auf den Akzeptorfarbstoff möglich. Dieser Prozess wird mit der Ratenkonstanten k_{FRET} beschrieben.

Beim Förster Resonanz Energietransfer zum Akzeptor (A) handelt es sich um einen weiteren Deaktivierungsprozess, der Einfluss auf die Quantenausbeute $\Phi_{FD(A)}$ und Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ des Donor-Fluorophors hat. Gleichung 2-1 und Gleichung 2-3 können entsprechend modifiziert werden:

$$\Phi_{FD(A)} = \frac{k_F}{k_{FRET} + k_0}, \qquad \text{Gleichung 2-5}$$

sowie

$$\tau_{D(A)} = \frac{1}{k_{FRET} + k_0}. \qquad \text{Gleichung 2-6}$$

Wie aus Gleichung 2-5 und Gleichung 2-6 erkennbar ist, ist ein FRET-Prozess mit einer Reduktion der Quantenausbeute und einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors verbunden.

2.5.1 Überlappungsintegral

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, müssen das Donor-Fluoreszenzspektrum und das Akzeptor-Absorptionsspektrum spektral überlappen (Clegg; 1992). Dies ist in Abbildung Abbildung 2-3 veranschaulicht.

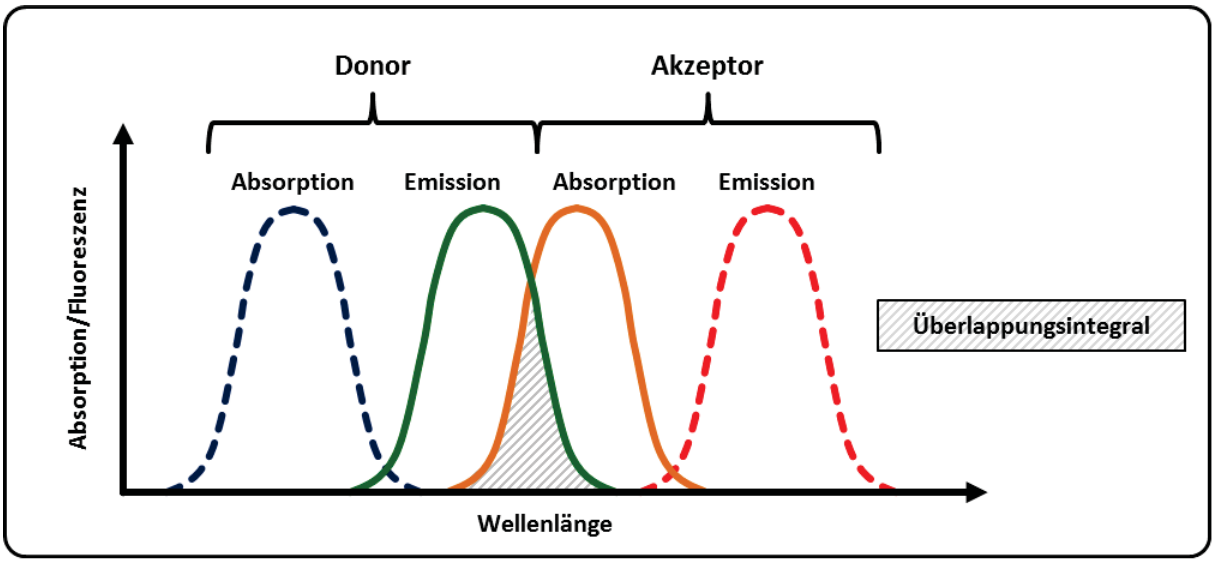


Abbildung 2-3: Veranschaulichung des Überlappungsintegrals. Für den Förster-Resonanz-Energietransfer ist es erforderlich, dass das Fluoreszenzspektrum des Donor mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Je größer die spektrale Überlappung (grau-schraffierte Fläche), desto effizienter ist der Energietransfer. Abbildung nach Clegg (1992).

Das Überlappungsintegral wird ermittelt aus der normalisierten Fluoreszenz des Donor-Fluorophors $F_{D(0)}$ in Abwesenheit des Akzeptors und des Extinktionskoeffizienten des Akzeptor-Fluorophors $\varepsilon(\lambda)$ in Abwesenheit des Donors bei der Wellenlänge λ. Somit ergibt sich für das Überlappungsintegral J (Selvin; 1995):

$$J = \int_0^\infty F_{D(0)}(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \qquad \text{Gleichung 2-7}$$

2.5.2 Orientierungsfaktor

Der Energietransfer zwischen einem Donor/Akzeptor-Paar ist erst dann möglich, wenn die Feldlinien der von den Übergangsdipolmomenten μ erzeugten elektromagnetischen Felder der Fluoreszenzfarbstoffe parallele Komponenten zueinander besitzen (Dale*, et al.*; 1974). Da Fluorophore meist über relativ lange Linker, zum Beispiel an einem Biomolekül, gekoppelt sind, ist der Orientierungsfaktor κ^2 abhängig von den relativen Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Donor-Fluoreszenz μ_D und Akzeptor-Absorption μ_A (Dale*, et al.*; 1979):

$$\kappa^2 = \left[\hat{\mu}_D \cdot \hat{\mu}_A - 3\left(\hat{\mu}_D \cdot \hat{R}_{DA}\right)\left(\hat{\mu}_A \cdot \hat{R}_{DA}\right)\right]^2 = \left(\sin\theta_D \sin\theta_A \cos\varphi - 2\cos\theta_D \cos\theta_A\right)^2 \qquad \text{Gleichung 2-8}$$

Wie aus der Gleichung 2-8 ersichtlich wird, kann der Orientierungsfaktor κ^2 nur Werte zwischen null und vier annehmen. Der Maximalwert vier kann nur durch eine kolineare Anordnung der Übergangsdipolmomente realisiert werden. Stehen Übergangsdipolmoment und Donor und Akzeptor senkrecht zueinander, ist der Wert immer gleich null. Fluorophore, die an Moleküle über lange Linker gekoppelt sind, weisen eine hohe Beweglichkeit auf. Wird davon ausgegangen, dass alle möglichen Orientierungen der Farbstoffe zueinander möglich sind, ermittelt sich der Orientierungsfaktor zu 2/3. Da κ^2, wie in Gleichung 2-8 erkennbar, ausschließlich eine Winkelabhängigkeit aufweist, gilt dieser Wert universell für alle Fluorophor-Paare.

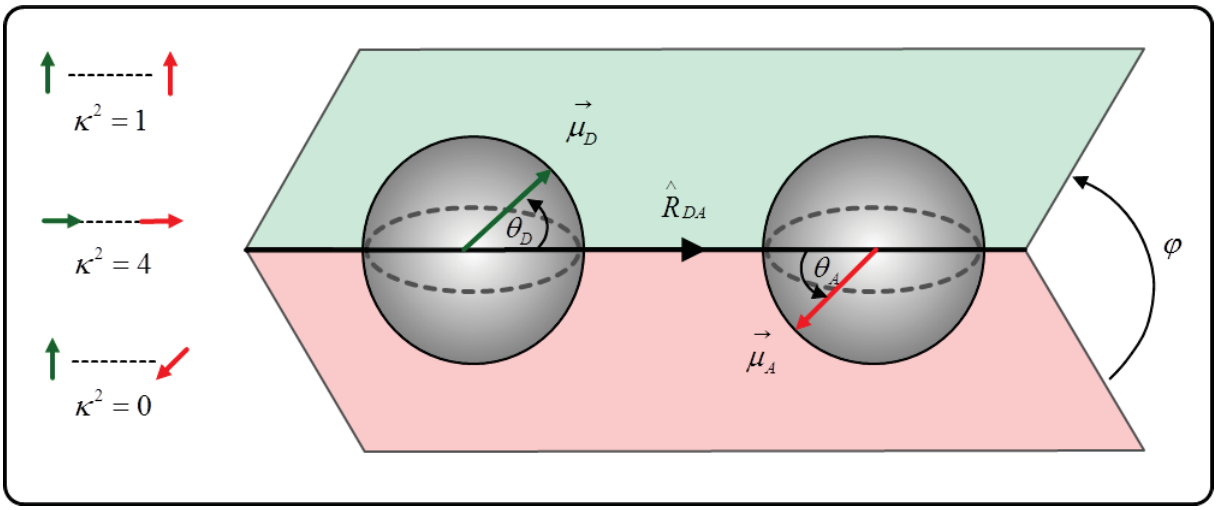


Abbildung 2-4: Graphische Darstellung des Orientierungsfaktors κ^2. Der Orientierungsfaktor nimmt je nach relativer Position der Übergangsdipolmomente von Donor $\overrightarrow{\mu_D}$ und Akzeptor $\overrightarrow{\mu_A}$ Werte zwischen 0 und 4 an. Die Ebenen der beiden Dipolmomente schließen zusammen den Winkel φ ein. Abbildung nach Sisamakis (2010).

2.5.3 Förster-Radius und Transfereffizienz

Wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2, sowie in Gleichung 2-7 gezeigt wurde, ist neben dem Brechungsindex des Mediums die Geschwindigkeitskonstante des Förster-Resonanz-Energietransfers im Wesentlichen vom Überlappungsintegral J, dem Orientierungsfaktor κ^2 und der Donor-Quantenausbeute Φ_{FD}, und somit vom gewählten Fluorophorenpaar, abhängig. Das Konzept des Energietransfers aufgrund Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, sowie der mathematische Zusammenhang wurden von Theodor Förster im Jahre 1948 hergeleitet. Die Rate für den Deaktivierungsprozesses durch FRET ist in Gleichung 2-9 beschrieben:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_{D(0)}} \left(\frac{9(\ln 10) J \kappa^2 \Phi_{FD(0)}}{R_{DA} \cdot 128 \pi^5 \mathrm{N_A}\, n^4} \right)^6 . \qquad \text{Gleichung 2-9}$$

$\tau_{D(0)}$ Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit von Akzeptor

R_{DA} Abstand zwischen Donor und Akzeptor

N_A Avogadrozahl

n Brechungsindex des Mediums

wobei die Gleichung 2-9 mit R_0 als sogenannter *Förster-Radius*:

$$\frac{R_0}{[\text{Å}]} = \left(\frac{9(ln10)J\kappa^2\Phi_{F_{D(0)}}}{128\pi^5 N_A n^4}\right)^{1/6}$$ Gleichung 2-10

beziehungsweise mit dem reduzierten Försterradius R_{0r} (Rothwell*, et al.*; 2003):

$$\frac{R_{0r}}{[\text{Å}]} = \left(\frac{9(ln10)J\kappa^2}{128\pi^5 N_A n^4}\right)^{1/6}$$ Gleichung 2-11

zu Gleichung 2-12:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_{D(0)}}\left(\frac{R_0}{R_{DA}}\right)^6 = k_F\left(\frac{R_{0r}}{R_{DA}}\right)^6$$ Gleichung 2-12

vereinfacht werden kann.

Die quantitative Beschreibung der Effizienz E des Förster Resonanz Energie Transfers ist definiert als

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_0 + k_{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_{D(0)}} = 1 - \frac{F_{D(A)}}{F_{D(0)}}$$ Gleichung 2-13

Zusammen mit Gleichung 2.11 lässt sich die Gleichung 2-13 auch als Funktion der Abstände R_0 und R_{DA} ausdrücken

$$E = \frac{{R_0}^6}{{R_0}^6 + {R_{DA}}^6}\,.$$ Gleichung 2-14

Abbildung 2-5 zeigt die Gleichung 2-14 graphisch dargestellt, wobei die Transfereffizienz gegen den normierten Abstand R_{DA}/R_0 aufgetragen wurde. Bereits geringe Distanzänderungen bei $R_{D(A)}/R_0$ = 1 zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff haben eine signifikante Änderung der Transfereffizienz zur Folge. Die Gleichung 2-14 zeigt die Bedeutung des Förster-Radius R_0, der so definiert ist, dass bei $R_{D(A)} = R_0$ die Transfereffizienz zwischen einem gewählten Donor/Akzeptor-Fluorophorenpaar 50 Prozent beträgt.

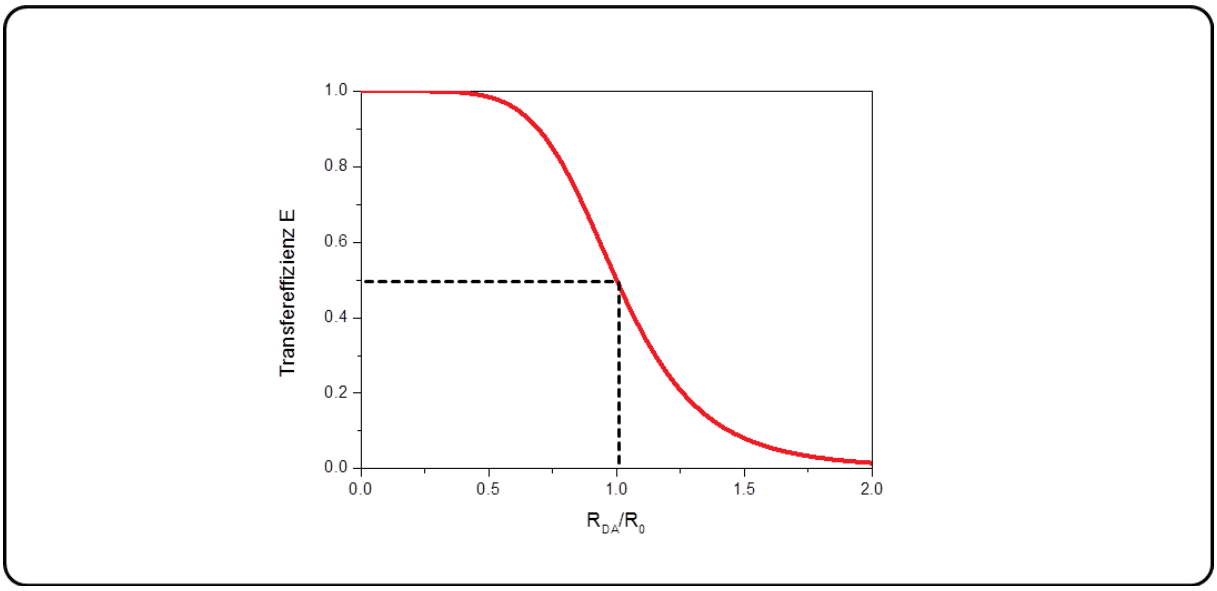


Abbildung 2-5: Graphische Darstellung der Transfereffizienz E in Abhängigkeit des Distanzverhältnisses R_{DA}/R_0. Die Transfereffizienz beträgt 0,5, wenn der Förster-Radius dem Abstand von Donor- und Akzeptorfluorophor entspricht.

2.6 Fluoreszenzanisotropie

Wie bereits im Kapitel 2.5.2 erläutert, muss das Übergangsdipolmoment des Fluorophors im Augenblick der Absorption parallele Komponenten zum elektrischen Feldvektor des linear polarisierten Anregungslichtes aufweisen. Daher werden auch nur diese Fluorophore in einer isotropen Lösung angeregt, die diese Eigenschaft aufweisen (Photoselektion). Fluorophore, die mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, strahlen gewöhnlich polarisierte Fluoreszenz wieder ab. Aufgrund der zeitlichen Verzögerung zwischen Absorption und Emission sinkt je nach Beweglichkeit des Fluorophors der Polarisationsgrad. Mit der Messung der Fluoreszenzanisotropie (Anisotropie, griechisch, *„von ungleicher Richtung“*) lassen sich also Rückschlüsse auf die Größe und Beweglichkeit fluoreszenzmarkierter Biomoleküle schließen (Lakowicz; 2006, Walla; 2009). Abbildung 2.6 veranschaulicht das Prinzip einer Fluoreszenz-Polarisationsmessung.

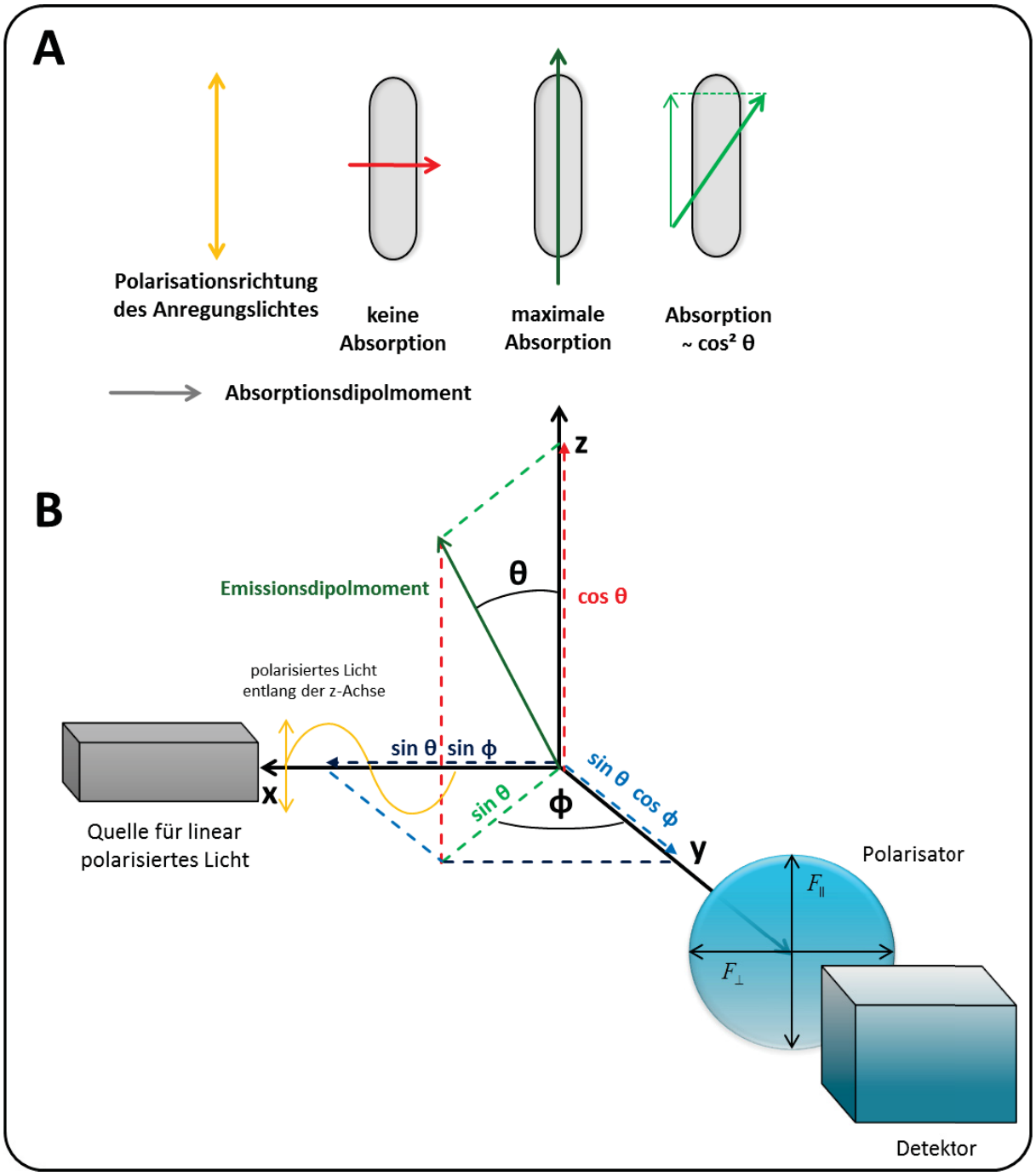


Abbildung 2-6: Prinzipielle Funktionsweise von Polarisationsmessungen. (A) Anregungslicht, welches entlang einer Achse linear polarisiert ist, wird von einem Fluorophor absorbiert, wenn das Absorptionsdipolmoment parallele Komponenten aufweist. Die Absorption ist dabei proportional zu $\cos^2 \theta$. **(B)** Zur Messung der Anisotropie wird eine Fluoreszenzprobe mit linear polarisiertem Licht bestrahlt. Die parallelen und senkrechten Komponenten der Fluoreszenzemission relativ zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes werden im rechten Winkel mit Hilfe eines Polarisators (Analysator) selektiv detektiert. Die Anteile von paralleler und senkrechter Fluoreszenz lassen sich als geometrische Funktionen darstellen. Abbildung nach Walla (2009).

Zur Quantifizierung des Ausmaßes einer Fluoreszenzpolarisation mit Hilfe der parallelen ∥ und senkrechten ⊥ Komponente des emittierten Fluoreszenzlichtes wird Fluoreszenzpolarisation P

$$P = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + F_{\perp}}. \qquad \text{Gleichung 2-15}$$

oder die Fluoreszenzanisotropie r

$$r = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2F_{\perp}}. \qquad \text{Gleichung 2-16}$$

verwendet. Wie aus Abbildung 2-6 B erkennbar ist, lassen sich die Fluoreszenzanteile aus paralleler und senkrechter Polarisationsrichtung wie folgt berechnen (vgl. Walla; Kapitel 3.4):

$$F_{\parallel}(\theta) = \cos^2\theta \text{ und } F_{\perp} = \frac{1}{2}\sin^2\theta. \qquad \text{Gleichung 2-17}$$

Zusammen mit Gleichung 2-16 lässt sich die Fluoreszenzanisotropie mit Hilfe des Trigonometrischen Pythagoras als Funktion des Winkels θ ausdrücken:

$$r(\theta) = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2}. \qquad \text{Gleichung 2-18}$$

Aus diesem Zusammenhang wird ersichtlich, dass Fluorophore, deren Absorptionsdipolmomente nicht vollständig kollinear zum Anregungslicht befinden, in einen angeregten Zustand übergehen können (Abbildung 2-7 A). Aufgrund der offenkundigen Winkelabhängigkeit der Polarisation lässt sich eine Verteilung der angeregten Zustände annehmen. Wie aus Abbildung 2-6 B und Abbildung 2-7 B ersichtlich, lässt sich die Anregungswahrscheinlichkeit eines Fluorophors im Bereich von θ und $\theta + d\theta$ zu

$$P(\theta)\,d\theta = \cos^2\theta \ \sin\theta \ d\theta \qquad \text{Gleichung 2-19}$$

berechnen.

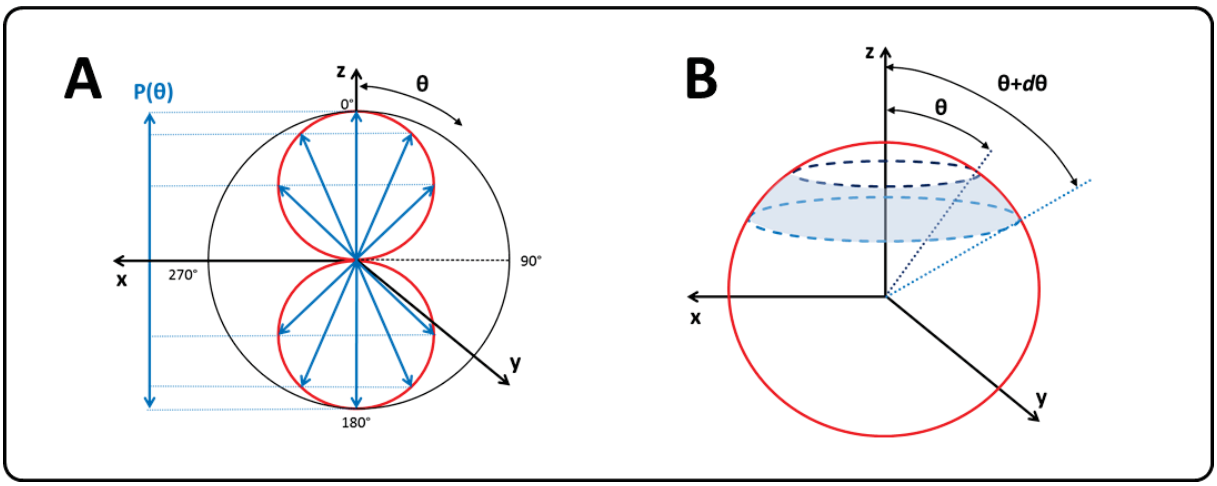


Abbildung 2-7: (A) Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit vom Winkel θ. Flurophore, deren Übergansdipolmomente nicht exakt kollinear zum Anregungslicht stehen, können trotzdem mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit angeregt werden. Erst bei einem Winkel θ von 90° bzw. 270° wird diese Wahrscheinlichkeit gleich null. **(B) Veranschaulichung der Verteilung der Übergangsdipolmomente.** Die Zahl der Moleküle, deren Übergangsdipolmoment einen Winkel mit dem Anregungslicht zwischen θ und $\theta + d\theta$ einschließt ist proportional zu der abgebildeten Fläche $sin\theta d\theta$ (blauer Bereich). Abbildung nach Walla (2009).

Für einen Fluorophor, welcher weder rotieren noch diffundieren kann, lässt sich das Maximum der Anisotropie berechnen. Die sogenannte *fundamentale Anisotropie* r_0 ergibt sich aus der Integration aller am Absorptionsprozess beteiligten Populationen $P(\theta)r(\theta)$ normiert durch die Gesamtpopulation $\int_0^{\pi} P(\theta)d\theta$ (Gleichung 2.19).

$$r_0 = \frac{\int_0^{\pi} P(\theta)r(\theta)d\theta}{\int_0^{\pi} P(\theta)d\theta} = \frac{\int_0^{\pi} \cos^2\theta \sin\theta \frac{3\cos^2 - 1}{2} d\theta}{\int_0^{\pi} \cos^2\theta \sin\theta d\theta} = 0{,}4\,. \qquad \text{Gleichung 2-20}$$

Für die fundamentale Anisotropie aller Moleküle mit nicht-kollinearen Übergangsdipolmomenten gilt zusammen mit Gleichung 2-18:

$$r_0 = 0{,}4 \cdot \frac{3\cos^2\beta - 1}{2}\,, \qquad \text{Gleichung 2-21}$$

wobei β der Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment darstellt. Die Anisotropie wird also gleich null, wenn $3\cos^2\beta = 1$ wird. Dies entspricht einem Winkel β von 54,7° (*„magic angle“*). Ein auf 54,7° eingestellter Analysator filtert somit alle Anisotropieeffekte einer Fluoreszenzprobe bei linear-polarisierter Anregung heraus.
Erfahren nun fluoreszenzmarkierte Moleküle Rotationsdiffusion, nimmt die Intensität der Fluoreszenz aufgrund der Brownschen Bewegung mit der Zeit ab (Ehrenberg, *et al.*; 1974). Dieser Zerfall kann monoexponentiell beschrieben werden:

$$r(t) = r_0 \cdot e^{-t/\rho}. \qquad \text{Gleichung 2-22}$$

Dabei ist ρ die Rotationskorrelationszeit, die wie folgt definiert ist:

$$\rho = \frac{\eta \cdot V}{k_B \cdot T} = \frac{1}{6 \cdot D_r}. \qquad \text{Gleichung 2-23}$$

η Viskosität

V Partikelvolumen mit evtl. Hydrathülle

k_B Boltzmannkonstante

T Temperatur

D_r Rotationsdiffusionskoeffizient

Zusammen mit Gleichung 2-20 lässt sich die zeitlich stationäre Anisotropie in einem Ensemble von fluoreszenzmarkierten Molekülen zu der sogenannten Perrin-Gleichung zusammenfassen:

$$\bar{r} = \frac{\int_0^\infty F(t)r(t)dt}{\int_0^\infty F(t)dt} = \frac{\int_0^\infty F_o e^{-t/\tau} r_0 e^{-t/\rho} dt}{\int_0^\infty F_o e^{-t/\tau} dt} = \frac{r_0}{1 + \left(\tau/\rho\right)}. \qquad \text{Gleichung 2-24}$$

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden

3.1.1 Materialien

3.1.1.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
10x Tris/Glycine/SDS premixed	BIO-RAD Lab. Inc.
2-Mercaptoethanol 99 % p.a.	Carl Roth
Acrylamid	Bio-Rad
Agar	Becton, Dickinson & Company
Agarose	Carl Roth
Aktivkohle	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth
β-Mercaptoethanol p.a.	Carl Roth
Chloramphenicol	Carl Roth
Complete, EDTA free	Roche
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H_2O	Grüssing
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
EDTA · Na_2 · $2H_2O$	AppliChem
Ethanol p.a.	VWR
flüssiger Stickstoff	Linde
Glycerin	Carl Roth
Harnstoff	Appli Chem
Hefeextrakt	Carl Roth
Hydroxy(tetramethylchroman)carbonsäure (Trolox)	Sigma-Aldrich
Imidazol	AppliChem
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Grüssing
Kanamycinsulfat	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid p.a.	VWR
Natriumhydroxid (NaOH, Pellets)	J.T.Baker

Natriumlaurylsulfat ≥ 99 % (SDS)	Carl Roth GmbH
Salzsäure 37%ig (HCl)	VWR
SimplyBlue™ SafeStain	Invitrogen
Sucrose ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	VWR
Trypton	Becton, Dickinson & Company
Zinksulfat-7-hydrat	Carl Roth

3.1.1.2 Geräte

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung

Gerät	Modell	
Autoklav	Systec VE-150	Systec
Dialyseschlauch	Spectra/Por 4	Spectrum Labs
Elektrophorese-Anlage	Mini-PROTEAN II	Biorad
FPLC-Affinitätssäule	HiTrap Chelating HP 1ml	GE Healthcare
FPLC-Kationenaustauscher	HiTrap sp ff	GE Healthcare
FPLC-System	ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare
Geldokumentationsanlage	Doc-Print II	Vilber Lourmat
Inkubator	Minitron	Infors HT
Membranfilter	2µm	Nalgene
Peristaltikpumpe	P1	GE Healthcare
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Präzisionswaage	CP224S	Sartorius®
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius
Rotator	Stuart® SB3	BioCote
Rotor	Sorvall SLA-3000	Thermo Scientific
Rotor	Sorvall SL-34	Thermo Scientific
Schüttler	Orbitalschüttler 4010	Köttermann
Sonifikator	Sonopuls HD 2200, MS 72	Bandelin
Spektrometer (Fluoreszenz)	FluoroLog®-3	Jobin Yvon Inc.
Spektrometer (OD_{600})	CO8000 Cell Density Meter	WPA Biowave
Spektrometer (TCSPC)	5000U	Jobin Yvon Inc.
Spektrometer (UV-Vis)	Cary 4000 UV-VIS	Agilent Technologies Inc.
Spektrometer (UV-Vis)	NanoDrop ND-1000	peqlab
Spritzenvorsatzfilter	2µm	Whatman
Stromquelle	Power Pac 3000	BioRad

Thermocycler	Primus 96 advanced	peqlab
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Ultrazentrifugalkonzentrator	Amicon® MW-15 10000k	EMD Millipore
Zentrifuge	Sorvall EvolutionRC	Thermo Scientific
Präzisionswaage	CP224S	Sartorius
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus

3.1.1.3 Sonstige Materialien

Tabelle 3-3: Verwendete *Lifescience*-Produkte

Produkt	Hersteller
dNTP-Mix	Fermentas
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Pfu DNA Polymerase	Fermentas
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
T4 DNA Ligase	New England Biolabs

3.1.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 3-4: Verwendete *E.coli*-Bakterienstämme mit Genotyp.

E. coli - Stamm	Genotyp	Hersteller
KK8	*trp*R, *tna*2, Δ*trp*EA2	Schneider et al. (1981)
BL21 (DH3)	F$^-$ *ompT hsdSB*($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)	Invitrogen
DH5alpha	F$^-$ endA1 *glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *λ–*	Invitrogen
turbo	*F', proA+B+, lacIq, Δ(lacZ)M15/fhuA2, Δ(lac-proAB), glnV, gal R(zgb-210::Tn10), Tets, endA1, thi-1, Δ(hsdS-mcrB)5*	NEB
XL1blue	endA1 *gyrA96*(nal^R) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *Δ(lacZ)M15] hsdR17*($r_K^- m_K^+$)	Promega

3.1.1.5 Lösungen

Lysogeny Broth-Medium

Für die Herstellung von einem Liter Lysogeny Broth-Medium (LB-Medium) wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und 5 g NaCl in einem Liter tridestiliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit einer 5 M NaOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt, in Erlenmeyerkolben mit Schikanen abgefüllt und autoklaviert.

KH_2PO_4/K_2HPO_4-Puffer (0,5 M-Stammlösung)

114,11 g di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H_2O (228,22 g/mol) und 68,05 g Kaliumdihydrogenphosphat (136,09 g/mol) wurden jeweils in einem Liter tridestiliertem Wasser gelöst. Die basische di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung wird vorgelegt und solange mit der sauren Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 7,5 erreicht wurde.

Ampicillin-Stammlösung (1 mM)

3,71 mg Ampicillin (als Natriumsalz vorliegend, 371,39 g/mol) wurden in 10 ml tridestiliertem Wasser gelöst und in 1 ml-Aliquots bei minus 22 °C eingefroren.

Chloramphenicol-Stammlösung (1 mM)

323 mg Chloramphenicol wurden in 10 ml Ethanol p.a. gelöst und in 1 ml-Aliquots bei minus 22 °C eingefroren.

Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid - Stammlösung

Für die Herstellung einer ein molaren Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) Stammlösung wurden 2,38 g Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (238,30 g/mol) in 10 ml tridestiliertem Wasser gelöst und in 1 ml-Aliquots bei minus 22 °C eingefroren.

Zinksulfat-Lösung

Für eine 0,1 molare $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (287,54 g/mol) wurden 14,38 g der Substanz in 1 Liter tridestiliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

NZY$^+$-Lösung

Zur Herstellung der NYZ$^+$-Lösung als Wachstumsmedium für *XL1-Blue Supercompetent Cells* der Firma Stratagene wurden 10 g N-Z-Amine® (Sigma-Aldrich), 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl in 500 ml tridestiliertem Wasser gelöst und auf pH 7.5 mit 5 M NaOH eingestellt. Die Lösung wurde auf ein Liter Gesamtvolumen mit tridestiliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 12,5 ml jeweils einer 1 M $MgCl_2$- und $MgSO_4$ Lösung, sowie 10 ml einer zwei molaren Glukose-Lösung steril filtriert und der autoklavierten Lösung beigegeben.

LB-(Ampicillin-)Agar

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 20 g Agar in 500 ml tridestiliertem Wasser gelöst und auf pH 7.0 mit 5 M NaOH eingestellt. Die Lösung wurde anschließend auf ein Liter Gesamtvolumen mit tridestiliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Nach Zugabe von 10 ml steril filtrierter Ampicillinlösung (10 mg/ml) bei einer Lösungstemperatur des LB-Agars von 55 °C wurde die Gesamtlösung in 20 ml-Portionen mit Hilfe von sterilen Pipetten in sterile Kunststoff-Petrischalen abgefüllt. Für die Transformationskontrolle mit dem *pWhitescript 4.5-kb* Kontrollvektor der Firma Stratagene (heute: Agilant Technologies, Inc.) wurden 250 ml LB-(Ampicillin-)Agar, wie oben beschrieben, vorbereitet und vor dem Abfüllen in Petrischalen mit 2 ml steril filtriertes X-Gal (10 mg/ml, 80 µg/ml Endkonzentration) und 1,2 g IPTG (20 mM Endkonzentration) versetzt.

TRIS-Borat-EDTA (TBE) –Puffer

10,8 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (89 mM), 5,5 g Borat (89 mM) und 0,7 g EDTA (2,5 mM) wurden in 700 ml tridestiliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 8,0 mit 1 M Salzsäure eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml mit tridestiliertem Wasser verdünnt.

Agarose-Gel für die Elektrophorese

400 ml TBE-Puffer wurden zusammen mit 4 g Agarose versetzt und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis eine klare Lösung erkennbar war.

5fach Probenpuffer für SDS-PAGE

In 10 ml 0,25 M Tris/HCl-Puffer (pH 6,8) wurden 1 g Natriumlaurylsulfat, 3 g Sucrose und 0,01 g Bromphenolblau (Natriumsalz) gelöst und mit 350 µl 2-Mercaptoethanol versetzt.

3.1.2 Übersicht der molekularbiologischen und Proteinchemischen Methoden

3.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) ist eine Standardmethode zur *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren (RNA, DNA und cDNA). Sie geht auf Kleppe et al. (1971) zurück und wurde von Kary B. Mullis wiederentdeckt (Saiki et al., 1985), wofür er 1993 zusammen mit Michael Smith mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet wurde (http://www.nobelprize.org). Für die Amplifikation von doppelsträngiger DNA (dsDNA) muss diese zunächst in zwei Einzelstränge (Matrizen) zerfallen. Dieser Vorgang der *Denaturierung* geschieht bei 92 bis 95°C (Abbildung 3-1 A). Anschließend erfolgt bei 40 bis 60 °C die Anlagerung von speziellen Oligonucleotiden (Primer) am 5‘- und 3‘-Ende des zu amplifizierenden Bereiches (*Annealing*, Abbildung 3-1 B), deren Nucleotid-Sequenz komplementär zur DNA-Matrize ist. Die Annealing-Temperatur ist dabei abhängig von deren mittlere Schmelztemperatur T_m. Durch eine hitzeresistente DNA-Polymerase werden diese Oligonucleotide mit Hilfe freier Desoxynucleodid-Triphosphate (dNTPs) verlängert (Elongation, Abbildung 3-1 C), so dass wieder ein Doppelstrang entsteht. Dies geschieht gewöhnlich zwischen 68 und 75 °C. Die Polymerisation erfolgt dabei so lange, bis die DNA-Polymerase diese vollständig beendet und sich vom Doppelstrang gelöst hat, oder wenn die Reaktion durch erneute Denaturierung unterbrochen wird. Nach erfolgter Elongation kann ein neuer Synthesezyklus gestartet werden (Abbildung 3-1 D) (Müller; 2001).

Für diese Arbeit wurde die PCR für die Vollplasmid-Amplifikation (engl. *whole plasmid amplification*, *WPA*), als auch für *overlap extension PCR* (oePCR) verwendet.

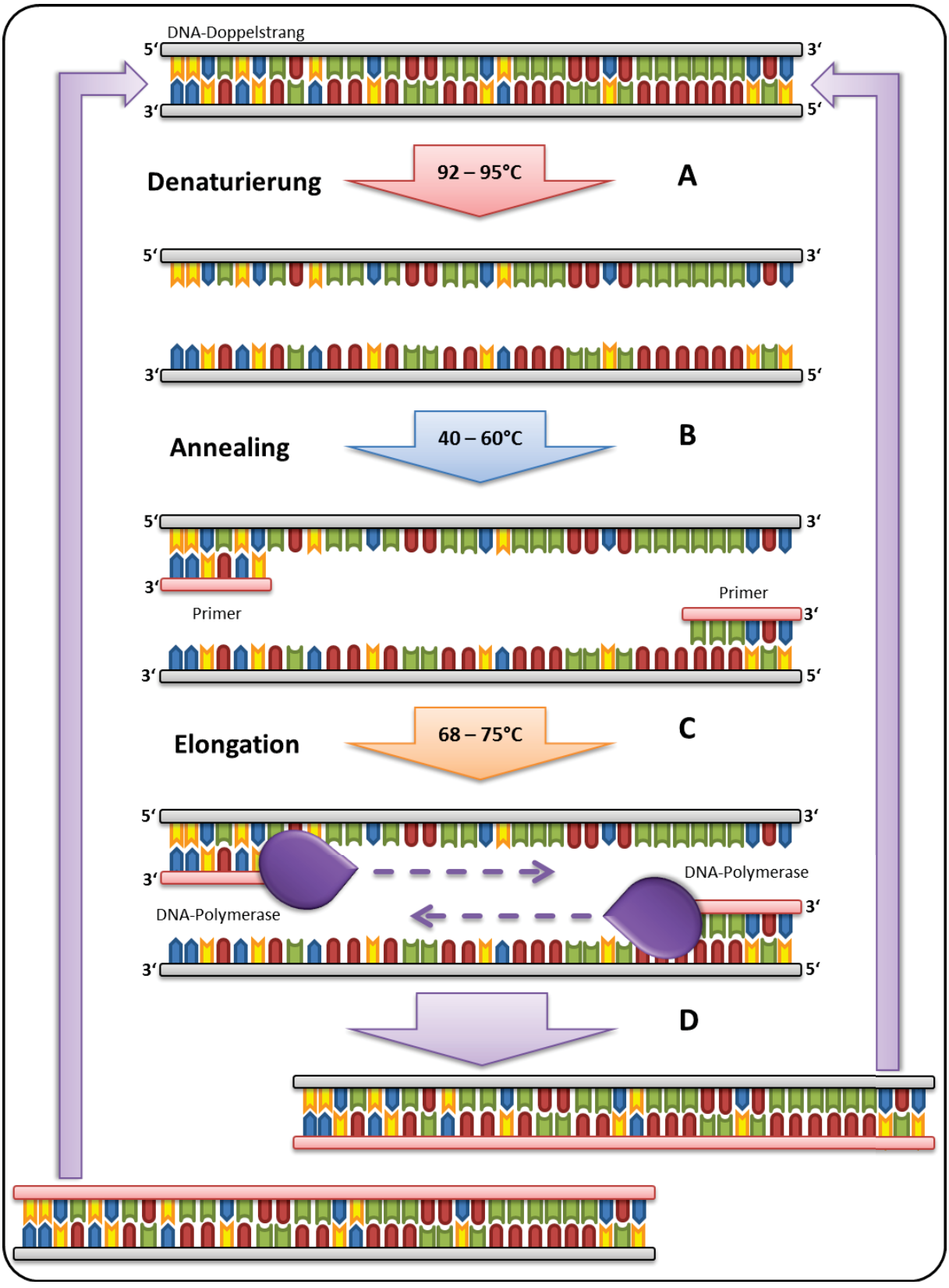


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion. (A) Ein DNA-Doppelstrang (Genfragment, Plasmid, etc.) wird bei 92 bis 95 °C denaturiert, so dass zwei Einzelstränge entstehen. **(B)** Bei 40 bis 60 °C lagern sich komplementäre Oligonucleotide (Primer) an die DNA-Matrize an (Annealing). **(C)** Die Verlängerung der Oligonucleotide durch die DNA-Polymerase erfolgt zwischen 68 und 75 °C. **(D)** Die Synthese stoppt bei vollständigem Verschwinden des Einzelstranges oder durch den nächsten Denaturierungsschritt im nächsten Zyklus. Bei n Durchläufen werden theoretisch 2^n Doppelstränge generiert.

3.1.2.1.1 Einbringen von Punktmutationen mit Hilfe der PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können gezielt Mutationen in eine DNA-Matrize eingebaut werden. Die Mutation wird dabei in die Primerstruktur eingebaut, so dass die Nucleotid-Sequenz nicht mehr vollständig komplementär zur DNA-Matrize ist. Bei entsprechender Primerlänge wird trotzdem eine Anlagerung an die Matrize erreicht. Durch den kontinuierlichen Prozess aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird der mutierte DNA-Strang bei der Synthese die dominierende Spezies.

Abbildung 3-2 erläutert diesen Prozess.

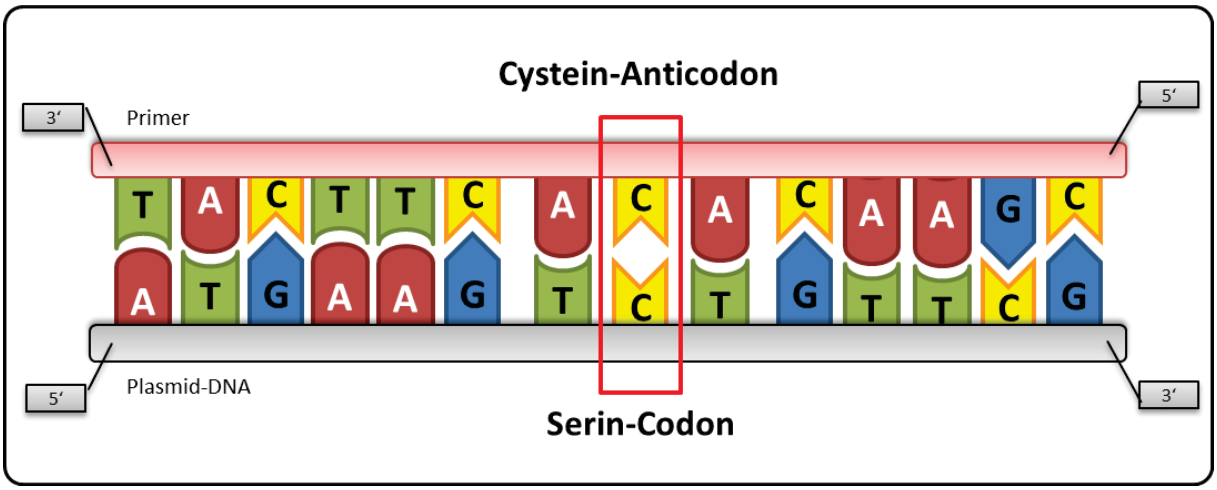


Abbildung 3-2: Einbringen von Punktmutationen. Mit einer entsprechenden Länge des Primers kommt eine Anlagerung an die DNA-Matrize zustande, obwohl beide nicht vollständig komplementär zueinander sind. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Änderung eines Serin-Codons in ein Cystein-Codon. Die inkomplementären Nucleotide sind rot eingerahmt.

3.1.2.1.2 *Overlap-Extention* PCR

Die *Overlap Extension*–PCR (OE-PCR) ist eine spezielle Methode für die gerichtete Mutagenese. Mit zwei zueinander komplementären Mutationsprimer, sowie mit genflankierenden Primern von der gleichen Matrize werden in zwei seperaten PCR-Ansätzen überlappende Genfragmente amplifiziert. Die flankierenden und die mutagenen Primer kennzeichnen dabei die Enden der neu synthetisierten DNA-Fragmente. Diese werden mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt. In einem weiteren PCR-Ansatz überlappen diese Fragmente im Bereich der ausgetauschten Nukleotide, so dass die DNA-Polymerase diese verlängern kann. Dadurch entstehen DNA-Fragmente mit der gewünschten Mutation, die mit den flankierenden Primern weiter vervielfältigt werden können. Das Prinzip der oePCR ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

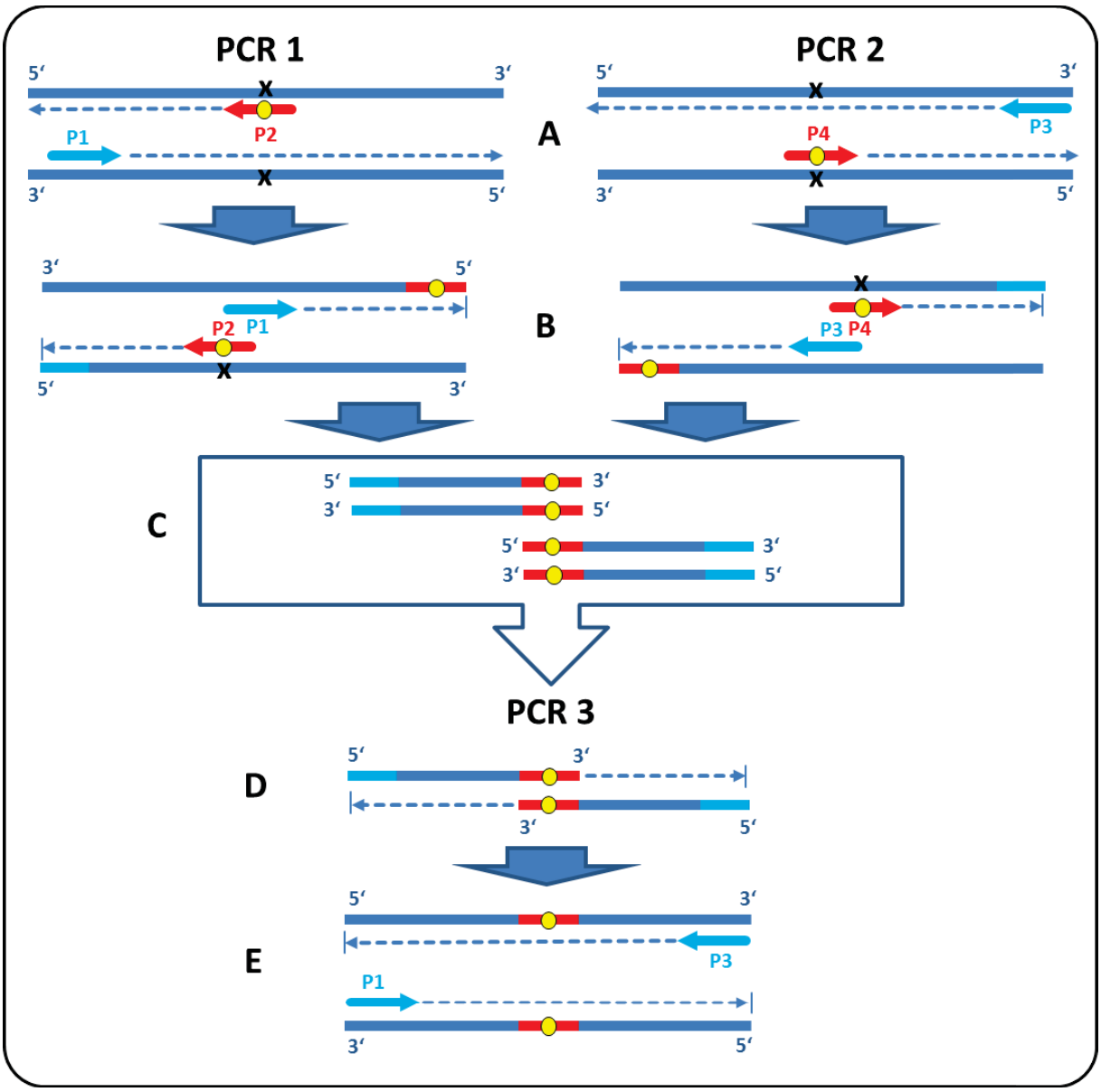


Abbildung 3-3: Prinzip der *overlap extension* PCR (oePCR). Für diese PCR-Methode sind neben den Mutagenese-Primern (P2 und P4) zwei flankierende Primer (P1 und P3) erforderlich. Diese werden in zwei seperaten PCR-Zyklen eingesetzt. **(A)** Bei der Elongation werden die Oligonucleotide zunächst über den gesammten Einzelstrang verlängert. **(B)** Im zweiten Schritt sind bereits DNA-Fragmente mit den Oligonucleotid-Sequenzen als Fragmentende vorhanden, so dass **(C)** nur noch Fragmente mit diesen Enden synthetisiert werden. **(D)** In einer dritten PCR hybridisieren diese Fragmente an den Enden so miteinander, dass die DNA-Polymerase die nicht überlappenden Teile des DNA-Stranges synthetisieren kann. **(E)** Zur Vervielfältigung der Fragmente werden im späteren Verlauf der PCR die flankierenden Primer dazugegeben.

3.1.2.2 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine analytische Methode zur Mengen- und Größenbestimmung von Proteinen und Plasmid-DNA und beruht auf der Trennwirkung eines poröses Gels mit Hilfe eines elektrischen Feldes (Adkins*, et al.*; 1996, Laemmli; 1970). Abbildung 3-4 B verdeutlicht das Prinzip. Für die Proteinanalyse werden die zu analysierenden Proteine mit Sodium-Dodecyl-sulfat (SDS) denaturiert (Abbildung 3-4 A), indem sich die SDS-Moleküle mit ihrem hydrophoben Teil an das Protein anlagern. Sie erhalten gleichzeitig durch den hydrophilen Teil eine negative Ladung. DNA benötigt ein solches Solvens aufgrund seines linearen Charakters und der negativen Grundladung nicht. Ringförmige Plasmid-DNA werden zur Linearisierung an einer Restriktionsstelle geschnitten.

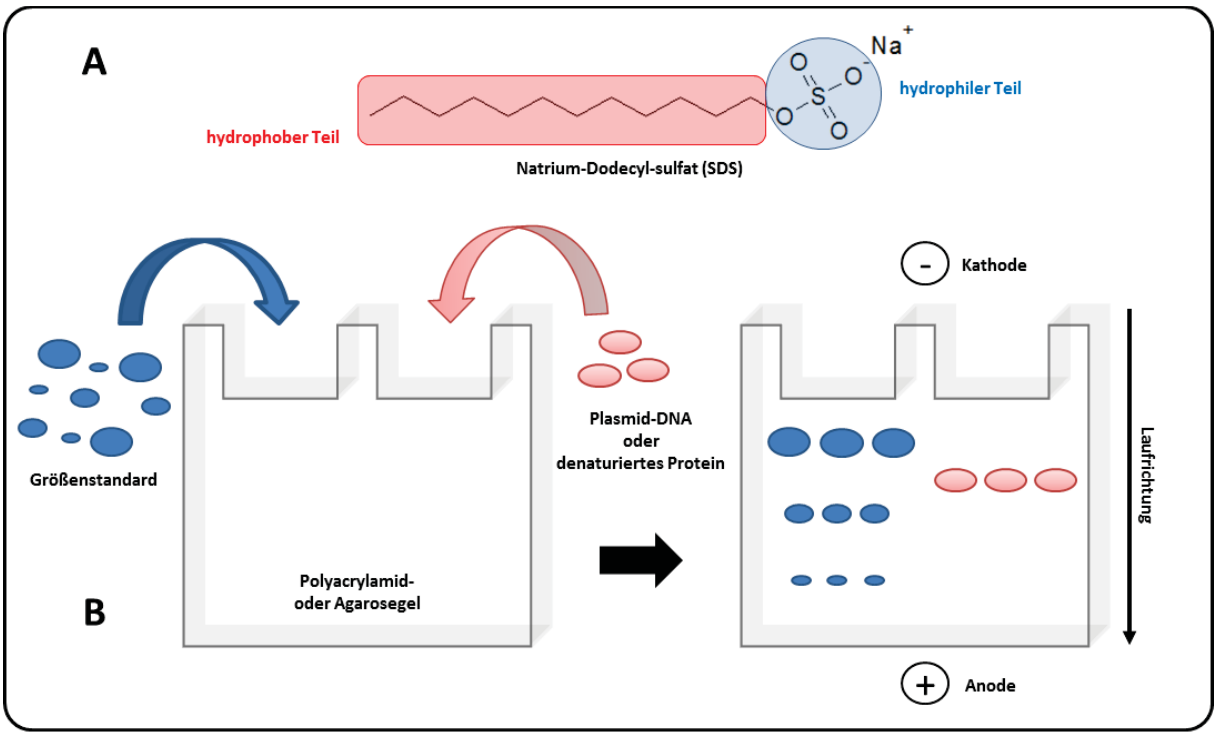


Abbildung 3-4: Prinzip der Elekrophorese zur Mengen- und Größenbestimmung von Biomolekülen. (A) Natrium-Dodecyl-sulfat (SDS) ist ein ionisches Detergens, das sich an Amniosäurereste eines Proteins anlagert und alle nicht-kovalenten Bindungen aufhebt, so dass nur noch die Primärstruktur des Proteins verbleibt. **(B)** Das Polyacrylamid- (für mit SDS denaturierte Proteine) bzw. Agarosegel (für Plasmid-DNA) wird mit einer Probe beladen. Wird nun eine Spannung wie abgebildet an das Elektrophoresegel angelegt, bewegt sich die Probe aufgrund seiner negativen Ladung in Richtung der Anode. Durch den Molekularsiebeffekt wandern kleinere Komplexe schneller als größere, wodurch eine Trennwirkung nach Molekulargewicht möglich wird. Größe und Menge der Probe kann durch zusätzliche Auftragung eines Größenstandards abgeschätzt werden.

Für die Visualisierung der Biomoleküle auf dem Gel müssen diese nach der Elektrophorese mit Farbstoffen wie *Coomassie blue* (für Proteine), beziehungsweise bereits während der Elektrophorese mit Ethidiumbromid (für DNA, sichtbar durch UV-Licht), angefärbt werden.

3.1.2.2.1 Elektrophorese mit Agarosegelen

Die Agarosegel-Elektrophorese kann neben ihrer Analysefunktion zur präparativen Aufreinigung von einzelnen DNA-Fragmenten angewandt werden (Adkins*, et al.*; 1996). In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,0 % und einer Taschengröße von 20 µl verwendet. Bei einer Temperatur von 55 °C wurde die Agarose mit 1,5 µl einer 0,5 % (w/v) Ethidiumbromidlösung versetzt. Zur Mengen- und Größenabschätzung wurde in die erste Tasche 10 µl des Längenstandards *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) eingebracht. Die Proben wurden vor dem Einbringen in die Taschen mit *FastDigest™ Green Reaction Buffer* der Firma Fermentas versetzt. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V bei variabler Stromstärke zwischen 80 und 110 mA. Für die Betrachtung und digitalen Archivierung der DNA-Fragmente wurde die Geldokumentationsanlage Doc-Print II der Firma Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei Bedarf unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel geschnitten und mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II-Kits* der Firma Macherey Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) aufgereinigt.

3.1.2.2.2 Elektrophorese mit SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Probenvorbereitung wurden die zu analysierenden Proteine mit 5fachem SDS-Probenpuffer versetzt und bei 98°C im Thermomixer *Eppendorf comfort* denaturiert. Die SDS-PAGE erfolgte mit 12% oder 15%-SDS-Gelen (vergleiche Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Substanz	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)
30 %ige Acrylamidlösung	0,830 ml	4,00 ml	5 ml
1 M Tris/Glycin, pH 8.8	nicht verwendet	3,75 ml	3,75 ml
1 M Tris/Glycin. pH 6.8	0,626 ml	nicht verwendet	nicht verwendet
tridest. Wasser	3,459 ml	2,09	1,09 ml
20 % (w/v) SDS	25 µl	50 µl	50 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
Polymerisationsdauer	**20 min**	**30 min**	**30 min**

Die Elektrophorese (*Mini-PROTEAN Gelkammer II*, Bio-Rad) erfolgte bei einer Spannung von zunächst 100 V, um die Probe im Sammelgel zu konzentrieren. Nach 15 Minuten wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Nach weiteren 45 Minuten wurde das Elektrophoresegel mit vollentsalztem Wasser bis zur Entfärbung des SDS-Probenpuffers gewaschen. Das Einfärben der Proteinbanden erfolgte mit *SimplyBlue™ SafeStain* von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bei gleichzeitigem Erwärmen durch Mikrowellen. Für einen besseren Kontrast von Proteinbanden zum Farbstoffhintergrund wurde das gefärbte Gel erneut mit vollentsalztem Wasser für mehrere Tage gewaschen.

3.1.2.3 Einbringen von nicht-natürlichen Aminosäuren in Proteinstrukturen

Die Integration nicht-natürlicher Aminosäuren in die Proteinstruktur ist eine Methode zur Installation von selektiv reaktiven Gruppen für die Fluoreszenzmarkierung. Diese Methode wurde nur für das T4 Lysozym (T4L, Modellsystem IV) etabliert, da die Fluoreszenzmarkierung bei 37 °C und einem pH-Wert von 4,0 in einem Zeitraum von 48 Stunden erfolgte (Lemke; 2011). Diese unphysiologischen Bedingungen für eine *in vitro* Fluoreszenzmarkierung überstehen nur wenige Proteine. Das Einbringen der künstlichen Aminosäure 4-Acetylphenylalanin in T4 Lysozym wurde durch einen Eingriff in die Proteinbiosynthese realisiert. Dazu wurde das „Amber"-Stopcodon (TAG) so umfunktionalisiert, dass die Termination der Proteinsynthese durch einen Einbau von 4-Acetylphenylalanin ersetzt wurde. Hierzu bedurfte es einer modifizierten Transfer-RNA (tRNA), sowie einer modifizierten Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) mit einer UAG-Erkennungssequenz, die beide auf dem Co-Vektor pEVOL^{pAcF} (Lemke; 2011) codiert und

bereits während der Anzucht des Expressionsstammes synthetisiert wurden. Durch einfache Zugabe des 4-Acetylphenylalanin während der Anzucht der Hauptkultur wurde dieses bei der Induktion einer T4 Lysozym-Amber-Mutante an der Stelle des „TAG“ in die Proteinstruktur eingebaut. Durch Co-Induktion mit L-Arabinose wurde eine zweite aaRS-Sequenz auf dem pEVOL^{pAcF}-Vektor aktiviert, so dass die Zahl der modifizierten aaRS-Proteine bei der Expression zunahm. Im Inneren des Expressionsbakteriums (im Fall von T4 Lysozym handelte es sich um den Stamm *E. coli* BL21(DE3)) wurde unter ATP-Verbrauch das 4-Acetylphenylalanin an der aaRS zu einem Acyladenylat umgewandelt (siehe Abbildung 3-5 A). Dabei wurde Pyrophosphat freigesetzt. Die modifizierte tRNA koppelte anschließend an der Erkennungssequenz für das Anticodon an die aaRS. Der Transfer des 4-Acetylphenylalanins an die tRNA erfolgte über eine Bindung des Acylrestes der Aminosäure mit der Hydroxygruppe an der 2‘-Position der Ribose der 3‘-endigen RNA-Base Adenin unter Bildung von AMP (Abbildung 3-5 B). Das 4-Acetylphenylalanin wurde somit in die Proteinstruktur während der Translation am Ribosom eingebaut (Abbildung 3-5 C).

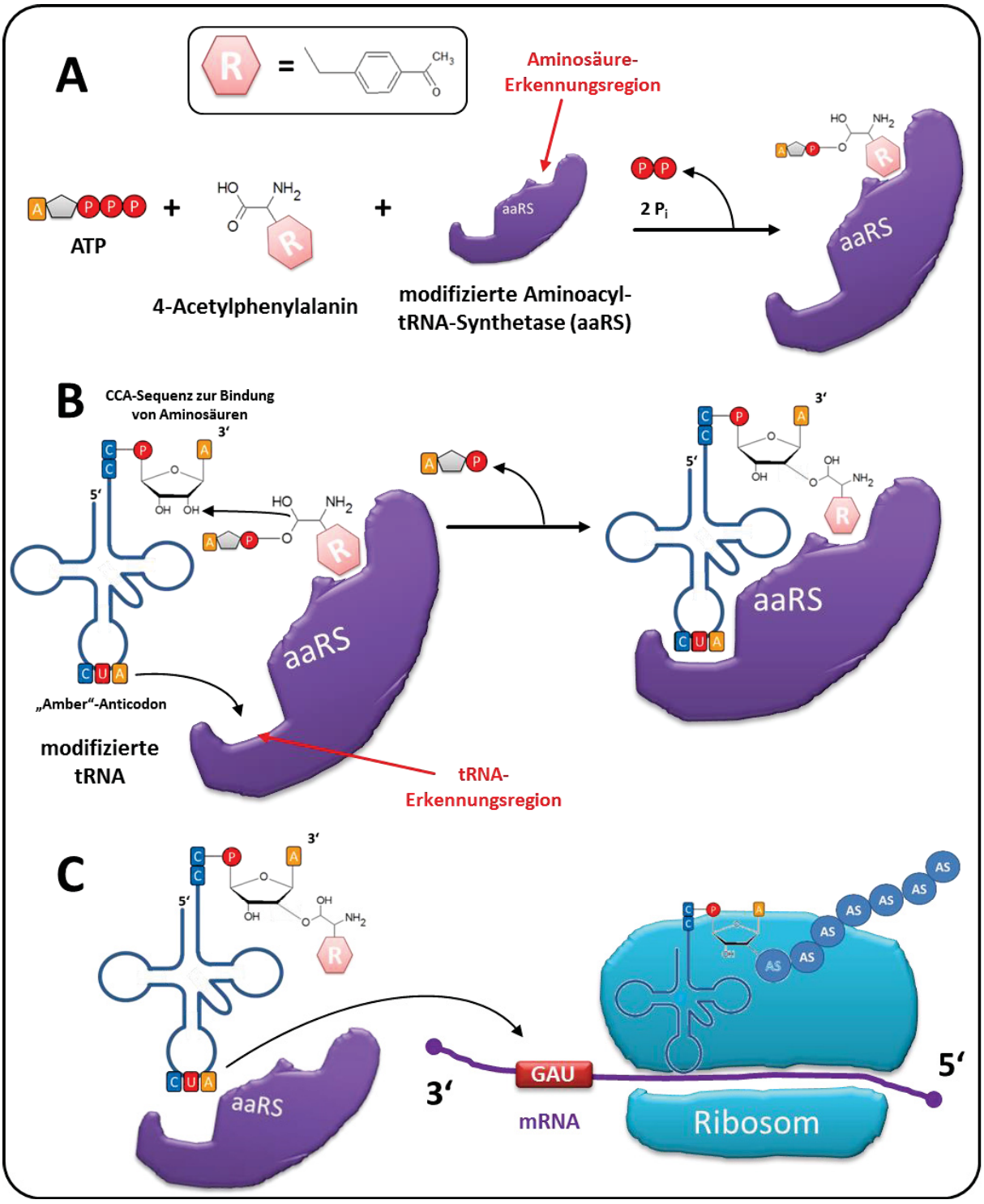


Abbildung 3-5: Prinzip der Integration von künstlichen Aminosäuren in die T4L-Proteinstruktur. (A) Die nicht-natürliche Aminosäure 4-Acetylphenylalanin wird von der modifizierten Aminoycyl-tRNA-Synthetase (aaRS) gebunden und mit Hilfe von ATP an der Carboxylgruppe als Acyladenylat für die Bindung an die t-RNA vorbereitet. **(B)** Die ebenfalls mit Hilfe des pEVOL^{pAcF}-Vektors synthetisierte und modifizierte tRNA koppelt an der Erkennungssequenz für das Anticodon CUA (TAG) an die aaRS. Anschließend bindet unter Bildung von AMP der Acylrest der Aminosäure mit der Hydroxylgruppe an der 2'-Position der Ribose der RNA-Base Adenin. **(C)** Die aaRS löst sich vom aktivierten tRNA-Aminosäureester. Da 4-Acetylphenylalanin nicht von einer natürlichen Aminosäure zu unterscheiden ist, kann es somit während der Proteinbiosynthese (Translation) am Ribosom in die Proteinstruktur eingebaut werden.

3.1.2.3.1 Chromatographische Proteinaufreinigung

Die Chromatographie ist in der Molekularbiologie eines der wichtigsten Verfahren zur Isolierung eines Zielproteins. Dabei wandern die Proteine in einer mobilen Phase durch eine stationäre Phase, wodurch eine Trennwirkung realisiert wird. Die Anwendungsmöglichkeiten sind dabei durch die unterschiedlichen chromatographischen Verfahren sehr vielfältig. In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen drei unterschiedliche chromatographische Methoden verwendet.

Die **Größenausschlusschromatographie** ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Als stationäre Phase dient dabei ein Gerüst aus biologischen oder synthetischen Polymeren, die als kleine Kügelchen in der Größe von 10 bis 250 µm vorliegen. Die Trennwirkung der Gelfiltration besteht aufgrund der mikroskopisch kleinen Hohlräume der Polymerkügelchen. Kleine Proteine können in die Hohlräume eindringen, während größere Proteine nur teilweise oder gar nicht in die Polymerstruktur vordringen können (Abbildung 3-6 A). Je kleiner ein Protein ist, desto größer ist die Verweildauer in der Säulenmatrix bis zur Elution. Proteingröße und Retentionszeit verhalten sich also umgekehrt proportional zueinander. Für diese Arbeit wurde die Größenausschlusschromatographie in erster Linie zur Enfernung ungekoppelter Farbstoffe von fluoreszenzmarkierten Proteinen verwendet.

Bei der **Kationenaustauschchromatiographie** werden bei neutralem pH-Wert negativ geladene Gruppen (wie zum Beispiel deprotonierte Sulfopropylgruppen (SP): $-O-CH_2CH_2CH_2-SO_3^-$) an einer Polymermatrix dazu verwendet, positiv geladene Proteine festzuhalten (Abbildung 3-6 B). Neutrale oder negativ geladene Proteine können hingegen die stationäre Phase ungehindert passieren. Die Eluierung des positiv geladenen Zielproteins wird durch einen Natriumchlorid-Gradienten realisiert. Dabei konkurrieren die positiv geladen Natriumionen mit dem Protein um die Bindestellen an der Säulenmatrix. Die Ionenaustauschchromatographie stellt somit ein sehr selektives Verfahren zur Proteinaufreinigung dar. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Bindungsankers für die Metallchelat-Affinitätschromatographie wurden die Varianten des Lysozyms des T4 Phagen mit der Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt.

Noch selektiver arbeitet die **Metallchelat-Affinitätschromatographie** (IMAC, *immobilized metal chelate affinity chromatography*). Diese wurde für das Modellsystem I (ssAnPRT) angewandt. Dabei muss vor der Verwendung dieser Technik eine geeignete Bindungseigenschaft in die Proteinstruktur eingebracht werden. Die häufigsten

Bindungsanker sind dabei Histidinseitenketten (sogenannte *His-tags,* engl. *tag*, Etikett) am C- oder N-Terminus des Proteins, wie bei ssAnPRT realisiert wurde. Diese binden nichtkovalent an immobilisierte Chelatliganden der Säulenmatrix. Diese Chelatliganden wurden zuvor mit Übergangsmetallionen wie Ni^{2+}, Zn^{2+} oder Co^{2+} beladen, so dass die freien Bindungsstellen des Metallchelatkomplexes mit den Histidinresten interagieren können (Abbildung 3-6 C). Obwohl diese Protein-Metallchelatkomplexe relativ instabil sind, ist die Affinität des Proteins zur Säulenmatrix ausreichend stark für eine sehr selektive Isolierung. Die IMAC-Technik ermöglicht somit eine Aufreinigung des Zielproteins in einem einzigen Schritt. Für die Eluierung von ssAnPRT wurde in dieser Arbeit Imidazol verwendet. Dabei konkurriert das Imidazol mit dem Protein, wie bereits die Natriumionen beim Kationenaustauscher, um die Bindungsstellen an der Säulenmatrix.

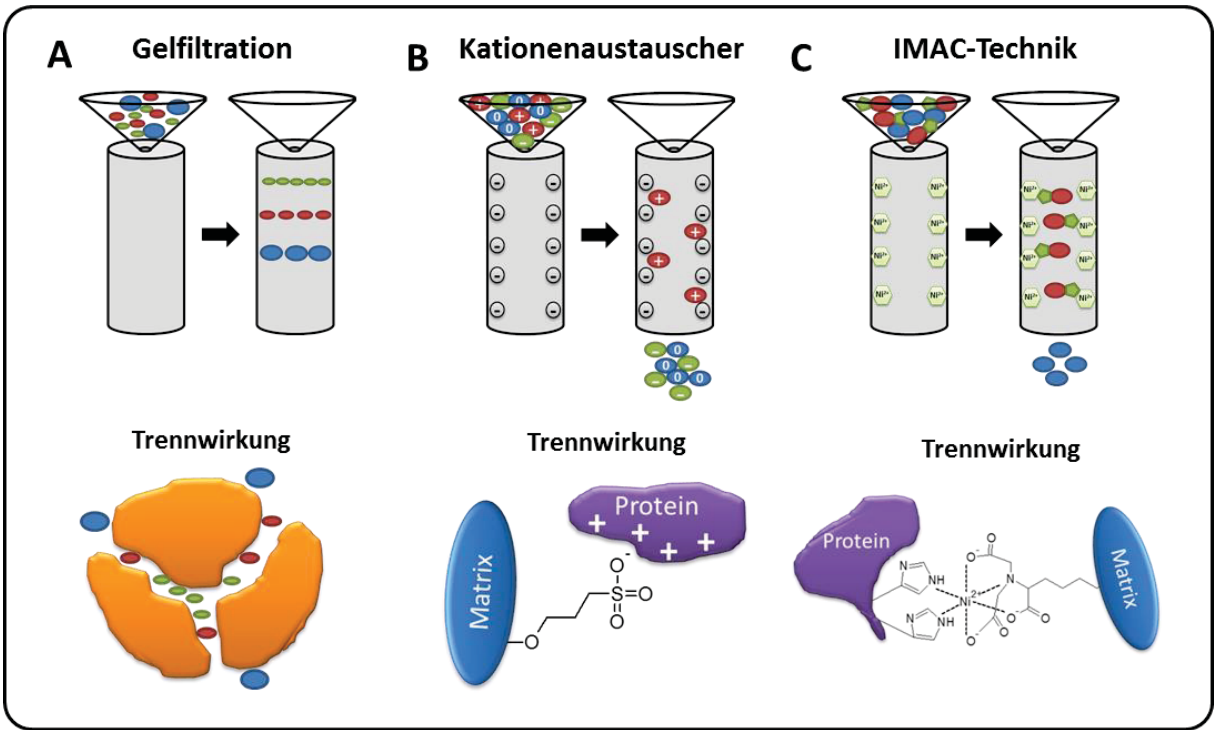


Abbildung 3-6: Verschiedene chromatographische Verfahren, wie sie in dieser Arbeit Verwendung finden. (A) Gelfiltration: Die stationäre Phase besteht aus porösen Gelkügelchen (orange dargestellt), die für kleinere Proteine zugänglich sind, während größere Proteine außen vor bleiben. Daher durchlaufen größere Proteine die Säule schneller als kleinere. **(B) Kationenaustauschchromatographie:** Eine Polymermatrix mit negativ geladenen Seitenketten dient hier als stationäre Phase. Positiv geladene Proteine bleiben an der Säulenmatrix haften, während negativ geladene oder neutrale Proteine die Säule durchlaufen. Das positiv geladene Zielprotein kann später mit einem Natriumchlorid-Gradienten eluiert werden. **(C) IMAC (*immobilized metal chelate affinity chromatography*):** Das Protein bindet an Übergangsmetallionen wie Ni^{2+} durch eine Histidinseitenkette (*His-tag*). Die Elution erfolgt in diesem Fall mit Hilfe von Imidazol.

3.1.2.4 Markierung von modifizierten Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen an die in dieser Arbeit isolierten Proteine erfolgte entweder über freie Cysteine in der Proteinstruktur oder mit Hilfe der künstlichen Aminosäure para-Acetylphenylalanin (nur für T4 Lysozym, Modellsystem II). Die Bindung über die Cysteine wurde durch eine Additionsreaktion mit reaktiven Maleimid-Gruppen der Farbstoffe realisiert. Die Bindung an para-Acetylphenylalanin erfolgte über eine Hydroxylamin-Gruppe des Farbstoffes unter Bildung eines Oxims in einer Kondensationsreaktion (Abbildung 3-7 A). Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe stammten von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Die Fluoerszenzfarbstoff-Parameter Strukturen sind in Abbildung 3-7 B dargestellt.

Tabelle 3-6: Spektroskopische Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (Herstellerangaben).

Alexa Fluor® 488 Maleimid C_5	
Anregungsmaximum	493 nm
Emissionsmaximum	516 nm
Extinktionskoeffizient am Peakmaximum	72000 $cm^{-1}M^{-1}$

Alexa Fluor® 488 Hydroxylamin C_5	
Anregungsmaximum	494 nm
Emissionsmaximum	518 nm
Extinktionskoeffizient am Peakmaximum	77000 $cm^{-1}M^{-1}$

Bodipy®FL N-(2-aminoethyl) Maleimid C_2	
Anregungsmaximum	502 nm
Emissionsmaximum	510 nm
Extinktionskoeffizient am Peakmaximum	79000 $cm^{-1}M^{-1}$

Alexa Fluor® 594 Maleimid C_5	
Anregungsmaximum	588 nm
Emissionsmaximum	612 nm
Extinktionskoeffizient am Peakmaximum	96000 $cm^{-1}M^{-1}$

Alexa Fluor® 647 Maleimid C_2	
Anregungsmaximum	651 nm
Emissionsmaximum	671 nm
Extinktionskoeffizient am Peakmaximum	265000 $cm^{-1}M^{-1}$

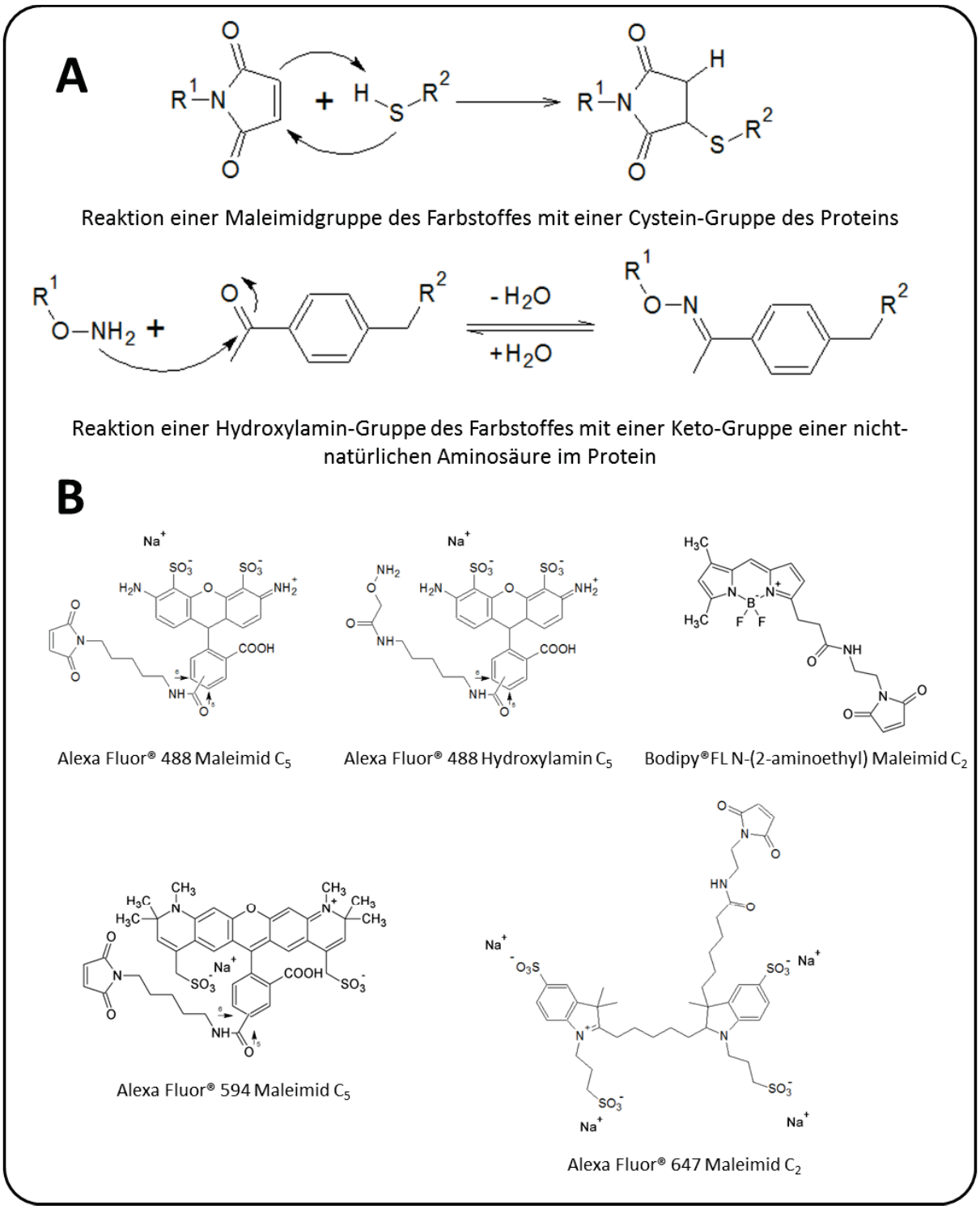


Abbildung 3-7: Kopplungsmöglichkeiten von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine. (A) Die obere Reaktionsgleichung zeigt die Additionsreaktion der Maleimid-Gruppe eines Fluoreszenzfarbstoffes (R^1) mit dem freien Cystein eines Proteins (R^2). In der unteren Reaktionsgleichung ist die Kondensationsreaktion der Hydroxylamin-Gruppe des Farbstoffes (R^1) mit der künstlichen Aminosäure 4-Acetylphenylalanin am Protein (R^2) dargestellt. **(B)** Molekülstrukturen der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

3.1.3 Spezieller Methodenteil für Modellsystem I:

Anthranilat- Phosphoribosyltransferase

3.1.3.1 Mutagenese

3.1.3.1.1 DNA-Template und Primer

Für die Mutagenese wurde ein pQE40-Vektor der Firma Qiagen (Abbildung 3-8) mit einer integrierten wildtypischen ssAnPRT-Sequenz (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Sterner, Universität Regensburg) als DNA-Template verwendet. Die verwendeten Primer für die Polymerasekettenreaktion sind im Anhang (Kapitel 8.1.1, Tabelle 8-1) aufgeführt.

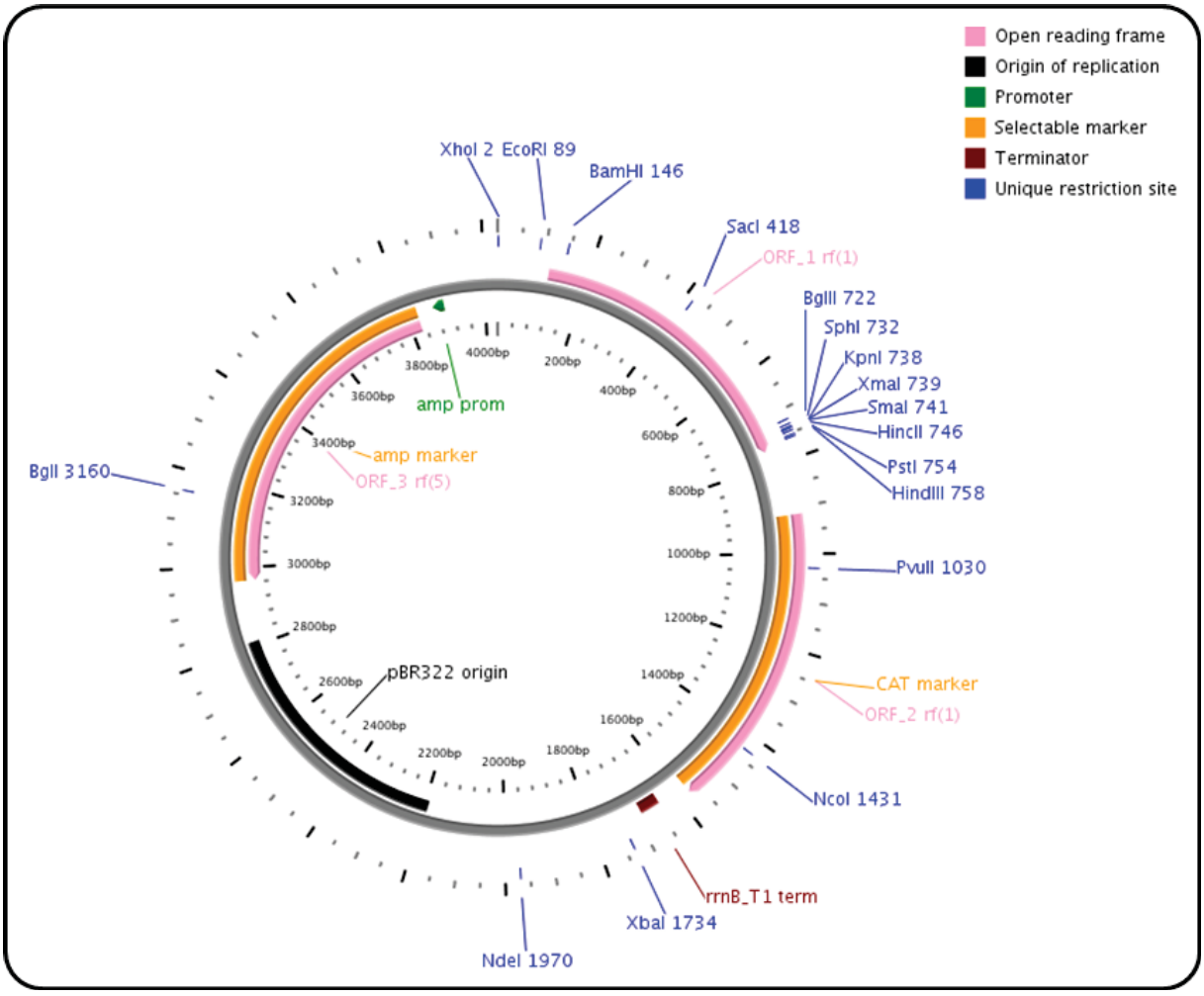


Abbildung 3-8: Plasmid-Karte des pQE40-Vektors. Die DNA-Sequenz wurde von der Firma *Qiagen GmbH Deutschland (Hilden)* zur Verfügung gestellt. Die graphische Kartierung erfolgte durch *PlasMapper 2.0 (Dong, et al.; 2004)*.

3.1.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methodik der Polymerase-Kettenreaktion ist bereits in Kapitel 3.1.2.1 erläutert worden. Das Einbringen von Cystein-Punktmutationen für die Farbstoffmarkierung wurde mit Hilfe eines Mutagenese-Kits (Quikchange II Site-Directed Mutagenesis Kit) der Firma Stratagene realisiert. Die dabei verwendete *PfuTurbo® DNA Polymerase* besitzt laut Hersteller (Quikchange II Site-Directed Mutagenesis Kit Manual) eine 6-fach geringere Fehlerrate, als eine herkömmliche *Taq* DNA Polymerase. Der Reaktionspuffer für die Polymerase-Kettenreaktion enthielt 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 200 mM Tris-HCl, 20 mM $MgSO_4$, 1 % Triton® X-100 und 1 mg/ml BSA. Um den Erfolg der PCR und der Transformation zu beurteilen, wurde dem Mutagenese-Kit ein Kontrollvektor (*pWhitescript 4.5-kb*) zusammen mit Kontrollprimern (*oligonucleotide control primer #1 und #2,* 34-mer, 100 ng/µl) beigelegt. Dieses Kontrollplasmid enthält ein Stop Codon (TAA) an der Stelle, wo normalerweise das Glutamin Codon (CAA) eines β-Galactosidase-Gens vorhanden ist, wodurch die β-Galactosidase nicht mehr zur Expression gebracht werden kann. Mit Hilfe der Kontrollprimer soll bei erfolgreicher PCR das Stopp Codon (TAA) wieder in das Glutamin Codon (CAA) umgeformt werden. 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) wird in Anwesenheit von β-Galactosidase und anschließender Oxidation mit Luftsauerstoff zu 5,5‘-Dibrom-4,4‘-dichlor-indigo umgesetzt (Horwitz*, et al.*; 1964). Bei erfolgreicher Mutagenese, sowie Transformation und Expression der β-Galactosidase (IPTG-induziert) erhalten Bakterienkolonien auf LB-Agar-Platten eine bläuliche Färbung.

In Tabelle 3-7 (Kontrollplasmid) und Tabelle 3-8 (pQE-ssAnPRT-Vektor) sind die Ansätze für die PCR zusammengefasst. Als nukleasefreies Wasser wurde autoklaviertes Reinstwasser verwendet.

Tabelle 3-7: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für das Kontrollplasmid *pWhitescript 4.5-kb* und pQE40-ssAnPRT.

Komponente	Menge
DNA-Template *pWhitescript 4.5-kb*	10 ng
oligonucleotide control primer #1 (forward)	125 pmol
oligonucleotide control primer #2 (reverse)	125 pmol
Stratagene 10x reaction buffer	5 µl
Stratagene dNTP-Mix [10mM each]	1 µl
nukleasefreies Wasser	bis Reaktionsvolumen gleich 50 µl

Nach Zugabe von 1 µl *PfuTurbo®* DNA Polymerase (2,5 U/µl) je Reaktion wurden die PCR-Ansätze in den Thermocycler (Primus 96 advanced Gradient, Peqlab) eingesetzt. Die Reaktionsparameter sind in Tabelle 3-8 aufgeführt.

Tabelle 3-8: Reaktionsparameter für den PCR-Automaten für das Einbringen von Punktmutationen in pQE40-AnPRT (WPA).

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initialdenaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	Gradient	60 s	18
Elongation	68 °C	5 min	
Lagerung	37 °C	∞	1

3.1.3.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte mit Restriktionsenzym-Verdau

Zur Entfernung des (methylierten) DNA-Templates wurden jeweils 1 µl *Stratagene Dpn I* (10 U/µl) Restriktionsenzym je Reaktion pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C im Thermocycler verdaut.

3.1.3.1.4 Transformation in XL1-Blue Supercompetent Cells

Jeweils ein 50 µl -Aliquot *XL1-Blue Supercompetent Cells* für jede Probe wurde langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 1 µl der Dpn I / DNA –Lösung dazu pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der darauffolgende Hitzeschritt erfolgte bei 42°C für 45 Sekunden mit anschließender Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Danach folgte die Zugabe von jeweils 500 µl auf 37 °C vorgewärmter NZY^+-Lösung und eine weitere Inkubation bei 37 °C und 250 rpm für eine Stunde. 250 µl der Probe wurden auf jeweils eine Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Für die Mutagenese- und Transformationskontrolle werden LB-Ampicillin-Agar-Platten mit 80 µg/ml X-gal und 20 mM IPTG verwendet. Die Transformations-Agarplatten wurden anschließend für 16 Stunden bei 37 °C in einen Inkubator (*Minitron*, Infors AG) gestellt.

3.1.3.1.5 Inokulation und Plasmidpräparation von pQE40-ssAnPRT

Nach erfolgreicher Mutagenese waren auf den Transformations-Agarplatten Bakterienkolonien zu erkennen. Jeweils drei Kolonien je Variante wurden mit sterilen Pipettenspitzen aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für je eine Kolonie überführt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 37 °C und 140 rpm in einem Inkubationsschüttler (*Minitron*, Infors AG) wurden die neu entstandenen Plasmide mit Hilfe eines DNA-Aufreinigungskits (*Plasmid Mini Kit*, *Qiagen*, 12123) aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde mit einem *Nanodrop®* Spektralphotometer (*ND-1000*, Peqlab) ermittelt. Eine erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung bestätigt und erfolgte durch die Firma *GATC Biotech AG*.

3.1.3.1.6 Plasmidgewinnung im präparativen Maßstab

Für eine größere Plasmidausbeute wurden die so erhaltenen Plasmidvarianten in *E.coli Turbo* der Firma New England Biolabs Inc. transformiert. Ein 100 µl Aliquot kompetenter *E.coli Turbo* Zellen wurde zusammen mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C und erneuter Inkubation auf Eis für weitere fünf Minuten wurden die Zellen mit 900 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für eine Stunde im Thermomixer (*comfort*, Eppendorf) zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz (phänische Expression) belassen. 200 µl dieser Bakteriensuspension wurden anschließend auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und für 12 Stunden bei 37 °C in einen Inkubator mit Programmiermöglichkeit und Kühlfunktion (*Multitron*, Infors AG) gestellt. Mit den erhaltenen Bakterienkolonien wurden 100 ml LB-Medium zusammen mit 100 µL (100 µM) Ampicillin (1 mM-Stock) angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Aus dieser Bakterienkultur wurde mit Hilfe eines Plasmidaufreinigungskits (*Plasmid Midi Kit 12143*, Qiagen AG Hilden) bis zu 120 ng/µl pQE40-AnPRT erhalten.

3.1.3.2 Heterologe Proteinexpression und Aufreinigung

Die Produktion und Aufreinigung der ssAnPRT-Varianten erfolgte nach Marino et al. (2006). Die in dieser Veröffentlichung gezeigten Methoden wurden für die in dieser Arbeit aufgereinigten ssAnPRT-Varianten optimiert.

3.1.3.2.1 Übernachtkultur

In einem 100 µl-Aliquot langsam auf Eis aufgetauten kompetenten *E.coli* KK8 Zellen wurden 100 ng einer pQE40-ssAnPRT-Plasmidvariante pipettiert und für fünf Minuten auf Eis gestellt. Die Transformation erfolgte wie oben beschrieben bei 42 °C für 45 s und anschließend erneuter Inkubation auf Eis für weitere fünf Minuten. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurde die Bakteriensuspension mit 900 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für eine Stunde im Thermomixer inkubiert. 100 ml LB-Medium wurden mit 100 µL (100 µM) Ampicillin (1 mM-Stock) versetzt und mit 500 µl der Bakterienkultur angeimpft. Das Medium wird weitere 18 h bei 37°C und 140 rpm inkubiert.

3.1.3.2.2 Hauptkultur

2 Liter Kulturmedium wurden mit 2 ml (100µM) Ampicillin (1mM-Stock) versetzt, auf eine OD_{600} von 0,05 mit der Vorkultur inokuliert und bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,6 wurde mit Hilfe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) die Genexpression induziert und die Kultur für weitere sechs Stunden bei 30°C und 140 rpm im Inkubator belassen. In diesen sechs Stunden wurde im Abstand von 90 Minuten Proben aus der Kultur entnommen, um mit Hilfe von SDS-PAGE die Expression der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase zu verfolgen. Die Kultur verblieb bei 25 °C und 140 rpm über Nacht im Inkubator.

3.1.3.2.3 Zellernte

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (*Sorvall Evolution RC*, Thermo Scientific, Rotor: SLA-3000, 6000xg, 20 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 25 ml 100 mM KP-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und erneut bei 4300 rpm, 30 min, 4 °C (*Megafuge 1.0R*, Heraeus) in 50

ml-Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das erhaltene Zellpellet zunächst bei minus 80 °C für die weitere Aufreinigung aufbewahrt.

3.1.3.2.4 Aufschluss

Das gefrorene Pellet wurde zunächst vorsichtig bei 4 °C aufgetaut und in ca. 30 ml 100 mM KP-Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend zur besseren Homogenisierung mit einer Spritze (*Terumo® Syringe steril*, Terumo Europe GmbH, Leuven, Belgien) aufgenommen und durch eine lange Kanüle (*Sterican®*, 0,80 x 120 mm, Braun Medical, Emmenbrücke, Schweiz) gepresst. Der Zellaufschluss erfolgte durch Kavitationskräfte („French-Press“, *TS Bench Top*, Constant Systems Ltd., Daventry United Kindom) unter Zugabe von 2 mM β-Mercaptoethanol (0,14 µl je ml Puffer). Alternativ erfolgte der Aufschluss mit Hilfe eines Sonifizierers (*Sonopuls*, Bandelin electronic, Titanteller TT13, Generator GM 2200) bei 50 % Leistung sechs Mal für 30 Sekunden. Das Lysat wurde anschießend bei 4 °C für 30 Minuten bei 30000xg (*Sorvall Evolution RC*, Thermo Scientific, Rotor: SS-44) zentrifugiert.

3.1.3.2.5 Hitzeschritt

Für wildtypisches ssAnPRT wurde der Hitzeschritt für 15 min bei 75°C, für die ssAnPRT-Varianten für 10 min bei 70°C durchgeführt. Durch Zentrifugation (Rotor: SS-34, 18500xg, 20 min, 4°C) wurden die ausgefallenen thermolabilen Proteine abgetrennt. Der Überstand wurde nach Sterilfiltration (Whatman® FP 30/0.2, Whatman GmbH Dassel, Deutschland) auf eine mit Zink-beladene 1 ml-*HiTrap Chelating*-Säule der Firma GE Healthcare geführt. Die Beladung erfolgte mit Hilfe einer Peristatlikpumpe über Nacht bei 4 °C in einem Eluat-Säule-Kreislauf. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, mit 2 mM β-Mercaptoethanol gewaschen.

3.1.3.2.6 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Anthranilat-Phosphoribosytransferase erfolgte mittels FPLC (*ÄKTAprime plus*, GE Healthcare) über einen Imidazolgradienten (Puffer A: 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol; Puffer B: 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol). Für die Fraktionierung mit der Einstellung „Manual Run" sind die Parameter in Tabelle 3-9 zusammengefasst.

Tabelle 3-9: Einstellungen am FPLC-System *Äkta Prime plus* der Firma GE Healthcare für die Aufreinigung von Varianten der Anthranilat-Phosphoribosytransferase mit Hilfe einer *Hitrap Chelating* Affinitätssäule der Firma GE Healthcare. *Parameter wie am Gerät angegeben.

Parameter*	Einstellung
Method Base	ml
Conc %B	0 %B
Gradient	20 ml 100 %B
Flow Rate	0,5 ml/min
Fraction Base	ml
Fraction Size	1 ml
Pressure Limit	0,30 MPa
Buffer Valve Pos	Pos 1
Inject Valve Pos	Load

3.1.3.2.7 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösung wurde mit Hilfe von Amicon MW-15 (Ausschlussgröße: 10 kDa) Zentrifugenröhrchen über eine semipermeable Membran durch Zentrifugation einkonzentriert. Dabei wurde das Zentrifugenröhrchen zunächst mit 100 mM KP-Puffer (pH 7,5) zusammen mit 2 mM β-Mercaptoethanol durch Zentrifugation äquilibriert, bevor die Proteinlösung einkonzentriert wurde. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Ausgangsvolumen der Proteinlösung und dem gewünschten Endvolumen.

3.1.3.2.8 Lagerung von Proteinlösungen

Die (einkonzentrierte) Proteinlösung wurde tropfenweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die erhaltenen Proteinkügelchen wurden anschließend in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgenommen und bei minus 80°C gelagert.

3.1.3.3 Fluoreszenzmarkierung

Die aufgereinigten ssAnPRT-Varianten zeigten die Eigenschaft, in einem beliebigen Markierungspuffer bei Kontakt mit den Farbstoffen *Alexa Fluor® 488 maleimid* und *Alexa Fluor® 647 maleimid* (beide von Invitrogen) zu aggregieren. Dieser Effekt zeigt sich nur in Kombination mit beiden Farbstoffen. Einzelmarkierungen waren hingegen möglich. Auch die Kombination *Bodipy® FL maleimid* und *Fluor® 647 maleimid* , wahrscheinlich aufgrund des unpolaren Charakters von *Bodipy® FL maleimid*, funktionierten. Daher wurde eine neue Markierungsstrategie etabliert.

Eine zinkbeladene 1 ml-*HiTrap Chelating*-Säule der Firma GE Healthcare wurde bei 4 °C mit ca. 1 mg einer ssAnPRT-Proteinvariante über eine Peristatlikpumpe beladen und die Säule mit 20 ml 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, mit 2 mM β-Mercaptoethanol gewaschen. Anschließend wurden 20 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) mit 10 mM TCEP über die Säule gepumpt. Durch einen Eluat-Säule-Kreislauf, wie in Abbildung 3-9 dargestellt, wurde die TCEP-Konzentration langsam von 10 auf 1 mM gesenkt und die Farbstoffe *Alexa Fluor® 488 maleimid* und *Alexa Fluor® 647 maleimid*, gelöst in DMSO, im Mengenverhältnis 1 : 1 : 4 (Protein : *Alexa Fluor® 488* : *Alexa Fluor® 647*) dem Eluat der Säule zugesetzt. Die ssAnPRT-Varianten wurden auf diese Weise über Nacht bei 4 °C mit den Farbstoffen an zufälligen Cystein-Positionen markiert. Der Farbstoff wurde anschließend mit 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, zusammen mit 2 mM β-Mercaptoethanol von der Säule gewaschen und das Protein mit 100 mM KP-Puffer (pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol) zusammen mit 500 mM Imidazol eluiert.

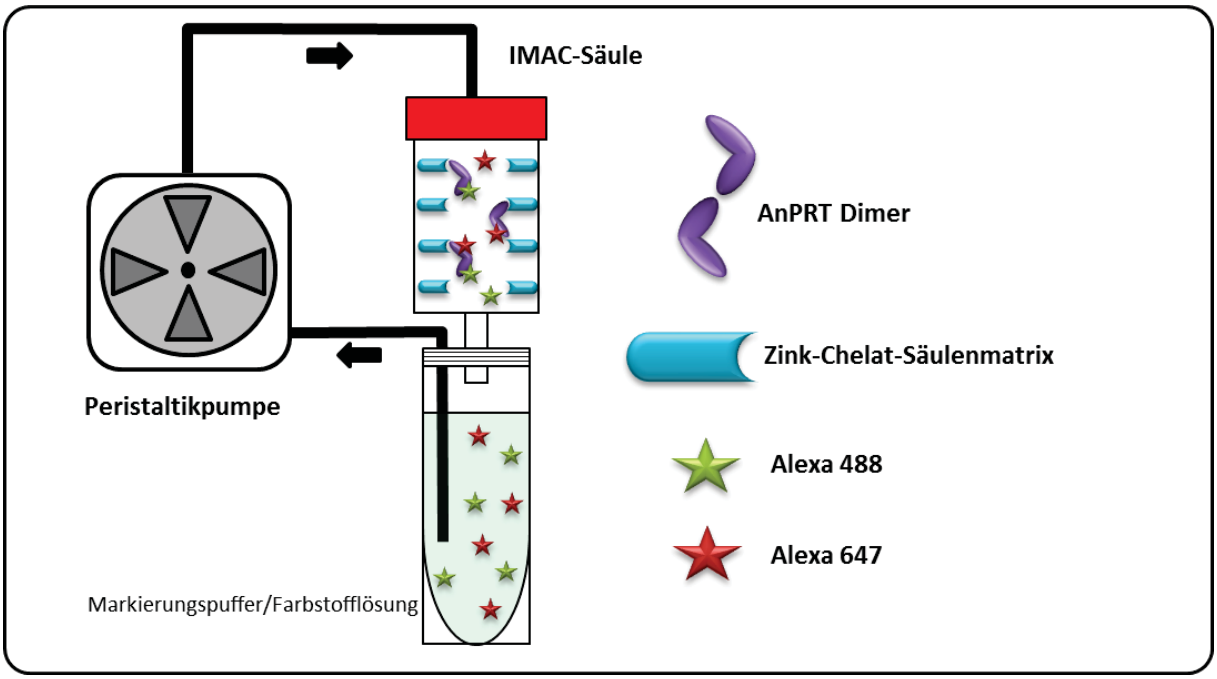


Abbildung 3-9: Eluat-Säule-Kreislauf zur Markierung von ssAnPRT. Eluat-Säule-Kreislauf für die Fluoreszenzmarkierung von Varianten der Anthranilat-Phosphoribosytransferase mit *Alexa Fluor® 488 maleimid* und *Alexa Fluor® 647 maleimid*. Bei der Säule handelte es sich um eine 1 ml-*HiTrap Chelating*-Säule der Firma GE Healthcare. Das Protein wurde zunächst auf die mit 100 mM KP-Puffer (pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol) äquilibrierte Säule geladen. Anschließend folgte ein Pufferwechsel (50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7, 10 mM TCEP), gefolgt von einer stufenweisen Reduzierung der TCEP-Konzentration auf 1 mM. Das Protein wurde über Nacht bei 4 °C auf der Säule mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der freie Farbstoff wurde mit 100 mM KP-Puffer (pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol) von der Säule gewaschen und das Protein mit 100 mM KP-Puffer (pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol) eluiert.

3.1.4 Spezieller Methodenteil für Modellsystem IV: T4 Lysozym

3.1.4.1 Mutagenese

3.1.4.1.1 Vektoren und Primer

Als DNA-Template für die Mutagenese wurde ein pET11a-Vektor (Abbildung 3-10) mit eingebautem wildtypischen T4 –Lysozym-Konstrukt verwendet. Die dazugehörigen Primer für die Polymerasekettenreaktion sind im Anhang (Kapitel 8.1.1, Tabelle 8-2) aufgeführt.

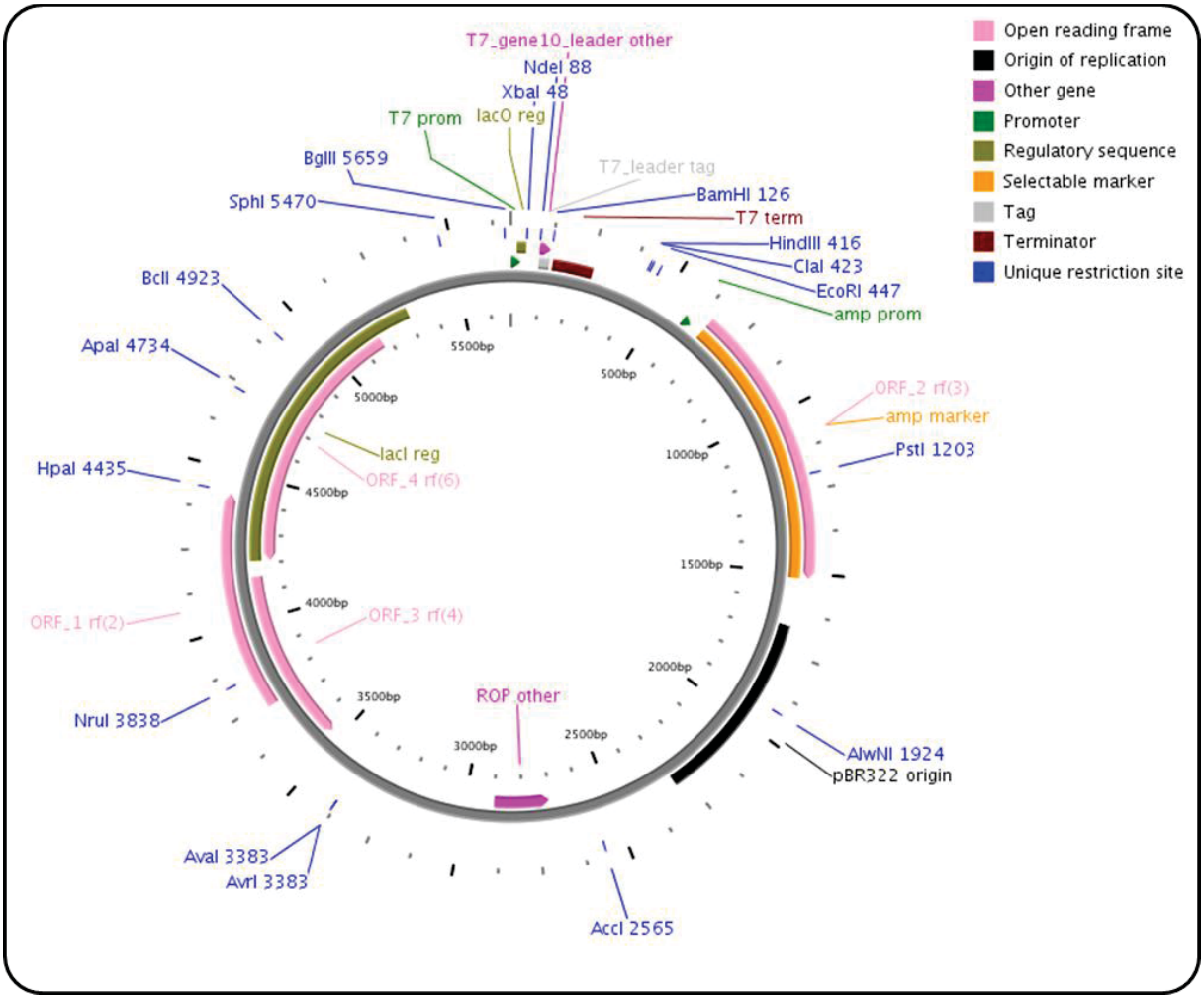


Abbildung 3-10 Plasmid-Karte von pET11a. Die DNA-Sequenz wurde durch die freie Vektor-Datenbank *addgene.org* zur Verfügung gestellt. Die graphische Kartierung erfolgte durch *PlasMapper 2.0* (Dong*, et al.*; 2004).

3.1.4.1.2 Polymerasekettenreaktion

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion ist ausführlich in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben. An dieser Stelle soll auf die spezielle Methodik zur Einbringung von Mutationen in T4-Lysozym eingegangen werden.

Die hier eingesetzte native *Pfu*-Polymerase aus dem hyperthermophilen Archaeum *Pyrococcus furiosus* der Firma Thermo Scientific (EP0571) besitzt eine hohe Thermostabilität, sowie eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die als Korrekturfunktion die Anzahl ungewünschter Mutationen reduziert. Die Fehlerrate liegt dabei bei 1,6 x 10^{-6} Fehlern pro Nukleotid (Lundberg*, et al.*; 1991). Viele Polymerasekettenreaktionen benötigen Hybridisierungstemperaturen von [T_m - 5°C] oder können bei einer fixen Hybridisierungstemperatur (gewöhnlich bei 55 °C) durchgeführt werden. Im Fall der T4L-Primer-Konstrukte konnte auf dieses einfache Verfahren nicht in jedem Fall zurückgegriffen werden. Einige Primer-Konstrukte benötigten signifikant andere Hybridisierungstemperaturen, die nur in Temperaturserien mit anschließender Sequenzierung zu ermitteln waren. Tabelle 3-10 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Tabelle 3-10: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für das Einbringen von Mutationen in T4-Lysozym

Komponente	Menge
DNA-Template (pET11a-T4L)	10 ng
Forward Primer	100 pmol
Reverse Primer	100 pmol
10X *Pfu*-Puffer mit 20 mM $MgSO_4$	5 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	1 µl
Pfu-Polymerase Thermo Scientific EP0571	1 µl
nukleasefreies Wasser	bis Reaktionsvolumen gleich 50 µl

Der mitgelieferte 10fach *Pfu*-Puffer enthielt nach der Produktinformation von Thermo Scientific 200mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM KCl, 1mg/ml BSA, sowie 1% (v/v) Triton X-100. Die Reaktionsparameter für den PCR-Automaten (Primus 96 advanced Gradient, Peqlab) sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Tabelle 3-11: Reaktionsparameter für den PCR-Automaten (WPA)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initialdenaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	Gradient	30 s	25
Elongation	72 °C	12 min	
Finale Elongation	72 °C	15 min	1

Anschließend wurden 1 µl DpnI Restrictionsenzym (Biolabs, R0176S) zur Reaktionslösung beigemischt und bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert, um die verbliebene (methylierten) DNA-Stränge des Templates zu entfernen.

3.1.4.1.3 oePCR für die T4L-Variante R8Amber

Für die T4L-R8Amber-Variante wurde für eine erfolgreiche Mutagenese die oePCR angewandt. Die Methodik ist in Kapitel 3.1.2.1.2 beschrieben. Der Fragment-PCR-Ansatz und die Reaktionsparameter sind in Tabelle 3-12 und Tabelle 3-13 zusammengefasst.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung den Fragment-PCR-Ansatz für die T4L-Variante R8Amber

Komponente	Menge
DNA-Template (pET11a-T4L)	10 ng
Forward Primer	100 pmol
Reverse Primer	100 pmol
Forward Mutagenese Primer	100 pmol
Reverse Mutagenese Primer	100 pmol
5X *Q5*-Puffer Biolabs #B90272	10 µl
dNTP-Mix [10 mM each]	1 µl
HiFi-Polymerase Biolabs #M0491S	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	bis Reaktionsvolumen gleich 50 µl

Tabelle 3-13: Reaktionsparameter für die Fragment-PCR für die T4L-Variante R8Amber

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initialdenaturierung	98°C	3 min	1
Denaturierung	98°C	30 s	
Hybridisierung	67°C	30 s	35
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

Die Fragmente 1 und 2 wurden durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.1.2.2.1) und mit einem DNA-Aufreinigungskit für Agarosegele (*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* , Macherey Nagel) isoliert. Der Hybrid-PCR-Ansatz und die Reaktionsparameter sind in Tabelle 3-14 und Tabelle 3-15 zusammengefasst.

Tabelle 3-14: Zusammensetzung den Hybrid-PCR-Ansatz für die T4L-Variante R8Amber

Komponente	Menge
Fragment 1	8 ng
Fragment 2	2 ng
5X *Q5*-Puffer Biolabs #B90272	10 µl
dNTP-Mix [10 mM each]	1 µl
HiFi-Polymerase Biolabs #M0491S	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	bis Reaktionsvolumen gleich 50 µl

Jeweils 100 pmol Forward- und Reverse-Mutagenese Primer werden in der Programmpause zur Reaktionslösung gegeben. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte wie für die Fragment-PCR. Der Einbau in den pET11a-Vektor erfolgte mit den Restriktionsenzymen Nhe I (Biolabs, R0131) und BamHI (Biolabs, R0136), sowie einer T4 DNA Ligase (Biolabs, M0202).

Tabelle 3-15: Reaktionsparameter für die Hybrid-PCR für die T4L-Variante R8Amber

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initialdenaturierung	98°C	3 min	1
Denaturierung	98°C	30 s	
Hybridisierung	67°C	30 s	20
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
	Programmpause		
Denaturierung	98°C	30 s	
Hybridisierung	67°C	30 s	35
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

3.1.4.1.4 Transformation in *E. coli* DH5α

Für die Transformation wurden je durchgeführte Mutagenese zwei Aliquots bei -80 °C eingefrorene kompetente *DH5α*-Bakteriensuspensionen (200 µl je Aliquot) langsam (Dauer etwa 30 min) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 und 45 µl der PCR-Reaktionslösung jeweils in ein Aliquot *DH5α*-Bakteriensuspension pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei 42 °C erfolgte dann der Hitzeschritt für 30 Sekunden. Danach wurde die Suspension für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend direkt auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach weiteren 12 bis 15 Stunden im Inkubator bei 37 °C waren die herangewachsenen Bakterienkolonien klar zu erkennen.

3.1.4.1.5 Inokulation und Plasmidpräparation

Für die Plasmidisolation wurden die Kolonien von der Agar-Platte verwendet, die das beste Wachstum hervorgebracht haben. Als Inokulum wurde 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für je eine Kolonie verwendet. Insgesamt wurden drei Kolonien pro Variante angezüchtet. Nach Inkubation bei 37 °C für 18 Stunden in einem Inkubationsschüttler (*Minitron*, Infors AG) wurden die replizierten Plasmide mit Hilfe des *Plasmid Mini Kits* (*Qiagen*, 12123) aufgereinigt und die Konzentration mit einem *Nanodrop®* Spektralphotometer (*ND-1000*, Peqlab) bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma *GATC Biotech AG*.

3.1.4.2 Heterologe Proteinexpression und Aufreinigung

3.1.4.2.1 Transformation in *E. coli* BL21(DE3)

15 ng des pET11a(+)-T4L-Vektors wurden zusammen mit 30 ng des pEVOL-Vektors (Lemke; 2011, Young*, et al.*; 2010) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Der bei -80 °C gelagerte *E. coli*-Stamm (200µl-Aliquot) wurde zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Die Vektoren wurden hinzupipettiert und für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte über einen Thermomixer (*comfort*, Eppendorf) bei 42 °C für 45 Sekunden. Nach weiterer Inkubation auf Eis für fünf Minuten wurden 800 µl LB-Medium zur Bakteriensuspension gegeben, welche im Anschluss für eine Stunde bei 37 °C zur Ausprägung der Antibiotika-Resistenz (phänische Expression) im Thermomixer belassen wurde. Das Transformationsprodukt wurde anschließend auf Agar (mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol) ausplattiert. Mit den über Nacht entstandenen Bakterienkolonien wurde eine Übernacht-Vorkultur zusammen mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol angeimpft.

3.1.4.2.2 Heterologe Proteinexpression

Die heterologe Proteinexpression erfolgte nach dem Protokoll von Lemke et al. (2011). Ein Liter LB-Medium wurden mit 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol und 0,4 g 4-Acetylphenylalanin-hydrochlorid versetzt und anschließend mit der Übernacht-Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,05 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 140 rpm bei einer OD_{600} von 0,5 mit 1 mM IPTG und 4 g L(+)-Arabinose induziert. Die Zellernte erfolgte nach 6 Stunden bei 6000xg (*Sorvall Evolution RC*, Thermo Scientific, Rotor: SLA-3000) und 4 °C für 20

Minuten. Das erhaltene Pellet wurde durch Aufnahme mit einem Einwegspatel in 50ml-Zentrifugenröhrchen (*VWR Freestanding*) überführt und bei -22 °C über Nacht eingefroren.

3.1.4.2.3 Aufreinigung

Das Bakterienpellet wurde mit 25 ml T4L-Puffer A (25 mM HEPES pH 7,5, 5 mM DTT, 0,1 mM EDTA) resuspendiert. Da aktives T4-Lysozym die Zellwände in Bakterien wie *E. coli* angreift, dient die Sonifizierung der Bakteriensuspension in erster Linie der Homogenisierung. Diese wurde mit Hilfe eines Sonifizierers (*Sonopuls*, Bandelin electronic, Titanteller TT13, Generator GM 2200) bei 50 % Leistung vier Mal für 30 Sekunden durchgeführt. Das Lysat wurde anschießend bei bei 4 °C für 30 Minuten bei 30000xg zentrifugiert. Eine mit fünf Säulenvolumen T4L-Puffer A equilibrierte Kationenaustauscher-Säule (*Hitrap sp ff*, GE Healthcare) wurde mit dem Überstand beladen und anschließend mit 10 Säulenvolumen T4L-Puffer A gewaschen. Die automatische Fraktionierung erfolgte über eine *Äkta Prime plus* der Firma GE Healthcare. Die Einstellungen für die Aufreinigung sind in Tabelle 3-16 zusammengefasst.

Tabelle 3-16: Parameter für *Äkta Prime plus* der Firma GE Healthcare für die Aufreinigung von T4L-Varianten mit Hilfe einer *Hitrap sp ff* Kationenaustauscher-Säule der Firma GE Healthcare. *Parameter wie am Gerät angegeben.

Parameter*	Einstellung
Method Base	ml
Conc %B	0 %B
Gradient	50 ml 100 %B
Flow Rate	1,5 ml/min
Fraction Base	ml
Fraction Size	5 ml
Pressure Limit	0,30 MPa
Buffer Valve Pos	Pos 1
Inject Valve Pos	Load

Mit Hilfe von SDS-PAGE konnten Proteinanteil und Reinheit der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Die Vorbereitung der Proben und die Durchführung der Elektrophorese ist in Kapitel 3.1.2.2.2 beschrieben. Über eine *PD-10* Entsalzungssäule der Firma GE Healthcare wurden die vereinigten Protein-Fraktionen in Puffer T (50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,5) umgepuffert. Das Eluat wurde direkt in flüssigen Stickstoff getropft.

Die gefrorenen Proteinkügelchen wurden in ein 50 ml-*Falcontube* überführt und bei -80 °C gelagert.

3.1.4.3 Fluoreszenzmarkierung

3.1.4.3.1 FRET-Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung von T4-Lysozym mit *Alexa Fluor® 647 maleimid* der Firma Invitrogen erfolgte im Puffer T bei Raumtemperatur für zwei Stunden (vergleiche Abbildung 3-7 A: Additionsreaktion der Maleimid-Gruppe). Dazu wurden ca. 1 ml Protein aufgetaut und deren Konzentration mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie (wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben) oder eines *Nanodrop®* Spektralphotometer bestimmt. Die Menge an in DMSO gelösten Fluoreszenzfarbstoff wurde so gewählt, dass der Farbstoff ungefähr im fünffachen Überschuss gegenüber der Proteinkonzentration vorlag. Nach Vereinigung beider Lösungen in einem 2 ml-Eppendorfgefäß wurde dieses abgedunkelt in einen Rotator (*stuart SB3*, Bibby Scientific Ltd.) eingespannt und bei 9 rpm inkubiert. Die Trennung von freiem Farbstoff und markiertem Protein erfolgte mit Hilfe von *NAP10*-Säulen der Firma GE Healthcare, die zuvor mit T4L-Puffer H (50 mM Natriumacetat-Puffer, 150 mM NaCl, pH 4,0) equlibriert wurden. Das Eluat wird sofort mit fünffachem Überschuss *Alexa Fluor® 488 Hydroxylamin* der Firma Invitrogen (gelöst in DMSO) versetzt und die Lösung abgedunkelt für 48 Stunden bei 37 °C und 9 rpm im Stuart-Rotator inkubiert (vergleiche Abbildung 3-7 A: Kondensationsreaktion der Hydroxylamin-Gruppe). Die anschließende erneute Trennung vom freien Farbstoff erfolgte aufgrund des größeren Volumens mit Hilfe von T4L-Puffer T equilibrierten *PD10*-Säulen (GE Healthcare). Dabei wurden während des Eluierens 250 µl-Fraktionen in 0,5 ml-Eppendorfgefäßen gebildet. Diese Fraktionen konnten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

3.1.4.3.2 *Donor-only*-Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung mit nur Alexa 488 Hydroxylamin erfolgt analog der FRET-Markierung. Die aufgetaute Proteinlösung wird direkt über *NAP10*-Säulen umgepuffert und mit der Farbstofflösung versetzt.

3.2 Spektroskopische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Protein- und Farbstoffkonzentration mit Spektralphotometrie

Peptidbindungen, Disulfidbrücken und aromatische Aminosäuren können Licht im Ultravioletten Bereich, hauptsächlich durch die elektronischen Übergänge π→ π* und n→ π*, absorbieren (Galla; 1988). Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte in einem *Cary 4000 UV-VIS der Firma Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA)*, dessen Aufbau in Abbildung 3-11 veranschaulicht wird. Die Verwendung eines Zweistrahlphotometers erhöhte die Genauigkeit des Spektrums, da durch einen speziellen Strahlteiler die Signale von Probe und Referenz auf den gleichen Detektor trafen und somit Fehler aufgrund unterschiedlicher Detektionseffizienzen, die bei Verwendung zweier getrennter Detektoren auftreten, vermieden worden.

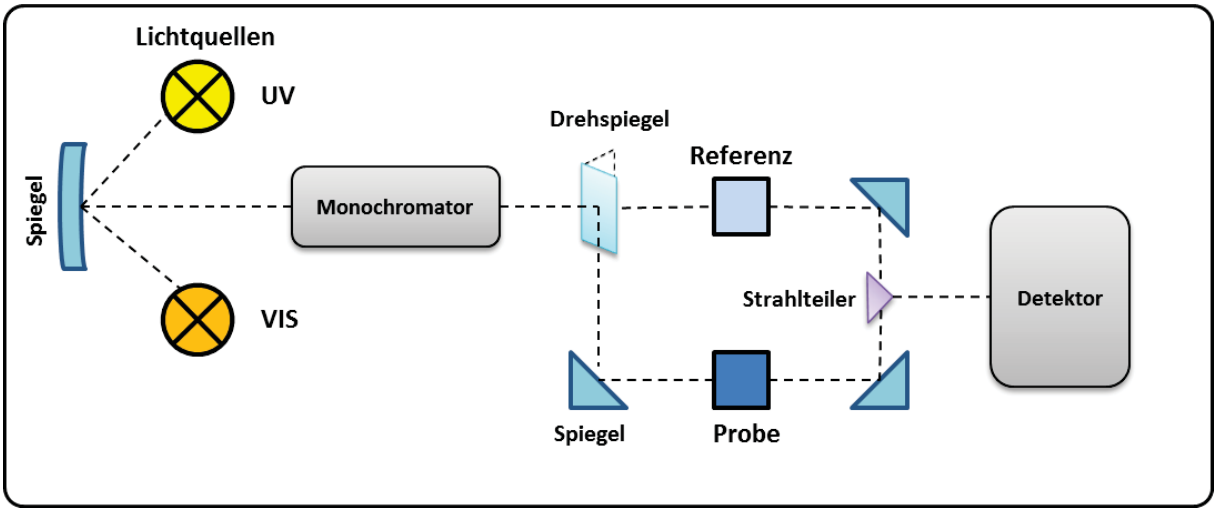


Abbildung 3-11: Aufbau und Funktionsweise eines Zweistrahlabsorptionsphotometers (Kaldenhoff; 2003). Bei dem Modell *Cary 4000 UV-VIS* der Firma Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA) werden zwei Lampen für den ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Wellenlängenbereich benötigt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie erfolgt durch Messung der Absorption A unter Zuhilfenahme des Gesetzes von Lambert-Beer (Gleichung 3-1) unter der Voraussetzung, dass die Probe weder das auftreffende Licht streut noch andere Photoeffekte durch die Bestrahlung aufweist.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$ Gleichung 3-1

I_0 ist dabei die Intensität des auf die Probe einfallenden Lichtes, I die Intensität des Lichtes nach Passieren der Probe, c die Konzentration der absorbierenden Substanz in mol pro Liter, d die Schichtdicke der Lösung in Zentimeter und ε der molare Extinktionskoeffizent in L mol^{-1} cm^{-1}. Abbildung 3-12 A zeigt ein typisches Absorptionsspektrum eines Proteins.

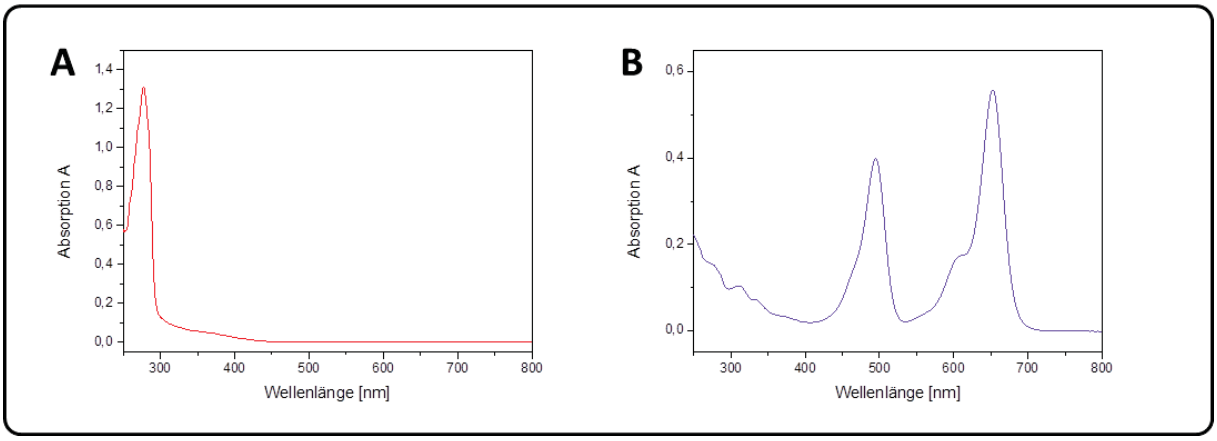


Abbildung 3-12: (A) Absorptionsspektrum einer ssAnPRT-Proteinvariante. Ein scharfes Absorptionsprofil bei 280 nm ist typisch für Proteine in diesem Wellenlängenbereich. **(B) Absorptionspektrum einer fluoreszenzmarkierten AnPRT-Variante.** Die Absorptionsprofile bei 495 und 650 nm stammen von den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und 647.

Peptidbindungen, Disulfidbrücken und aromatische Aminosäuren können Licht im Ultravioletten Bereich absorbieren. Damit ist es möglich, den molaren Extinktionskoeffizent bei 280 nm durch die Anzahl # der Tryptophane, Tyrosine und Disulfidbrücken mit Gleichung 3-2 (Pace*, et al.*; 1995) abzuschätzen.

$$\frac{mol \cdot cm}{l} \cdot \varepsilon_{280nm} = 5500 \cdot \#_{Tryptophan} + 1490 \cdot \#_{Tyrosin} + 125 \cdot \#_{Disulfidbrücke}$$ Gleichung 3-2

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt durch Umstellung von Gleichung 3.1 nach der Konzentration c:

$$\frac{c_{Protein}}{\mu M} = \frac{V_{Gesamt}}{V_{Protein}} \cdot \frac{A^{280nm}_{Protein}}{\varepsilon^{280nm}_{Protein} \cdot d}$$ Gleichung 3-3

beziehungsweise:

$$\frac{c_{Farbstoff}}{\mu M} = \frac{V_{Gesamt}}{V_{Farbstoff}} \cdot \frac{A^{\max}_{Farbstoff}}{\varepsilon^{\max}_{Farbstoff} \cdot d}$$ Gleichung 3-4

Abbildung 3-12 B zeigt das Absorptionsspektrum eines fluoreszenzmarkierten Proteins. Bei der Bestimmung der Markierungseffizienz eines fluoreszenzmarkierten Proteins musste die Eigenabsorption des Fluoreszenzfarbstoffes bei 280 nm beachtet werden. Dieser Anteil der Absorption bei 280 nm, der nicht dem Protein zugeordnet werden kann, wird durch Gleichung 3-5 beschrieben:

$$f^{280nm} = \frac{A^{280nm}_{Farbstoff}}{A^{\max}_{Farbstoff}}$$ Gleichung 3-5

Die Bestimmung des Korrekturfaktors f^{280nm} erfolgt relativ zum detektierten Farbstoffpeakmaximum. Die Absorption bei 280 nm kann nun wie folgt korrigiert werden:

$$A^{280nm}_{\mathrm{Pr}otein(korrigiert)} = A^{280nm}_{total} - \left(f^{280nm} \cdot A^{\max}_{Farbstoff}\right)$$ Gleichung 3-6

Entsprechend für j unterschiedliche gekoppelte Farbstoffe i:

$$A^{280nm}_{\mathrm{Pr}otein(korrigiert)} = A^{280nm}_{total} - \sum_{i}^{j} f_i^{280nm} \cdot A_i^{\max}$$ Gleichung 3-7

Zusammen mit Gleichung 3-3 , bzw. Gleichung 3-5, kann nun die korrekte Proteinkonzentration einer fluoreszenzmarkierten Probe bestimmt und somit die Markierungseffizienz ermittelt werden:

$$E_L[\%] = \frac{c_{Farbstoff}}{c_{protein}} \cdot 100$$ Gleichung 3-8

Die entsprechenden Absorptionskoeffizienten ε für die Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst, die der Proteine sind im Anhang aufgeführt.

3.2.2 Sekundärstrukturanalyse mit Circulardichroismus

Die Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie ist in der Biochemie eine wichtige Methode der Konformationsanalyse. Aus den Spektren lassen sich Rückschlüsse auf die relative Verteilung der Protein-Sekundärstrukturen schließen. Die Probe wird dabei mit Hilfe eines elektrooptischen Modulators alternierend mit links-polarisiertem (L) und rechts-polarisiertem Licht (R) bestrahlt. Dieses Bauteil besteht aus einem Kristall, der aufgrund eines hochfrequenten elektrischen Feldes einer wechselnden Polarität ausgesetzt ist. Aufbau und Funktionsweise eines CD-Spektrometers sind in Abbildung 3-13 A erläutert. Infolge unterschiedlicher Absorptionen chiraler Moleküle von L- und R-Komponente entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Als *Elliptizität* θ wird daher die Differenz aus den gemessenen Absorptionen bezeichnet:

$$\frac{\theta}{[mgrad]} = 2{,}303 \cdot (A_L - A_R) = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \qquad \text{Gleichung 3-9}$$

Die *Elliptizität* ist aufgrund des *Cotton*-Effektes von der Wellenlänge abhängig. Für die Untersuchungen wird ein Spektralbereich von 160 bis 260 nm verwendet, der den elektronischen Übergängen n → π* und π → π* der chiralen Carbonylgruppe einer Peptidbindung entspricht. Die Carbonylgruppe ist aufgrund ihrer wichtigen Bedeutung bei der Bildung von Sekundärstrukturen in Proteinen interessant. Abbildung 3-13 B zeigt charakteristische CD-Spektren verschiedener Protein-Strukturelemente. Messungen können unter *steady-state*-Bedingungen oder zeitlich aufgelöst erfolgen. In dieser Arbeit wurden Varianten von T4-Lysozym (Modellsystem IV) bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen versetzt und die Änderung der Elliptizität beobachtet. Aufgrund des denaturierenden Effektes von Harnstoff änderte sich mit zunehmender Konzentration das CD-Spektrum von einem α-helikalen zu einem strukturfreien Verlauf. Aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der Elliptizität wurden für jede Harnstoff-Konzentration separate Proben hergestellt. Dabei wurde zunächst für jede Probe eine bestimmte Harnstoff-Konzentration eingestellt und

mittels eines Refraktometers überprüft. 200 µl dieses Puffers wurde mit 3 bis 4 µl der T4L-Proteinvariante versetzt und die Proteinkonzentration mit einem Absorptionsspektrometer bei 217 nm bestimmt. Für die CD-Messungen wurden ein *Jasco J-815* CD-Spektrometer und Küvetten (Modell 110-QS/1 mm Schichtdicke) der Firma Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland) verwendet. Für jede Harnstoff-Konzentration wurde der spektrale Untergrund mit jeweils drei Akkumulationen bestimmt und später vom Proteinspektrum (ebenfalls drei Akkumulationen) subtrahiert.

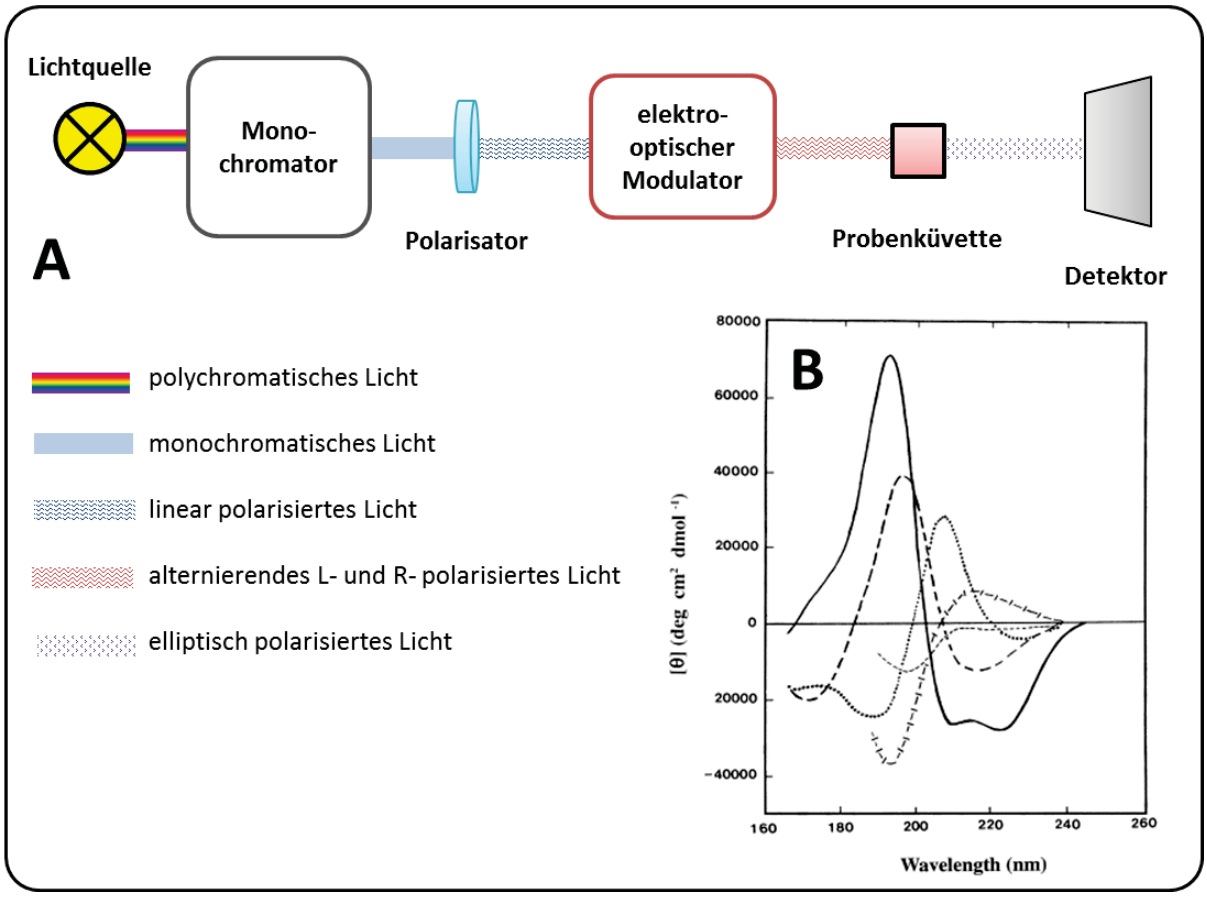


Abbildung 3-13: Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie: Messaufbau und Spektren. (A) Polychromatisches Licht einer -Xenon-Lampe trifft auf einen Monochromator und anschließend auf einen Polarisator, der das monochromatische Licht linear polarisiert. Ein elektrooptischer Modulator zerlegt dieses alternierend in links- (L) und rechts-zirkular (R) polarisiertes Licht, welches dann auf die Probe trifft. L- und R-Komponente werden dann von einem Detektor (Photomultiplier) synchron empfangen. Das Signal wird in eine Spannung umgewandelt, aus der die *Elliptizität* θ für jede Wellenlänge berechnet wird. **(B)** Spektren von sekundären Proteinstrukturen für einzelne Strukturelemente: α-Helix (durchgezogene Linie), anti-paralleles β-Faltblatt (lang gestrichelte Linie), β_I-Schleife (gepunktete Linie), Polyprolin II Helix (kreuz-gestrichelte Linie), unregelmäßige Struktur (kurz gestrichelte Linie); Abbildung aus Kelly et al. (2005) (Kelly, *et al.*; 2005).

3.2.3 Methoden der Fluoreszenzspektroskopie

3.2.3.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie

Für die Messung der Fluoreszenz eines Ensembles von fluoreszierenden Molekülen wurde ein Flurolog®-3 Fluoreszenzspektrometer der Firma Jobin Yvon Inc. (Edison, USA) verwendet, welches mit einer 450 W Xenon Lampe der Firma Osram (Frankfurt a.M., Deutschland) betrieben wurde. Das Spektrometer verfügt auf der Anregungs- und Fluoreszenzseite über Doppelmonochromatoren und Polarisatoren und ist mit einem peltiergekühlten Photomultiplier ausgestattet. Die eigenkonstruierte Probenkammer (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) bestand aus einem temperierbaren Küvettenhalter, der mit einem Thermostaten verbunden war. Die Temperatursteuerung erfolgte durch einen externen Sensor an der Probenkammer. Die Steuerung des Spektrometers, sowie die Datenauswertung erfolgten über die firmeneigene Software FluorEssence™. Aufgrund des nichtidealen Verhaltens der Xenon-Lampe bei verschiedenen Wellenlängen wurde über einen Quarz-Strahlenteiler 4% des Anregungslichtes auf eine Photodiode gelenkt. Diese dient als sogenannter Quantenzähler und korrigiert somit Intensitätsdifferenzen des Anregungslichtes bei verschiedenen Wellenlängen. Abbildung 3-14 veranschaulicht den apparativen Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzspektrometers.

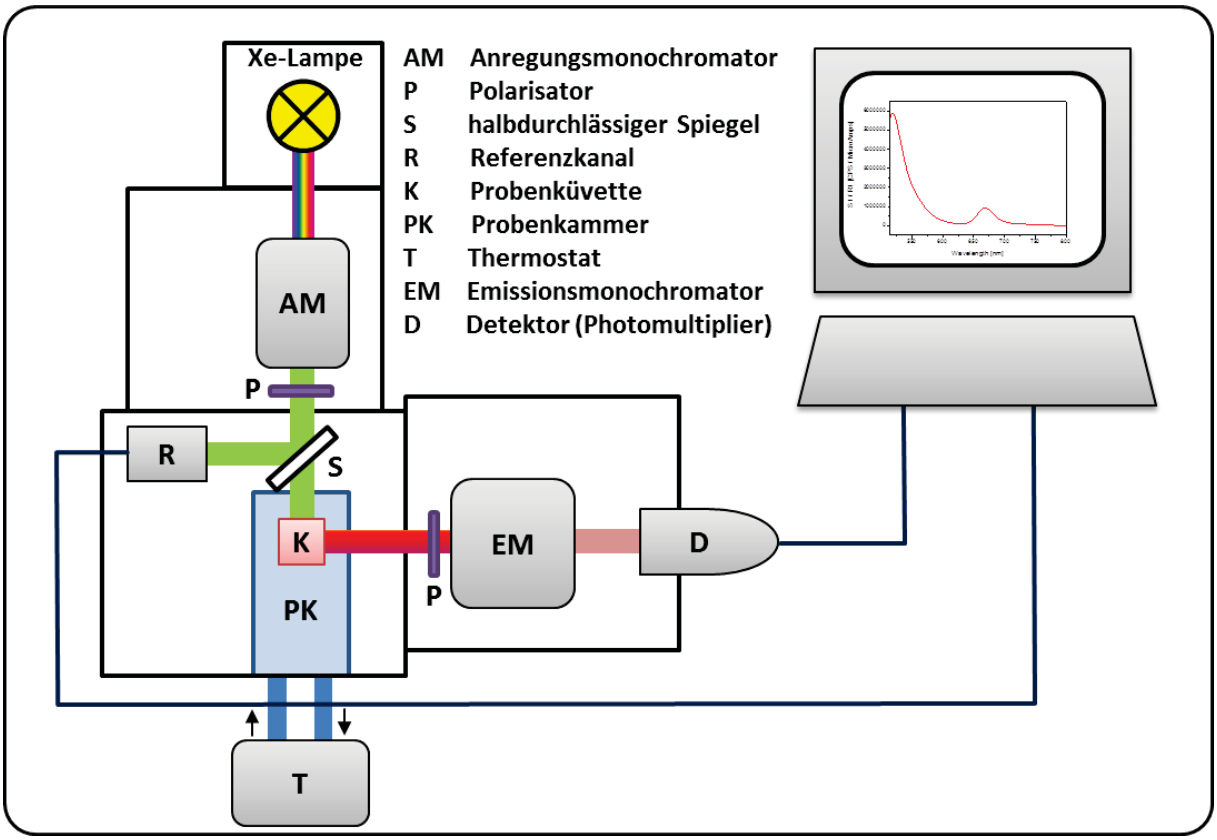


Abbildung 3-14: Apparativer Aufbau des Fluorimeters Fluorolog®-3. Als Lichtquelle wurde eine Xe-Lampe verwendet, die hauptsächlich Licht im sichtbaren, aber auch im nahen UV- und Infrarotbereich emittiert. Das polychromatische Licht passiert zunächst den Anregungsmonochromator (AM) und einen einfahrbaren Polarisator (P), bevor es auf die Probenküvette innerhalb der temperierten Probenkammer (Eigenbau) trifft. Ein Teil des monochromatischen Anregungslichtes wurde dabei in einen Referenzkanal umgeleitet, um Intensitätsschwankungen der einzelnen Wellenlängen zu minimieren. Die Fluoreszenz der Probe wurde im rechten Winkel detektiert. Bevor es auf den Detektor (Photomultiplier) trifft, durchläuft das Fluoreszenzlicht einen weiteren Polarisator und Monochromator. Die Steuerung des Gerätes, sowie die Analyse der Daten erfolgt über die Software FluorEssence™.

3.2.3.1.1 Fluoreszenztitrationen im Ensemble

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von fallender Proteinkonzentration durch Verdünnung (Modellsystem I: ssAnPRT) und der denaturierende Einfluss durch zunehmende Harnstoffkonzentration (Modellsystem IV: T4L) fluoreszenzspektroskopisch im Ensemble untersucht. Die Volumenzugabe in die Küvette wurde so gewählt, dass diese für jeden Messpunkt im Bereich von 20 bis 100 µl liegt. Dabei wurde auf gut einstellbare Volumina (Pipetman, Gilson Inc, Middleton, USA) geachtet und auf die Konzentration zurückgerechnet. Die Probenküvette (104F-QS, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) konnte mit Hilfe einer Schraube seitlich der Probenkammer (Eigenbau, Institut für Molekulare Physikalische Chemie) fixiert werden. Die Zugabe des Verdünnungsmittels in die Küvette erfolgte entlang einer Glaskapillare (Me-18552, Mettler-Toledo GmbH, Gießen,

Deutschland), die zuvor am unteren Ende durch eine Bunsenbrennerflamme verschlossen wurde. Aufgrund ihrer geringen Oberfläche war die Glaskapillare gut geeignet die Lösung innerhalb der Küvette zu homogenisieren. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder bei der Zugabe des Verdünnungsmittels, noch bei dem Entfernen aus der Lösung die Glaskapillare die Glaswand der Küvette berührt wurde. Die Glaskapillare wurde anschließend bis zur darauffolgenden Verdünnung in einem leicht zu öffnenden Kunststoffgefäß mit feuchten Tüchern aufbewahrt, um das Antrocknen der Restflüssigkeit an der Kapillare zu verhindern. Die Lösung wurde vor jeder Messung zwei Mal mit der Glaskapillare gerührt, gefolgt von einer kurzen Inkubationszeit von 30 Sekunden. Die Temperatur am Thermostaten wurde auf konstant 25 °C eingestellt. Die Polarisatoren am Fluoreszenzspektrometer wurden an der Anregungsseite auf 0°, auf der Detektionssseite auf 54,7° *(„magic angle“*) eingestellt.

3.2.3.1.2 Homogenisierung von fluoreszenzmarkiertem T4L für Ensemble-Fluoreszenztitrationen

Die Zugabe von konzentriertem Harnstoff-Puffer für die Denaturierung von T4L beeinflusst die Viskosität und damit den Brechungsindex der Probelösung signifikant. Zur Prävention von nicht vorhersehbaren Messartefakten aufgrund unzureichender Homogenisierung der fluoreszierenden Probe wurde die Messmethode optimiert. Die Messung erfolgte in einer temperierten Probenkammer (Eigenbau, Institut für Molekulare Physikalische Chemie, siehe Kapitel 3.2.3.1) bei der die Möglichkeit bestand, die Messküvette zu fixieren. Dies ist erforderlich, um eine eventuelle Positionsveränderung der Küvette aufgrund des Durchmischens der Probelösung mit einer einseitig geschlossenen Glaskapillare (Me-18552, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) zu verhindern. Die optische Dichte der Startkonzentration wurde auf unter 0,05 eingestellt, damit der *inner filter*-Effekt vernachlässigbar blieb. Die Glaskapillare wurde nach der Homogenisierung der Probelösung in eine Kunststoffbox mit feuchten Tüchern ohne Kontakt der Kapillarenspitze zur Behälterwand aufbewahrt, um ein Austrocknen der noch an der Kapillare befindlichen Probeflüssigkeit zu verhindern. Die Homogenisierungsprozedur ist in Tabelle 3-17 zusammengefasst.

Tabelle 3-17: Homogenisierungs- und Titrationsprozedur für Denaturierungsstudien mit Hilfe der Ensemble-Fluoreszenztitration

Vorgang	Beschreibung
Temperatureinstellung	konstante Temperatur bei 25°C
Pipettiervolumen	Pipettiervolumen zwischen 20 und 100 µl
1. Homogenisierungsvorgang	mit Hilfe einer einseitig geschlossen Glass-Kapillare
1. Inkubation	Inkubation für 30 s
2. Homogenisierungsvorgang	Glass-Kapillare wird anschließend in Kunststoffbox aufbewahrt
2. Inkubation	Inkubation für weitere 30 s
Messung	die Punktmessung am Spektrometer erfolgt so lange, bis die Abweichung der Messwerte unter 0,1% liegt

3.2.3.2 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung im Ensemble (eTCSPC)

Die wohl meist angewandte Methode zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer ist die Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl. time-correlated single-photon counting, TCSPC). Dabei wird die Probe mit einer gepulsten Lichtquelle angeregt und die Zeitdifferenz zwischen dem Anregungspuls und der darauffolgenden emittierten Fluoreszenz (Δt_{TAC}) registriert. Die Zeitachse wird dabei in i Kanäle von endlicher Breite (TAC channels) unterteilt und die registrierten Ereignisse entsprechend einsortiert (Abbildung 3-15 A). Daraus ergibt sich ein Häufigkeitshistogramm, aus der die typische Fluoreszenzabklingkurve zusammen mit der Apparatefunktion (engl. *Instrument Response Function, IRF*) erhalten wird (Abbildung 3-15 B).

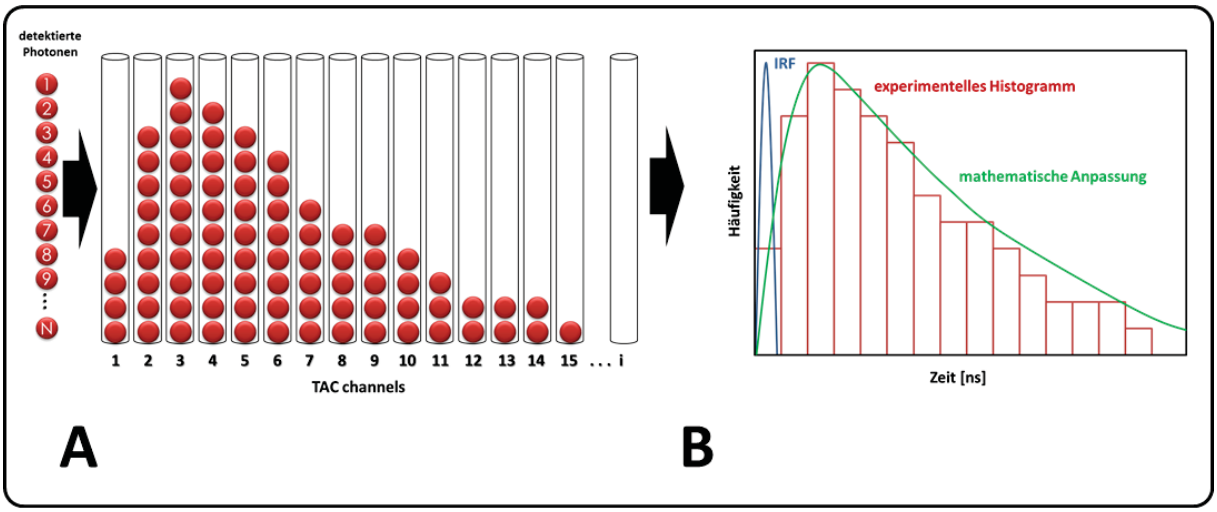


Abbildung 3-15: Prinzip der Zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC). (A) Die registrierten Photonen aus den Fluoreszenzemissionen werden nach der Zeitdifferenz zwischen erfolgter Anregung und Detektion der Fluoreszenz in sogenannte *TAC channels*, die einem bestimmten Zeitintervall entsprechen, sortiert. **(B)** Aus dem resultierenden Häufigkeitshistogramm (rot) wird durch mathematische Faltung mit der Apparatefunktion (engl. Instrument Response Function, IRF, in blau) die Fluoreszenzabklingkurve (grün) erhalten.

3.2.3.2.1 eTCSPC-Messaufbau

Das gepulste Anregungslicht trifft nach Durchqueren des Antregungsmonochromators auf die Probenküvette. Die im 90°-Winkel emittierte Fluoreszenz passiert einen zweiten Monochromator, bevor es auf den *Photomultiplier* (PM) trifft. Vom Pulsgenerator geht ein Signal an einen *Constant Function Discriminator* (CFD), der die exakte Startzeit des Pulses registriert und dieses Signal an einen *Time-to-Amplitude Converter* (TAC) sendet. Das Signal vom CFD dient dabei als Startsignal für den TAC, der dann eine Spannungsrampe startet, die linear mit der Zeit verläuft. Das Signal des Photomultipliers wird an einen zweiten CFD geleitet, der die genaue Ankunftszeit des emittieren Photons registriert und ein Stoppsignal an den TAC sendet. Die aufgelaufene Spannung U am TAC ist proportional zu $\Delta t_{TAC.}$ Die Spannung am TAC wird durch einen *Programmable Gain Amplifier* (PGA) weiter verstärkt, und anschließend von einem *Analog-to-Digital Converter* (ADC) digitalisiert. Dabei wird die Spannung als Fluoreszenzereignis mit einer bestimmten Lebensdauer gespeichert. Um falsche Messwerte zu verhindern filtert ein *Window Discriminator* (WD) die Signale heraus, die außerhalb eines bestimmten Spannungsbereiches liegt und unterdrückt diese. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3-16 gezeigt.

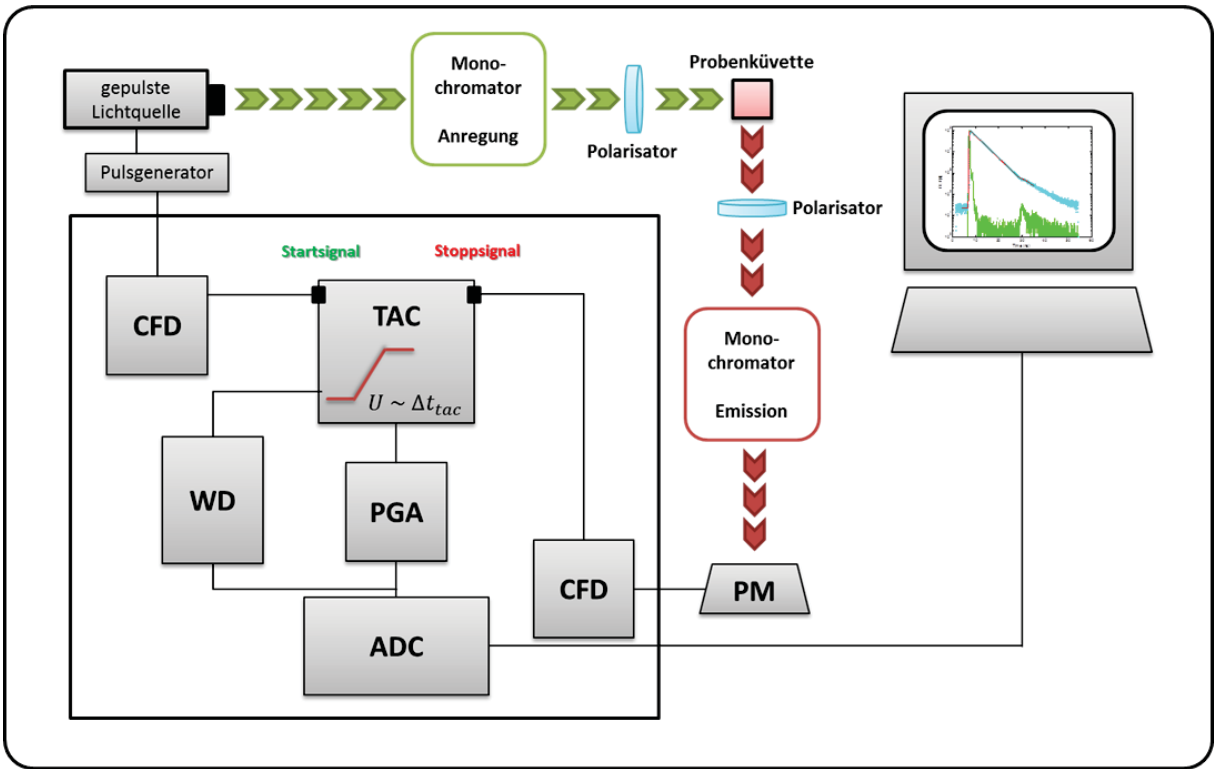


Abbildung 3-16: Schematischer elektronischer Aufbau für die TCSPC (Lakowicz; 2006). Die Funktionsweise der verschiedenen Komponenten ist im Text erklärt.

Für diese Arbeit wurde ein 5000U-System der Firma HORIBA Jobin Yvon verwendet mit einer TAC-Channel-Breite von 0,0141 ns. Als Lichtquellen wurden ein gepulster 470 nm Dioden-Laser (PDL 800-B, Picoquant, Berlin) für die Donor-Anregung, bzw. ein 635 nm Dioden-Laser (PDL 800, Picoquant, Berlin) für die Akzeptor-Anregung mit jeweils einer Repetitionsrate von 10 MHz verwendet. Die Signalverarbeitung erfolgte mit Hilfe des IHB *Datastation Hub* sowie die Steuerung über die Software *Datastation v 2.2*. Neben den Monochromatoren ist für die Anregungs- und Emissionsseite jeweils ein Polarisator vorhanden. Um Polarisationseffekte auszuschließen wurde der anregungsseitige Polarisator auf 0°, der emissionsseitige Polarisator auf 54,7° eingestellt (Lakowicz; 2006). Zur weiteren Reduktion des Streulichtanteils wurden Kantenfilter eingesetzt.

3.2.3.2.2 Analyse der eTCSPC-Daten

Die Bestimmung der Lebensdauer erfolgte mit *MatLab 2009*. Die Beschreibung des Fluoreszenzzerfalls erfolgte dabei mit bis zu drei Fluoreszenzlebensdauern τ_i mit ihren jeweiligen Spezies-Anteilen x_i:

$$F(t) = x_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + x_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + x_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}} \text{ mit } \sum x_i = 1. \qquad \text{Gleichung 3-10}$$

Ermittelt wird außerdem die Spezies-gemittelter Fluoreszenzlebensdauer $\langle \tau \rangle_x$:

$$\langle \tau \rangle_x = x_1 \tau_1 + x_2 \tau_2 + x_3 \tau_3 \qquad \text{Gleichung 3-11}$$

sowie die intensitätsgewichtete mittlere Fluoreszenzlebensdauer $\langle \tau \rangle_f$:

$$\langle \tau \rangle_f = \frac{x_1 \tau_1^2 + x_2 \tau_2^2 + x_3 \tau_3^2}{\langle \tau \rangle_x}. \qquad \text{Gleichung 3-12}$$

3.2.3.3 Praktische Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten

ETCSPC ist insbesondere bei der Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeute von Bedeutung. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Referenz-Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_{ref} sind in Tabelle 3-18 aufgeführt und wurden mit den experimentellen Daten abgeglichen. Die Berechnung erfolgt dabei nach Gleichung 3-13:

$$\Phi_{F(D/A)} = \Phi_{ref(D/A)} \cdot \frac{\tau_{F(D/A)}}{\tau_{ref(D/A)}} \qquad \text{Gleichung 3-13}$$

Tabelle 3-18: Referenz-Fluoreszenzquantenausbeuten.

[1] Dissertation Dr. Anna Wozniak (Wozniak; 2006)
[2]Herstellerangaben: Fluoreszenzquantenausbeuten und -lebensdauern von Alexa-Farbstoffen (LIFEtechnologies; 2014a)
[3] Herstellerangaben: Eigenschaften von Bodipy-Farbstoffen (LIFEtechnologies; 2014b)
[4] Peakmaximum der smFRET-Messung von Bodipy FL an T4L(I150C)D (Kapitel 4.1.1.1)

Fluoreszenzfarbstoff	Φ_{ref}	τ_{ref} [ns]
Alexa 488	0,80[1]	4,1[1]
Alexa 594	0,66[2]	3,9[2]
Alexa 647	0,33[2]	1,0[2]
Bodipy FL	1,00[3]	5,7[4]

3.2.3.4 Multiparameter-Fluoreszenzdetektion im Einzelmolekülmaßstab

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen einzelner fluoreszenzmarkierter Proteine erfolgten mit Hilfe der sogenannten Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD). Diese Technik basiert auf der von Keller (Keller*, et al.*; 1996) etablierten BIFL-Technik (*Burst Integrated Fluorescence Lifetime*) und wurde im Arbeitskreis stetig weiterentwickelt (Eggeling*, et al.*; 1998, Kühnemuth*, et al.*; 2001, Margittai*, et al.*; 2003, Rothwell*, et al.*; 2003).

3.2.3.4.1 Experimenteller Aufbau

Die Hauptkomponente des Versuchsaufbaus für die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion ist ein konfokales epi-illuminiertes Mikroskop (IX70 oder IX 71, Olympus). Die einfarbige Fluoreszenz-Anregungen (*One-color pulsed excitation*, OCE) erfolgte mit Hilfe eines gepulsten linear polarisierten Argon-Ionen-Lasers (Sabre®, Coherent, Santa Clara/USA) bei 496,5 nm (73,5 MHz, Pulslänge 180 ps) oder eines ebenfalls gepulsten und linear polarisierten Diodenlasers (Picoquant, Berlin/Deutschland) bei 485 nm, dessen Laserlicht über ein Glasfaserkabel eingespeist wurde. Für eine Zweifarben-Anregung wurde ein zusätzlicher Diodenlaser (Picoquant, Berlin/Deutschland) mit einer Wellenlänge von 634 nm in die Fiberglasoptik integriert. Das Laserlicht passierte einen dichroitischen Strahlteiler (Q 505 LPXR, AHF, Tübingen/ Deutschland) bevor es mit einem 60fach Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, Deutschland) mit einer numerischen Apertur (NA) von 1,2 in einem Probentropfen oder einer Probenkammer fokussiert wurde. Dadurch wurde ein etwa zwei Femtoliter großes Detektionsvolumen realisiert, so dass die Diffusionszeiten durch FCS-Messungen von Rhodamin 110 bei ungefähr 200 µs lagen. Das Fluoreszenzlicht der Probe wurde dann zurück über das Objektiv und den dichroitischen Strahlteiler auf die Tubuslinse des Mikroskops geleitet und auf eine Lochblende mit einem Durchmesser von 100 µm fokussiert. Ein polarisierender Strahlteiler (*10 mm Polarizing Beamsplitter Cube, 420 - 680 nm*; Thorlabs, Dachau/Deutschland) teilte das Fluoreszenzlicht in parallele und senkrechte Komponenten, während darauffolgende dichroitischen Strahlteiler (Q 595 DCXR, AHF, Tübingen/Deutschland) dieses in zwei Wellenlängenbereiche ober- und unterhalb von 595 nm dividierte. Nachdem das Fluoreszenzlicht die Bandpassfilter (HQ 533/46 für den “grünen Kanal”, HQ720/150 für den „roten“ Kanal) passiert haben, treffen die Photonen auf

insgesamt vier Avalanche-Photodioden (SPCMAQR-14, Laser Components, für die roten Kanäle und PDM050CTC, MPD, für die grünen Kanäle). Mit Hilfe zweier weiterer Detektoren kann zusätzlicher Spektralbereich abgedeckt werden. Die Signalausgabe der Detektoren wurde von TCSPC-Modulen (SPC 832, Becker und Hickl, Berlin, Deutschland) registriert. Abbildung 3-17 zeigt den Versuchsaufbau schematisch.

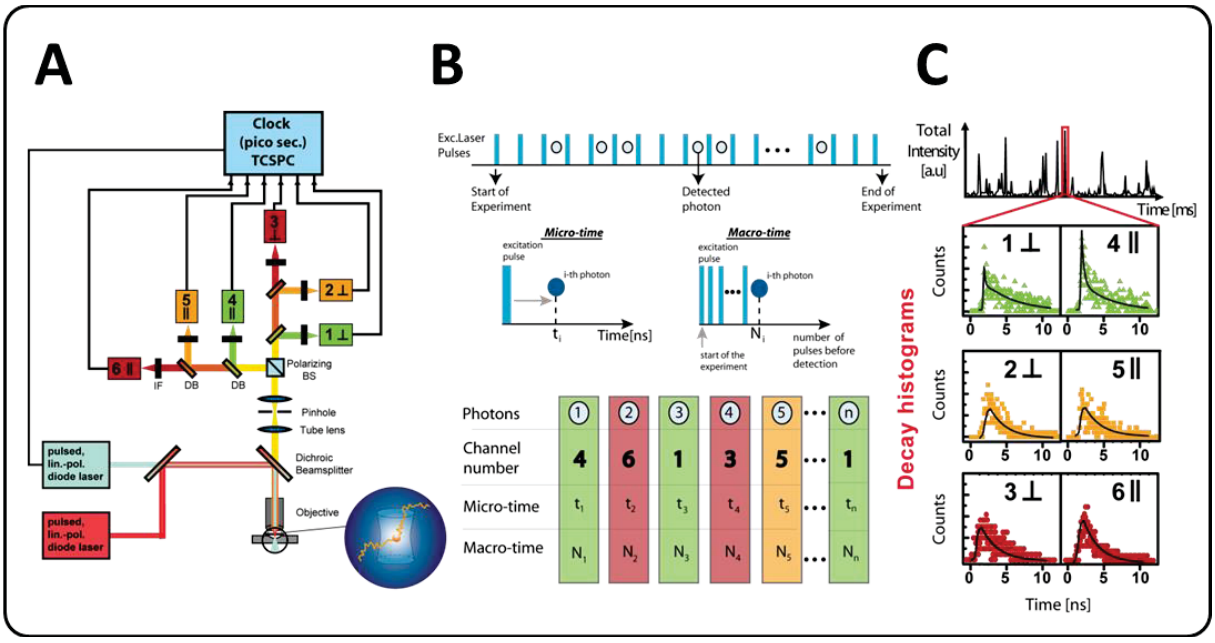


Abbildung 3-17: Experimenteller SMD-Aufbau und Datenregistrierung (Sanabria, *et al.*; in Vorbereitung). (A) Gezeigt ist ein Multiparameter-Fluoreszenzdetektionsaufbau mit sechs Detektoren für drei Spektralbereiche wie in Kapitel 3.2.3.4.1 beschrieben. **(B)** Für jedes registrierte Photon wurden drei Parameter bestimmt: 1. Die Zeitdifferenz zwischen Anregung und Detektion (*Micro-time*), 2. Die zeitliche Zuordnung des Photons über die Messzeit (*Macro-time*), sowie 3. die Zuordnung zum jeweiligen Detektor (*Channel number*). Ferner wird noch die sogenannte *Interphotonenzeit* bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.3.4.2). **(C)** Jede Salve an Photonen (engl. *burst*), die einem Fluoreszenzereignis zugeordnet werden kann, enthält eine Verteilung der verschiedenen Zeitdifferenzen zwischen Anregung und Detektion für jeden Detektionskanal. Aus den so gewonnenen Histogrammen kann durch eine mathematische Anpassung die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ für jeden *burst* ermittelt werden.

3.2.3.4.2 Messdatenerfassung

Bevor das fluoreszenzmarkierte Zielprotein unter Einzelmolekülbedingung untersucht werden konnte, mussten vorab Kalibriermessungen am Messaufbau vorgenommen werden (Schweinberger; 2002). Diese sind in Tabelle 3-19 zusammengefasst.

Tabelle 3-19 Kalibriermessungen für die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Kalibriersubstanz	Konzentration	Kalibrierziel
tridest. Wasser	-	Bestimmung der Instrumentenantwortfunktion
Rhodamin 110 gelöst in tridest. Wasser	10^{-9} mol/l	Bestimmung des G-Faktors in den grünen Detektionskanälen
Rhodamin 101 gelöst in tridest. Wasser	10^{-9} mol/l	Bestimmung des G-Faktors in den roten Detektionskanälen
Rhodamin 110 gelöst in tridest. Wasser	10^{-11} mol/l	Messung im Einzelmolekülmaßstab zur Kontrolle der Kalibrierung
fluoreszenzmarkierte DNA	10^{-11} mol/l	Bestimmung der Detektionseffizenzen in beiden Spektralbereichen
Puffer	-	Bestimmung der Untergrundzählraten in beiden Spektralbereichen

Wird eine fluoreszenzmarkierte Probe mit einem Laserblitz kurzzeitig zur Emission von Fluoreszenz angeregt, werden bei der BIFL-Messdatenerfassung jedem detektieren Photon vier Parameter zugeordnet (Abbildung 3-17 B):

1. Zuerst wird registriert, an welchem Detektor das Photon detektiert wurde.
2. Gleichzeitig wird die Zeitdifferenz $\Delta\tau$ registriert, die das Photon nach erfolgter Anregung durch den Laserpuls bis zur Ankunft am Detektor benötigt.
3. Dem Fluoreszenzereignis wird eine Ereignisnummer $\#^{MFD}$ zugeordnet, um die zeitliche Reihenfolge der Datenerfassung zu dokumentieren.
4. Der zeitliche Abstand zwischen den unter Punkt 3 erfassten Ereignissen (Interphotonenzeit, Δt) wird berechnet.

Bei der Durchführung von Einzelmolekülexperimenten wurde darauf geachtet, dass die Wahrscheinlichkeit zwei fluoreszierende Moleküle zur gleichen Zeit zu detektieren sehr gering ist. Dies wurde mit einer ausreichenden Verdünnung realisiert. Aufgrund dessen dauerte eine Einzelmolekülmessung ein bis zwei Stunden, da sich im Detektionsvolumen die meiste Zeit kein Fluorophor aufhielt und die auftretenden Signale aufgrund des „Shot-noise“, sowie durch unzureichend gefilterte Raman- und Rayleighstreuung verursacht wurde. Daher ist es bei der Datenanalyse von entscheidender Bedeutung die Einzelmoleküldurchtritte (engl.: „bursts“) von den Hintergrundsignalen zu trennen. Hierbei bedient man sich der Eigenschaft, dass bei der laserinduzierten Fluoreszenz der zeitliche Abstand zwischen den an den Detektoren ankommenden Photonen abnimmt, also die Interphotonenzeit Δt sehr klein wird. Somit konnten bei der Auftragung von Δt gegen die Ereignisnummer $\#^{MFD}$ Einzelmolekülereignisse aufgrund der fluoreszierenden Probe identifiziert werden. Mit Hilfe

eines mathematischen Verfahrens, dem sogenannten „Lee-Filter“ (Enderlein*, et al.*; 1997), wurde ein besseres Verhältnis zwischen der Änderung von Δt und statischem Rauschen realisiert. Außerdem wurden nur Einzelmolekülereignisse berücksichtigt, die eine Mindestanzahl von 100 Photonen aufwiesen. Das Prinzip der BIFL-Technik ist in Abbildung Abbildung 3-17 C erläutert. Für jedes Fluoreszenzereignis konnte nun die Fluoreszenzintensität *S* aus der Anzahl der detektierten Photonen und der Dauer des Ereignisses für beide Spektralbereiche berechnet werden. Mit Hilfe der Ankunftszeiten am Detektor $\Delta\tau$ konnten ebenfalls Zerfallshistogramme erstellt werden, die zur Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer τ und der Anisotropie r für beide Spektralbereiche benötigt wurden.

3.2.3.4.3 Analyse der Messdaten

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der institutseigenen Software *Paris* nach Sisamakis et al. (2010). Die Signale *S* aus den grünen ($S_G = S_{G,\parallel} + S_{G,\perp}$, $S_{G,\parallel}$: Signal bei parallelen Analysator, $S_{G,\perp}$: Signal bei senkrechtem Analysator) und den roten Kanälen ($S_R = S_{R,\parallel} + S_{R,\perp}$) wurden um den Mittelwert des Untergrunds $\langle B \rangle$ (engl. „background“) aufgrund der Lichtstreuung, Dunkelzählrate des Detektors und Eigenfluoreszenz des Lösungsmittels, korrigiert. Für die detektierte Fluoreszenz aus den grünen Kanälen F_G ergibt sich daher:

$$F_G = S_G - \langle B_G \rangle .$$

Gleichung 3-14

Für die Fluoreszenz aus den roten Kanälen musste zudem der *spektrale crosstalk* berücksichtigt werden, da ein Teil der Donor-Fluoreszenz auch in den roten Kanälen detektiert wurde. Der *spektrale crosstalk* wurde mit Hilfe einer *Donor-only*-Probe ermittelt und ist dabei definiert als

$$crosstalk = \left(\frac{F_{R(D)}}{F_{G(D)}} \right) \cdot F_G = \alpha \cdot F_G .$$

Gleichung 3-15

Somit ist es möglich die reine Fluoreszenz F_R aus den roten Kanälen zu erhalten:

$$F_R = S_R - \alpha \cdot F_G - \langle B_R \rangle .$$ Gleichung 3-16

Neben dem *spektralen crosstalk* wurden die unterschiedlichen Detektionseffizienzen für die grünen g_G und roten Kanäle g_R ermittelt. Diese, aufgrund des experimentellen Aufbaus und verwendeten Detektoren zu berücksichtigen Korrekturparameter, sind sehr schwer zu messen (Fries*, et al.*; 1998, Sabanayagam*, et al.*; 2005). Zugänglicher ist das Verhältnis g_G / g_R , welches in die Gleichung für die Transfereffizenz (Gleichung 2-13) integriert werden kann:

$$E = \frac{F_R}{\gamma \cdot F_G + F_R} \text{ mit } \gamma = \frac{g_R \cdot \Phi_{FA}}{g_G \cdot \Phi_{FD(0)}} .$$ Gleichung 3-17

Die Ermittlung des g_G / g_R -Verhältnisses erfolgt mit Hilfe von DA-markierter DNA, da hier mit einem definiertem F_G / F_R - Verhältnis zu rechnen ist (Sisamakis*, et al.*; 2010, Woźniak*, et al.*; 2008). Für die korrigierte Fluoreszenz ergibt sich somit:

$$F_D = \frac{F_G}{g_G} = \frac{S_G - \langle B_G \rangle}{g_G} .$$ Gleichung 3-18

und

$$F_A = \frac{F_R}{g_R} = \frac{S_R - \alpha \cdot F_G - \langle B_R \rangle}{g_R} .$$ Gleichung 3-19

Die Auftragung des Fluoreszenz-Intensitätsverhältnis F_D / F_A erfolgte in einem zweidimensionalen Histogramm gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors $\tau_{D(A)}$. Daraus resultiert die folgende Abhängigkeit:

$$\left(\frac{F_D}{F_A} \right)_{statisch} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \cdot \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \cdot \left(\frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(A)}} - 1 \right)^{-1} .$$ Gleichung 3-20

Die Gleichung ergibt eine sigmoidale Kurve (statische FRET-Linie), auf denen alle experimentell bestimmten FRET-Populationen theoretisch aufliegen sollten (Sisamakis*, et al.*;

2010), soweit es sich um ein statisches System handelt. Abweichungen von diesem Kurvenverlauf weisen auf Moleküldynamiken oder photophysikalische Effekte hin.
Ein weiterer Effekt sind Linker-Dynamiken des Fluoreszenzfarbstoffes. Diese Form der Dynamik resultiert in einen multiexponentialen Fluoreszenzzerfall des Donors und fließt als *Spezies-gemittelte Fluoreszenzlebensdauer* $\left\langle \tau_{D(\mathrm{A})} \right\rangle_{\mathrm{x}}$ in Gleichung 3-21 ein:

$$\left(\frac{F_D}{F_A} \right)_{statisch,L} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \cdot \left(\frac{\tau_{D(0)}}{\left\langle \tau_{D(\mathrm{A})} \right\rangle_{\mathrm{x}}} - 1 \right)^{-1} . \qquad \text{Gleichung 3-21}$$

Aufgrund der Tatsache, dass $\left\langle \tau_{D(\mathrm{A})} \right\rangle_{\mathrm{x}}$ experimentell nicht bestimmt werden kann, da ein Fluoreszenzereignis über 100 Photonen mit verschiedenen Donor-Lebensdauern enthält, wird zunächst mit Hilfe der *Maximum-Likelihood*-Methode die sogenannte *Fluoreszenz-gewichtete durchschnittliche Lebensdauer* $\left\langle \tau_{D(\mathrm{A})} \right\rangle_{\mathrm{f}}$ ermittelt:

$$\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_f = \frac{1}{\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_x} \sum_i x_i \tau_i^2 \qquad \text{Gleichung 3-22}$$

Mit Hilfe empirischer Polynome kann $\left\langle \tau_{D(\mathrm{A})} \right\rangle_{\mathrm{x}}$ als Funktion der experimentell zugänglichen $\left\langle \tau_{D(\mathrm{A})} \right\rangle_{\mathrm{f}}$ ausgedrückt werden:

$$\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_x = \sum_{i=0}^{n} A_{i,L} \left(\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_f \right)^i . \qquad \text{Gleichung 3-23}$$

Dabei werden die polynomialen Koeffizienten $A_{i,L}$ aus Simulationen mit spezifischer *Linker*-Länge erhalten. Gleichung 3-21 lässt sich dann wie folgt ausdrücken:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{statisch,L} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \cdot \left(\frac{\tau_{D(0)}}{\sum_{i=0}^{3} A_{i,L} \left(\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_f \right)^i} - 1 \right)^{-1}. \qquad \text{Gleichung 3-24}$$

Für dynamische Systeme gilt dementsprechend:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn,L} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \cdot \frac{\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_x}{\tau_{D(0)} - \left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_x}$$
$$= \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA} \cdot \tau_{D(0)}} \cdot \frac{\tau_1 \cdot \tau_2}{\left(\tau_1 + \tau_2 - \left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_f \right) - \frac{\tau_1 \cdot \tau_2}{\tau_{D(0)}}}. \qquad \text{Gleichung 3-25}$$

Mit $\left\langle \tau_1 \right\rangle_f$ und $\left\langle \tau_2 \right\rangle_f$ als durchschnittliche, Fluoreszenz-gewichtete und *Linker*-korrigierte Lebensdauern zweier FRET-Zustände und entsprechend Gleichung 3-23 ergibt sich mit den polynomialen Koeffizienten $C_{i,L}$:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn,L} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}\tau_{D(0)}} \cdot \frac{\left\langle \tau_1 \right\rangle_f \cdot \left\langle \tau_2 \right\rangle_f}{\left(\left\langle \tau_1 \right\rangle_f + \left\langle \tau_2 \right\rangle_f - \sum_{i=0}^{3} C_{i,L} \left(\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_f \right)^i \right) - \frac{\left\langle \tau_1 \right\rangle_f \cdot \left\langle \tau_2 \right\rangle_f}{\tau_{D(0)}}}. \qquad \text{Gleichung 3-26}$$

Aufgrund der in Kapitel 3.2.3.2 beschriebenen Registrierung der Fluoreszenzphotonen nach gepulster Anregung wurde der zeitliche Fluoreszenzzerfall $F(t)$ in ein Häufigkeitshistogramm aufgetragen. Unter Berücksichtigung der Geräteantwortfunktion $IRF(t)$ erhält man:

$$S(t) = IRF(t) \otimes \exp(-t \cdot k_0). \qquad \text{Gleichung 3-27}$$

Wobei für die Geschwindigkeitskonstante der Entvölkerung des angeregten Zustandes steht (Maus*, et al.*; 2001, Schaffer*, et al.*; 1999).

Durch die im Einzelmolekül-Aufbau enthaltenen Polarisationsfilter konnte ebenfalls für jedes Fluoreszenzereignis die Gleichgewichtsanisotropie des Donors r_D bestimmt werden:

$$r_D = \frac{G \cdot F_{D,\parallel} - F_{D,\perp}}{(1-3l_2)\cdot G \cdot F_{D,\parallel} + (2-3l_1)\cdot F_{D,\perp}}. \qquad \text{Gleichung 3-28}$$

mit $G = g_\perp / g_\parallel$ sowie l_1 und l_2 als gerätespezifische Korrekturfaktoren für die Objektivlinsen aufgrund des Polarisationsgemisches (Koshioka*, et al.*; 1995, Schaffer*, et al.*; 1999). Die Auftragung der Fluoreszenzanisotropie in 2D-Histogrammen dient in erster Linie der Überprüfung der Qualität der Separation von fluoreszenzmarkiertem Protein und freiem Farbstoff. Werte für r_D größer 0,05 indizieren fluoreszenzmarkiertes Protein. Bei Werten unter 0,05 ist das Vorliegen von freiem Fluoreszenzfarbstoff sehr wahrscheinlich. Aus der Fluoreszenzanisotropie können aber auch weitere Charakteristika des fluoreszenzmarkierten Proteins entnommen werden, die in den einzelnen Kapiteln des Ergebnisteiles dieser Arbeit beschrieben werden.

3.2.3.4.4 Photon Distribution Analysis

Die quantitative Beschreibung der mit Hilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie generierten Histogramme erfolgte mit der *Photon Distribution Analysis* (PDA) (Antonik*, et al.*; 2006, Kalinin*, et al.*; 2007, Kalinin*, et al.*; 2008). Unter Berücksichtigung von Untergrundzählrate, spektralem *crosstalk*, FRET-Effizienz und dem *shot noise* (dargestellt als Poisson-Verteilung) berechnet PDA die minimale Breite einer FRET-Verteilung. Grundlage hierfür ist die Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Kombination von Fluoreszenzsignalen $P(S_G, S_R)$ aus den grünen und roten Kanälen der verschieden Detektoren (Gleichung 2.41).

$$P(S_G, S_R) = \sum P(F)\cdot P(F_G, F_R \mid F)\cdot P(B_G)\cdot P(B_R). \qquad \text{Gleichung 3-29}$$

Die Fluoreszenz-Intensitätsverteilung wird bestimmt durch die Gesamtintensitätsverteilung $P(F)$ unter der Annahme, dass die Untergrundsignale B_G und B_R sich mit einer Poisson-

Verteilung, $P(B_G)$ und $P(B_R)$, beschreiben lassen. Hierzu ist es erforderlich, dass die durchschnittliche Untergrundzählraten $\langle B_G \rangle$ und $\langle B_R \rangle$ bekannt sind. Die Wahrscheinlichkeit eine bestimmten Kombination aus den Fluoreszenzsignalen und zu beobachten, wird mit der bedingten Wahrscheinlichkeit $P(F_G, F_R \mid F)$ beschrieben. Diese ist abhängig von der Gesamtzahl der registrierten Fluoreszenz-Photonen F und folgt einer binomialen Verteilung. Mit $P(S_G, S_R)$ ist es anschließend möglich, ein theoretisches Histogramm zusammen mit den vorgegebenen FRET-Parametern zu erstellen. Für die mathematische Anpassung eines solchen Histogramms für eine Einzelspezies wird ein variabler Parameter p_G benötigt, der eindeutig mit der FRET-Effizienz *E* verbunden ist:

$$p_G = \left(1 + \alpha + \frac{E\Phi_{\mathrm{FA}}}{(1-E)\dfrac{g_G}{g_R}\Phi_{\mathrm{FD}}} \right)^{-1} . \qquad \text{Gleichung 3-30}$$

Die Quantifizierung von dynamischen Prozessen mit PDA (dPDA) erfolgte nach Kalinin et al. (Kalinin*, et al.*; 2010b). DPDA beruht auf der Annahme, dass ein Molekül zwei dynamische Zustände S_1 und S_2 besitzt, die mit den Ratenkonstanten k_{12} und k_{21} ineinander übergehen können ($S_1 \xrightarrow{k_{12}} S_2$ und $S_2 \xrightarrow{k_{21}} S_1$). Das Molekül wird dabei in einem Zeitfenster Δt beobachtet, wobei es sich für die Zeit t_1 im Zustand S_1 und für die Zeit $t_2 = \Delta t - t_1$ im Zustand S_2 aufhält. Die Dichtefunktion $p(t_1)$ lässt sich dann wie folgt ausdrücken (Sanabria*, et al.*; in Vorbereitung):

$$p(t_1) = \delta(t_1)\frac{k_{12}}{k_{12}+k_{21}}\exp(-k_{21}\Delta t) + \delta(\Delta t - t_1)\frac{k_{21}}{k_{12}+k_{21}}\exp(-k_{12}\Delta t) +$$
$$\left[\frac{2k_{12}k_{21}}{k_{12}+k_{21}} I_0\left(2\sqrt{k_{12}k_{21}t_1t_2}\right) + \frac{k_{21}t_1 + k_{12}t_2}{k_{12}+k_{21}} \cdot \frac{\sqrt{k_{12}k_{21}}}{\sqrt{t_1t_2}} I_1\left(2\sqrt{k_{12}k_{21}t_1t_2}\right)\right]\exp(-k_{12}t_1 - k_{21}t_2)$$

(Gleichung 3-31)

Die ersten beiden Terme von (Gleichung 3-31 beschreiben die Wahrscheinlichkeitsdichte des Moleküls im Zeitfenster Δt jeweils in den Zuständen S_1 und S_2, der dritte Term ausschließlich das Molekül im Zustand S_1 für die Zeit t_1 ($0 < t_1 < \Delta t$). δ beschreibt dabei die Dirac-Funktion, I_0 und I_1 sind Bessel-Funktionen mit nullter und erster Ordnung.

Ein dynamisches System mit zwei Zuständen wurde durch Auftragung des Signalverhältnisses S_G/S_R in Abbildung 3-18 simuliert. Dynamische Raten, die kleiner sind als das gewählte Zeitfenster von 1 ms (Abbildung 3-18 A), sind aufgrund der Mittelung der beiden Grenzzustände S_1 und S_2 als quasi-statische Einzelpopulation erkennbar. Bei zunehmender Relaxationszeit t_R ($t_R = (k_1 + k_2)^{-1}$) tritt eine Verbreiterung der Populationen ein, bis beide Grenzzustände erkennbar sind. Sehr langsame Dynamiken erscheinen daher als zwei statische Populationen. Mit dPDA ist es daher möglich, Dynamiken im Bereich der Diffusionszeit t_{diff} zu erkennen (Abbildung 3-18 B und C) und mit Hilfe von (Gleichung 3-31 zu quantifizieren.

Bei der PDA lassen sich Dynamiken auch insoweit erkennen, dass für die Erstellung der Fluoreszenzhistogramme unterschiedliche Zeitfenster (*time windows*, TWs) betrachtet werden. Die Gegenüberstellung der verschiedenen Histogramme mit unterschiedlichen Zeitfenstern gibt Aufschluss über die Änderung der Signalzusammensetzung in einem Millisekunden-Zeitrahmen. Daher ist die PDA gut geeignet, um langsame Proteindynamiken zu erkennen.

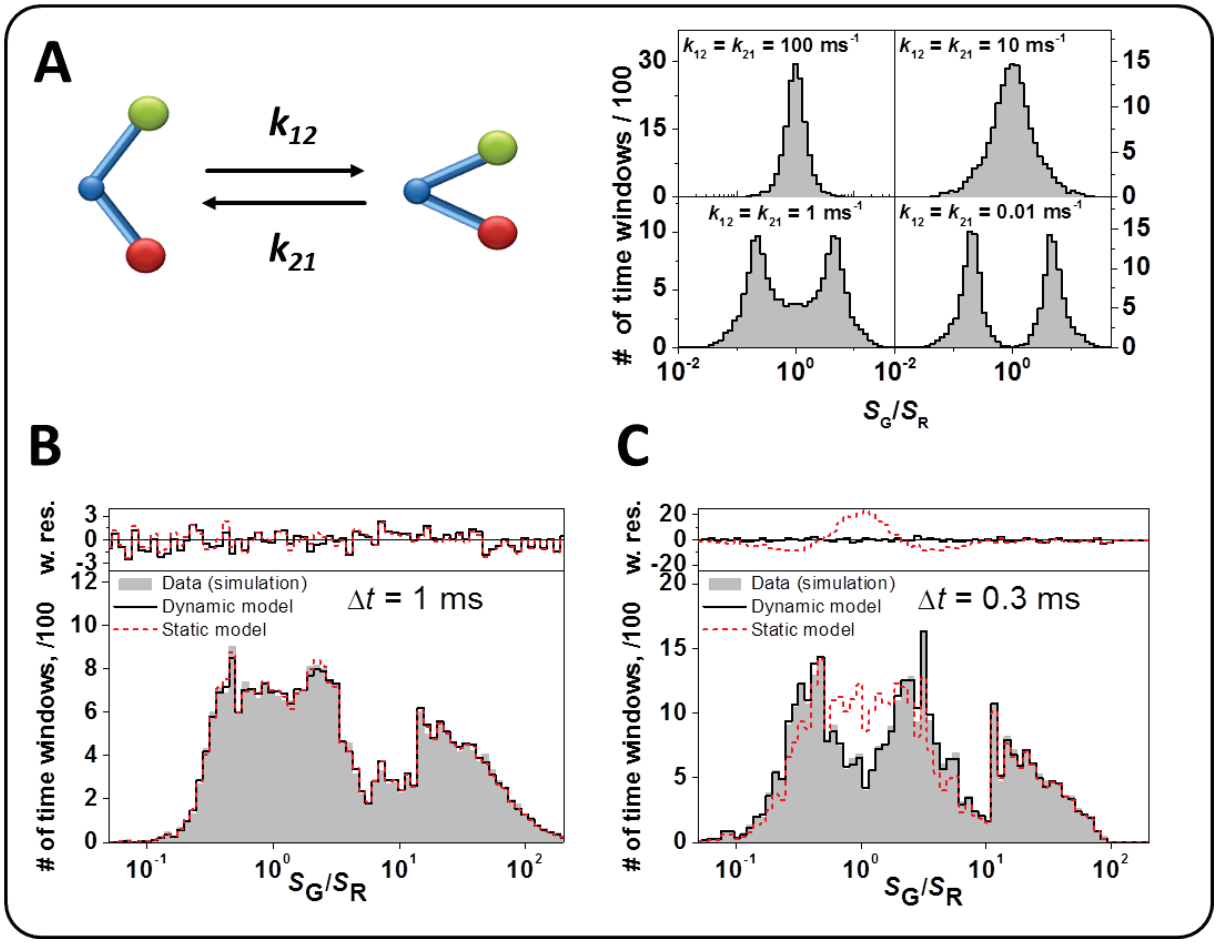


Abbildung 3-18: Illustration von dynamischem PDA (Sanabria, *et al.*; in Vorbereitung). (A) Simulation eines dynamischen Systems mit zwei Zuständen bei unterschiedlichen Relaxationszeiten $t_R = (k_1 + k_2)^{-1}$ dargestellt durch S_G/S_R - Histogramme für ein Zeitfenster von Δt = 1 ms. **(B und C)** Globale mathematische Anpassung zweier S_G/S_R - Histogrammen mit Δt = 1 ms und 0,3 ms für das simulierte dynamische System (graue Histogramme) mit einem dynamischen Zwei-Zustandsmodell (schwarze Linie) und einem statischen Modell mit zwei Gauss'schen Abstandsverteilungen, einem fixen Abstand sowie dem D-only-Anteil (rote gestrichelte Linie). Die Werte für χ_r^2 ermittelten sich zu 1,19 (Δt = 1 ms, dynamisches Modell: k_1 = 0.89 ms^{-1}; k_2 = 0.87 ms^{-1}), 1,20 (Δt = 1 ms, statisches Modell), 1,43 (Δt = 0,3 ms, dynamisches Modell) und 58 (Δt = 0,3 ms, statisches Modell). χ_r^2 ist als oberes Diagramm der S_G/S_R - Histogramme dargestellt. Für Δt = 1,0 ms wird deutlich, dass ein statisches Modell das simulierte dynamische System ausreichend beschreibt, während für Δt = 0,3 ms dies nicht möglich ist. Parameter für die Simulation: E_1 = 0.25, E_2 = 0.75, $k_1 = k_2$ = 1 ms^{-1}; 40% D-only; N_{FCS} = 0.002. Für das statische Modell: D-only (40.2%), zwei Gauss-Abstandsverteilungen $\langle R_1 \rangle$ = 1.18R_0 ($\langle E_1 \rangle$ = 0.27), σ_1 = 0.03, R_0 (18.3%), $\langle R_2 \rangle$ = 0.98 R_0, $\langle E_2 \rangle$ = 0.53), σ_2 = 0.09R_0 (27.6%), sowie R_3 = 0.84 R_0 $\langle E_3 \rangle$ = 0.74; (13.9%).

3.2.3.5 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Wie aus den vorangegangenen Kapiteln ersichtlich wurde, können Prozesse, die die Fluoreszenzintesität beeinflussen, auf molekularer Ebene beobachtet werden, wenn es gelingt, den Fokus auf einzelne Moleküle zu lenken. Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Methode, die Schwankungen in der Fluoreszenzintesität analysiert und sie um einen zeitlichen Mittelwert in Relation setzt. Dabei werden diese Intensitätsschwankungen, aufgrund extremer Verdünnung der Probenlösung, von einzelnen durch das Detektionsvolumen diffundierenden fluoreszierenden Partikeln, verursacht. Dadurch können photophysikalische und –chemische Prozesse, sowie Rotation und Translationsbewegungen quantifiziert werden (Ehrenberg*, et al.*; 1974, Magde*, et al.*; 1974). Da während der Diffusion die Fluorophore quasi kontinuierlich angeregt werden, können die dabei auftretenden Schwankungen in der Fluoreszenzintensität miteinander korreliert werden. Die Funktionsweise der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie, sowie der Einfluss der Probenparameter auf die Korrelationsfunktion, werden in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

3.2.3.5.1 Abhängigkeit der Autokorrelationsfunktion von Diffusionsprozessen

Die am häufigsten beobachtbaren Prozesse bei der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie sind Diffusionsvorgänge. Kleinere Flurophore passieren das konfokale Detektionsvolumen schneller als größere Protein-Fluorophorkomplexe. Aufgrund der längeren Verweildauer größerer Moleküle im Detektionsvolumen, sind die beobachtbaren Fluoreszenzfluktuationen mit der Zeit kleiner als bei kleineren Partikeln (Abbildung 3-19).

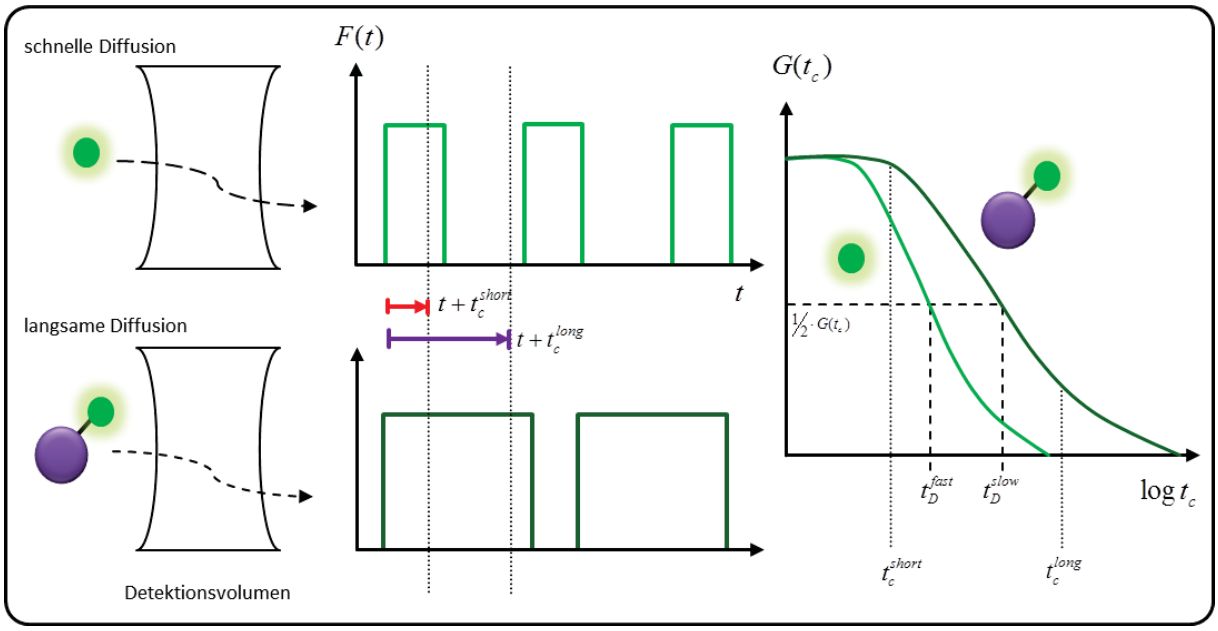


Abbildung 3-19: Schematische Darstellung des Einflusses der Partikelgröße auf die Korrelationsfunktion. Größere fluoreszenzmarkierte Moleküle passieren das Detektionsvolumen langsamer als kleiner. Infolgedessen werden Fluoreszenzsignale auch bei längeren Korrelationszeiten (t_c^{long}) erhalten. Die Autokorrelationsfunktion errechnet daher bei $\frac{1}{2} \cdot G(t_c)$ eine längere Diffusionszeit als für kleinere fluoreszenzmarkierte Moleküle.

Vergleicht man nun die Fluoreszenzintensität zu einem Zeitpunkt t mit der Fluoreszenzintensität zu einem Zeitpunkt $t + t_c$ mit Hilfe einer einfachen Autokorrelationsfunktion $A(t_c)$:

$$A(t_c) = \langle F(t) \cdot F(t + t_c) \rangle \ , \qquad \text{Gleichung 3-32}$$

stellt man fest, dass bei längeren Zeitabschnitten $t + t_c^{long}$ die Amplitude $A(t_c)$ bei schnell diffundierenden Molekülen eher gleich null wird, als bei größeren Molekülen, weil sie sich zum Zeitpunkt $t + t_c^{long}$ nicht mehr im Detektionsvolumen aufhalten und somit auch die Intensität F $(t + t_c^{long})$ gleich null wird. Bei Auftragung der Amplitude gegen die Korrelationszeit t_c wird der Unterschied erkennbar. Somit ist die Amplitude $A(t_c)$ proportional zur Wahrscheinlichkeit, bei der ein Photon nach der Zeit $t + t_c$ detektiert wird. Die durchschnittliche Diffusionszeit t_D eines Fluorophors ist dabei an dem Punkt der Korrelationskurve definiert, wo die Amplitude $A(t_c)$ auf 50 Prozent des Maximalwertes des Diffusionsterms gefallen ist.

3.2.3.5.2 Abhängigkeit der Autokorrelationsfunktion von der Fluorophorkonzentration

Befindet sich mehr als ein Fluorophor im konfokalen Detektionsvolumen, hat dies aufgrund der Messmethode Einfluss auf die Schwankungen der Fluoreszenzintensität. Dies ist in Abbildung 3-20 veranschaulicht.

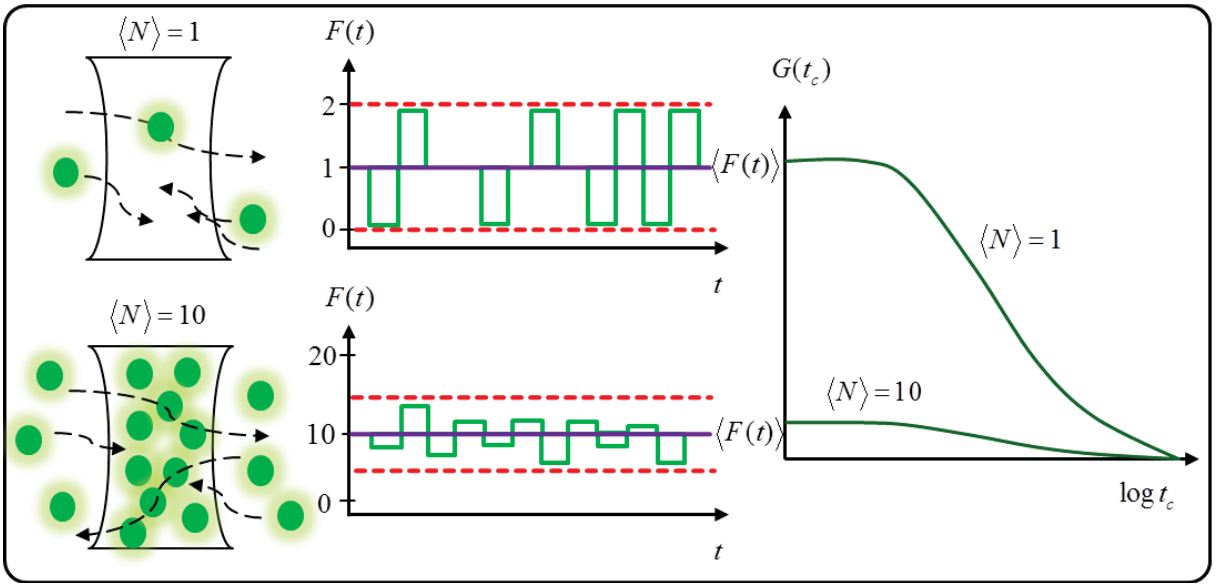


Abbildung 3-20: Einfluss der Partikelzahl im Detektionsvolumen auf die Korrelationsfunktion. Je mehr fluoreszenzmarkierte Moleküle sich im Detektionsvolumen aufhalten, desto mehr Signale werden am Detektor registriert. Damit steigt auch die durchschnittliche Fluoreszenzintensität $\langle F(t)\rangle$, die relativen Intensitätsschwankungen werden aber geringer. Nach der Autokorrelationsfunktion resultiert eine größere durchschnittliche Fluoreszenzintensität in eine kleinere Korrelationsamplitude $G(t_c)$. Mit Hilfe von FCS kann somit auf die Zahl der Moleküle im Focus geschlossen werden.

Je mehr Fluorophore sich im Detektionsvolumen aufhalten, desto höher sind auch die registrierten Fluoreszenzintensitäten. Die relativen Intensitätsschwankungen werden jedoch dadurch geringer, da gleichzeitig die durchschnittliche Fluoreszenzintensität über die gesamte Messzeit größer wird. Um dies zu verstehen, wird an dieser Stelle die um die durchschnittliche Fluoreszenzintensität normierte Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ eingeführt:

$$G(t_c) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t+t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$ Gleichung 3-33

mit $\langle F(t)\rangle = \frac{\int_0^T F(t)dt}{T}$ über die gesamte Messzeit T.

Dadurch wird ersichtlich, dass mit zunehmender durchschnittlicher Fluoreszenzintensität die Amplitude $G(t_c)$ kleiner wird. Damit verhält sich $G(t_c)$ umgekehrt proportional zur Anzahl der Moleküle N im Detektionsvolumen.

3.2.3.5.3 Weitere Korrelationseffekte

Betrachtet man die FCS-Kurve zu Korrelationszeiten, die kürzer als 50 µs sind, können weitere Effekte beobachtet werden. Korrelationskurven werden für gewöhnlich mit logarithmischer Zeitachse dargestellt. Ein Abfall der Amplitude $G(t_c)$ in einem Bereich der Korrelationskurve wird als *Bunchingterm* bezeichnet, ein Anstieg hingegen als *Antibunchingterm*. Abbildung 3-21 zeigt einen simulierten Verlauf einer Korrelationsfunktion.

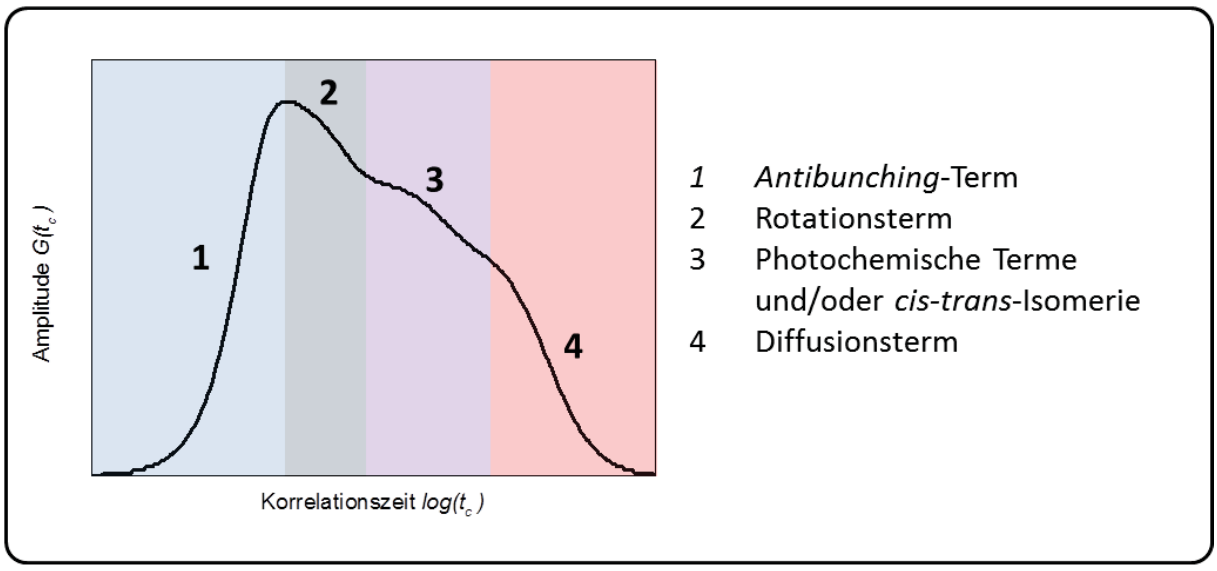


Abbildung 3-21: Simulierte FCS-Kurve. Der Kurvenverlauf zeigt die verschiedenen Bereiche der Korrelationsfunktion.

Aus Abbildung 3-21 wird ersichtlich, dass man die Korrelationsfunktion in vier Bereiche unterteilen kann:

1. Für eine erneute Emission eines Photons muss der Fluorophor erneut angeregt werden. Die Wahrscheinlichkeit dafür steigt für Korrelationszeiten im Nanosekundenbereich sprunghaft an. Dieser Bereich der Kurve wird als *Antibunching* bezeichnet, kann aber aufgrund der Totzeit des Detektors in vielen Fällen nicht aufgelöst werden. Die Verwendung eines weiteren Detektors kann diese Totzeit allerdings überbrücken.
2. Erfolgt die Anregung mit polarisiertem Licht oder wird nur die Emission einer Polarisationsrichtung detektiert, können Rotationseffekte im Nanosekundenbereich nach dem Maximum der Amplitude registriert werden, da sich aufgrund der Molekülrotation die Effizienz der Absorption bzw. Fluoreszenzemission (vgl. Kapitel 2.1.6).
3. Der untere µs-Bereich der Korrelationsfunktion stimmt mit charakteristischen Geschwindigkeitskonstanten während des *Intersystem Crossing* überein, da bei einem Übergang in den Triplettzustand das Molekül nicht mehr am Absorptions- bzw. Emissionsprozess teilnehmen kann. Da in dieser Zeit kein Photon detektiert werden kann, fällt die Korrelationsfunktion an dieser Stelle ab. Cis-Trans-Isomerisierungen können ebenfalls Ursache für einen Abfall der Amplitude sein. Der Cyanin-Farbstoff *Cy5* zum Beispiel wechselt in diesem Zeitintervall zwischen der nicht-fluoreszierenden Cis- zur fluoreszierenden Trans-Konfiguration. Beide Effekte können gleichzeitig auftreten (Schäfer; 1973, Widengren*, et al.*; 2001).
4. Dieser Bereich der Korrelationsfunktion wird durch die Diffusion der fluoreszierenden Partikel bestimmt. Da das Molekül mit der Zeit aus dem Messfokus diffundiert, verläuft die Amplitude mit zunehmender Korrelationszeit gegen Null.

Da nicht alle oben beschriebene Effekte bei der Untersuchung fluoreszenzmarkierter Biomoleküle auftreten, können die Korrelationskurven für verschiedene Modelle angepasst werden. Die Korrelationsfunktion kann als Produkt der auf die Anzahl der Moleküle normierten Einzelkorrelationsterme ausgedrückt werden (Widengren*, et al.*; 1995):

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) \cdot [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)]$$ Gleichung 3-34

$G_D(t_c)$ Diffusionsterm

$G_T(t_c)$ Triplettterm

$G_R(t_c)$ Rotationsdiffusionsterm

Die für diese Arbeit verwendeten Korrelationsfunktionen wurden entsprechend der zu erwarteten Korrelationseffekte angepasst und werden im dazugehörigen Ergebnissteil vorgestellt.

3.2.3.6 Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie

Eine Weiterentwicklung der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie stellt die Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS) (Schwille*, et al.*; 1997) dar. Bei dieser Technik werden zwei Detektoren ähnlich dem Aufbau für die Einzelmolekülspektroskopie (vgl. Kapitel 3.2.3.4) kombiniert und deren Signale miteinander korreliert. Damit kann die Totzeit bei der Verwendung von nur einem Detektor umgangen werden. Die Korrelationsfunktion für die Detektoren A und B kann dann wie folgt definiert werden:

$$G_{AB}(t_c) = \frac{\langle F^A(t) \cdot F^B(t + t_c) \rangle}{\langle F^A(t) \rangle \cdot \langle F^B(t) \rangle}.$$ Gleichung 3-35

Die Detektoren können aber auch zur Registrierung von Photonen in zwei unterschiedlichen Spektralbereichen dienen. Zum Beispiel können durch eine zweifarbige Anregung Interaktionen zwischen den unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Biomolekülen beobachtet werden (Abbildung 3-22). Ein weiteres Beispiel ist die Bestimmung von Dynamiken einer Monomer-Einheit. Ändert sich die Position von Donor- und Akzeptorfarbstoff bei FRET-markierten Biomolekülen beim Durchqueren des Detektionsvolumens, so verhalten sich die Signale aus den grünen und roten Kanälen antiproportional zueinander. Erkennbar wird dies durch einen *Antibunching*-Term in der Korrelationskurve. Bei der einfarbigen Anregung einer für zwei Spektralbereiche markierten Probe können Kinetiken mit Hilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers untersucht werden (Schweinberger; 2002). Änderungen in der

Transfereffizienz werden demnach als Antikorrelation, also dem Anstieg der Kreuzkorrelationsfunktion, registriert. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Differenz des Energietransfers und die Geschwindigkeit ziehen, mit der dieser Transfer stattfindet.

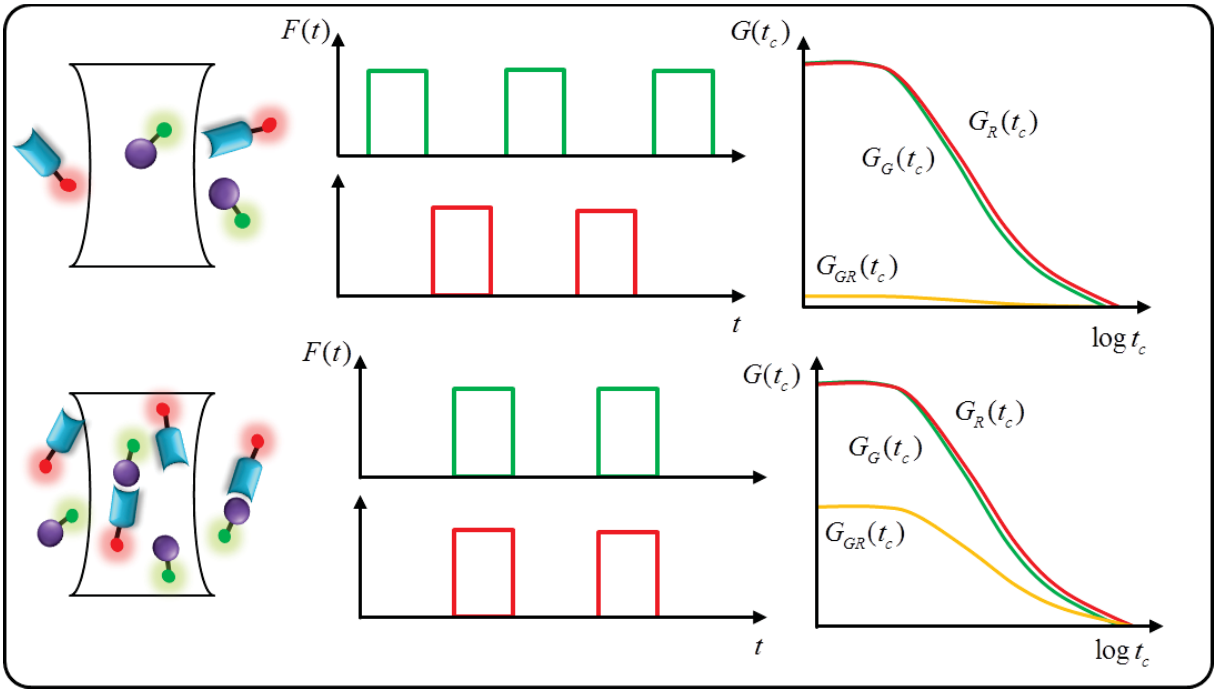


Abbildung 3-22: Prinzip der Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie. Dargestellt ist die Detektion zweier unterschiedlicher Wellenlängenbereiche. Die unterschiedlichen Detektionsbereiche werden dabei miteinander korreliert. Befindet sich jeweils eines der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Moleküle (grün und rot) im Fokus, werden Korrelationsamplituden für die jeweiligen Wellenlängenbereiche erhalten ($G_G(t_c)$ und $G_R(t_c)$), die Signale korrelieren aber nicht miteinander ($G_{GR}(t_c) = 0$). Sind jedoch grüne und rote Moleküle miteinander gekoppelt, erhält man Signalamplituden zur gleichen Zeit in beiden Detektionskanälen und für die Autokorrelation gilt $G_{GR}(t_c) \neq 0$.

3.2.3.7 Spezies-selektive Fluoreszenz-Kreuzkorrelation

Werden verschiedene Zustände eines fluoreszenzmarkierten Biomoleküls angenommen, können diese für gewöhnlich durch unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (Kapitel 3.2.3.2) identifiziert werden. Besteht ein dynamischer Zusammenhang zwischen diesen Zuständen, zum Beispiel durch eine Konformationsänderung während der Diffusion durch das Detektionsvolumen, können die Signale der verschiedenen Zustände miteinander korreliert werden. Zu diesem Zweck wurde die *Spezies-selektive Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie* (*Basis gefilterte FCS*, engl. *filtered FCS* oder *fFCS*) entwickelt (Böhmer, *et al.*; 2002, Felekyan, *et al.*; 2012), die sowohl als Auto- (*sAC*), als auch als Kreuzkorrelationsfunktion (*sCC*) berechnet werden kann. Zielsetzung ist

dabei die Generierung eines höheren Kontrastes zweier fluoreszierender Spezies. Die Methodik der Spezies-selektiven Fluoreszenz-Kreuzkorrelation ist in Abbildung 3-23 beschrieben.

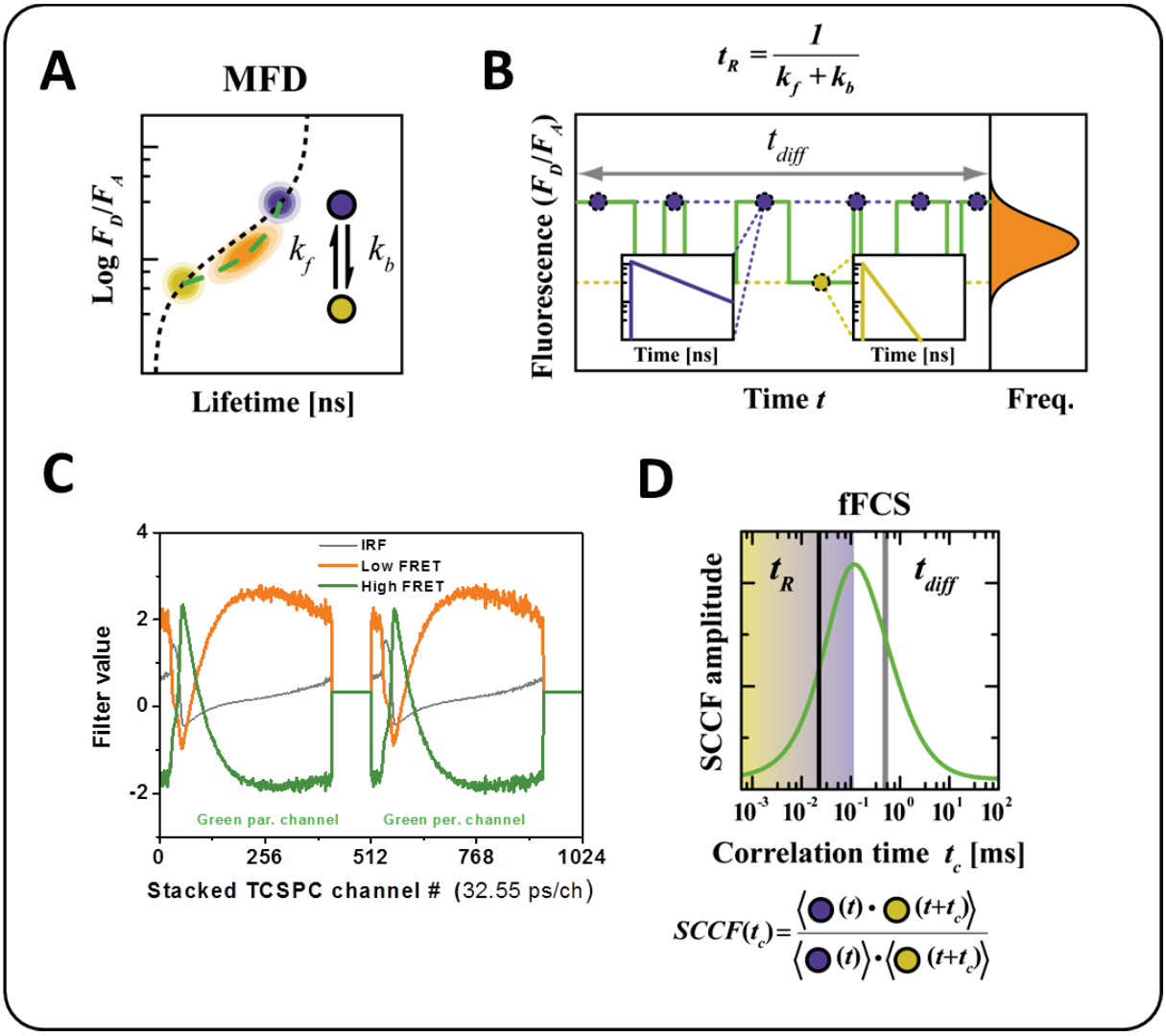


Abbildung 3-23: Prinzip der Spezies-selektiven Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie. (A) Die FRET-Effizienzen einzelner fluoreszenzmarkierter Moleküle werden in einem MFD-Experiement registriert und als Verhältnis von Donor- zu Aktzeptorfluoreszenz (F_D/F_A) aufgetragen. Anhand der Verteilung der FRET-Populationen kann auf verschiedene (dynamische) FRET-Spezies geschlossen werden. **(B)** Konformelle Dynamiken, die schneller als die charakteristische Diffusionszeit t_{diff} sind, werden als unimodale F_D/F_A-Verteilungen registriert. Den einzelnen FRET-Spezies können charakteristische Fluoreszenzlebensdauern zugeordnet werden. **(C)** Für die Gewichtung der unterschiedlichen FRET-Spezies in den TCSPC-Kanälen werden *Spezies-selektive* Filter generiert. Dargestellt sind generierte Filter von simulierter Streuung (IRF, graue Linie) und zwei simulierten fluoreszierenden Spezies (Low FRET, orange Linie; High FRET, grüne Linie) für die grünen parallelen und senkrechten Detektionskanäle. **(D)** Nach Selektion der unterschiedlichen Spezies können diese miteinander korreliert (SCCF) werden (Sanabria*, et al.*; in Vorbereitung).

Wurden zwei verschiedene Fluoreszenzlebensdauern eines Biomoleküls ermittelt, können aus diesen Daten charakteristische Zerfallshistogramme für jede Lebensdauer simuliert werden. Aus diesen Histogrammen und der Instrumentenantwortfunktion (IRF) lassen sich

Spezies-selektive Filter $f_j^{(i/m)}$ generieren, die anschließend auf Einzelmoleküldaten (Kapitel 3.2.3.4.2) angewendet werden können. Dabei muss die jeweilige Anisotropie der Spezies berücksichtigt werden, da Einzelmolekülmessungen nicht unter Ausschluss von Anisotropieeffekten („*Magic Angle*“) durchgeführt werden. Dadurch ist es möglich den Anteil des Fluoreszenzsignals S_j für jeden *TAC channel* $j = 1...L$ herauszufiltern, der zur betreffenden Spezies i oder m gehört. Diese Signale können dann miteinander korreliert werden. Die Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion (SCCF) lässt sich mit Hilfe von Gleichung 3-35 wie folgt ausdrücken:

$$G^{(i,m)}(t_c) = \frac{\left\langle F^{(i)}(t) \cdot F^{(m)}(t+t_c) \right\rangle}{\left\langle F^{(i)}(t) \right\rangle \cdot \left\langle F^{(m)}(t+t_c) \right\rangle}$$
$$= \frac{\left\langle \left(\sum_{j=1}^{L} f_j^{(i)} \cdot S_j(t) \right) \cdot \left(\sum_{j=1}^{L} f_j^{(m)} \cdot S_j(t+t_c) \right) \right\rangle \cdot}{\left\langle \sum_{j=1}^{L} f_j^{(i)} \cdot S_j(t) \right\rangle \cdot \left\langle \sum_{j=1}^{L} f_j^{(m)} \cdot S_j(t+t_c) \right\rangle} \qquad \text{Gleichung 3-36}$$

Eine Korrelation zwischen den Signalen beider Spezies lässt sich mit anhand der Entstehung eines oder mehrere Antikorrelationsterme beobachten. Eine sCC-Funktion, die verschiedene Antikorrelationsterme berücksichtigt, kann dann an die entstandene Korrelationskurve angepasst werden. Dadurch ist es möglich, die Relaxationszeiten t_R der Zustände zu ermitteln.

3.2.4 Simulation der Zugänglichkeit von gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen an Proteinen

Ein an einem Protein gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff kann aufgrund der sterischen Hinderung nur bestimmte Positionen im Raum einnehmen. Diese räumliche Verteilung des Farbstoffes wurde mit Hilfe des AV-Modells (engl., *accessible volume*) simuliert (Kalinin*, et al.*; 2012, Sindbert*, et al.*; 2011). Dabei wird der Farbstoff als eine Kugel mit den Radien $R_{F(1)}$, $R_{F(2)}$ und $R_{F(3)}$ angenommen (Abbildung 3-24). Der Mittelpunkt dieser Kugel wird mit einem

flexiblen Linker mit den Dimensionen Länge (L_{Linker}) und Breite (W_{Linker}) verbunden und simuliert somit die Kohlenstoffkette von der Kopplungsstelle zum Farbstoffmolekül.

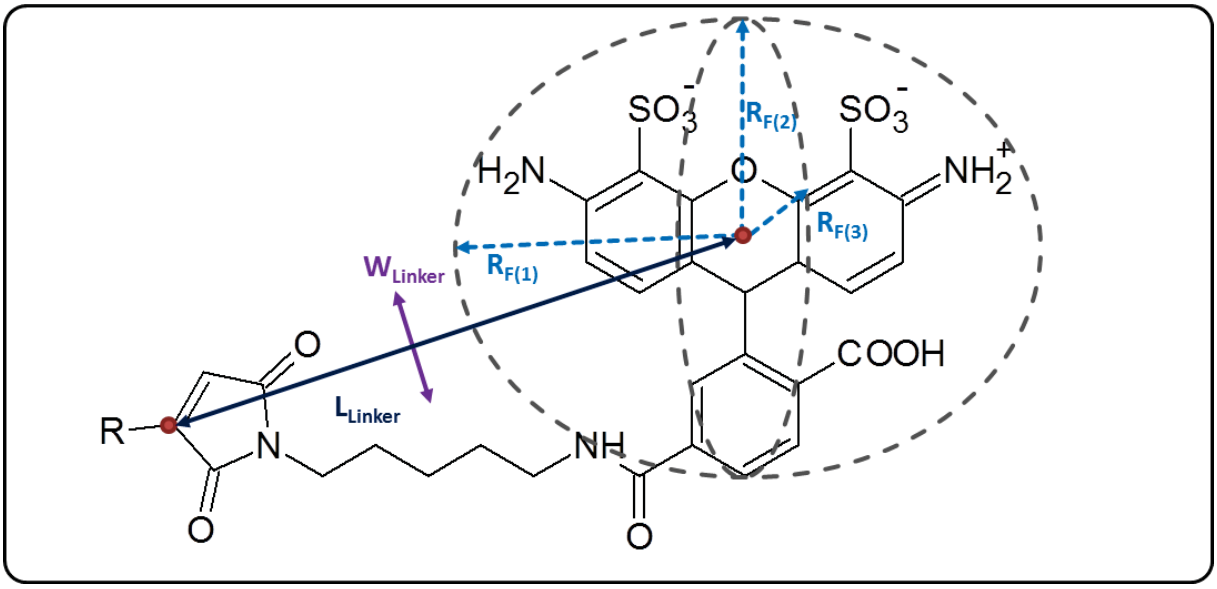


Abbildung 3-24: Parameter in der AV-Simulation. Der Farbstoff, hier Alexa 488, wird als Sphäre mit den Radien $R_{F(1)}$, $R_{F(2)}$ und $R_{F(3)}$ dargestellt. Der Linker wird über die Parameter Länge (L_{Linker}) und Breite (W_{Linker}) definiert.

Der geometrische Suchalgorithmus des AV-Modells ermittelt dann alle sterisch erlaubten Positionen des Farbstoffes im gegebenen Raum, so dass Kollisionen mit der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden. Dabei werden alle erlaubten Positionen als gleich wahrscheinlich angesehen. Die Parameter für die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488 und 647 für die AV-Simulation sind in Tabelle 3-20 zusammengefasst.

Tabelle 3-20: Parameter für die AV-Simulation.

Farbstoff	L_{Linker}	W_{Linker}	$R_{F(1)}$	$R_{F(2)}$	$R_{F(3)}$
Alexa 488	18,2 Å	4,5 Å	5,65 Å	5,2 Å	1,25 Å
Alexa 647	17,9 Å	4,5 Å	10,15 Å	5,7 Å	2,05 Å

Die ermittelten sinnvollen Positionen der gebundenen Farbstoffe erlauben die Bestimmung des mittleren Abstandes zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff $\langle R_{DA} \rangle$, die sonst mit Hilfe von TCSPC ermittelt werden. Dabei werden die Abstände zwischen den unterschiedlichen Donor- und Akzeptor-Positionen bestimmt und daraus ein Mittelwert generiert (Abbildung 3-25). Analog erfolgt die Bestimmung des mittleren FRET-gewichteten Abstandes $\langle R_{DA} \rangle_E$

(Bestimmung durch Messung über Intensitäten) erfolgt durch Berechnung der Transfereffizienz nach Gleichung 3-37:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)} \qquad \text{Gleichung 3-37}$$

für alle Abstände zwischen den möglichen Donor- und Akzeptor-Positionen. Aus der daraus errechneten mittleren Transfereffizienz wird $\langle R_{DA} \rangle_E$ bestimmt. Aus den verschiedenen möglichen Positionen von Donor und Akzeptor am Proteingerüst ergibt sich eine mittlere Position der Farbstoffe im Raum. Eine weitere Möglichkeit der Abstandsbeschreibung besteht also darin, diese mittleren Aufenthaltspunkte beider Farbstoffe zu bestimmen und deren Distanz R_{mp} zueinander zu berechnen. Dieser Abstand kann nicht experimentell bestimmt werden, ist aber für Strukturbestimmungen wichtig.

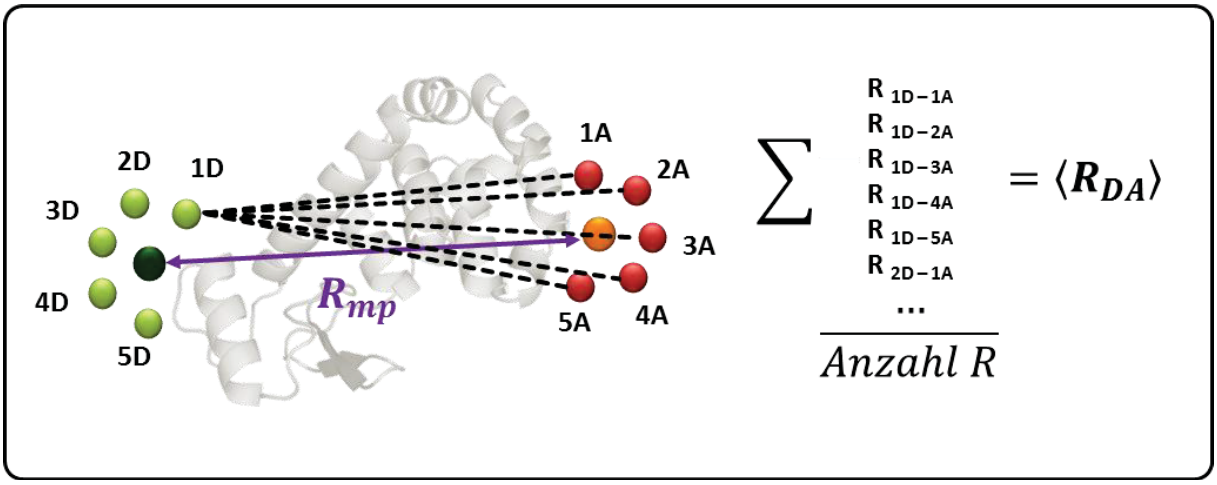


Abbildung 3-25: Veranschaulichung der Bestimmung des mittleren Abstandes zwischen Donor und Akzeptor-Farbstoff. Zwischen den möglichen Positionen eines gekoppelten Donor- (hellgrüne Kugeln) und Akzeptor-Farbstoffes (rote Kugeln) werden alle möglichen Abstände bestimmt und daraus ein Mittelwert $\langle R_{DA} \rangle$ berechnet. Eine Alternative zur Abstandsberechnung stellt die Bestimmung des Abstandes R_{mp} zwischen den mittleren Aufenthaltspositionen von Donor (dunkelgrüner Punkt) und Akzeptor (orangefarbener Punkt) dar.

Am Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie und Elektrochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde für die AV-Simulation die anwenderfreundliche Software *FRET Positioning and Screening* (FPS) entwickelt (Kalinin*, et al.*; 2012). Diese ermöglicht nicht nur die Bestimmung oben genannten Parameter, sondern simuliert in Abhängigkeit von vorgegebenen FRET-Abständen mögliche Strukturkonformationen und -orientierungen. Bei FPS werden ausschließlich strukturelle Beschränkungen berücksichtigt. Andere

Interaktionen, wie elektrostatische oder hydrophobische Wechselwirkungen, werden durch das Programm nicht erfasst. Für die Simulation werden die Molekülstrukturen im pdb-Format für jede Untereinheit, die Fluoreszenzmarkierungsposition, sowie die FRET-Distanzbeschränkungen (R_{mp}, $\langle R_{DA} \rangle$ oder $\langle R_{DA} \rangle_E$) benötigt. Mittels *Rigid Body Docking* (engl., „Andocken von starren Körpern“) und *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD, engl., quadratische Mittelwertsabweichung) erfolgt die simulierte Fluoreszenzmarkierung, die Berechnung des zugänglichen Farbstoffvolumens („*accessible volume“*), sowie die Simulation möglicher Strukturorientierungen. Das Programm basiert dabei auf den Arbeiten von Muschielok et al. (Muschielok*, et al.*; 2008) und Brunger et al. (Brunger*, et al.*; 2011). Die $R_{C\beta}$-Abstände wurden mit dem Programm *Pymol* Version 1.7 ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Modellsystem I: Untersuchungen zur katalytischen Konformationsänderung der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

Der Schwerpunkt dieses Projektes war die Untersuchung der katalytischen Konformationsdynamik von fluoreszenzmarkierten Varianten der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT). Ausgewählte Aminosäuren von ssAnPRT wurden gegen Cysteine ausgetauscht (Kapitel 3.1.3.1), wodurch eine Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels Thiol-Maleimid-Chemie an die Proteinstruktur möglich wurde (Kapitel 3.1.3.3). Für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden die ssAnPRT-Varianten gewählt, die aus SAXS-Messungen (*Small Angle X-ray Scattering*, engl.) eine hinreichende Abstandsänderung zwischen den modifizierten Aminosäuren aufwiesen. Daher wurden für diese Arbeit die dimeren Varianten ssAnPRT(K280C), ssAnPRT(N162C, K280C) und ssAnPRT(E5C, K280C) des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg, als auch die institutseigenen dimeren Varianten ssAnPRT(S14C, S254C), ssAnPRT(S254C) und das monomere ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) untersucht.

4.1.1 Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung mit *Alexa Fluor® 488* (kurz: Alexa 488 oder A488) und *Alexa Fluor® 647* (kurz Alexa 647 oder A647) erfolgte nach der in Kapitel 3.1.3.3 beschriebenen Methode. Das monomere ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) wurde mit *Bodipy® FL N(-2-aminoethyl)maleimid* (kurz *Bodipy® FL maleimid* oder Bodipy FL) und *Alexa Fluor® 594* (kurz: Alexa 594 oder A594) markiert, da bei dieser Variante Präzipitation mit Alexa 488 und 647 auftrat (siehe Kapitel 4.1.1.1). Fluoreszenz-markierte Proteinvarianten werden im Text mit dem Index „DA“ („Donor-Akzeptor“) oder „D“ („nur Donor“, bzw. „D-only“, engl.) hinter der Angabe der modifizierten Aminosäuren kenntlich gemacht. Für den Donor variierte der Markierungsgrad zwischen 5 und 100% und für den Akzeptor zwischen 10 und 80% je nach Zugänglichkeit der Cystein-Mutation in der ssAnPRT-Struktur. Die Bestimmung der Markierungseffizienzen erfolgte nach Kapitel 3.2.1 und sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1 Ergebnis der Fluoreszenzmarkierung verschiedener ssAnPRT-Varianten je Protomer.

Variante	Donor Markierungsgrad	Akzeptor Markierungsgrad
ssAnPRT(E5C, K280C)	5% (A488)	10% (A647)
ssAnPRT(S14C, S254C)	50% (A488)	70% (A647)
ssAnPRT(S254C)	94% (A488)	80% (A647)
ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C)	65% (Bodipy FL)	23% (A594)
ssAnPRT(N162C, K280C)	30% (A488)	30% (A594)
ssAnPRT(K280C)	100% (A488)	keine Akzeptormarkierung

4.1.1.1 Irreversible Präzipitation von fluoreszenzmarkiertem ssAnPRT(S14C,I36E, M47D, S254C)

Ein Sonderfall für die Fluoreszenzmarkierung stellte das monomere ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) dar. Diese Variante konnte nicht mit der in Kapitel 3.1.3.3 beschriebenen Methode mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und 647 markiert werden, da sie nach Kontakt mit den Farbstoffen sofort präzipitierte. Aus diesem Grund wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe getestet, um stabiles DA-markiertes ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) zu erhalten. Die Ergebnisse der Markierungsuntersuchung sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Nur eine Kombination aus einer aus *Bodipy® FL maleimid* (Abbildung 4-1 A) und *Alexa Fluor® 594 maleimid* konnte ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) erfolgreich DA-markieren.

Tabelle 4-2 Fluoreszenzmarkierung von ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

Donor-Farbstoff	Akzeptorfarbstoff	Reaktion des Enzyms
Alexa Fluor® 488 maleimid	kein Akzeptor	**stabil**
Atto 488 maleimid	kein Akzeptor	**stabil**
Bodipy® FL maleimid	kein Akzeptor	**stabil**
kein Donor	*Alexa Fluor® 594 maleimid*	**stabil**
kein Donor	*Alexa Fluor® 647 maleimid*	**stabil**
Alexa Fluor® 488 maleimid	*Alexa Fluor® 594 maleimid*	**Präzipitation**
Atto 488 maleimid	*Alexa Fluor® 594 maleimid*	**Präzipitation**
Alexa Fluor® 488 maleimid	*Alexa Fluor® 647 maleimid*	**Präzipitation**
Bodipy® FL maleimid	*Alexa Fluor® 594 maleimid*	**stabil**

Im Vergleich zu den Alexa- und Atto-Farbstoffen verhält sich *Bodipy® FL maleimid* bei pH 7,5 nahezu ladungsneutral. Es ist anzunehmen, dass zwei geladene Fluoreszenzfarbstoffe die Präzipitation dieser ssAnPRT-Variante auslösen. Der Nachteil einer Fluoreszenzmarkierung mit *Bodipy® FL maleimid* ist die breite Verteilung der Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffes durch *shot noise* zwischen 3,5 und 9 ns mit Schwerpunkt bei $\tau_{D(0)}$ = 5,5 ns unter Einzelmolekülbedingungen (Abbildung 4-1 B), wie es am Beispiel der D-only-Probe T4L(I150C)+BodipyFL zu erkennen ist. Die Folge ist eine breitere Verteilung des FRET-Signals bei DA-markierten Proben (vergleiche hierzu Kapitel 4.1.8.4).

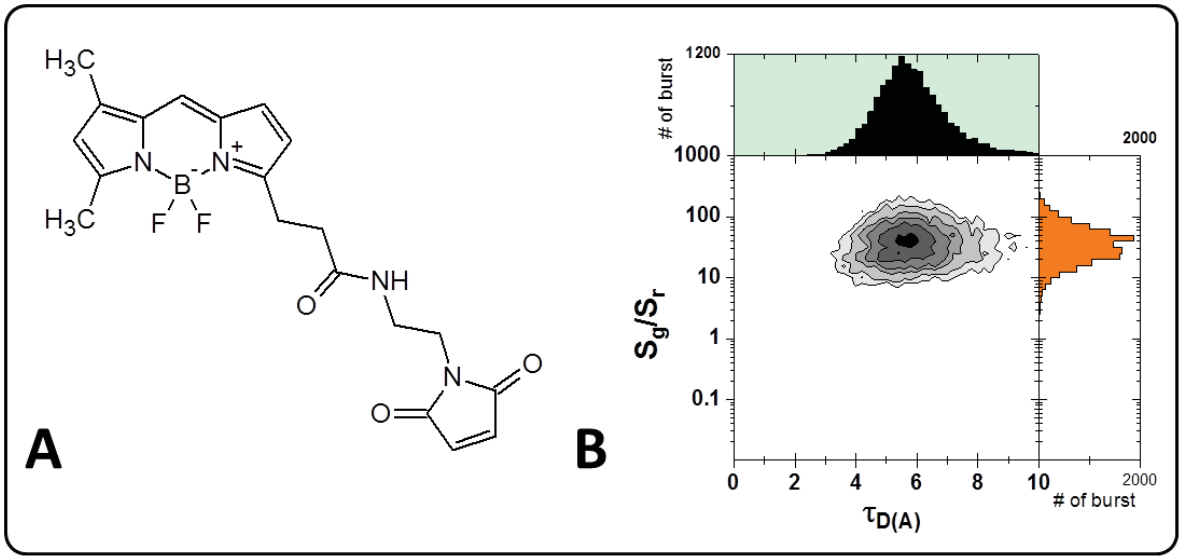


Abbildung 4-1: Struktur und Fluoreszenzverhalten von *Bodipy® FL N(-2-aminoethyl)maleimid* (kurz „*Bodipy® FL maleimid*"). **(A)** Darstellung der Molekülstruktur. **(B)** Das 2D-Histogramm zeigt die Auftragung des Signalverhältnises S_g/S_r gegen die Lebensdauer $\tau_{D(A)}$ von T4-Lysozym(I150C), welches mit *Bodipy® FL maleimid* markiert wurde. Deutlich ist die breite Verteilung der Lebensdauer (zwischen 3,5 und 9 ns) erkennbar.

4.1.2 Fluoreszenzquantenausbeuten des Akzeptors

Die Fluoreszenzquantenausbeuten des Akzeptors Φ_{FA} wurden mittels eTCSPC nach der Methode, wie sie in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben wurde, bestimmt und sind in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Fluoreszenzquantenausbeute für die Doppelcystein-Variante ssAnPRT(S14C, S254C)DA berechnete sich zu Φ_{FA} = 0,41 (τ_A = 1,24 ns) und für die Monocystein-Variante ssAnPRT(S254C)DA zu 0,32 (τ_A = 0,97 ns). Für ssAnPRT(E5C, K280C)DA und ssAnPRT(N162C, K280C)DA wurden Φ_{FA} = 0,41 angenommen.

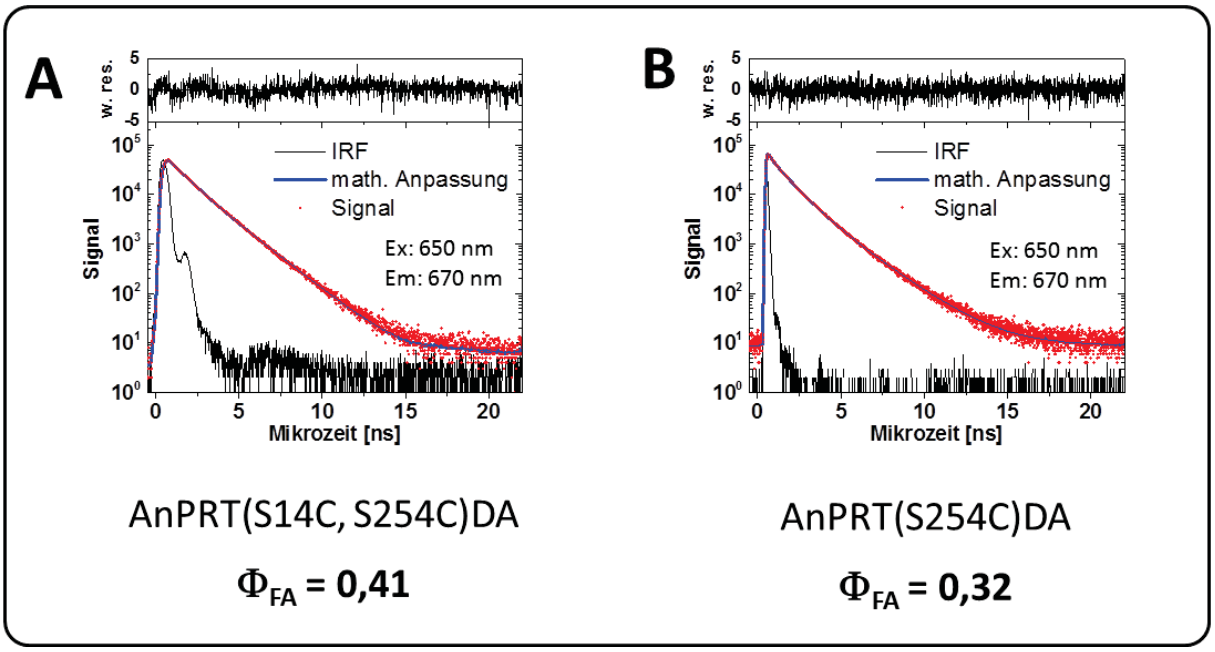


Abbildung 4-2: Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_{FA} mittels eTCSPC. (A) Bestimmung von Φ_{FA} von AnPRT(S14C, S254C)+(A488, A647). **(B)** Bestimmung von Φ_{FA} von AnPRT(S254C)+(A488, A647). Die Anregungswellenlänge betrug 650 nm, die Emissionswellenlänge wurde bei 670 nm detektiert.

4.1.3 Dynamik des Monomer-/Dimer-Gleichgewichtes der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

Das Vorliegen der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase in monomerer oder dimerer Form ist von der Konzentration der Monomeruntereinheiten abhängig und wurde bereits fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Rohrbeck; 2007). Die ermittelten Dissoziationskonstanten wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie überprüft. Aus Rohrbeck (2007) wurde ersichtlich, dass die

Dissoziationskonstante K_D stark abhängig vom Fluoreszenzfarbstoff und der gewählten Markierungspositionen ist. Daher wurde für die erneute Untersuchung die ssAnPRT-Variante K280C aufgrund der räumlichen Entfernung der Markierungspositionen gewählt, um eventuelle Interaktionen mit der Kopf-an-Kopf-Verknüpfung des Proteins, sowie der Farbstoffe untereinander, zu vermeiden. Für die Untersuchung wurde die Monomerkonzentration der fluoreszenzmarkierten Proteine auf 50 pM eingestellt, während die Konzentration an wildtypischen ssAnPRT variiert wurde. Aus fünf voneinander unabhängigen Messreihen wurden die Diffusionszeiten mit Hilfe von Gleichung 4-1 bestimmt.

$$G(t_c) = offset + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1+\frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{z_0}{\omega_0}\right)^{-2}\frac{t_c}{t_{diff}}}} \cdot \left(1 - x_{Tr} \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{xTr}}\right)}\right) \qquad \text{Gleichung 4-1}$$

N	durchschnittliche Zahl der Moleküle im Focus
t_c	Korrelationszeit
t_{diff}	Diffusionszeit
z_0 / ω_0	Axial-radiales Verhältnis des Detektionsvolumens
x_{Tr}	Triplettamplitude
t_{Tr}	charakteristische Relaxationszeit des Triplettzustandes

Die Auftragung der gemittelten Diffusionszeiten gegen die ssAnPRT-Monomerkonzentration $[M]_T$ und die daraus resultierenden Standardabweichungen sind in Abbildung 4-3 dargestellt. Wie erwartet, verkürzt sich die Diffusionszeit durch das Detektionsvolumen von ssAnPRT bei sinkender Gesamtkonzentration aufgrund der zunehmenden Monomerisierung. Die Dissoziationskonstante K_D wurde nach Gleichung 4-2 ermittelt (Graziano*, et al.*; 2006, Rohrbeck; 2007):

$$t_D = t_D^{\min} + \frac{K_D + 4\cdot[M]_T - \sqrt{K_D^2 \cdot 8 \cdot [M]_T \cdot K_D}}{4\cdot[M]_T} \cdot \left(t_{diff}^{\max} - t_{diff}^{\min}\right) \qquad \text{Gleichung 4-2}$$

Gleichung 4-2 diente dabei als mathematische Anpassung an die aufgetragenen Messdaten, deren Lösung mit Hilfe des Programms *Matlab®* generiert wurde. Die Dissoziationskonstante ermittelte sich dabei zu 394,9 +/- 189,4 nM und zeigte damit eine gute Übereinstimmung mit

307 +/- 36 nM für ssAnPRT(E5C)+A488 aus Rohrbeck (2007). Die Schwankungsbreite der Messpunkte, und somit auch die Qualität der mathematischen Anpassung, konnte mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie hingegen nicht verbessert werden.

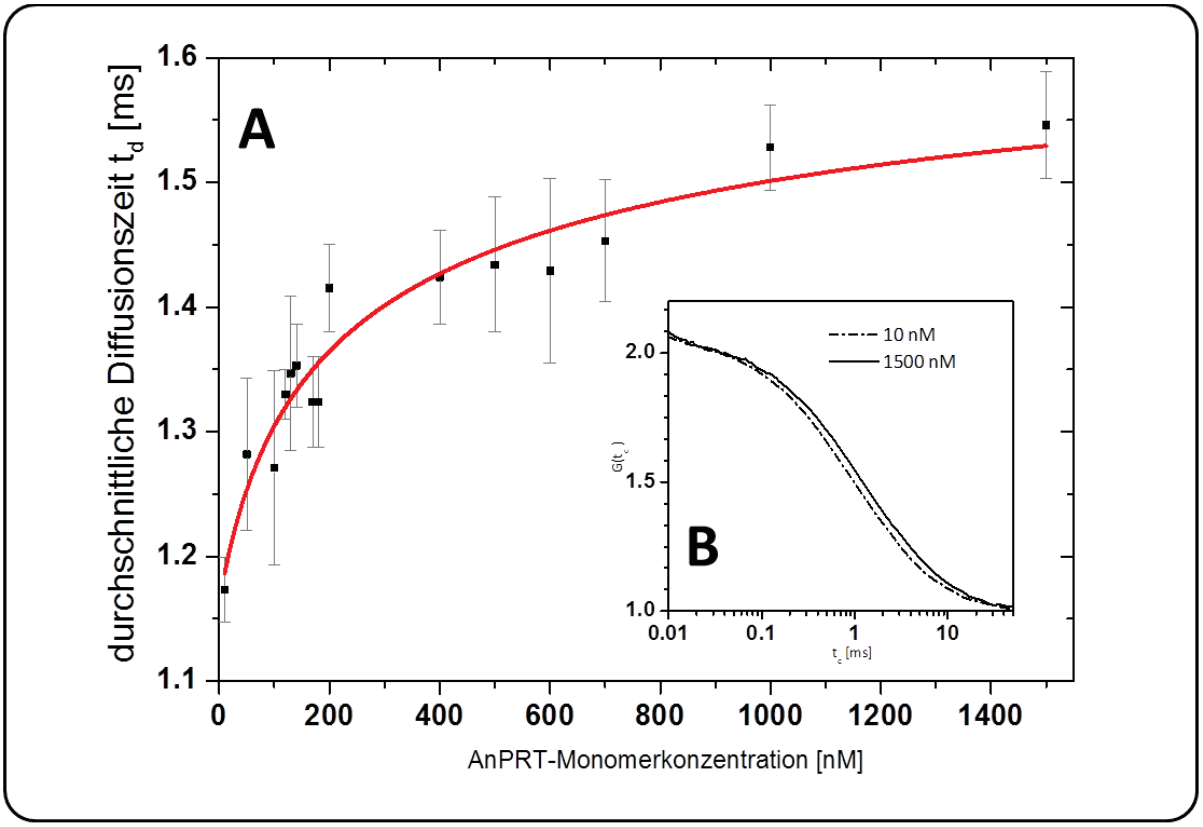


Abbildung 4-3: Ermittlung der Dissoziationskonstanten von ssAnPRT(K280C)+A488. Mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wurden die Diffusionszeiten von fluoreszenzmarkiertem ssAnPRT(K280C) bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ermittelt. Die Konzentration von markiertem ssAnPRT wurde auf konstant 50 pM gehalten, während die Gesamtkonzentration der Monomeruntereinheiten mit Hilfe von wildtypischen ssAnPRT variiert wurde. **(A)** Aufgrund zunehmender Dimerisierung von ssAnPRT steigt mit zunehmender Monomerkonzentration die Diffusionszeit asymptotisch an. Von fünf unabhängigen Messreihen wurden diese gemittelt und gegen die ssAnPRT-Monomerkonzentration aufgetragen. Die daraus resultierenden Standardabweichungen sind als graue Fehlerbalken dargestellt. Mit Hilfe einer mathematischen Anpassung nach Gleichung 4-2 (rote Kurve) wurde die Dissoziationskonstante K_D zu 394,9 (+/- 189,4) nM bestimmt (Graziano*, et al.*; 2006, Rohrbeck; 2007). In Abbildung **(B)** sind zwei typische Korrelationskurven für die Monomerkonzentrationen 10 und 1500 nM dargestellt. Hier ist der Trend zu kürzeren Diffusionszeiten bei abnehmender Monomerkonzentration erkennbar.

Aufgrund der nachgewiesenen Möglichkeit der Monomerisierung von ssAnPRT durch die Konzentrationsabnahme des Enzyms wurde ein dynamischer Austausch der Protomere untereinander vermutet. Aus diesem Grund wurde homodimeres ssAnPRT(S14C, S254C)DA (Endproteinkonzentration: 250 pM) mit wildtypischem ssAnPRT (1 und 10 µM) versetzt und in einem Zeitraum von einer Stunde und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ziel des Experimentes war die Bestätigung der in Kapitel 4.1.8.1 angenommenen Zuordnung der

FRET-Populationen, sowie der Beweis des dynamischen Protomerenaustausch durch Zugabe hoher Konzentrationen von wildtypischen ssAnPRT. Die Ergebnisse aus Abbildung 4-4 A und B zeigen, dass selbst bei 10 µM an wildtypischen ssAnPRT und einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur die FRET-Populationen erhalten bleiben und somit ein dynamische Protomeraustausch nicht gezeigt werden konnte. Ein Austausch der Protomere untereinander kann nur nachgewiesen werden, wenn zuvor eine Mischung aus fluoreszenzmarkiertem und wildtypischen ssAnPRT weit unterhalb des ermittelten Wertes für die Dissoziationskonstante K_D verdünnt und anschließend wieder aufkonzentriert wird (Abbildung 4-4 C). Durch die Neuorientierung der Protomere wurden die Fluoreszenzpopulationen des intramolekularen FRETs stärker hervorgehoben (Abbildung 4-4 D). Dabei zeigte sich deutlich, dass die MF- und HF-Populationen der dimeren fluoreszenzmarkierten Varianten (Abbildung 4-4 A und B) eine Überlagerung aus intra- und intermolekularem FRET darstellen, da sie sich vom F_D/F_A-Verhältnis deutlich von den Proben aus Abbildung 4-4 A und B unterscheiden. Ausgehend von der Vermutung, dass es sich in Abbildung 4-4 D um ausschließlich Dimere handelt, von der nur eines der Protomere fluoreszenzmarkiert ist, zeigt das 2D-Histogramm eine *Donor-only*-Population, sowie eine MF- und HF-Population, die gemeinsam auf einer dynamischen FRET-Linie liegen. Aufgrund der Signalverteilung ist von einer Dynamik im dreistelligen Mikrosekundenbereich auszugehen (Sanabria*, et al.*; in Vorbereitung). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den FRET-Populationen um mehrere Zustände des Proteins handelt, die ineinander übergehen können.

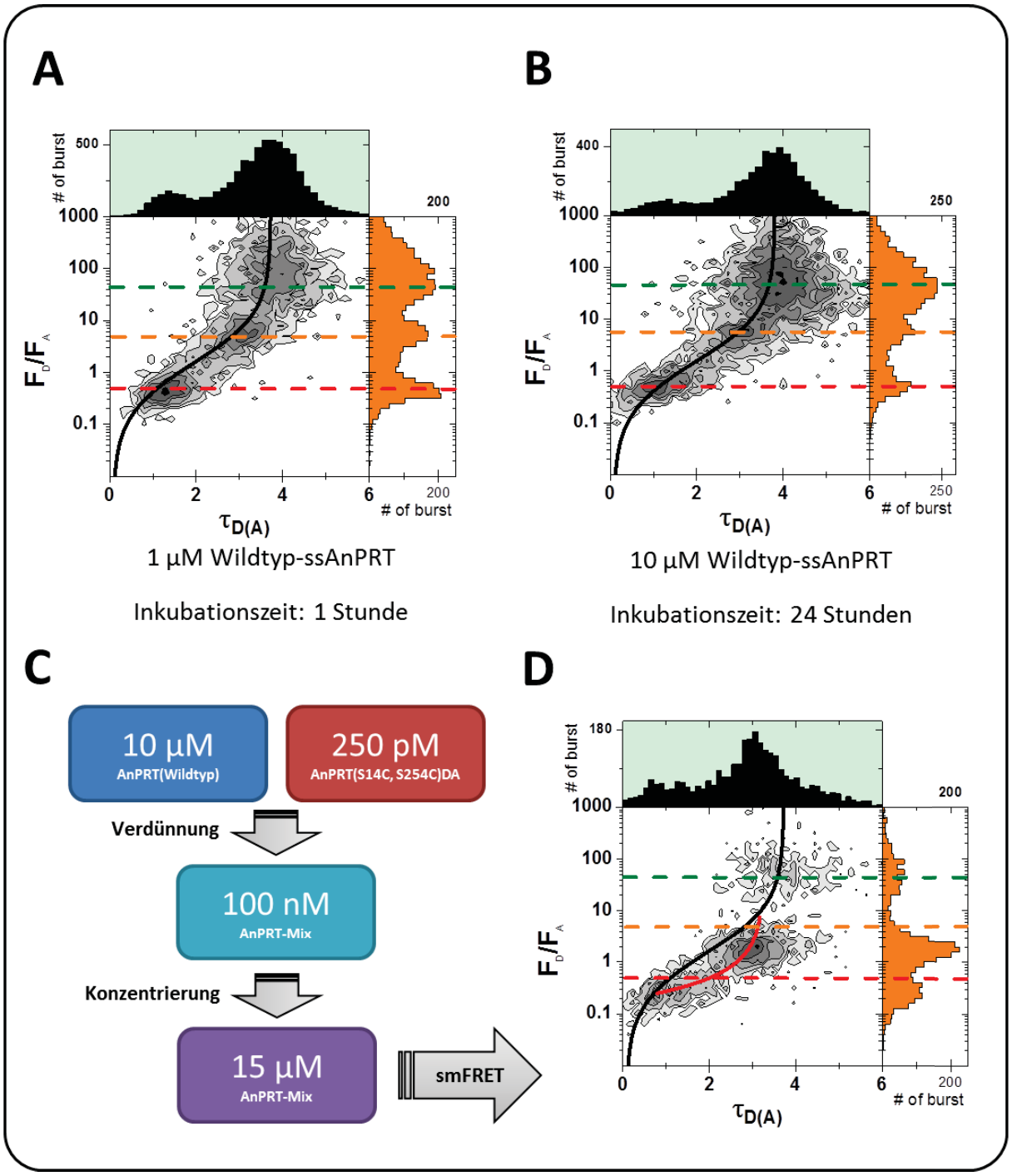


Abbildung 4-4 Untersuchung des dynamischen Monomerenaustausches anhand homodimerem ssAnPRT(S14C, S254C)DA ohne Substrate. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde mit 1 µM **(A)**, sowie nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 10 µM an wildtypischen ssAnPRT **(B)** war kein dynamischer Monomerenaustausch nachweisbar. **(C)** Durch Verdünnung einer Lösung aus fluoreszenzmarkiertem und wildtyptischen ssAnPRT auf 100 nM Gesamtproteinkonzentration und Aufkonzentrierung auf 15 µM konnte gezeigt werden, dass **(D)** ein Austausch der Protomere nur durch die Proteinkonzentration erzwungen werden kann, wie es durch die Abnahme der LF-Population, sowie der Verschiebung der MF- und HF-Populationen, erkennbar ist. Es zeigt außerdem, dass die MF- und HF-Populationen in (A) und (B) eine Überlagerung aus intra- und intermolekularem FRET darstellen. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	1,985	0,656	0,0170	0,730	1,000
B	1,319	0,456	0,0170	0,730	1,000
D	0,460	0,509	0,0300	0,730	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	A_0	A_1	A_2	A_3
A	0,76	0,41	3,80	-0,0421	0,2976	0.4870	-0.0417
B	0,80	0,41	4,00	-0,0376	0,2794	0.4934	-0.0432
D	0,76	0,32	3,80	-0,0358	0,2926	0,4934	-0,0443

Für die dynamischen FRET-Linien (Gleichung 3-26) wurden folgende Paramenter verwendet:

Abbildung	Φ_A	τ_{D0} [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
D	0,32	4,00	0,6	3,2	0,0000	0,0000	1,9547	-3,0613

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.1.4 Untersuchung der Konformationsänderung nach Substratzugabe

Die Abbildung 4-5 zeigt die Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von ssAnPRT(E5C, K280C)DA. Das Fluoreszenzverhältnis aus grünen und roten Kanälen F_D/F_A wurde gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Gegenwart des Akzeptors $\tau_{D(A)}$ aufgetragen. Aufgrund der geringen Markierungseffizienz konnten Änderungen in der Verteilung der verschiedenen FRET-Populationen nur unzureichend aufgelöst werden. Nach dem AV-Modell ist nach Substratzugabe von einer deutlichen Vergrößerung des intermolekularen Abstandes zwischen E5C (+ 10,2 Å) und dem intramolekularen Abstand zwischen E5C und K280C (+ 18,2 Å) zu erwarten (Anhang, Kapitel 8.2, Tabelle 8-3). Eine Änderung der Fluoreszenzverteilung in Richtung LF ist bei Substratzugabe zu erkennen (Abbildung 4-5 B) und liefert somit ein erstes Indiz auf den Konformationswechsel. Da der Markierungsgrad nicht verbessert werden konnte, wurden die Arbeiten mit dieser ssAnPRT-Variante eingestellt. Für die nachfolgenden detaillierteren fluoreszenzspektroskiopischen Untersuchungen wurden andere ssAnPRT-Mutanten mit besserem Markierungsgrad gewählt.

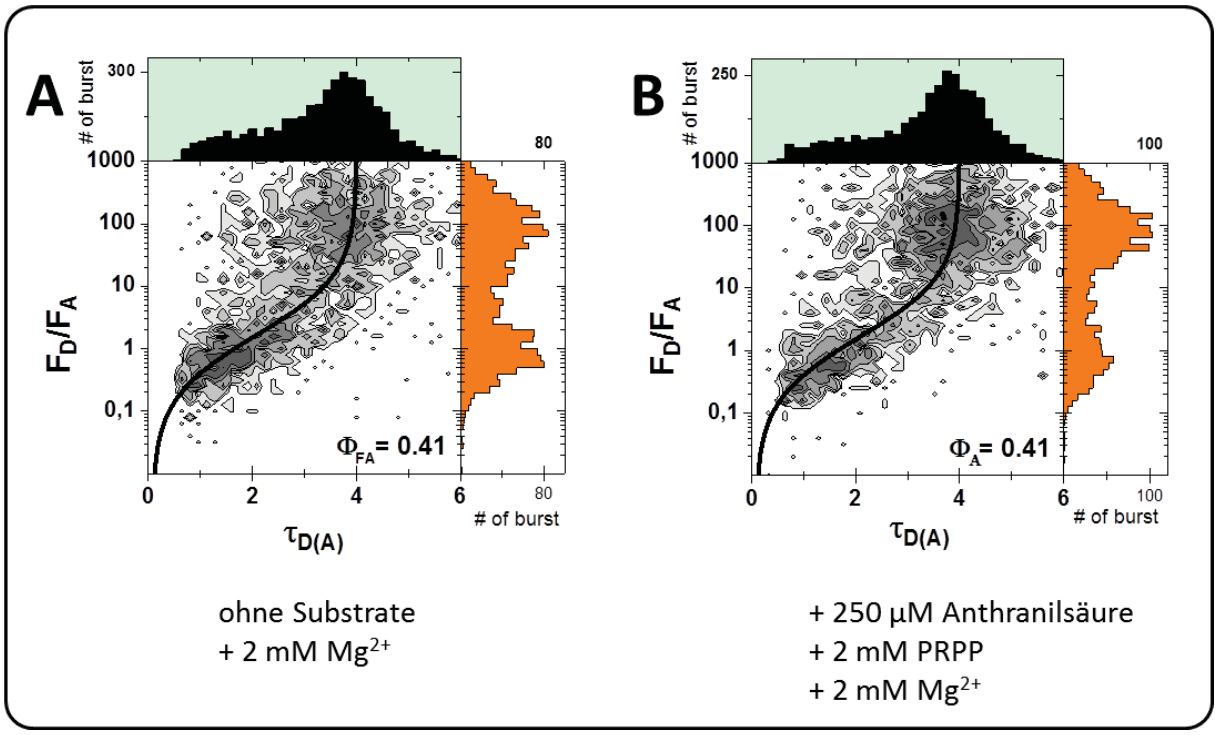


Abbildung 4-5: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von ssAnPRT(E5C, K280C)DA unter Einzelmolekülbedingungen. Das Fluoreszenzverhältnis F_D/F_A ist gegen die Fluoreszenzlebensdauer für die folgenden Pufferbedingungen (Puffer: 50 mM TRIS/HCl pH 7,5) aufgetragen: **(A)** ohne Substrate, **(B)** mit 250 µM Anthranilsäure und 2 mM PRPP. Beide Puffer enthielten 2 mM Magnesiumchlorid. Aufgrund des niedrigen Markierungsgrades mit den Fluoreszenzfarbstoffen *Alexa Fluor® 488 maleimid* (5%) und *Alexa Fluor® 594 maleimid* (10%) konnte nur eine unzureichende Statistik in den 2D-Histogrammen generiert werden, so dass strukturelle Änderungen der Proteinstruktur anhand dieser Histogramme nur schwer zu erkennen waren. Ein Indiz für den Konformationswechsel liefert die Zunahme der LF-Population nach Substratzugabe, da sich bestimmte Abstandskonfigurationen im AV-Modell nach Substratzugabe vergrößern. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. red
A	0,592	0,379	0,0200	0,750	1,000
B	0,763	0,489	0,0200	0,750	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	A_0	A_1	A_2	A_3
A	0,80	0,41	4,00	-0,0376	0,2794	0,4934	-0.0432
B	0,80	0,41	4,00	-0,0358	0,2726	0,4934	-0.0443

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.1.4.1 Einzelmolekül-FRET-Experimente und Photon Distribution Analysis von homodimerem ssAnPRT(N162C, K280C)

Eine Verbesserung des Fluoreszenzmarkierungsgrades konnte mit ssAnPRT(N162C, K280C) erzielt werden (A488: 30%, A647: 30%). Der Grund für die Wahl dieser Doppelcystein-Proteinvariante war die zu erwartende intramolekulare C_β-Abstandsänderung zwischen N162C und K280C (Tabelle 4-3 A).

Tabelle 4-3: Berechnung des C_β-Abstandes und der simulierten Abstandsänderung zwischen offener und geschlossender Konformation aus dem AV-Modell in ssAnPRT(N162C, K280C). Offene Konformation:PDB-ID 1O17, geschlossene Konformation (ein Protomer geschlossen, ein Protomer offen): PDB-ID 1ZYK. Die Angabe „mit Substrat" bezieht sich auf die Anwesenheit von Anthranilsäure, PRPP und Magnesiumchlorid.

A: Simulierte intramolekulare Abstandsänderung zwischen N162C und K280C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{C\beta\text{-}C\beta}$	45,5 Å	35,0 Å	10,5 Å
R_{mp}	52,4 Å	51,0 Å	1,4 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	54,0 Å	52,6 Å	1,4 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	53,3 Å	52,1 Å	1,2 Å

B: Simulierte intermolekulare Abstandsänderung zwischen N162C und K280C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{C\beta\text{-}C\beta}$	60,8 Å	56,2 Å	4,6 Å
R_{mp}	71,0 Å	53,1 Å	17,9 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	72,1 Å	54,4 Å	17,7 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	69,7 Å	53,6 Å	16,1 Å

C: Simulierte intermolekulare Abstandsänderung zwischen N162C und N162C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{C\beta\text{-}C\beta}$	16,2 Å	14,6 Å	1,6 Å
R_{mp}	17,2 Å	12,0 Å	5,2 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	21,5 Å	18,0 Å	3,5 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	27,3 Å	23,1 Å	4,2 Å

D: Simulierte intermolekulare Abstandsänderung zwischen K280C und K280C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{C\beta\text{-}C\beta}$	98,6 Å	87,6 Å	11,0 Å
R_{mp}	111,9 Å	98,0 Å	13,9 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	112,7 Å	99,0 Å	13,7 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	111,0 Å	97,0 Å	14,0 Å

Die Ergebnisse aus dem AV-Modell zeigen jedoch eine völlig andere Verteilung der Abstandsänderungen im Vergleich zu den C_β-Abständen. Im AV-Modell ist die intermolekulare Abstandsänderung zwischen N162C und K280C deutlich ausgeprägter, als die intramolekulare Abstandsänderung zwischen den beiden Aminosäuren. Wie schon bei ssAnPRT (E5C, K280C)DA zeigt dieses Resultat deutlich, wie wichtig die Einbeziehung der dynamischen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe bei der Betrachtung von FRET-Abständen ist und dass C_β-Abstände durch die Farbstofflinkerbeiträge bei fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen ein ungeeignetes Auswahlkriterium bei der Untersuchung von Abstandsänderungen ist.

In Abbildung 4-6 ist die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung unter Einzelmolekülbedingungen mit verschiedenen Substratverhältnissen gezeigt. In 2D-Histogrammen wurde das Fluoreszenzverhältnis F_D/F_A gegen die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ für verschiedene Substratbedingungen aufgetragen. Im Wesentlichen ist eine Verbreiterung der FRET-Signale entlang der statischen FRET-Linie bei der Zugabe von nur einem Substrat (mittleres 2D-Histogramm) erkennbar. Die Vergrößerung der MF- und LF-Population lässt auf die Entstehung einer komplizierteren FRET-Verteilung aufgrund von Strukturänderungen des Proteins schließen, deren Auslöser die Bindung von Substraten ist. Diese FRET-Populationen liegen außerhalb der statischen FRET-Linie und können nur mit durch dynamische Änderungen des FRET beschrieben werden. Diese Dynamik für die einzelnen Substratbedingungen können mit den gleichen Parametern beschrieben werden, so dass für diese fluoreszenzmarkierte Proteinvariante von Substrat-unabhängigen dynamischen Konformationsänderungen von ssAnPRT auszugehen ist. Um katalytisch inaktives Protein auszuschließen, wurde die enzymatische Aktivität von ssAnPRT(N162C, K280C)DA im nächsten Kapitel genauer untersucht.

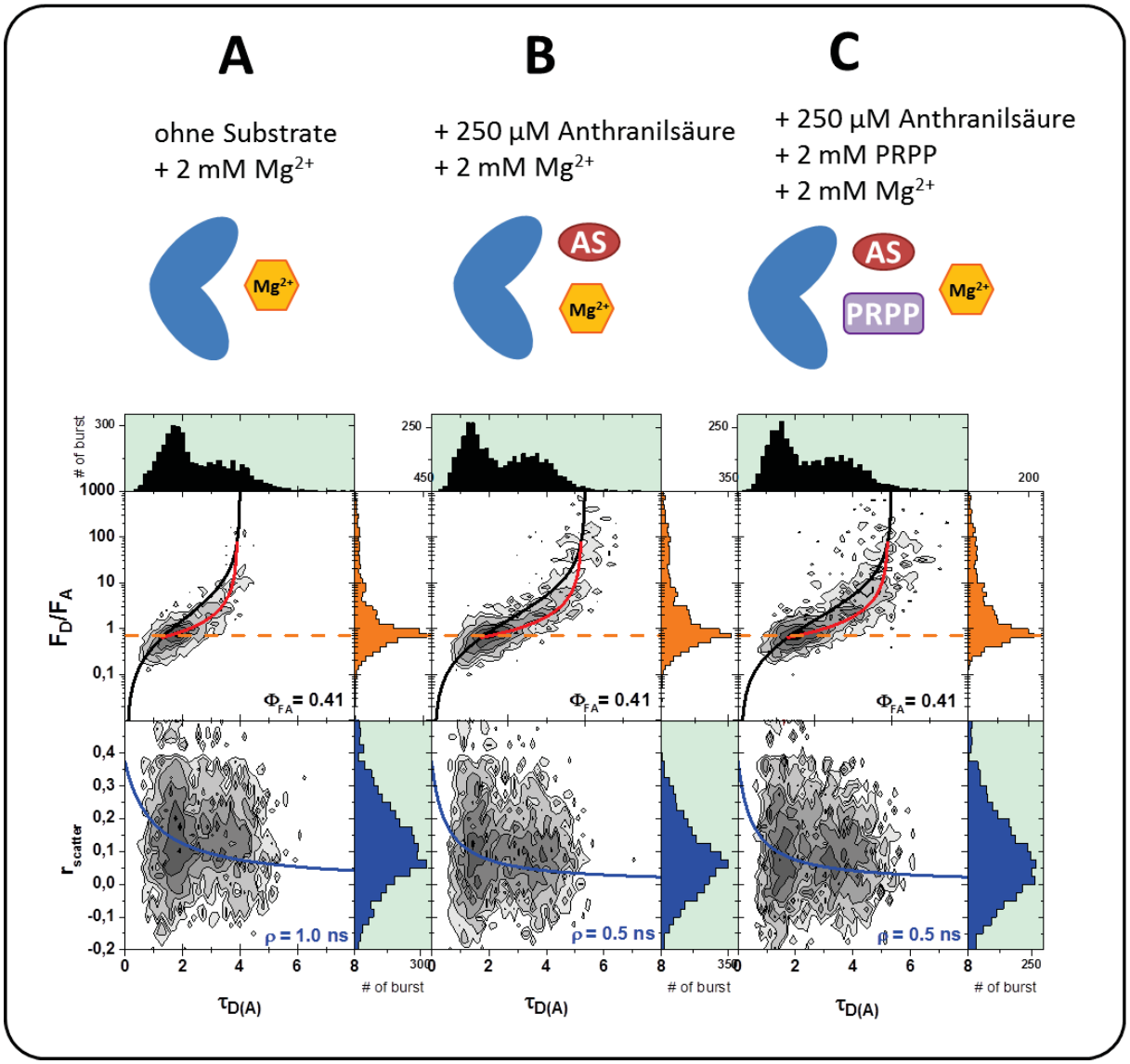


Abbildung 4-6: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von homodimerem ssAnPRT(N162C, K280C)-DA. In den ausgewählten 2D-Histogrammen **(A)** bis **(C)** ist der Einfluss der Substrate Anthranilsäure (AS) und 5-Phosphoribosyl-α1-Pyrophosphat (PRPP) (Puffer: 50 mM TRIS/HCl pH 7,5) auf das Fluoreszenzverhältnis, bzw. Anisotropie, gegen die Fluoreszenzlebensdauer dargestellt. Die schwarze Kurve stellt die statische, die rote Kurve die dynamische FRET-Linie dar. Die Kurve im Anisotropie-2D-Histogramm stellt die Perrin-Gleichung mit der dazugehörigen Rotationskorrelationszeit ρ dar. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.		
A	0,966	0,609	0,0200	0,750	1,000		
B	0,969	0,588	0,0200	0,750	1,000		
C	1,021	0,637	0,0200	0,750	1,000		
	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	A_0	A_1	A_2	A_3
A	0,80	0,41	4,00	-0,0376	0,2794	0,4934	-0.0432
B	0,80	0,41	4,00	-0,0376	0,2794	0,4934	-0.0432
C	0,80	0,41	4,00	-0,0376	0,2794	0,4934	-0.0432

Für die dynamischen FRET-Linien (Gleichung 3-26) wurden folgende Paramenter verwendet:

Abbildung	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,41	4,00	1,30	3,90	0,0000	0,0000	1,4666	-1,8202
B	0,41	4,00	1,30	3,90	0,0000	0,0000	1,4666	-1,8202
C	0,41	4,00	1,30	3,90	0,0000	0,0000	1,4666	-1,8202

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

Für eine genauere Quantifizierung der Signaländerung wurde eine *Photon Distribution Analysis* (PDA) durchgeführt, die vier unterschiedliche FRET-Populationen, sowie der Anteil von nur Donor-markiertem Protein, identifizieren konnte (Abbildung 4-7). Unter Berücksichtigung des Försterradius von 52 Å konnte die aus der Fluoreszenzverteilung resultierenden Abstände zwischen Donor und Akzeptor im Bereich von etwa 27 bis 70 Å ermittelt werden. Dieses Ergebnis korrespondiert weitgehend mit den berechneten Abständen aus dem AV-Modell. Der Vergleich unter den verschiedenen Substratbedingungen zeigte nur geringfügige Änderungen in der Verteilung. Erkennbar ist jedoch ein leichter Anstieg des Donor-only-Anteils (dunkelgrün) nach Substratzugabe, wie er bereits in den 2D-Histogrammen in Abbildung 4-6 erkennbar ist. Wird der Hauptpopulation (orange) dem intramolekularen FRET-Abstand zwischen N162C und K280C zugeordnet, so ist erkennbar, dass die Zugabe von Substraten in keiner signifikanten Verschiebung der Population resultiert, wie es bereits durch das AV-Modell vorhergesagt wurde. Die anderen FRET-Populationen sind zu wenig prominent, um daraus Aussagen zur Konformationsänderung während der Katalyse treffen zu können. Die deutlich hervorgehobene intramolekulare FRET-Population deutet auf das fast ausschließliche Vorhandensein des Enzyms in seiner monomeren Form hin. Durch Vergleich der PDA zwischen verschiedenen Zeitfenstern konnte die Dynamik zwischen den verschiedenen FRET-Zuständen stärker lokalisiert werden (Abbildung 4-8). Dieser Vergleich zwischen dem durch Modellbeschreibung analysierten 0,5 ms-Histogramm (schwarz) und dem mit diesem Modell angewendeten 3,0 ms-Histogramm (rot) zeigt im Bereich von S_g/S_r = 10 und 100 deutliche Änderungen in der Verteilung, wie an den Residuen χ_r^2 zu erkennen ist. Diese Änderungen in der S_g/S_r-Verteilung korrespondiert in etwa mit den dynamischen FRET-Linien in den 2D-Histogrammen (Abbildung 4-6). Die Anwendung von dynamischen PDA war nicht möglich, da für komplizierte FRET-Verteilungsmuster bisher kein hinreichendes Modell existiert. Daher

konnten die Proteindynamik von ssAnPRT(N162C, K280C)DA nicht weiter quantifiziert werden.

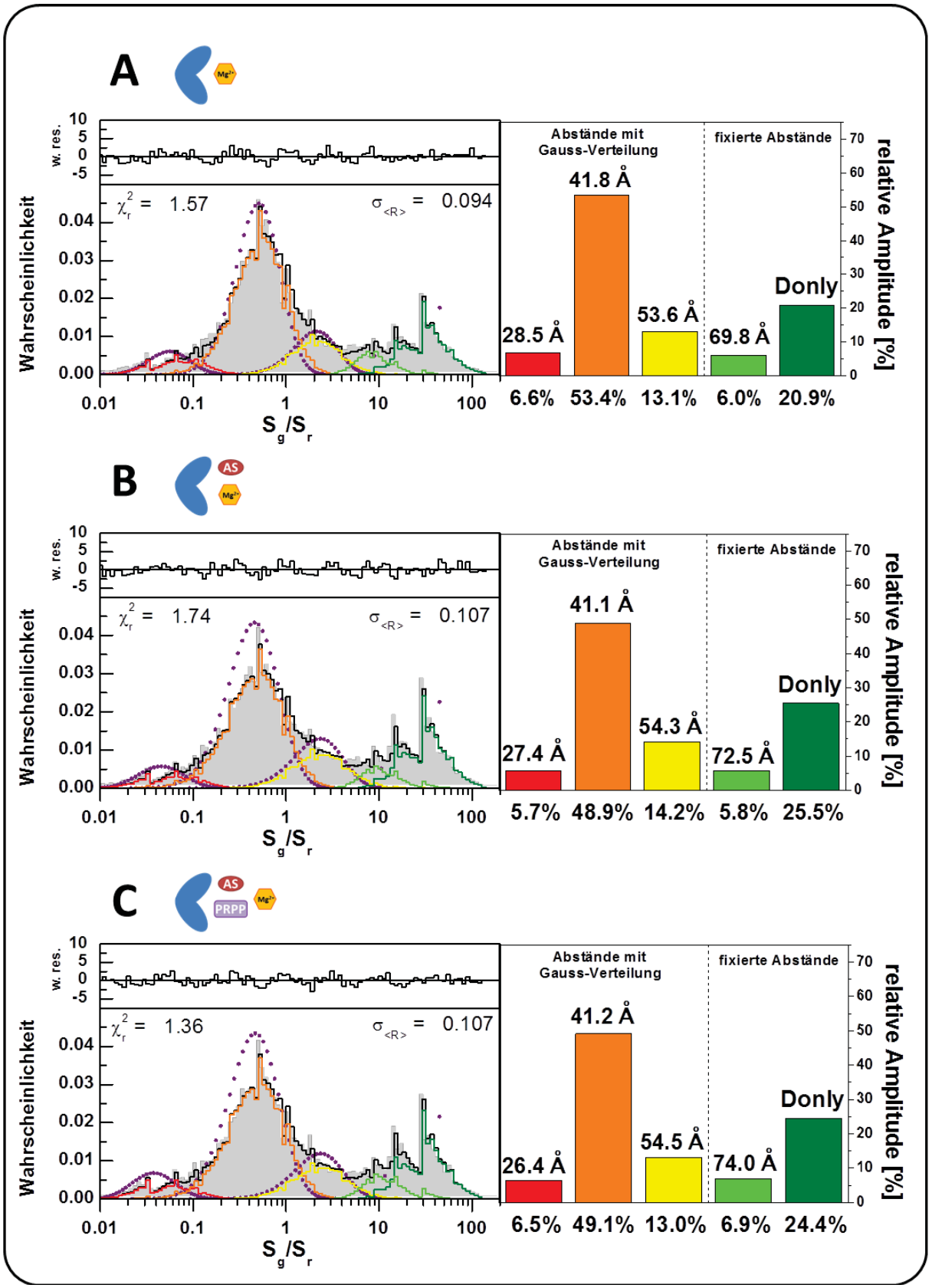


Abbildung 4-7: PDA der smFRET-Untersuchung von ssAnPRT(N162C, K280C)DA. Substratbedingungen: **(A)** 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 + 1 mM ssAnPRT(wt) + 2 mM $MgCl_2$, **(B)** wie (A) + 250µM AS, **(C)** wie (B) + 2 mM. Das linke Histogramm (TW = 1ms) enthält die experimentelle S_g/S_r-Verteilung (graue Fläche), das angewendete Modell (violette Punkte), das daraus simulierte Histogramm (schwarze Linie) und die dazugehörigen Histogramme der FRET-Populationen (VHF → rot, HF → orange, MF → gelb, LF → hellgrün, D-only → grün). Das rechte Diagramm zeigt die ermittelten FRET-Abstände und die dazugehörigen Amplituden. Parameter der PDA: siehe Tabelle 4-4.

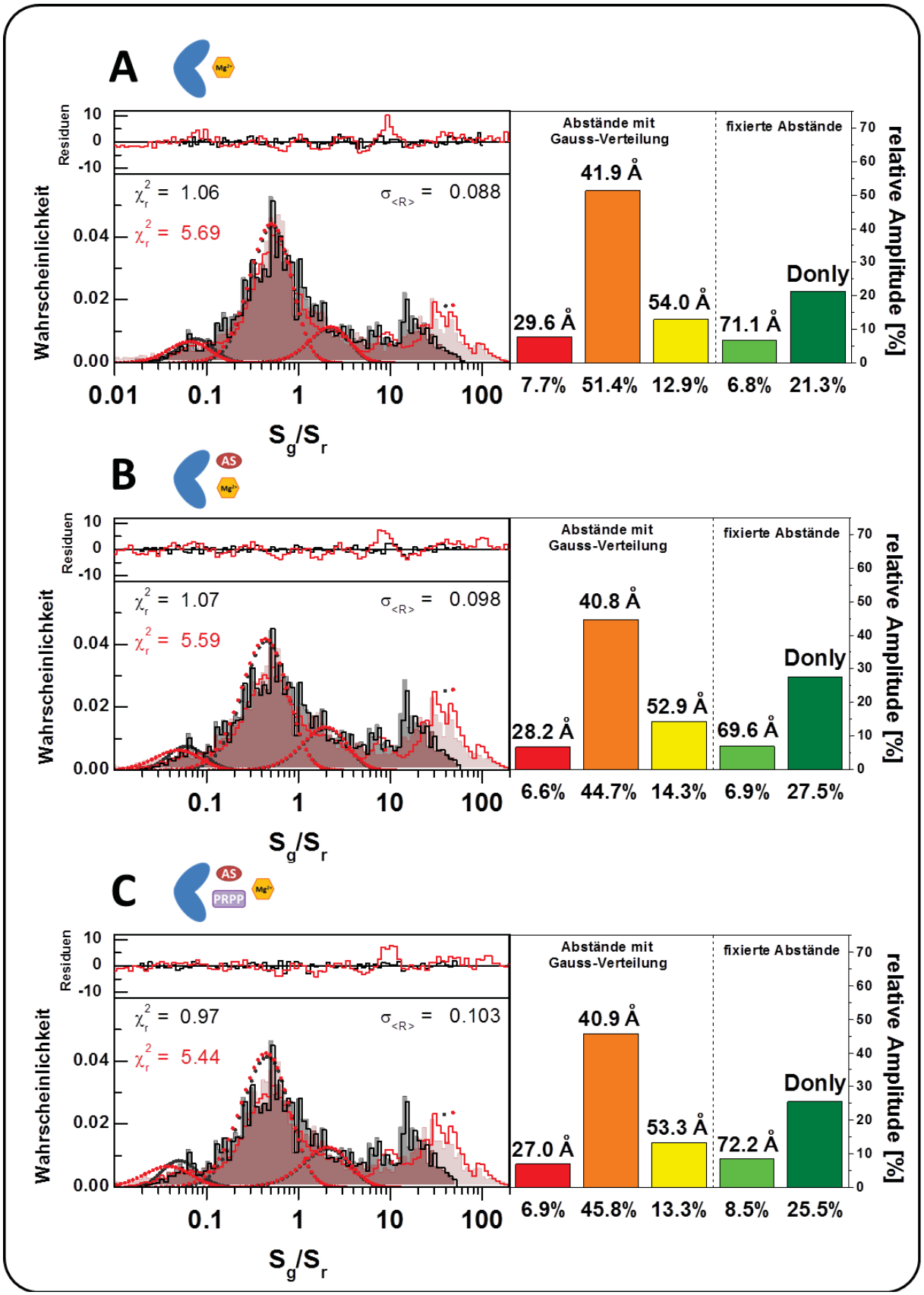


Abbildung 4-8: PDA von unterschiedlichen Zeitfenstern der smFRET-Untersuchung von ssAnPRT(N162C, K280C)DA. Die Analyse wurde für die gleichen Pufferbedingungen, wie in Abbildung 4-7 durchgeführt. Linkes Diagramm: Verglichen wurden das durch Modellbeschreibung analysierte 0,5 ms-Zeitfenster (schwarz) mit der S_g/S_r-Verteilung des 3,0 ms-Zeitfensters (rot). Rechtes Diagramm: Die ermittelten Abstände und die dazugehörigen Amplituden des 0,5 ms-Zeitfensters. Die Parameter der PDA sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-4 Parameter für die Photon Distribution Analysis (PDA) der Analysen aus Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8.

Modell: *"Model of everything"* [P(F)]				
B_{green} [kHz]	**B_{red} [kHz]**	**Crosstalk**	**det.eff. gr. ch.**	**det.eff. r. ch.**
0,966 (A) 0,969 (B) 1,021 (C)	0,609 (A) 0,588 (B) 0,637 (C)	0,02	0,750	1,000
Start	**Ende**	**Bins**	**I_1**	**I_2**
0,01	200	101	0,0308	0,0368
Φ_{FD}	**Φ_{FA}**	**R_0**	**2 molecules P**	**N_{min}**
0,80	0,41	52,0	0	15 (TW = 0,5 ms)
# of Gaussians	**bins per Gaussian**	**# of single ratios**	**# of dynamic states**	30 (TW = 1,0 ms)
3	51	2	0	90 (TW = 3,0 ms)

4.1.5 Kinetische und chromatographische Charakterisierung von ssAnPRT(N162C, K280C)DA

Die qualitative Überprüfung der enzymatischen Aktivität ssAnPRT(N162C, K280C)DA erfolgte durch die zeitliche fluoreszenzspektroskopische Verfolgung der Konzentrationsabnahme der Anthranilsäure während der Katalyse. Wie bereits schon in Kapitel 1.1 erwähnt, katalysiert die Anthranilat-Phosphoribosyltransfersase in Anwesenheit von Magnesiumionen die 5-Phosphoribosyl-α1-Pyrophosphat (PRPP) und Anthranilsäure zu N-(5'-Phosphoribosyl)-anthranilat (Abbildung 4-9 A). Da die Anthranilsäure durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 310 nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann (Abbildung 4-9 B), sind Veränderungen in der Konzentration spektroskopisch quantitativ nachweisbar (Abbildung 4-9 C). Die Substrate (0,85 µM Anthranilsäure, 2 mM PRPP) wurden in 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4-Puffer (pH 7,5) vorgelegt und die enzymatische Reaktion mit Zugabe von 2,0 nM ssAnPRT gestartet. Um ein schnelles Ausbleichen der Anthranilsäure zu verhindern, wurden Punktmessungen (Integrationszeit: 1 s) alle zehn Sekunden bei Schließung des Spektrometerverschlusses zwischen den Messungen vorgenommen. Die Aktivitätsmessung erfolgte bei 37°C.

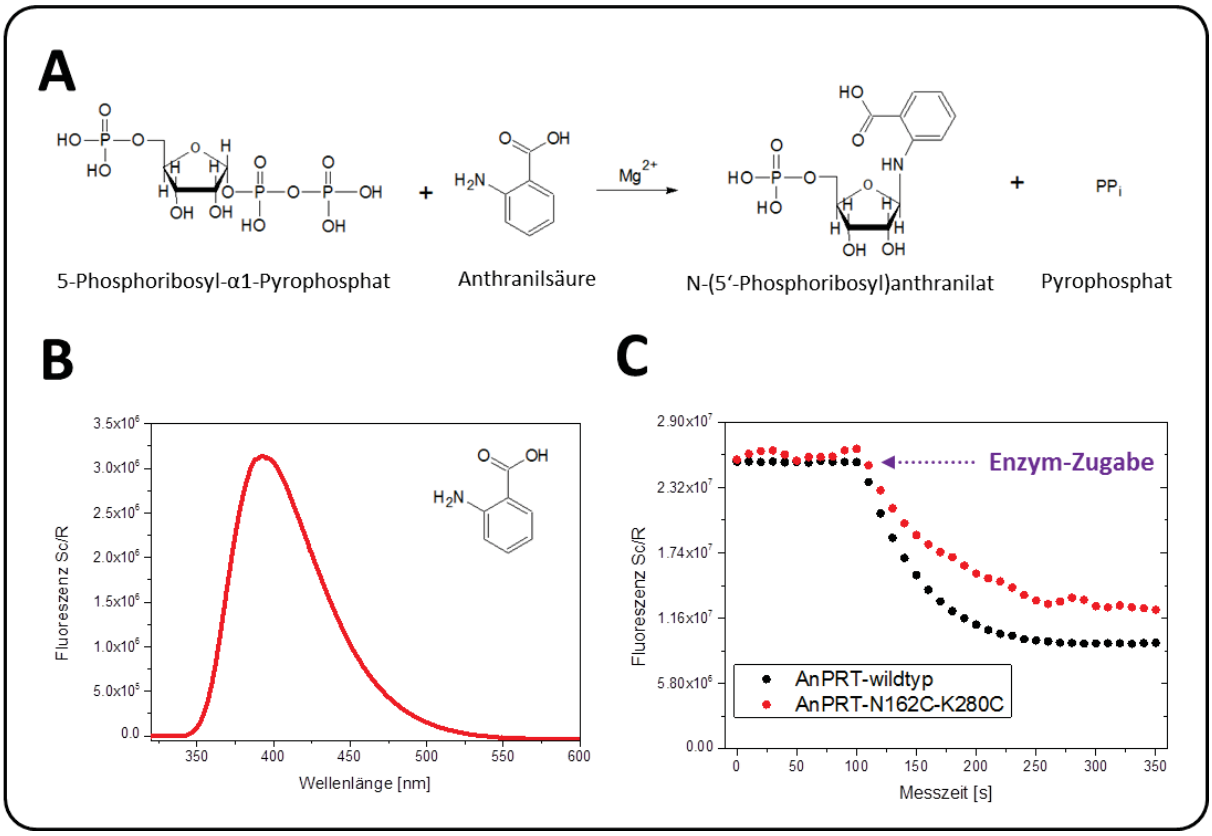


Abbildung 4-9: Messung der enzymatischen Aktivität von ssAnPRT. (A) Enzymatische Katalyse von Anthranilat-Phosphoribosyltransfersase 5-Phosphoribosyl-α1-Pyrophosphat und Anthranilsäure zu N-(5'-Phosphoribosyl)anthranilat und Pyrophosphat in Anwesenheit von Magnesiumionen. **(B)** Fluoreszenzemissionsspektrum der Anthranilsäure (Anregung: 310 nm). **(C)** Fluoreszenzspektroskopische Verfolgung der Abnahme der Anthranilsäurekonzentration (Anregung: 310 nm; Emission: 400 nm) während der Katalyse von ssAnPRT-N162C-K280C im Vergleich zu ssAnPRT-Wildtyp. Die Katalyse wird durch Zugabe des Enzyms gestartet und erfolgte bei 37 °C.

SsAnPRT(N162C, K280C)DA zeigte eine qualitativ vergleichbare enzymatische Aktivität, wie der Wildtyp (Abbildung 4-9 C). Das Fluoreszenzsignal der Anthranilsäure ist bei ssAnPRT(N162C, K280C)DA jedoch verrauschter. Eine Steigerung des Markierungsgrades auf nahezu 100% war erforderlich, um die Katalyseaktivität von markiertem und unmarkiertem Protein zu unterscheiden. Daher wurde zunächst versucht, unter verschiedenen Protein- und Farbstoffkonzentrationen, sowie durch Änderung der Pufferbedingungen, den Markierungsgrad zu erhöhen. Ebenfalls wurde versucht, die Konzentration an markierten Enzymen chromatographisch zu steigern. Eine Optimierung des Fluoreszenzgrades konnte jedoch nicht realisiert werden. Auch der Einsatz von Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP), ein Reduktionsmittel ohne Thiolgruppen, konnte ebenfalls nicht die Fluoreszenz-Markierungseffizienz verbessern. Aus diesem Grund wurde ssAnPRT(N162C, K280C) mit Hilfe von FPLC und HPLC weiter charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

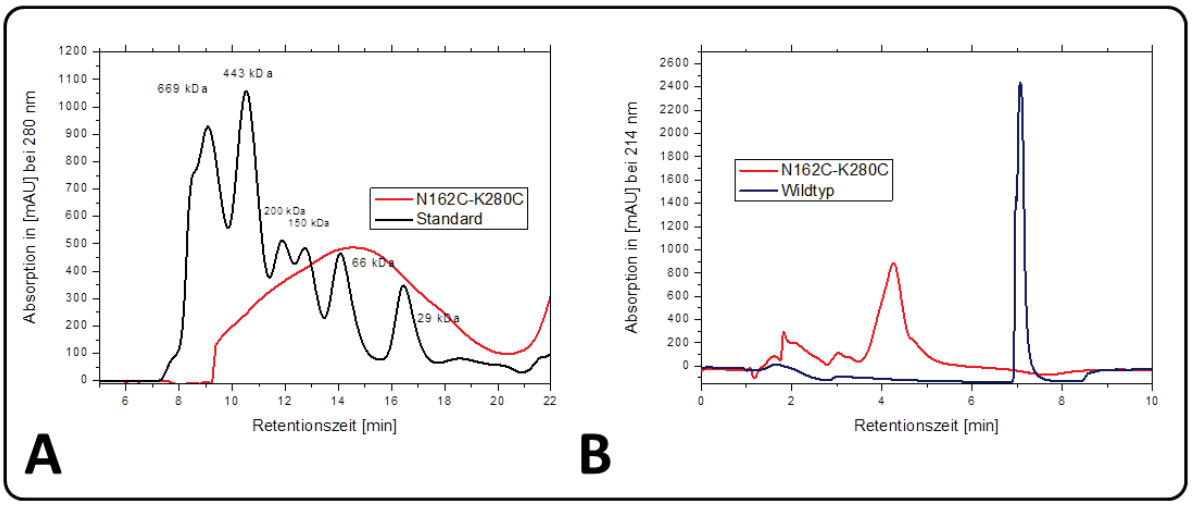


Abbildung 4-10: Chromatographische Analyse von unmarkiertem ssAnPRT(N162C, K280C). (A) Analytische Gelfiltration (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE Healthcare) in 100mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5). Die Breite Verteilung des Proteinsignals deutete auf Aggregation hin. **(B)** HPLC-Chromatogramm der gleichen Proteinvariante im Vergleich zum wildtypischen Enzym mit einer Anionenaustauschersäule (POROS® HQ20, Applied Biosystems, Forster City, USA), Puffer: 50 mM TRIS/HCl pH 7,5; 50 µM $MgCl_2$; Salzgradient von 0 bis 1 M NaCl). Die unterschiedlichen Retentionszeiten beider ssAnPRT-Varianten sind eindeutig zu erkennen. Aus beiden Chromatogrammen ist anzunehmen, dass ssAnPRT(N162C, K280C) nicht in der gleichen strukturellen Konformation vorliegt, als der Wildtyp und daher nicht die erwartete Änderung des Fluoreszenzsignales zeigte.

Wie aus der analytischen Gelfiltration (Abbildung 4-10 A) zu entnehmen ist, neigt ssAnPRT(N162C, K280C) zur Oligomerisierung, sobald reduzierende Mittel wie DTT oder β-Mercaptoethanol aus der Proteinlösung entfernt werden, und ist somit wahrscheinlich die Ursache für den geringen Fluoreszenz-Markierungsgrad. Die Analyse mit einer Anionenaustauschersäule (Abbildung 4-10 B) zeigte ebenfalls das Vorliegen inhomogenen Proteinlösung im Vergleich zum Wildtyp, deren Ursache ebenfalls die Oligomerisierung, als auch Veränderungen in der Struktur des Enzyms sein können. Aufgrund der hier aufgezeigten Heterogenitäten von ssAnPRT(N162C, K280C) sind die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen kritisch zu betrachten.

4.1.6 Erstellung neuer Varianten der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

Aufgrund der zuvor beschriebenen mangelnden Charakterisierbarkeit von ssAnPRT(E5C, K280C) und ssAnPRT(N162C, K280C) mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden wurde ein neuer Satz von Mutanten generiert. Dabei wurden in erster Linie Serin- und Glycin-Aminosäurereste aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu Cystein ausgetauscht. Dieser Austausch der Aminosäuren wurde ebenfalls bevorzugt in unstrukturierten Bereichen der Proteinstruktur und so weit wie möglich entfernt vom aktiven Zentrum, bzw. des Bereichs

der Protomerverknüpfung, vorgenommen. Die neu generierten ssAnPRT-Varianten wurden mit der in Kapitel 3.1.4.1 vorgestellten Methode generiert und sind in Tabelle 4-5 aufgelistet. Gen- und Proteinsequenzen, sowie die Position der ausgetauschten Aminosäure im Röntgenstrukturmmodell, sind im Anhang (Kapitel 8.1.2) dargestellt.

Tabelle 4-5: Neu generierte Cystein-Varianten der Anthranilat-Phosphoribosytransferase.

Einzel-Cystein-Variante	Doppel-Cystein-Variante
S14C	S14C+S254C
S254C	S14C+I36E+M47D+S254C (Monomer)
D15C	D15C+S254C
E17C	E17C+S254C
G31C	G31C+S254C
S39C	S39C+I36E+M47D+S254C (Monomer)
G49C	G49C+S254C
S51C	S51C+S254C
G168C	G168C+K280C

Das ssTrpD-Gen, welches für ssAnPRT codiert, wurde in den Vektor pQE40 der Firma *Qiagen* eingebracht und in *E. coli* KK8 überexprimiert (Kapitel 3.1.3.1). Mittels SDS-PAGE wurde die Überexpression bestätigt. Die Ergebnisse für die Doppelcystein-Varianten sind in Abbildung 4-11 dargestellt.

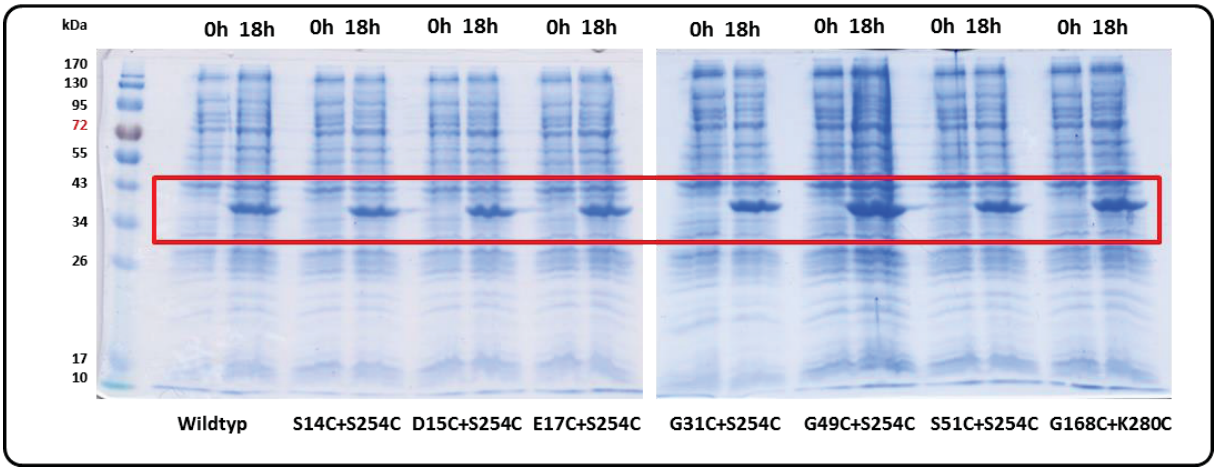


Abbildung 4-11: Expressionskontrolle einiger neuen ssAnPRT-Varianten mittels SDS-PAGE nach 18 Stunden Inkubation. Die optische Dichte wurde bei 600 nm auf 0,5 eingestellt. Relativ zu wildtypischem ssAnPRT zeigen die Doppel-Cystein-Varianten vergleichbare Überexpressionen.

Das aufgereinigte Protein wurde nach der in Kapitel 3.1.3.2 beschriebenen Methode erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass der überwiegende Teil des produzierten Proteins nach dem Zellaufschluss unlöslich war und zusammen mit den Zelltrümmern im

Zentrifugationsschritt sedimentiert wurde. Zunächst wurde angenommen, dass der Hitzeschritt als eine der Reinigungsstufen die Ursache dafür war. Daher wurden die Doppelcystein-Varianten auf Ihre Hitzebeständigkeit untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-12 gezeigt.

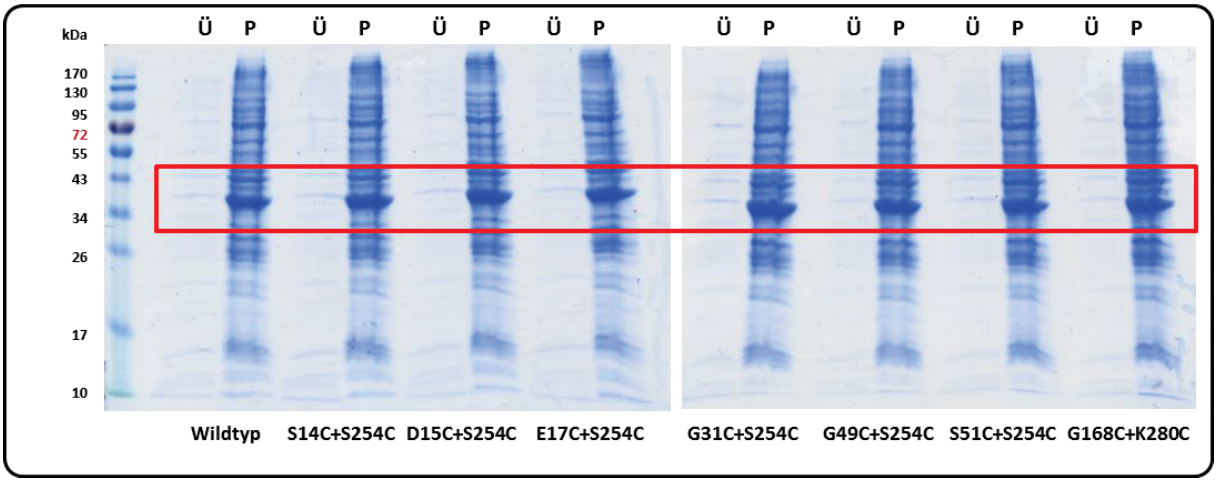


Abbildung 4-12: Untersuchung der Hitzebeständigkeit der ssAnPRT-Doppelcystein-Varianten. Die unaufgeschlossenen *E. coli* KK8-Zellen mit den jeweiligen überexprimierten Proteinvarianten wurden auf 70°C für 10 Minuten erhitzt. Nach Zentrifugation (30000xg, 30 Minuten) wurde mittels SDS-PAGE der Verbleib des Proteins im Überstand (Ü), sowie im Pellet (P) untersucht. Es zeigte sich, dass keine der Varianten, ebenso der Wildtyp, den Hitzeschock überstanden haben.

Wie die Ergebnisse der SDS-PAGE in Abbildung 4-12 gezeigt haben, überstand keine der neuen ssAnPRT-Varianten den Hitzeschritt. Die mangelnde Thermostabilität des Wildtyps war hingegen unerwartet. Infolge dieses Ergebnisses wurde versucht eine erfolgreiche Aufreinigung der ssAnPRT-Varianten ohne Hitzeschritt zu ermöglichen. Jedoch verblieb auch hier der Hauptteil des Proteins in den sedimentierten Zelltrümmern (Abbildung 4-13, beispielhaft für die ssAnPRT-Variante S14C+S254C). Das Vorliegen dieser Proteinaggregate (Einschlusskörperchen, engl. *inclusion bodies*) führte zu dem Versuch, ssAnPRT unter denaturierenden Bedingungen aufzureinigen. Nach erfolgter Entfaltung des Enzyms durch 8 M Harnstoff, bzw. 6 M Guanidinhydrochlorid, war eine Rückkehr in den nativen Zustand durch Entfernung des Denaturierungsmittels nicht möglich, da hierdurch ssAnPRT präzipitierte.

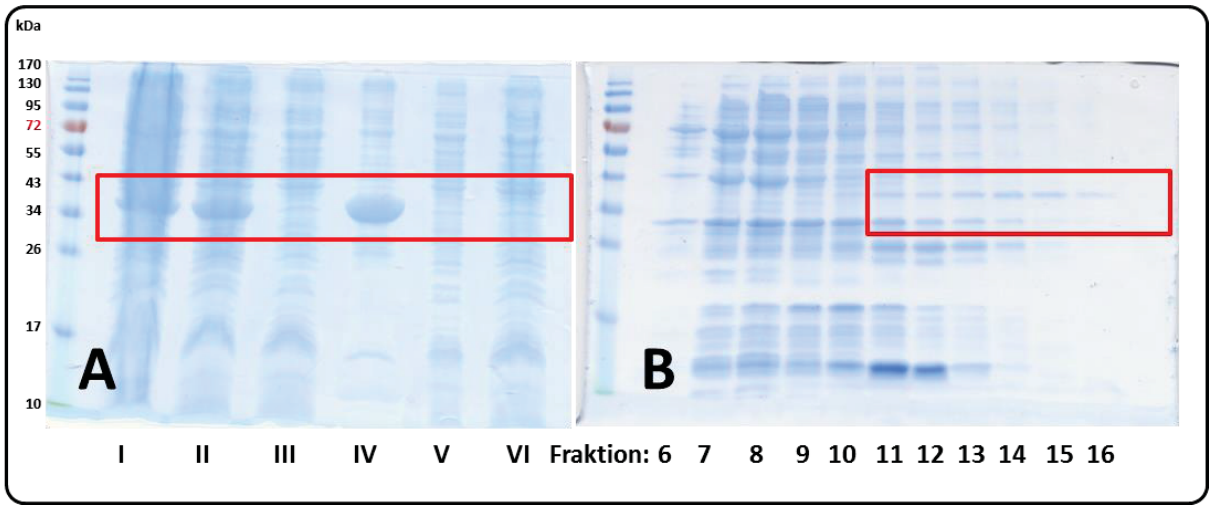


Abbildung 4-13: Aufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C) ohne Hitzeschritt. (A) SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsstufen: (I) unbehandelte *E. coli* KK8-Zellen mit überexprimiertem ssAnPRT, (II) Probe nach Zellaufschluss, (III) Überstand nach Zentrifugation, (IV) sedimentierte Zelltrümmer, (V) Überstand nach Filtration mit Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm), (VI) Durchfluss nach beladen der IMAC-Säule. Deutlich ist der Verbleib des Proteins im Zentrifugationspellet zu erkennen. **(B)** SDS-PAGE der IMAC-Aufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C). Nach der Fraktionierung konnte nur ungefähr 20 µg des Enzyms aus den Fraktionen 11 bis 16 sauber isoliert werden.

4.1.6.1 Untersuchung des Expressionsvektors pQE40

Untersuchungen am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sterner zeigten, dass der pQE40-Vektor zu einer Deletion der Plasmid-Sequenz nahe der Ribosomen-Bindestelle neigte, wenn dieser in *E. coli*-Stämmen wie *DH5α* reproduziert wurde (Burkhardt; 2010). Dieses Phänomen wurde bereits in Kawe et al. (2009) beschrieben und tritt bei *high-level* Translationen auf (Kawe*, et al.*; 2009). Der Mechanismus der Deletion ist noch unbekannt, allerdings wurden hohe Konzentration an *E. coli* Dps (*DNA-binding protein from starved cells*, engl.) bei den überexprimierten Testproteinen gefunden, wobei bekannt ist, dass Dps zum Protektorsystem der prokaryotischen DNA gegen oxidative Einflüsse gehört. Die Deletion kann durch gleichzeitige Überexpression des LacI-Proteins verhindert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten pQE40-ssTrpD-Vektoren zeigten ebenfalls das Fehlen von 32 Basenpaaren an der Promotor-Sequenz (Abbildung 4-14). Daher wurde das ssTrpD-Gen in einen fehlerfreien pQE40-Vektor umkloniert und zur Plasmidreplikation in einen neuen Replikationsstamm (*E. coli* turbo, New England Biolabs Inc.) transformiert.

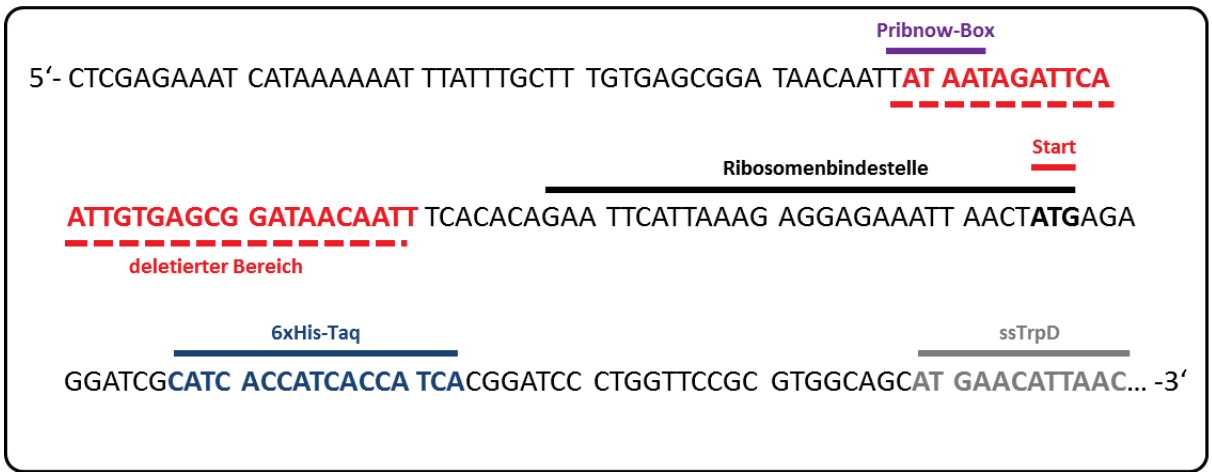


Abbildung 4-14: Fehlerhafte Promotorsequenz im Expressionsvektor pQE40. Der deletierte Bereich ist in roter Schrift dargestellt. Durch das Fehlen von 32 DNA-Basenpaaren im Vergleich zu einem fehlerfreien pQE40-Vektor zu erkennen, wodurch die Funktionsfähigkeit des Plasmids als Expressionsvektor nicht mehr vorhanden war.

4.1.6.2 Produktion der ssAnPRT-Varianten nach Umklonierung

Nach erfolgreicher Umklonierung der ssAnPRT-Varianten konnte die Expressionsrate und damit die Proteinausbeute deutlich gesteigert werden. Dabei konzentrierten sich die Proteinproduktionen auf den Satz an Varianten, die in ausreichender Konzentration für die Fluoreszenzmarkierung hergestellt werden konnten. Die Proteinausbeuten nach vollständiger Aufreinigung wurden mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie bei 280 nm bestimmt und sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Abbildung 4-15 A zeigt qualitativ den Verlauf der Produktion von ssAnPRT(S14C, S254C) im Vergleich zu wildtypischen ssAnPRT. Vergleichbare Produktionsraten konnten ebenfalls für ssAnPRT(S254C) und dem monomeren ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) erzielt werden. Abbildung 4-15 B zeigt die spektroskopische Verfolgung der IMAC-Aufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C), die Kontrolle der Reinheit des Proteins mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 4-15 C dargestellt.

Tabelle 4-6 Proteinausbeute verschiedener ssAnPRT-Varianten nach vollständiger Aufreinigung.

Variante	ungefähre Ausbeute in µg
ssAnPRT(Wildtyp)	4200
ssAnPRT(S14C, S254C)	2000
ssAnPRT(S254C)	1800
ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C)	500

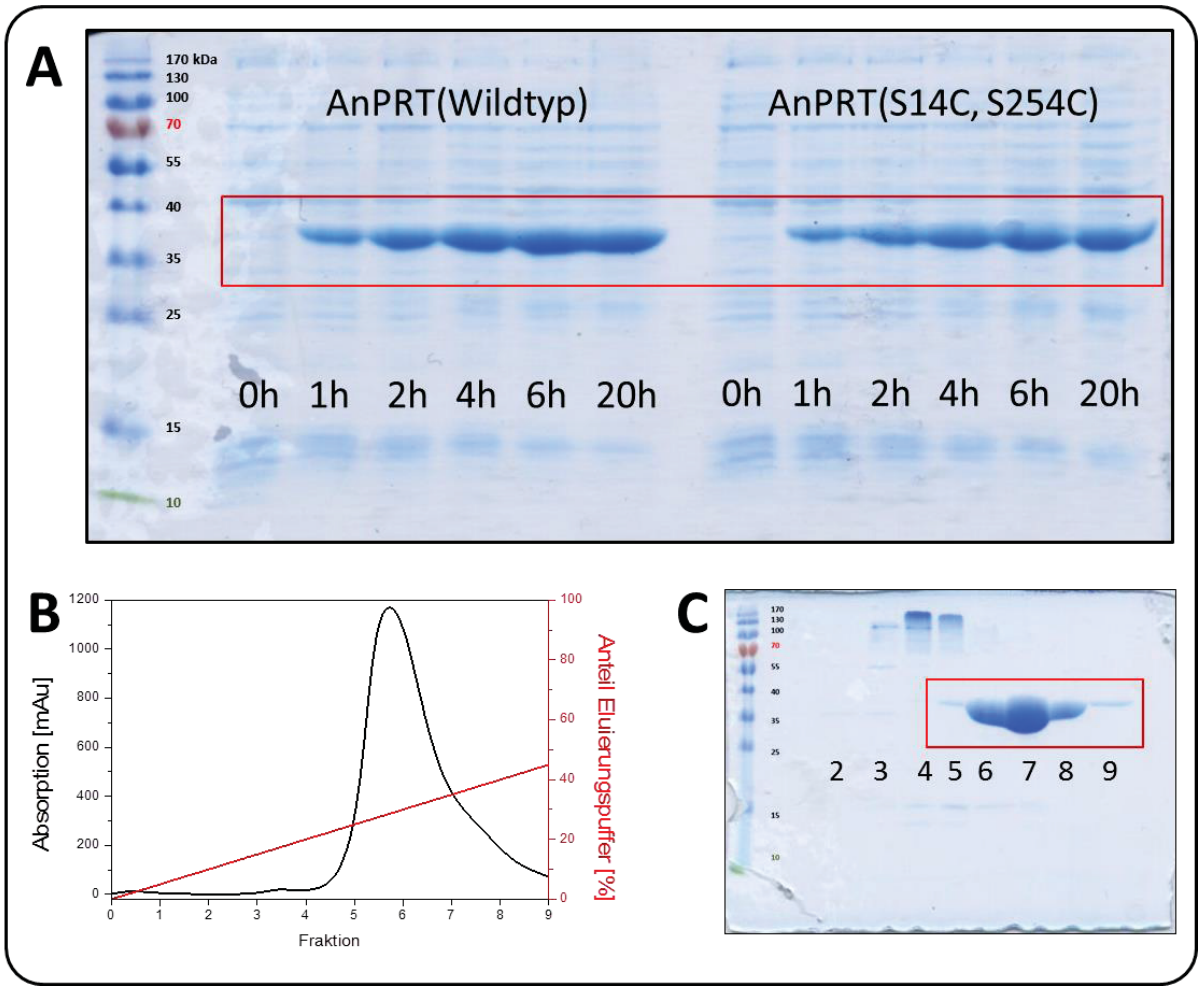


Abbildung 4-15: Expression und Aufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C). (A) SDS-PAGE der homogenisierten *E. coli* KK8 Zellen vor (0h) und nach der Induzierung mit IPTG von den Varianten ssAnPRT(Wildtyp) und ssAnPRT(S14C, S254C), sowie dem dazugehörigen Größenstandard (links außen). Die Vergrößerung der Bande zwischen 35 und 40 kDa deutet auf eine erfolgreiche Produktion von ssAnPRT hin. Qualitativ erkennbar sind die vergleichbaren Expressionsraten zwischen Wildtyp und Variante. **(B)** Spektroskopische Verfolgung der fraktionierten Proteinaufreinigung von ssAnPRT(S14C, S254C). **(C)** SDS-PAGE der aus (B) gewonnenen Fraktionen. Die Fraktionen 6 bis 8 enthielten die größte Proteinkonzentration. Gleichzeitig ist erkennbar, dass die ssAnPRT-Varianten sehr rein eluiert werden konnten.

4.1.7 Untersuchung der Konformationsdynamik von ssAnPRT-S14C-S254C während der Katalyse

4.1.7.1 Untersuchung mittels FPS

Der Raum („accessible volume“, deu. zugängliches Volumen), den der gekoppelte Farbstoff einnehmen kann, wurde mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur des Biomoleküls und der Strukturdaten des Farbstoffes simuliert (Kalinin*, et al.*; 2012). Die Methode ist in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Im Fall von ssAnPRT wurden die zugänglichen Volumina an den Aminosäuren-Positionen 14 und 254 mit Alexa 488 (C_5-Linker) und Alexa 647 (C_2-Linker) ermittelt. Da vier Kopplungsstellen für das Dimer (zwei je Monomer Untereinheit) vorhanden waren, wurde die Simulation für vier verschiedene Farbstoffkombinationen durchgeführt (Abbildung 4-16).

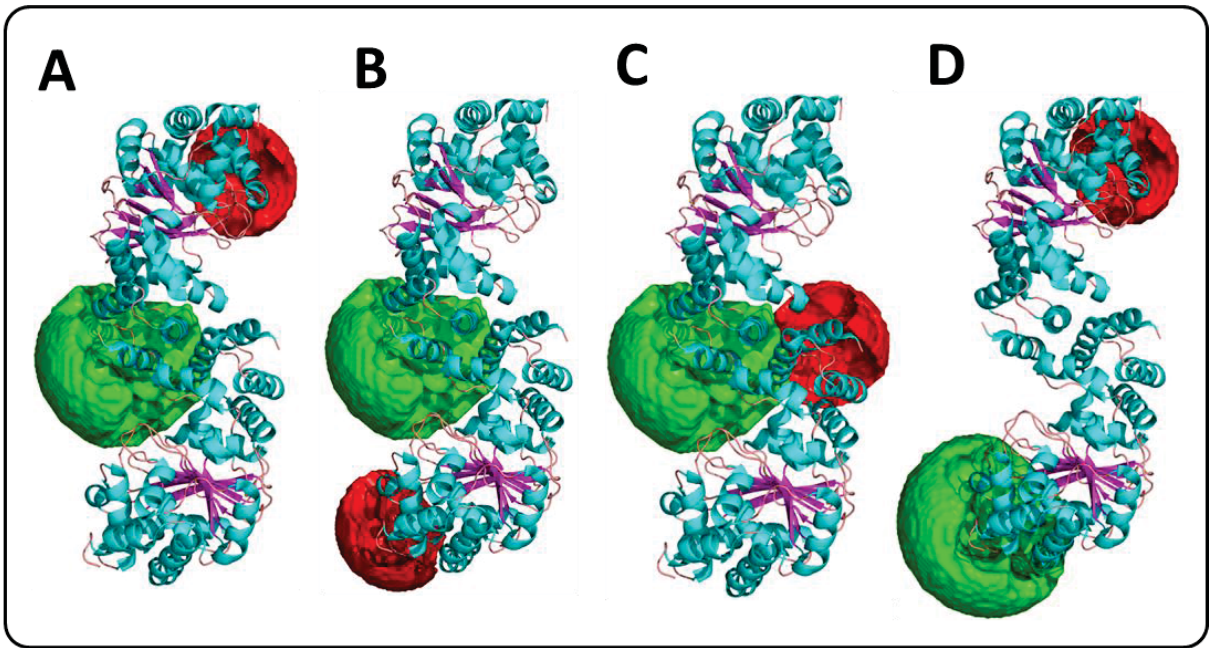


Abbildung 4-16: Simulation des zugänglichen Volumens von Fluoreszenzfarbstoffen an ssAnPRT-S14C-S254C. Dargestellt ist die Berechnung des zugänglichen Volumens für Alexa 488 (C_5-Linker, grün) und Alexa 647 (C_2-Linker, rot). Aufgrund des längeren Linkers, ist der Raum, den Alexa 488 einnehmen kann, größer als für Alexa 647. Folgende Kopplungskombinationen wurden dabei berücksichtigt (PDB ID: 1O17):
A: Intramolekulare Fluoreszenzmarkierung an den Aminosäuren S14C und S254C.
B: Intermolekulare Fluoreszenzmarkierung an den Aminosäuren S14C und S254C.
C: Intermolekulare Fluoreszenzmarkierung an den äquivalenten Aminosäuren S14C.
D: Intermolekulare Fluoreszenzmarkierung an den äquivalenten Aminosäuren S254C.

Wie Marino et al. (Marino, *et al.*; 2006) annimmt, vollzieht ssAnPRT eine Konformationsänderung bei Zugabe von Anthranilsäure und 5-Phosphoribosyl-α1-Pyrophosphat in Anwesenheit von Magnesium. Diese These wurde mit Hilfe von *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS) untermauert. Die daraus erhaltenen Strukturdaten wurden in die Simulation miteinbezogen, um die zu erwartenden Konformationsänderungen während der Katalyse zu berechnen. Eine solche Simulation ist beispielhaft für die intermolekulare Fluoreszenzmarkierung an den beiden Aminosäuren S254C von Protomer 1 und 2 dargestellt (Abbildung 4-17).

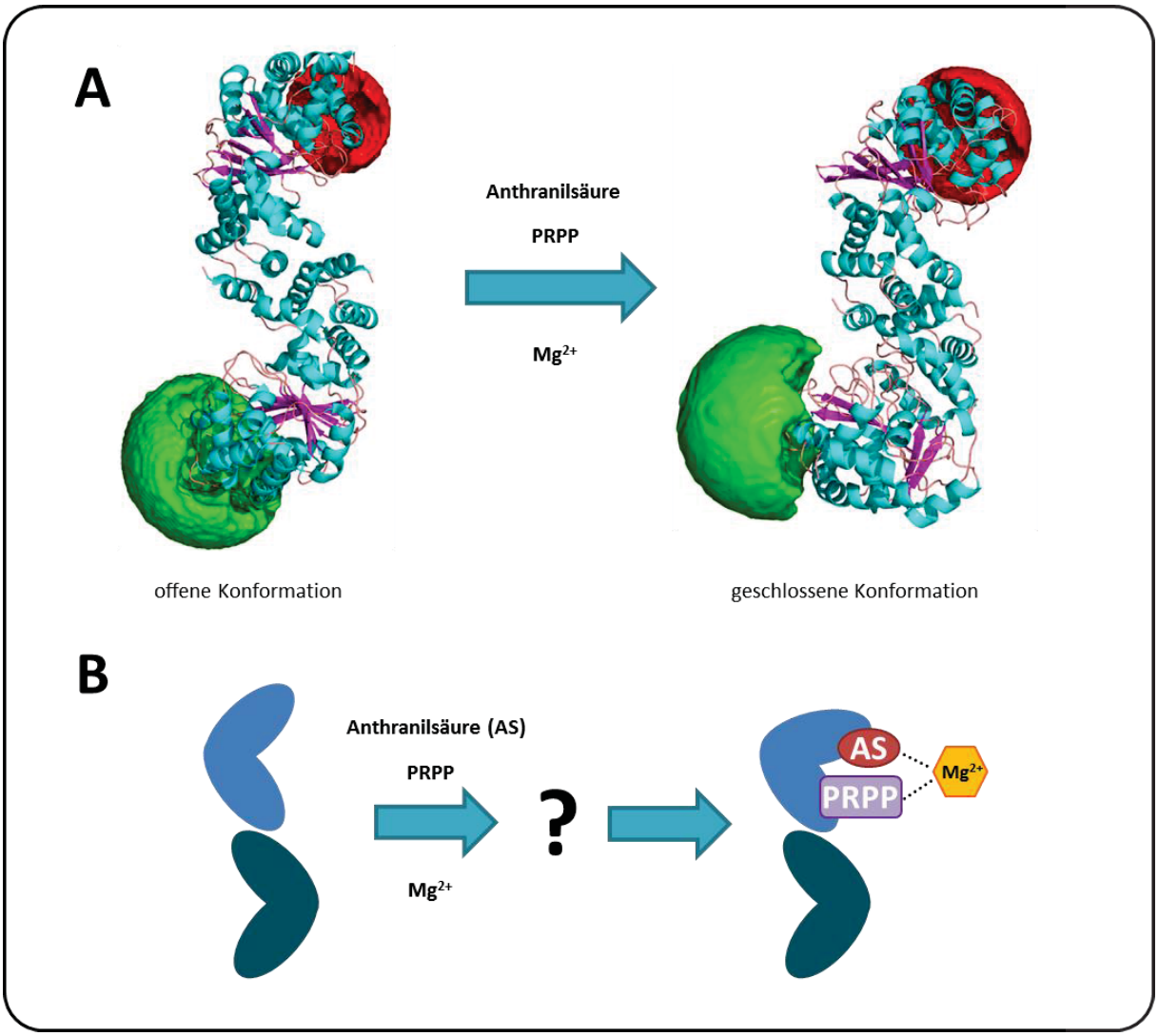


Abbildung 4-17: Vergleich von offener und geschlossener ssAnPRT(S254C)DA-Konformation. (A) Die Veränderung des zugänglichen Volumens der Farbstoffe Alexa 488 und 647 machen die Strukturänderung in Anwesenheit von Anthranilsäure, PRPP und Magnesium sichtbar(ohne Substrate, PDB ID: 1O17, mit Substrate, PDB ID: 1ZYK, unteres Protomer geschlossen, oberes Protomer offen). **(B)** Mit der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wurden die Frage nach dem Verlauf der Katalyse und die Initiierung des Konformationswechsels untersucht.

Die berechneten Distanzänderungen für die in Abbildung 4-16 dargestellten Simulationen wurden in Tabelle 4-7 zusammengefasst. Für ssAnPRT(S14C, S254C) wurden kürzere beobachtbare Distanzen zwischen Donor und Akzeptor berechnet, als diese zuvor angenommen wurden. Insbesondere die intramolekulare Distanzänderung zwischen den Aminosäuren S14C und S254C (Abbildung 4-16 A) berechnet sich zu 0,4 Å, während beim Vergleich der entsprechenden Cβ-Atome miteinander eine viel größere Distanzänderung (7,8 Å) ermittelt wurden.

Tabelle 4-7: Quantifizierung der simulierten Abstandsänderung im AV-Modell zwischen offener und geschlossener Konformation in ssAnPRT(S14C, S254C). Offene Konformation:PDB-ID 1O17, geschlossene Konformation (ein Protomer geschlossen, ein Protomer offen): PDB-ID 1ZYK. Die Angabe „mit Substrat" bezieht sich auf die Anwesenheit von Anthranilsäure, PRPP und Magnesiumchlorid.

A: Simulierte intramolekulare Abstandsänderung zwischen S14C und S254C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{Cβ-Cβ}$	49.7 Å	41.8 Å	7.8 Å
R_{mp}	57.1 Å	56.5 Å	0.6 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	58.7 Å	58.1 Å	0.5 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	57.0 Å	56.6 Å	0.4 Å

B: Simulierte intermolekulare Abstandsänderung zwischen S14C und S254C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{Cβ-Cβ}$	42.7 Å	29.5 Å	13.3 Å
R_{mp}	38.4 Å	29.8 Å	8.6 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	40.8 Å	32.8 Å	8.0 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	42.8 Å	37.2 Å	5.6 Å

C: Simulierte intermolekulare Abstandsänderung zwischen S14C und S14C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{Cβ-Cβ}$	23.9 Å	18.2 Å	5.7 Å
R_{mp}	31.7 Å	25.1 Å	6.6 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	34.3 Å	28.2 Å	6.1 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	38.0 Å	33.7 Å	4.3 Å

D: Simulierte intermolekulare Abstandsänderung zwischen S254C und S254C

	ohne Substrat	mit Substrat	Differenz
$R_{Cβ-Cβ}$	85.2 Å	78.2 Å	7.1 Å
R_{mp}	92.3 Å	85.9 Å	6.4 Å
$\langle R_{DA} \rangle$	93.3 Å	87.1 Å	6.2 Å
$\langle R_{DA} \rangle_E$	89.4 Å	83.6 Å	5.8 Å

4.1.8 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchung von ssAnPRT(S14C, S254C)

4.1.8.1 Identifizierung der verschiedenen FRET-Populationen

Für die Interpretation der Daten aus Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopischen Messungen in Hinblick auf Konformationsänderungen von ssAnPRT ist eine Zuordnung der auftretenden Fluoreszenzpopulationen zu den erhaltenen Abständen aus dem AV-Modell erforderlich. In Abwesenheit der Substrate konnten drei Populationen (LF, MF und HF) mit unterschiedlichem Signalverhältnis identifiziert werden (Abbildung 4-18 A-I). Betrachtet man die ermittelten Abstände aus dem AV-Modell und vergleicht diese mit den experimentell ermittelten Abstandsverteilung R_{DA} (Abbildung 4-18 A-II), so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den Histogramm-Maxima. Die LF-Population kann demnach dem intermolekularen Abstand zwischen beiden S254C-Aminosäureresten zugeordnet werden (Abbildung 4-18 A, grün gestrichelte Linie), wobei ein unbestimmter Anteil von D-only-markierter Enzyme berücksichtigt werden muss. Anhand der Breite der Verteilung sind zwei oder mehrere LF-Populationen wahrscheinlich. Die MF-Population entspricht dem intramolekularen Abstand zwischen S14C und S254C (Abbildung 4-18 A, orange gestrichelte Linie). Für die HF-Population kann dementsprechend die intermolekularen Abstände zwischen S14C (1. Monomer) und S14C (2. Monomer), sowie S254C (2.Monomer) angenommen werden (Abbildung 4-18 A, rot gestrichelte Linie). Aufgrund der Ähnlichkeit beider Abstände ist Separation beider Fluoreszenzfarbstoff-Kominationen nicht möglich. Die statische FRET-Linie (Gleichung 3-23) wurde für die Auftragung des Donor/Akzeptor-Abstandes R_{DA} gegen die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(0)}$ modifiziert:

$$R_{0(statisch,D)} = R_0 \cdot \left[\left(\frac{\tau_{D(0)}}{\sum_{i=0}^{2} A_{i,L} \left(\left\langle \tau_{D(A)} \right\rangle_f \right)^i} - 1 \right)^{-1} \right]^{1/6} . \qquad \text{Gleichung 4-3}$$

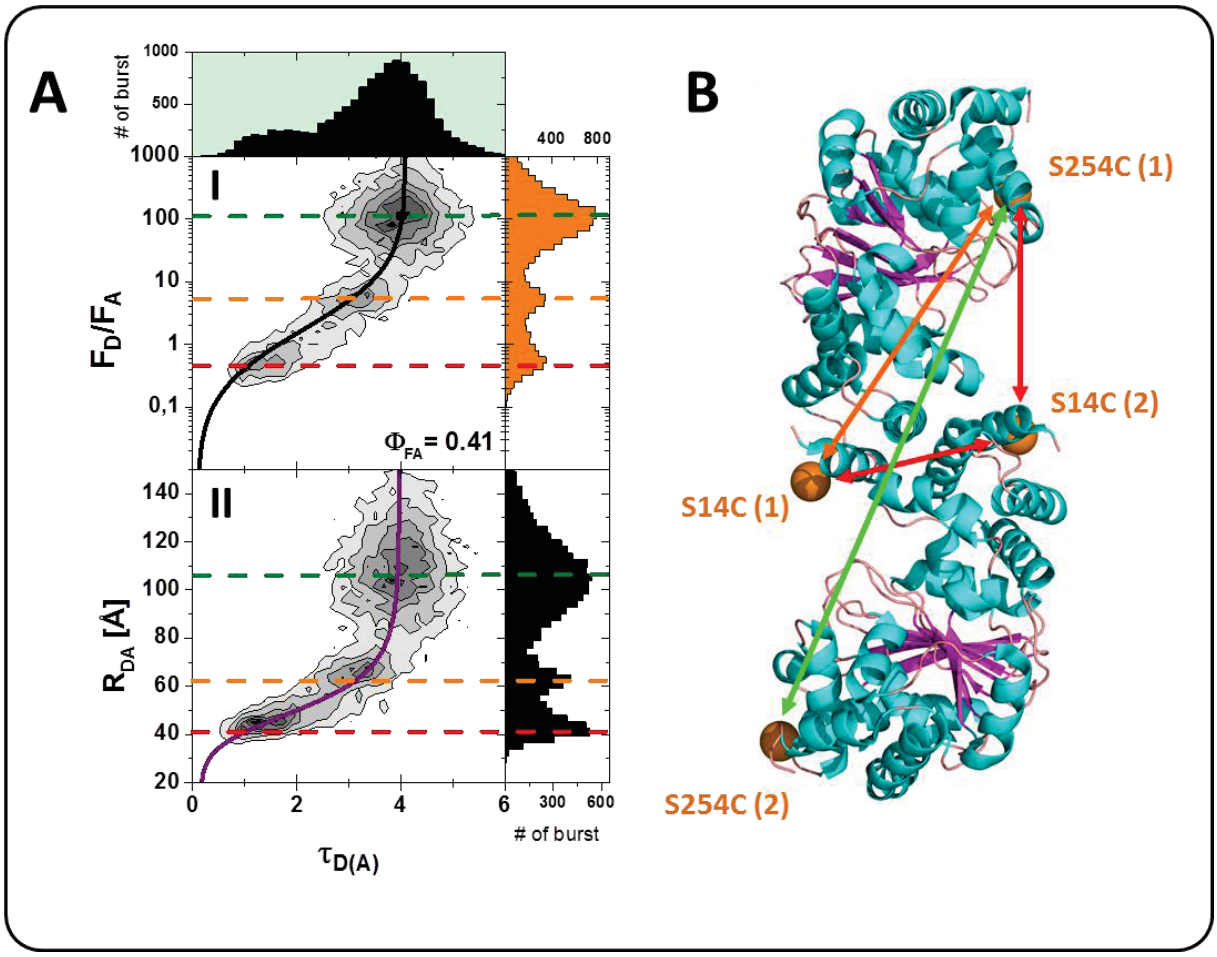


Abbildung 4-18: Zuordnung der unter Einzelmolekülbedingungen identifizierten Fluoreszenzpopulationen in S14C-S254C(A488; A647). (A) Dargestellt ist eine zweidimensionale Auftragung des Fluoreszenzverhältnisses F_D/F_A (A-I), sowie des Donor/Akzeptor-Abstandes R_{DA} (A-II), gegen die Fluoreszenzlebensdauer. Die dazugehörigen FRET-Linien sind in schwarz, bzw. violett, dargestellt. Deutlich sind in den 2D-Diagrammen drei verschiedene Spezies zu erkennen, die als LF (grün), MF (orange) und HF (rot) bezeichnet wurden. **(B)** Röntgenstrukturmodell von ssAnPRT mit den verschiedenen Markierungspositionen. Die Zahl in Klammern gibt die Nummer der Monomeruntereinheit an. Mit Hilfe der erhaltenen Daten aus Tabelle 4-7 wurden den Populationen bestimmte Abstandsverhältnisse zugeordnet, die als nach den verschiedenen Populationen kolorierten Doppelpfeilen dargestellt sind. Es zeigte sich dabei, dass eine eindeutige Zuordnung der inter- und der intramolekularen Abstandsänderung zwischen den Aminosäuren S14C(1 und 2) und S254C (1) nicht erfolgen kann. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24 und Gleichung 4-3) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]		Crosstalk	det.eff. gr. ch.		det.eff. r. ch.
A-I+II	1,229	0,528		0,0170	0,390		1,000
	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	A_0	A_1	A_2	A_3
A-I	0,82	0,41	4,10	-0,0336	0,2711	0,4964	-0.0440
	R_{0r} [Å]	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	A_0	A_1	A_2	
A-II	54,0	0,41	4,10	0,0421	0,8728	0,1452	

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.1.8.2 Magnesiuminduzierte Strukturänderung der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

Aus Kapitel 4.1.8.1 wurden für ssAnPRT(S14C, S254C)DA drei fluoreszierende Spezies detektiert und in den strukturellen Kontext zugeordnet (Abbildung 4-19 A). Nach Aussage des AV-Modells ist eine Strukturänderung des Proteins ausschließlich an einer Verschiebung der LF-Population zu kleineren Fluoreszenzverhältnissen F_D/F_A erkennbar (Kapitel 4.1.7). Die Zugabe von Anthranilsäure und PRPP (Abbildung 4-19 B) zeigte bereits eine geringfügige Verschiebung der *LF*-Population in Richtung kleinerer Signalverhältnisse. MF- und HF-Population bleiben unverändert. Offensichtlich hat die Anbindung von Anthranilsäure und PRPP bereits Einfluss auf die Proteinstruktur. Wesentlich deutlicher wurde diese Verschiebung nach Zugabe von Magnesiumchlorid (Abbildung 4-19 C). Die MF- Population bleibt, wie aus Tabelle 4-7 zu erwarten war, unverändert. Allerdings ist bereits aus Kapitel 4.1.3 bekannt, dass es sich bei der HF- und MF-Population um eine Überlagerung verschiedener fluoreszierender Spezies handelt und eventuelle Signaländerungen in diesem F_D/F_A-Bereich bei dieser Proteinvariante nicht erkennbar sind. Daher ist, entgegen der Erwartungen, keine Verschiebung der HF-Population in Richtung kleinerer Fluoreszenzverhältnisse erkennbar, obwohl diese, wie sie aus Tabelle 4-7 B und C ersichtlich, eine Abstandsänderung um circa 5 Å erkennbar sein müsste. Die signifikante Strukturänderung wird erst dann erkennbar wird, wenn alle Komponenten der katalytischen Reaktion vorhanden sind. Aus Schlee et. al (Schlee*, et al.*; 2009) wurde berichtet, dass in Anwesenheit aller Komponenten ein ssAnPRT-AS-Mg-PRPP-Komplex entsteht, der erst gebildet werden kann, wenn ssAnPRT seine Struktur so ändert, so dass der Abstand zwischen den Substraten verringert wird. Unter diesen Substratbedingungen können die fluoreszierenden Spezies nicht mehr vollständig durch eine statische FRET-Linie beschrieben werden. Die F_D/F_A-Verteilung zwischen HF und MF (τ_1 = 0.9 ns, τ_2 = 2,9 ns) zeigt eine erkennbare Proteindynamik, die abgeschätzt im dreistelligen Mikrosekundenbereich liegt (Sanabria*, et al.*; in Vorbereitung).

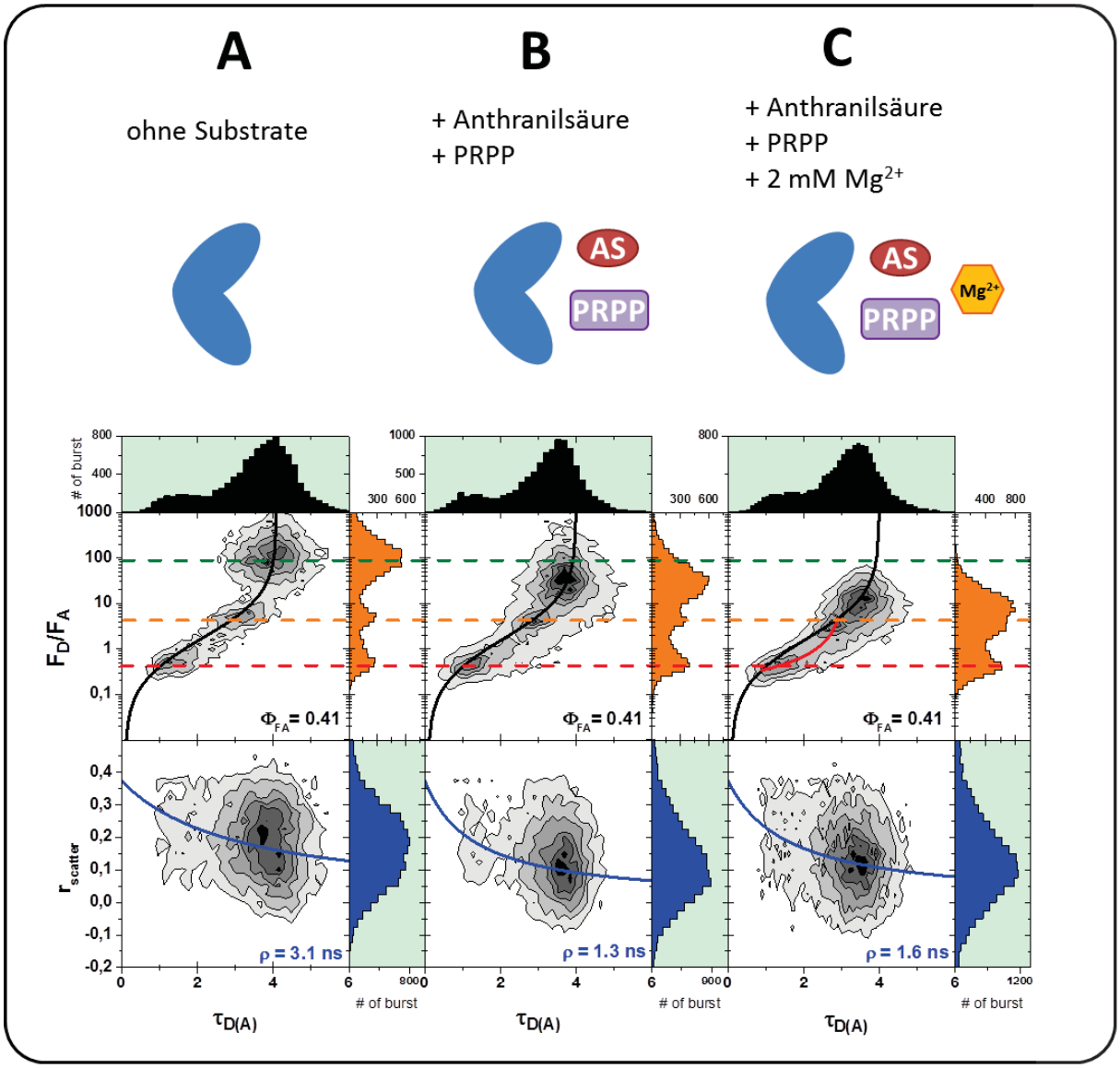


Abbildung 4-19 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchungen von ssAnPRT(S14C, S254C)DA. Für die Messungen wurde 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 + 1 mM ssAnPRT(wt) mit 5 µM EDTA verwendet, um ungewollte Mg^{2+}-Kontaminationen zu vermeiden. Die Quantenausbeute Φ_A von Alexa 647 ermittelte sich mit eTCSPC zu 0,41. Die Anisotropien für die verschiedenen Messungen (untere 2D-Abbildung) zeigen eindeutig Werte über 0,05, so dass die verbliebende Konzentrationen an freien Farbstoffen vernachlässigt werden kann. **(A)** Die Untersuchung des Enzyms in Abwesenheit der Substrate zeigte drei Populationen, wie sie bereits in Abbildung 4-18 gezeigt wurde. Zum Vergleich mit den nachfolgenden Untersuchungen wurden die Maxima dieser Populationen mit gestrichelten Linien durchzogen (grün für die LF-, gelb für die MF und rot für die HF-Population). **(B)** Nach Zugabe von 250 µM Anthranilsäure und 2 mM PRPP in Abwesenheit von Mg^{2+} ist eine Verlagerung der LF-Population in Richtung kleinerer Signalverhältnisse erkennbar, was auf eine Verkleinerung des Abstandes des Donor/Akzeptor-Paares zwischen den Aminosäuren S254C beider Monomeruntereinheiten hindeutet. Die anderen Populationen bleiben von der Strukturänderung des Enzyms unbeeinflusst oder sind nicht erkennbar. **(C)** Bei Zugabe von 2 mM Magnesiumchlorid ist diese Verlagerung der LF-Population wesentlich stärker ausgeprägt. Wie bereits vermutet, setzt erst in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen die katalytische Strukturänderung ein. Zudem kann die Fluoreszenzverteilung nicht mehr vollständig statisch beschreiben werden, wie an der dynamischen FRET-Kurve zu erkennen ist. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	1,229	0,528	0,0170	0,390	1,000
B	1,672	4,261	0,0170	0,390	1,000
C	1,672	4,261	0,0170	0,390	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,80	0,41	4,00	-0,0376	0,2794	0,4934	-0.0432
B	0,76	0,41	3,80	-0,0421	0,2976	0.4870	-0.0417
C	0,78	0,41	3,90	-0,0397	0,2883	0.4902	-0.0425

Für die dynamische FRET-Linie (Gleichung 3-26) wurden folgende Paramenter verwendet:

Abbildung	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
C	0,41	4,00	0,90	2,90	0,0000	0,0000	1,7382	-2,1667

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

Eine genauere Untersuchung erfolgte mit PDA, um weitere Fluoreszenzpolulationen zu identifizieren. Die ermittelten Abstände, und deren relativen Amplituden sind für die untersuchten Substratbedingungen in Abbildung 4-20 dargestellt. Im Vergleich zu den 2D-Histogrammen in Abbildung 4-19 A bis C sind vier FRET-Populationen erkennbar. Der ermittelte *Donor-only*-Anteil (grüne Säule) von 3,6% in Abbildung 4-20 A ist ein Resultat der PDA-Modellbeschreibung und geht nach Substratzugabe in den LF-Zustand über. Mit einer Fixierung der Amplitude des *Donor-only*-Anteils auf null bei der PDA war jedoch keine sinnvolle Modellbeschreibung möglich, so dass diese Fraktion variabel für die Messung ohne Substrate angepasst werden musste. Die Zugabe von Anthranilsäure, PRPP und Magnesiumchlorid führte zu keiner wesentlichen Abstandsänderung von VHF- (rote Säule) und HF-Population (orange Säule), jedoch stieg der VHF-Anteil relativ zum Gesamt-FRET von 18,1% (ohne Substrate) auf 23,4% (+AS, +PRPP) und 27,5% (+AS, +PRPP, $+Mg^{2+}$). In gleicher Weise ist ein Anstieg des Anteils der MF-Population (gelbe Säule) zu beobachten (ohne Substrate: 11,5%; AS+PRPP: 25,4%; AS+PRPP+Mg^{2+}:28,6%). Die LF-Population nimmt hingegen in gleicher Weise ab (ohne Substrate: 52,6%; AS+PRPP: 37,1%; AS+PRPP+Mg^{2+}:27,4%). Bei der Betrachtung der PDA-Histogramm-Verteilung von MF- und LF-Population wird deutlich, dass beide Verteilungen stärker ineinander übergehen.

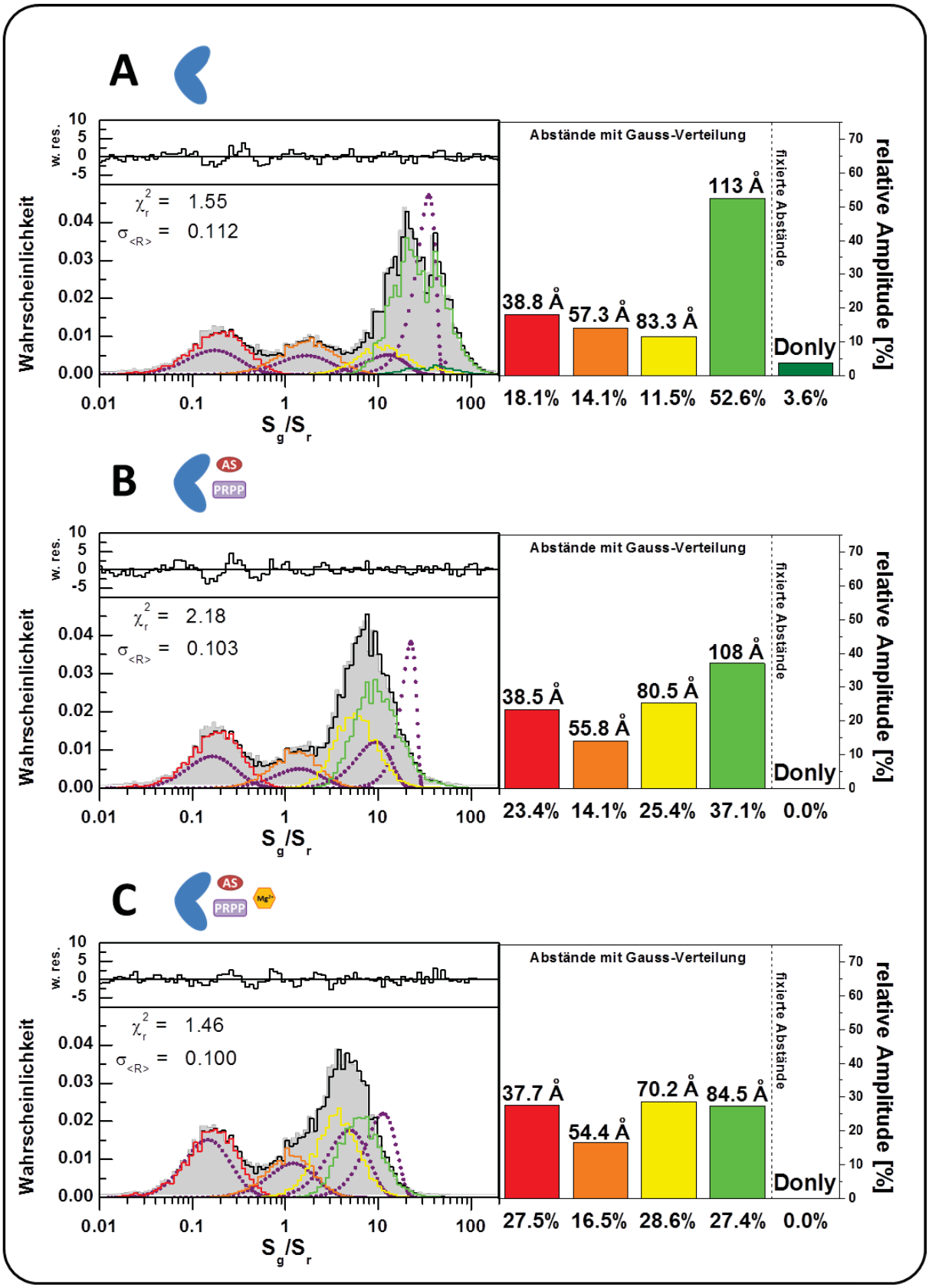


Abbildung 4-20: PDA der smFRET-Untersuchung von ssAnPRT(S14C, S254C)DA. Substratbedingungen: **(A)** 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 + 1 mM ssAnPRT(wt), **(B)** wie (A) + 250µM AS und 2 mM PRPP, **(C)** wie (B) + 2 mM $MgCl_2$. Das linke Histogramm (TW = 1ms) enthält die experimentelle S_g/S_r-Verteilung (graue Fläche), das angewendete Modell (violette Punkte), das daraus simulierte Histogramm (schwarze Linie) und die dazugehörigen Histogramme der FRET-Populationen (VHF → rot, HF → orange, MF → gelb, LF → hellgrün, Donly → grün). Das rechte Diagramm zeigt die ermittelten FRET-Abstände und die dazugehörigen Amplituden.

Für die PDA wurden folgende Parameter verwendet:

Modell: *"Model of everything"* [P(F)]				
B_{green} [kHz]	**B_{red} [kHz]**	**Crosstalk**	**det.eff. gr. ch.**	**det.eff. r. ch.**
1,229 (A) 1,672 (B) 1,672 (C)	0,528 (A) 4,261 (B) 4,261 (C)	0,017	0,390	1,000
Start	**Ende**	**Bins**	**l_1**	**l_2**
0,01	200	101	0,0308	0,0368
Φ_{FD}	**Φ_{FA}**	**R_0**	**2 molecules P**	**N_{min}**
0,80	0,41	52,0	0	40 (TW = 1,0 ms)
# of Gaussians	**bins per Gaussian**	**# of single ratios**	**# of dynamic states**	
4	51	1 [für (A)]	0	

4.1.8.3 Untersuchung der Dynamik von ssAnPRT(S14C, S254C)DA mit PDA und Fluoreszenz-Kreuzkorrelation

Die Untersuchung von Dynamiken dieser ssAnPRT-Variante während der Katalyse erfolgte ebenfalls mit PDA sowie Fluoreszenzkreuzkorrelation. Für die Identifizierung der Strukturdynamik von ssAnPRT(S14C, S254C)DA mit PDA wurden 1,0 ms- und 3,0 ms-Zeitfenster (TW) miteinander verglichen. Wie bereits aus den Ergebnissen des vorherigen Kapitels entnommen werden konnten, zeigt sich auch beim der Vergleich der PDA-Zeitfenster keine Veränderung der Verteilung von VHF- und HF-Population (Abbildung 4-21). Im Bereich der MF/LF-Population zeigt der Vergleich der beiden Zeitfenster eine signifikant veränderte Histogramm-Verteilung. Die Modellbeschreibung für das Histogramm mit 1,0 ms-Zeitfenster (Abbildung 4-21, schwarze Verteilung) konnte nicht mehr für das 3,0 ms-Zeitfenster (Abbildung 4-21, rote Verteilung) vollständig angewendet (Erhöhung des Wertes für χ_r^2) werden. Aufgrund des komplizierten FRET-Verteilungsmuster konnten mit dPDA keine quantifizierbaren Dynamiken eindeutig bestimmt werden. Jedoch kann qualitativ, aufgrund der so gewählten PDA-Zeitfenster, eine Millisekunden-Dynamik für ssAnPRT angenommen werden.

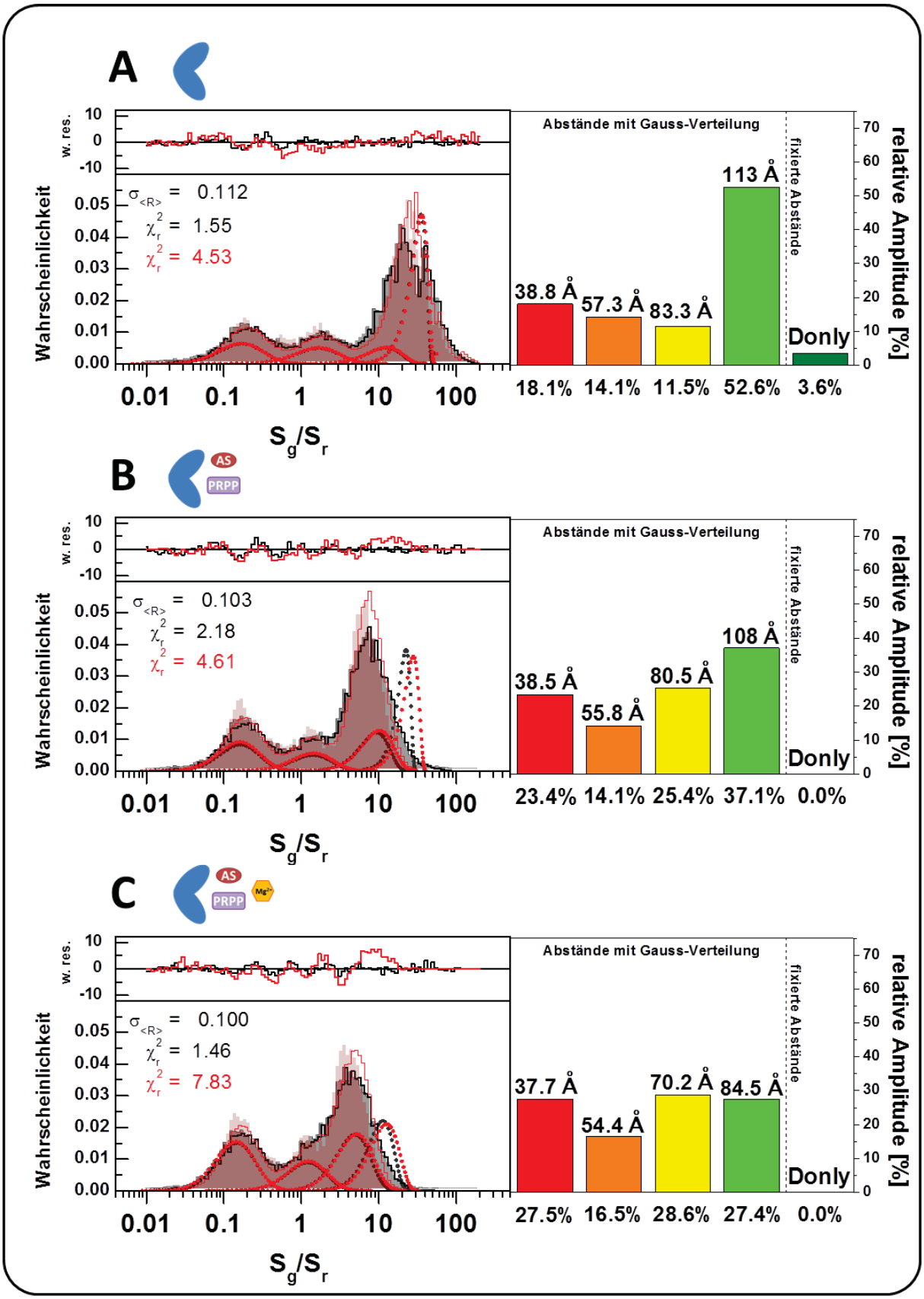


Abbildung 4-21: PDA-Zeitfensteranalyse von ssAnPRT(S14C, S254C)DA. Substrat-bedingungen: **(A)** 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 + 1 mM ssAnPRT(wt), **(B)** wie (A) + 250µM AS und 2 mM PRPP, **(C)** wie (B) + 2 mM $MgCl_2$. Das linke Histogramm zeigt den Vergleich zwischen dem 1 ms- (grau) und dem 3 ms-Zeitfenster (rot) mit den experimentelle S_g/S_r-Verteilung (graue/rote Fläche), das angewendete Modell (graue/rote Punkte), das daraus simulierte Histogramm (schwarze und rote Linie). Das Modell des 1 ms-Zeitfensters wurde auf das des 3 ms-Zeitfensters angewendet. Rechtes Diagramm: FRET-Abstände und Amplituden.

Für die PDA wurden folgende Parameter verwendet:

Modell: *"Model of everything"* [P(F)]				
B_{green} [kHz]	**B_{red} [kHz]**	**Crosstalk**	**det.eff. gr. ch.**	**det.eff. r. ch.**
1,229 (A) 1,672 (B) 1,672 (C)	0,528 (A) 4,261 (B) 4,261 (C)	0,017	0,390	1,000
Start	**Ende**	**Bins**	**l_1**	**l_2**
0,01	200	101	0,0308	0,0368
Φ_{FD}	**Φ_{FA}**	**R_0**	**2 molecules P**	**N_{min}**
0,80	0,41	52,0	0	40 (TW = 1,0 ms) 120 (TW = 3,0 ms)
# of Gaussians	**bins per Gaussian**	**# of single ratios**	**# of dynamic states**	
4	51	1 [für (A)]	0	

Durch Fluoreszenzkreuzkorrelation kann die durch PDA identifizierte Dynamik stärker quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden im ersten Schritt die Signale aus den grünen, sowie aus den roten Kanälen miteinander korreliert und mit der Gleichung 4-4 mathematisch angepasst:

$$G(t_c) = offset + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1+\frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{z_0}{\omega_0}\right)^{-2} \frac{t_c}{t_{diff}}}} \cdot \left(x_{Tr} \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{xTr}}\right)} \right) \cdot \left(1 - \left(x_1 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r1}}\right)} + x_2 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r2}}\right)} + (1 - x_1 - x_2) \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r3}}\right)} \right) \right)$$

Gleichung 4-4

N	durchschnittliche Zahl der Moleküle im Focus
t_c	Korrelationszeit
t_{diff}	Diffusionszeit
z_0 / ω_0	Axial-radiales Verhältnis des Detektionsvolumens
x_{Tr}	Triplettamplitude
t_{Tr}	charakteristische Relaxationszeit des Triplettzustandes
x_1 / x_2	Antikorrelationsamplitude
t_{r1} / t_{r2}	Relaxationszeiten der Antikorrelation

Gleichzeitig erfolgte zur Ermittlung der Amplituden die mathematische Anpassung für die rot-grüne Kreuzkorrelation nach Gleichung 4-5 durch Gesamtglobalanalyse:

$$G(t_c) = offset + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1+\frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{z_0}{\omega_0}\right)^{-2} \frac{t_c}{t_{diff}}}} \cdot \left(x_{Tr} \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{xTr}}\right)} \right) \cdot \left(1 - A \cdot \left(x_1 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{x1}}\right)} + x_2 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{x2}}\right)} + (1 - x_1 - x_2) \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{x3}}\right)} \right) \right)$$

Gleichung 4-5

N	durchschnittliche Zahl der Moleküle im Focus
t_c	Korrelationszeit
t_{diff}	Diffusionszeit
z_0 / ω_0	Axial-radiales Verhältnis des Detektionsvolumens
x_{Tr}	Triplettamplitude
t_{Tr}	charakteristische Relaxationszeit des Triplettzustandes
A	Gesamt-Antikorrelationsamplitude
x_1 / x_2	Antikorrelationsamplitude
t_{x1} / t_{x2}	Relaxationszeiten der Antikorrelation

Dynamiken sind mit Hilfe der Fluoreszenzkreuzkorrelation dann erkennbar, wenn eine Antikorrelation zwischen dem Donor- und Akzeptor-Signal vorliegt, und entsprechend als Antikorrelationsterm in der Korrelationskurve auftritt. Da die mathematische Anpassung für mehrere Variable erfolgte, wurde die Kreuzkorrelation global mit den Korrelationen aus den grün-grünen und rot-roten Korrelationen durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit für den Erhalt von konsistenten Werten zu erhöhen. Zudem schließt die rot-grüne Kreuzkorrelation Pseudodynamiken aufgrund Photozerstörung des Akzeptors aus. Die Konformationsdynamik der smFRET-Daten von ssAnPRT(S14C, S254C)DA (vergleiche Abbildung 4-19) wurde auf diesem Wege quantifiziert und ist in Abbildung 4-22 zusammengefasst.

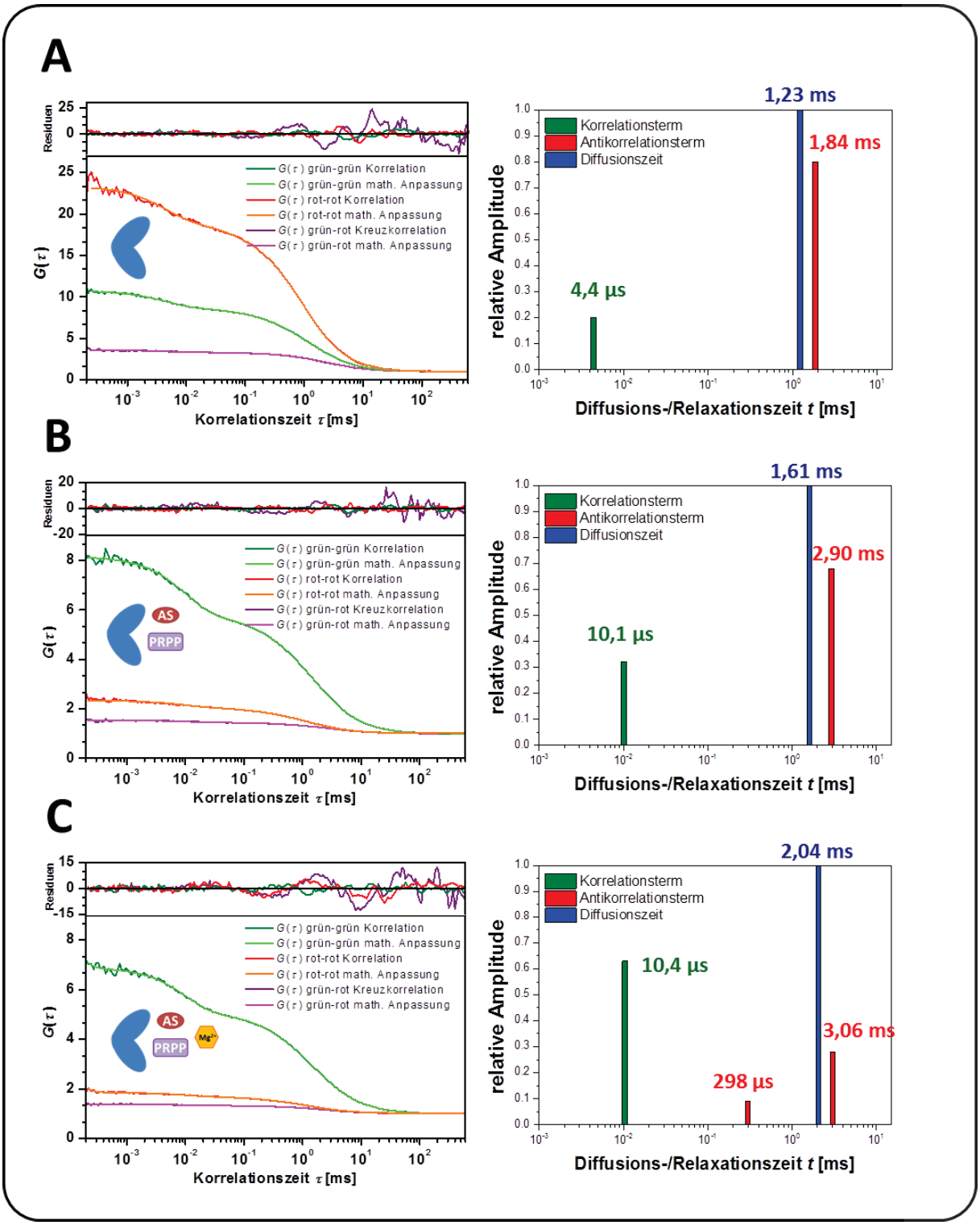


Abbildung 4-22 Fluoreszenz(kreuz)korrelation von ssAnPRT(S14C, S254C)DA unter verschiedenen Substratbedingungen. (A) 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 + 1 mM ssAnPRT(wt), **(B)** wie (A) + 250µM AS und 2 mM PRPP, **(C)** wie (B) + 2 mM $MgCl_2$. Die Relaxations- und Diffusionszeiten (rechte Diagramme) aus den Korrelationskurven (linke Diagramme) wurden global ermittelt. Die Amplituden wurden der rot-grünen Kreuzkorrelation entnommen.

Deutlich ist die Zunahme der Diffusionszeit t_{diff} von 1,23 auf 1,61 bzw. 2,04 ms nach Substratzugabe (Abbildung 4-22 B) im Vergleich zu der Probe ohne Substrate (Abbildung 4-22 A) erkennbar. Eine mathematische Anpassung der Korrelationskurven mit einer einheitlichen Diffusionszeit für alle Substratbedingungen erbrachte keine sinnvolle Lösung. Die Substratbindung hat möglicherweise einen Einfluss auf das Monomer/Dimer-Gleichgewicht in Richtung der Dimere. Dies konnte jedoch durch Experimente zur Dynamik dieses Gleichgewichtes nicht bestätigt werden (vergleiche hierzu Kapitel 4.1.3). Ebenfalls ist eine Zunahme der roten Photonen in der rot-roten Korrelation, wahrscheinlich aufgrund der rot-fluoreszierenden Anthranilsäure, durch Absenkung der Gesamtamplitude erkennbar. Möglicherweise erzeugen das Ausbleichen und der katalytische Umsatz der Anthranilsäure eine Pseudodynamik, die sich im Korrelationsterm mit ungefähr 10 µs und bei Zugabe von Magnesiumchlorid als steigende Amplitude beschreiben lassen.

In Abwesenheit der Substrate wurde im Antikorrelationsterm eine Relaxationszeit von 1,84 ms ermittelt, die sich nach Zugabe von Anthranilsäure und PRPP auf 2,90 ms deutlich verlängert und bleibt auch in Anwesenheit von Magnesiumchlorid bei 3,06 ms nahezu unverändert. Die Substratbindung an ssAnPRT bewirkt scheinbar eine Abnahme der Flexibität des Proteingerüstes. Bei Magnesiumzugabe konnte jedoch eine neue, dreistellige Mikrosekunden-Dynamik von 298 µs identifiziert werden. Es ist daher anzunehmen, dass diese langsame Mikrosekundendynamik mit der Bildung des ssAnPRT-AS-Mg_2-PRPP-Komplexes (Schlee*, et al.*; 2009) und dem katalytischen Umsatz der Substrate einhergeht. Die katalytische Bildung von PRA wäre somit unterscheidbar vom Prozess der Substratbindung.

Wie bereits in Schlee et al. (2009) beschrieben wurde, beträgt die Wechselzahl (k_{cat}) bei 60°C 4,2 s^{-1} für wildtyptisches ssAnPRT, jedoch fällt sie bei 37°C auf 0,33 s^{-1} zurück und bei 25 °C kaum noch von einer statischen Substratbindung zu unterscheiden (Abbildung 4-23). Da die Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen technisch bedingt bei einer Raumtemperatur von 20 °C durchgeführt wurden, ist unter diesen Messbedingungen von keinem wesentlichen Substratumsatz, wahrscheinlich aufgrund der temperaturbedingten langsamen Domänenbewegung und/oder mangels Aktivierungsenergie für den katalytischen Prozess auszugehen. Die so ermittelten quantifizierten Dynamiken sind also bezogen auf 20°C.

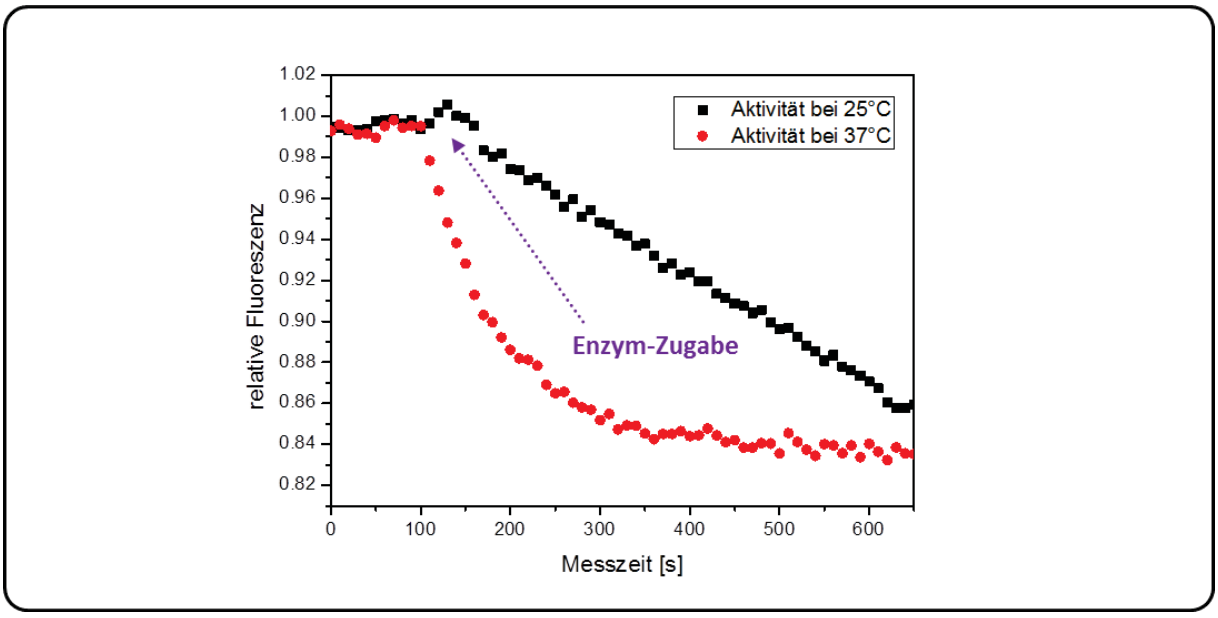


Abbildung 4-23 Vergleich der enzymatischen Aktivität von ssAnPRT(S14C, S254C) bei unterschiedlichen Temperaturen. Anhand des hyperbolischen Verlaufs der relativen Anthranilsäure-Fluoreszenz bei 37°C (rote Messpunkte) ist der Substratumsatz erkennbar. Bei 25°C ist der Substratumsatz deutlich langsamer und verläuft, verglichen mit der hyperbolischen Kurve bei 37 °C, eher linear. Die Messpunkte wurden um den Photozerstörungsanteil korrigiert.

4.1.8.4 Kombinierte Analyse aus FCCS und PDA

Der Vorteil der Fluoreszenzkreuzkorrelation liegt in der genauen Bestimmung von Relaxationszeiten der FRET-Dynamiken, während die PDA ein geeignetes Analyseverfahren zur Bestimmung von statischen und dynamischen FRET-Abständen ist. Eine Kombination aus beiden Verfahren ermöglicht die Zuordnung der verschiedenen fluoreszierenden Zustände eines Proteins und erlaubt die Entwicklung eines genaueren Modells der Konformationsdynamik. Daher wurden die aus FCCS ermittelten Relaxationszeiten t_R von ssAnPRT(S14C, S254C)DA als feste Parameter der PDA integriert. Dazu war es erforderlich die PDA-Modellbeschreibung so zu modifizieren, dass nach Gleichung 4-6 t_R konstant bleibt, während ausschließlich die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} der dynamischen Proteinkonformationen 1 und 2 und deren FRET-Abstände variabel sind.

$$t_R = \left(k_{12} + k_{21}\right)^{-1} \qquad \text{Gleichung 4-6}$$

In Kapitel 4.1.8.2 konnte mit ssAnPRT(S14C, S254C)DA eine Verschiebung der LF-Population in Richtung höherer FRET die konformelle Änderung von ssAnPRT während der Katalyse gezeigt werden. Mit Hilfe des AV-Modells (Kapitel 4.1.8.1) wurde der LF-Population die intermolekulare Abstandsänderung der Fluoreszenzfarbstoffe zwischen den Aminosäuren 254 beider Protomere zugeordnet. Dieser FRET-Abstand zeigt auch die größte Änderung des FRET während der Katalyse. Eine dynamische PDA von ssAnPRT(S14C, S254C)DA war jedoch aufgrund des komplexen FRET-Verteilungsmusters nicht möglich. Ist die FPS-Zuordnung des FRET-Abstandes korrekt, sollte sich durch Eliminierung der anderen FRET-Zustände die Signalverteilung nur den intermolekularen LF zeigen. Aus diesem Grund wurde die Monocysteinvariante ssAnPRT(S254C) DA-fluoreszenzmarkiert und unter den gleichen Puffer- und Substratbedingungen wie ssAnPRT(S14C, S254C)DA (Kapitel 4.1.8.2) Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abbildung 4-24). Die Akzeptor-Quantenausbeute Φ_{FA} ermittelte sich durch eTCSPC zu 0,32. Dabei zeigte sich in weniger starker Ausprägung die gleiche Signalverschiebung, wie auch für die Doppelcysteinvariante. Aufgrund des sehr guten Markierungsgrades der Fluoreszenzfarbstoffe (94% für Alexa 488 und 80% für Alexa 647), und der damit resultierende schwache *Donly*-Anteil, ist die LF-Population klar zuzuordnen. Mit dieser smFRET-Untersuchung konnte nicht nur die Konformationsänderung von ssAnPRT während der Katalyse anhand einer anderen Proteinvariante gezeigt werden, sondern auch die korrekte Identifizierung der FRET-Population mit dem AV-Modell.

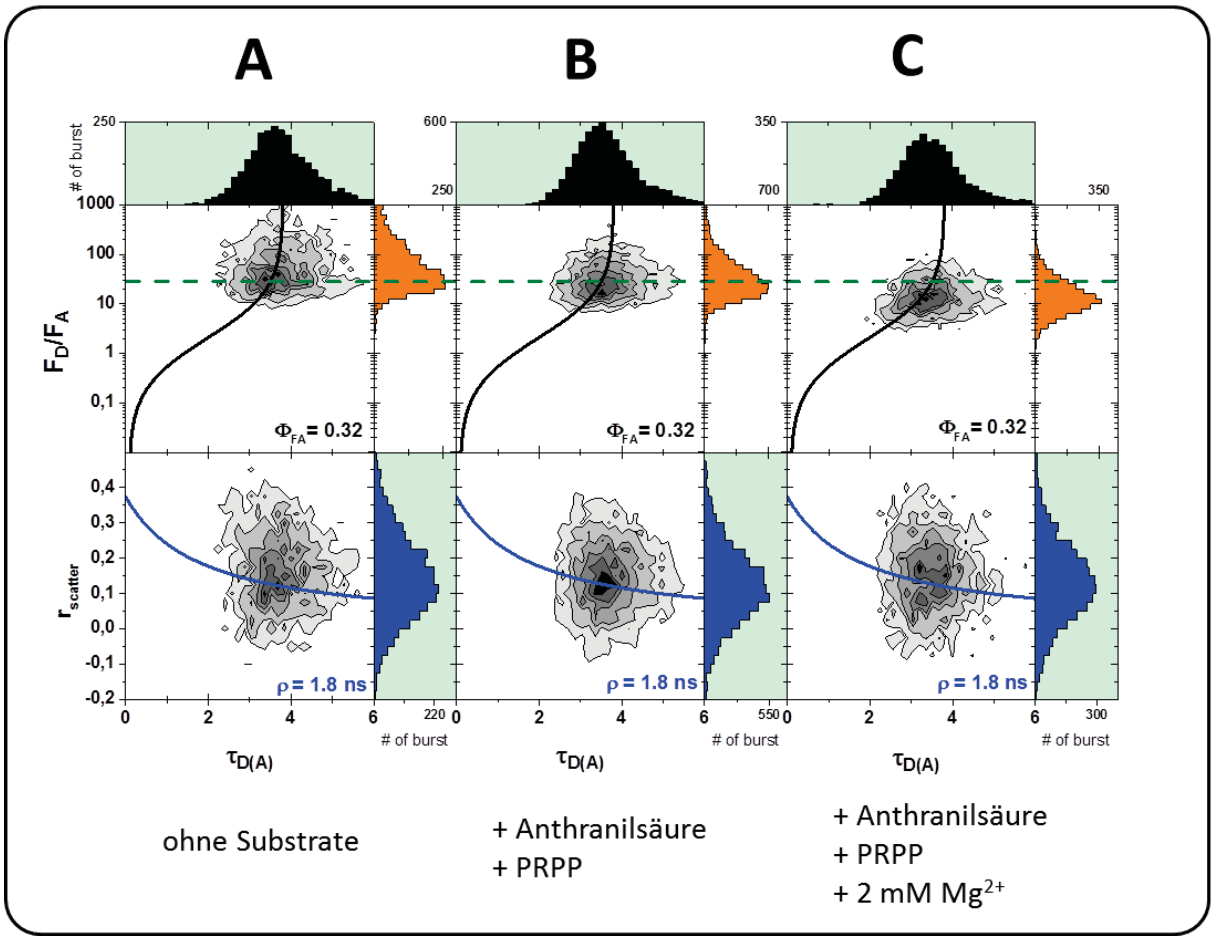


Abbildung 4-24 Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von ssAnPRT(S254C)DA. Wie bereits für ssAnPRT(S14C, S254C)DA erkannt wurde, verschiebt sich die LF-Population nach Substratzugabe in Richtung kleiner Fluoreszenzverhältnisse. Insbesondere in Anwesenheit beider Substrate und Magnesiumchlorid **(C)** ist die Verschiebung der LF-Population stark ausgeprägt. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	0,506	1,233	0,0200	0,750	1,000
B	0,484	1,266	0,0200	0,750	1,000
C	0,484	1,266	0,0200	0,750	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,76	0,32	3,80	-0,0421	0,2976	0.4870	-0.0417
B	0,76	0,32	3,80	-0,0421	0,2976	0.4870	-0.0417
C	0,76	0,32	3,80	-0,0421	0,2976	0.4870	-0.0417

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

Mit ssAnPRT(S254C)DA war außerdem eine kombinierte FCCS/dPDA-Analyse möglich, da hier nur der dynamische Abstand zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt werden musste. Die dPDA erfolgte dabei als globale Analyse zwischen den 1 ms, - 2 ms und 3 ms-PDA-Zeitfenstern. Durch Fixierung der Relaxationszeit t_R = 1,84 ms für die Untersuchung von ssAnPRT(S254C)DA ohne Substrate wurde mittels dPDA zwei dynamische FRET-

Grenzzustände von 112 Å (offene Konformation, „open“, O) und 70,4 Å (halboffene Konformation, „closed*“, C*) mit den dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten (k_{OC*} = 0,147 ms^{-1} und k_{C*O} = 0,397 ms^{-1}) ermittelt. Wie erwartet, nimmt die Konformationsdynamik nach Zugabe von Anthranilsäure und PRPP deutlich ab. Diese bewegt sich nur noch zwischen 74,4 Å (A) und 64,4 Å (geschlossene Konformation, „closed“, C) bei einer fixierten Relaxationszeit von t_R = 2,90 ms (k_{OC} = 0,064 ms^{-1} und k_{CO} = 0,281 ms^{-1}). Zudem wurde eine statische Gaussverteilung mit einem Anteil von 55,6% am Gesamtprozess ermittelt, bei der es sich wahrscheinlich um eine sehr langsame Dynamik von der offenen zur halboffenen Konformation handelt, die mittels dPDA nicht aufgelöst werden konnte. Die Zugabe von Magnesiumchlorid induziert einen weiteren dynamischen Zustand im dreistelligen Mikrosekundenbereich (t_{R1} = 298 µs). Die FRET-Grenzabstände ermittelten sich zu 78,7 Å (A) und 59,2 Å (C) mit k_{AC} = 1,290 ms^{-1} und k_{CA} = 2,070 ms^{-1}. Für die langsamere Konformationsdynamik mit t_{R2} = 3,06 ms wurden 93,9 Å (O) und 71,1 Å (A) erhalten (k_{OC} = 0,117 ms^{-1} und k_{CO} = 0,210 ms^{-1}). Dabei wurden auch die Amplituden aus der FCCS als feste Parameter in die dPDA integriert.

Für alle drei Substratzustände konnten unterschiedliche „halbgeöffnete“ Strukturkonformationen ermittelt werden. Für die Bildung des dimeren ssAnPRT-AS-Mg-PRPP-Komplexes (Schlee*, et al.*; 2009) erscheint ein Zwischenzustand aus jeweils nur einem „offenen“ und „geschlossenen“ Protomer sinnvoller. Daher wurde der Mittelwert beider halboffenen Zustände gebildet und in dPDA als fixer Übergangszustand definiert. Es zeigte sich, dass ein Drei-Zustandsmodell (Abbildung 4-26) die vorhandenen experimentellen Daten gleichwertig im Vergleich zum Mehrzustandsmodell (Abbildung 4-25) beschreibt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Scharnierbewegung eines Protomers um den Faktor 10 schneller verläuft, wenn auch das zweite Protomer im „geschlossenen“ Zustand vorliegt.

Zusammengefasst erscheint ssAnPRT nach den vorliegenden Ergebnissen als ein dynamisches Proteinkonstrukt, welches nach Zugabe der Substrate deutlich an Flexibilität verliert. Erst durch das Vorhandensein von katalytisch wirkenden Magnesiumionen nimmt diese Dynamik durch einen weiteren Zustand zu, der mit einer weitaus deutlicheren Konformationsänderung einhergeht, als es durch Röntgenkristallstrukturen und das AV-Modell zu erwarten war. Für die Bildung des ssAnPRT-AS-Mg-PRPP-Komplexes ist diese ausgeprägte Konformationsänderung erforderlich, um den Abstand der Substrate soweit zu verringern, dass eine nukleophile Substitution stattfinden kann. Es zeigte sich außerdem,

dass die Kinetik der angenommenen Scharnierbewegung abhängig vom Konformationszustand des zweiten Protomers ist.

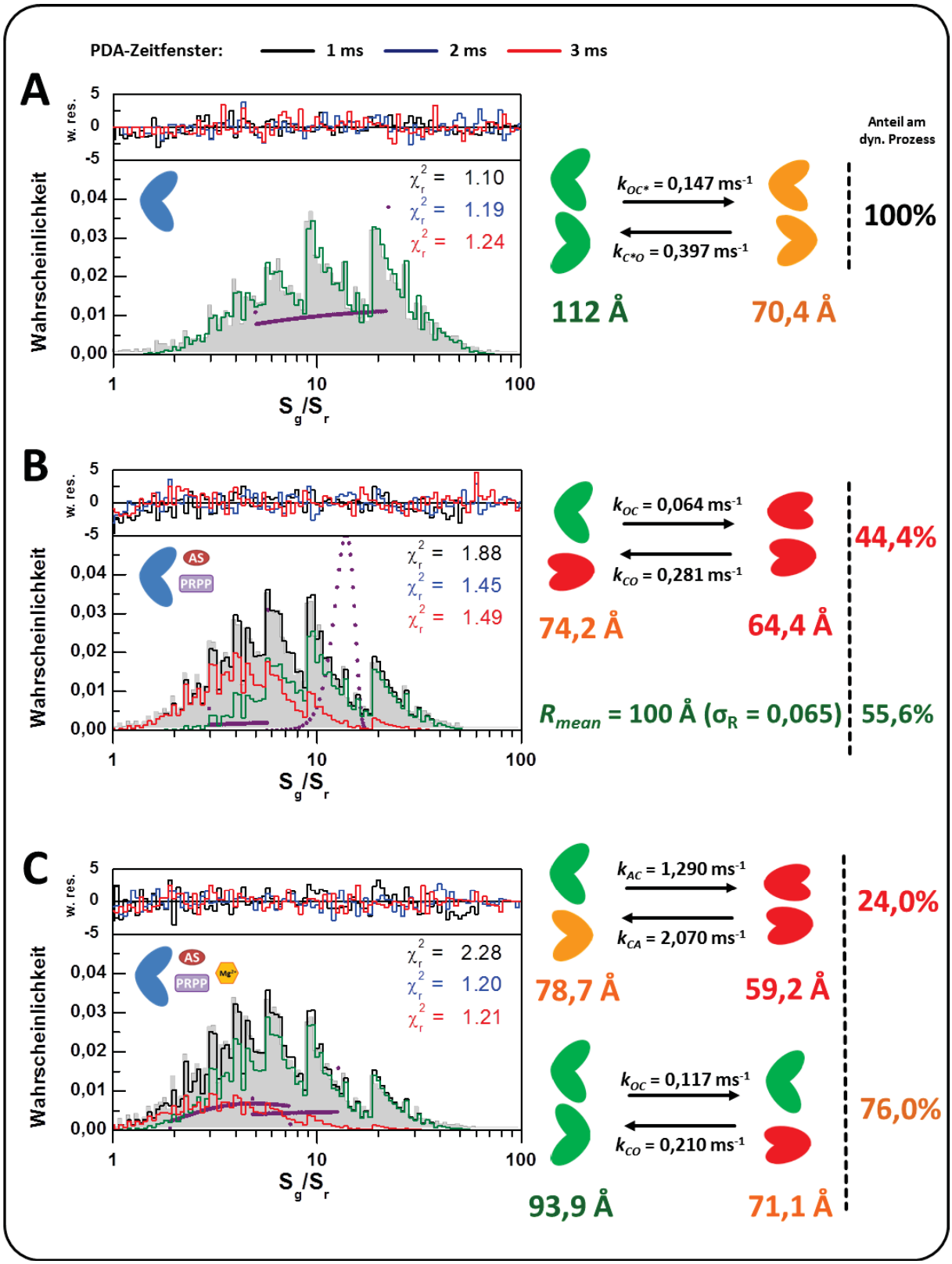


Abbildung 4-25 Dynamische PDA von ssAnPRT(S254C)DA mit festen Relaxationszeiten. Substratbedingungen: **(A)** 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 + 1 mM ssAnPRT(wt), **(B)** wie (A) + 250µM AS und 2 mM PRPP, **(C)** wie (B) + 2 mM $MgCl_2$. Drei PDA-Zeitfenster (TW = 1, 2 und 3 ms) wurden global dynamisch analysiert. Dargestellt sind die Histogramme des 1 ms-Zeitfensters. Die Residuen enthalten alle drei Zeitfenster. Die statischen und dynamischen Komponenten sind mit der jeweiligen Farben markiert (experimentelle S_g/S_r-Verteilung → graue Fläche; angewendetes Modell → violette Punkte; simuliertes Histogramm →schwarze Linie). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und FRET-Abstände sind rechts neben den Histogrammen und deren Anteil am katalytischen Prozess dargestellt. Die folgenden Parameter wurden für die dPDA verwendet:

Modell: *"Combined dynamic PDA"* [P(F)]				
B_{green} [kHz]	**B_{red} [kHz]**	**Crosstalk**	**det.eff. gr. ch.**	**det.eff. r. ch.**
0,393 (A) 0,484 (B) 0,484 (C)	0,449 (A) 1,166 (B) 1,166 (C)	0,030	0,390	1,000
Start	**Ende**	**Bins**	**l_1**	**l_2**
1	100	101	0,0308	0,0368
Φ_{FD}	**Φ_{FA}**	**R_0**	**2 molecules P**	**N_{min}**
0,80	0,32	52,0	0	20 (TW = 1,0 ms) 40 (TW = 2,0 ms) 60 (TW = 3,0 ms)
# of Gaussians	**bins per Gaussian**	**# of single ratios**	**# of dynamic states**	
0 (A)	-	0	1	
1 (B)	51	0	1	
0 (C)	-	0	2	

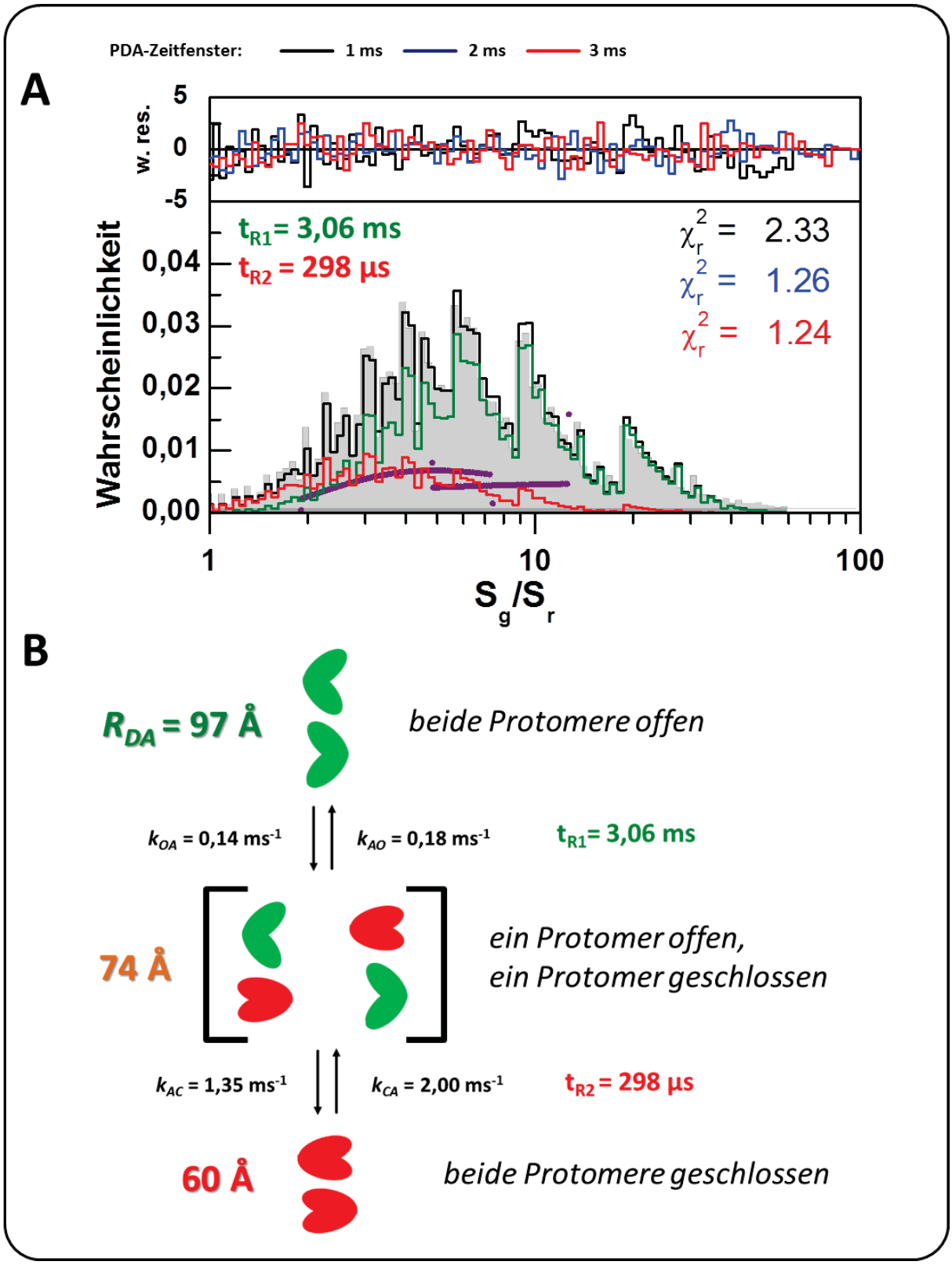


Abbildung 4-26 Dynamische PDA als Drei-Zustandsmodell von ssAnPRT(S254C)DA. (A) Dargestellt ist das Histogramm des 1 ms-Zeitfensters unter den folgenden Substratbedingungen: 250µM AS und 2 mM PRPP, sowie 2 mM $MgCl_2$. Drei PDA-Zeitfenster (TW = 1, 2 und 3 ms) wurden global dynamisch analysiert, dabei enthalten Residuen enthalten alle drei Zeitfenster. Die statischen und dynamischen Komponenten sind mit der jeweiligen Farben markiert (experimentelle S_g/S_r-Verteilung → graue Fläche; angewendetes Modell → violette Punkte; simuliertes Histogramm →schwarze Linie). **(B)** Schemata des Drei-Zustandsmodell unter der Berücksichtigung, dass es nur ein Zwischenzustand bei 74 Å existiert. Für die dPDA wurden die gleichen Parameter, wie für Abbildung 4-25 verwendet.

4.1.8.5 Struktursimualtion von ssAnPRT(S254C)DA

Aus der dynamischen PDA (Kapitel 4.1.8.4, sowie Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26) wurde ein FRET-Abstand von ungefähr 60 Å ermittelt. Die AV-Simulation von ssAnPRT(S254C)DA (Kapitel 3.2.4 und 4.1.7.1) konnte dies nicht bestätigen. Da es sich bei Röntgenstrukturmodellen um statische Momentaufnahmen handelt, sind weitere Strukturkonformationen anzunehmen, die diesen FRET-Abstand realisieren können. Mit Hilfe von geometrischer Struktursimulationen, die Domänen- und *loop*-Bewegungen miteinbeziehen, können weitere Proteinkonformationen simuliert werden (Ahmed*, et al.*; 2011, Krüger*, et al.*; 2012), die mit dem AV-Modell kombiniert werden können. Der Fokus der Simulation richtete sich auf die an der Katalyse beteiligte Aminosäuren am reaktiven Zentrum (Glycin 79, Serin 91 und Arginin 164) und welchen Abstand sie zueinander annehmen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-27 gezeigt. Während sich Serin 91 (PRPP-Bindetasche) und Arginin 164 (AS I-Bindetasche) auf maximal 15 Å einander nähern können (Abbildung 4-27 C), ist der Abstand zwischen Serin 91 und Glycin 79 (AS II-Bindetasche) mit unter 7,5 Å deutlich kürzer (Abbildung 4-27 D). Es ist daher anzunehmen, dass die AS-I-Bindetasche keine katalytische Funktion besitzt. Bei der Anwendung des AV-Modells auf die Strukturdaten der Simulation (Abbildung 4-27 E) konnte nachgewiesen werden, dass ein FRET-Abstand von 60 Å möglich ist.

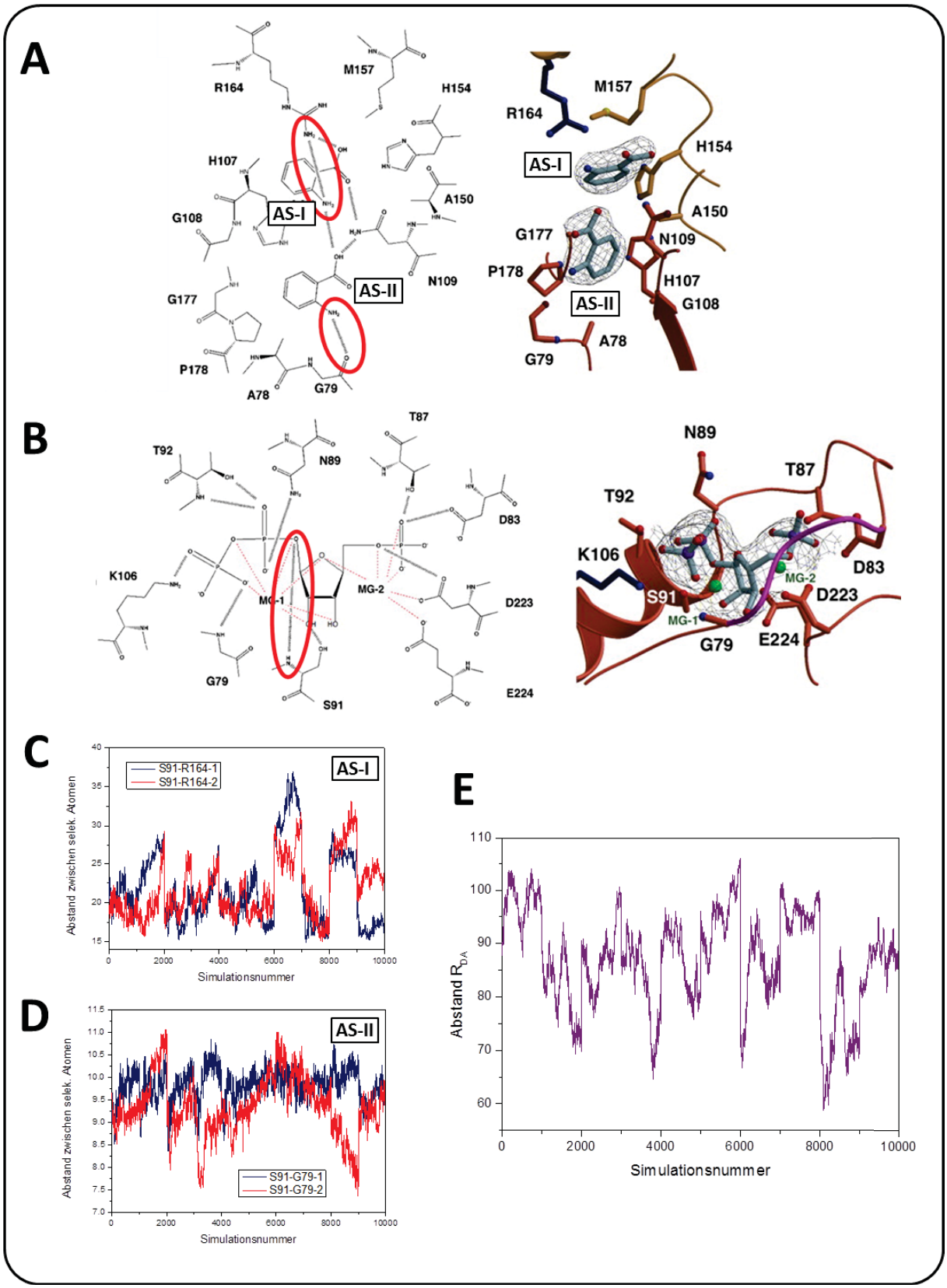


Abbildung 4-27 Geometrische Strukturisimulation von ssAnPRT(S254C)DA. (A) Lokalisation der Anthranilsäure, sowie **(B)** von PRPP in der Proteinstruktur von ssAnPRT (Marino, *et al.*; 2006). **(C)** und **(D)** Während der Struktursimulation wurden die atomaren Abstände zwischen den Aminosäuren Serin 91 (PRPP) und Gycin 79 (AS II) sowie Arginin 164 (AS I) für beide Protomere 1 und 2 ermittelt, da diese dem reaktiven Zentrum am nächsten stehen (ovale rote Kreise in (A) und (B)). **(E)** Die Struktursimulation in Kombination mit dem AV-Modell lieferte eine Verteilung möglicher FRET-Abstände aufgrund der Proteinflexibilität (Ahmed, *et al.*; 2011, Krüger, *et al.*; 2012).

4.1.8.6 MFD-Untersuchung von monomerem ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C)

Die Untersuchung des intramolekulare FRET zwischen den fluoreszenzmarkierten Cysteinen an den Positionen 14 und 254 des gleichen Protomers erfolgte durch die Mutationen I36E und M47D in der Proteinsequenz, um eine konzentrationsunabhängige Monomerisierung von ssAnPRT zu generieren. Die Variante ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C) wurde dabei erfolgreich aufgereinigt und mit Bodipy FL und Alexa 594 fluoreszenzmarkiert. Dabei sollte die Fragestellung untersucht werden, ob durch die destabilisierende Wirkung der Monomerisierung (Schwab*, et al.*; 2008) die Konformationsänderung während der Katalyse einen anderen Verlauf nimmt. Laut Aussage des AV-Modells ist keine Änderung des FRET-Signales erkennbar. Die Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopische Untersuchung wurde unter den gleichen Substratbedingungen wie in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-24 vorgenommen, und ist in Abbildung 4-28 dargestellt. Aufgrund der starken Signalverbreiterung von Bodipy FL®, wurden ausschließlich die Signale der FRET-Moleküle durch ausschließliche Selektion der Photonen der roten Kanälen dargestellt („*FRET-sensitized*“, engl.), um eventuelle Änderungen der Fluoreszenzsignale besser zu erkennen. Für die Akzeptor-Quantenausbeute Φ_A wurde 0,66 angenommen. Die für das dimere ssAnPRT(S14C, S254C) ermittelte Dynamik zwischen zwei FRET-Populationen des substratfreien Protomers (Kapitel 4.1.3) ist für diese ssAnPRT-Variante nicht erkennbar. Bei der Zugabe von Anthranilsäure und PRPP ist zunächst ein deutliche Verschiebung zu einem kleineren F_D/F_A-Verhältnis und eine Verbreitung des Signals erkennbar (Abbildung 4-28 B). Das substratfreie, sowie das mit Anthranilsäure und PRPP komplexierte Enzym zeigen eine dynamische Komponente, die zwischen τ_1 = 2,5 ns und τ_2 = 5,6 ns abgeschätzt wurde. Zusammen mit Magnesiumchlorid (Abbildung 4-28 C) ist eine weitere, wesentlich stärkere Signaländerung zu mehr FRET entlang der statischen FRET-Linie zu erkennen, obwohl dies nicht durch das AV-Modell vorhergesagt wurde. Die dynamische Komponente ist nicht mehr eindeutig zu erkennen, da bei *FRET-sensitized* Fluoreszenzsignalen der Donor-only-Anteil entfernt wurde, dieser aber Teil der dynamischen Komponente (τ_2 = 5,6 ns) sein kann. Die Konformationsänderung von monomerem ssAnPRT nimmt also einen anderen Verlauf, als das dimere Protein. Die Ergebnisse untermauern die Aussage von Schwab et al. (2008), dass die Monomerisierung von ss AnPRT einen destabilisierenden Einfluss auf das Protomer hat, trotzdem im gleichen Umfang wie wildtypisches ssAnPRT katalytisch aktiv bleibt. Für die

Stabilisierung von ssAnPRT unter hyperthermophilen Bedingungen scheint die Dimerisierung von Bedeutung zu sein.

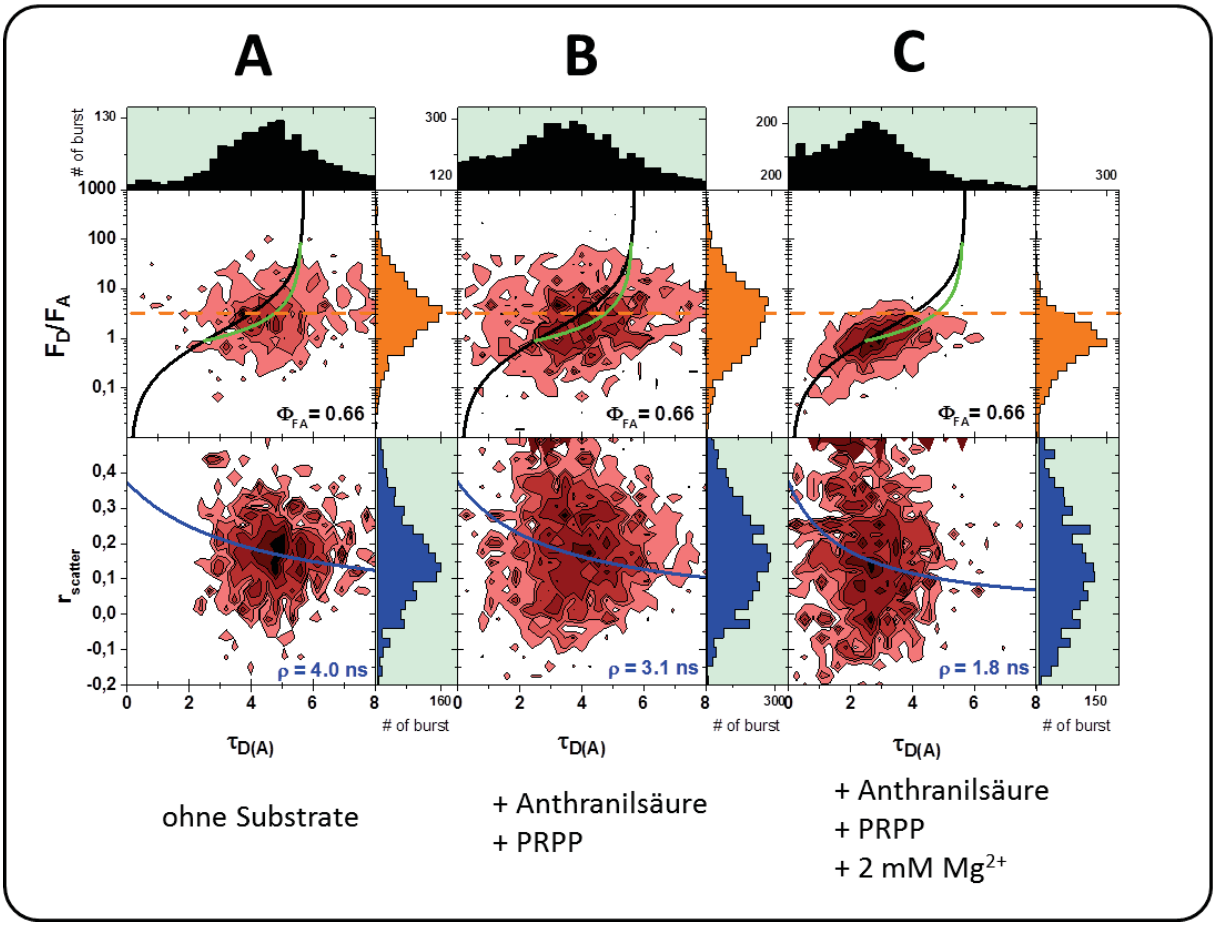


Abbildung 4-28 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchungen von monomerem ssAnPRT(S14C, I36E, M47D,S254C)DA. Bei dieser Untersuchung wurde der Fokus auf die Eigenschaften der intramolekularen MF-Population gelegt. Aufgrund des instabilen Charakters einiger ssAnPRT-Varianten in Anwesenheit von Fluoreszenzfarbstoffen wurde die monomere Variante von ssAnPRT(S14C, S254C) mit dem ladungsneutralen Donor-Fluoreszenzfarbstoff *Bodipy FL® maleimid* markiert. In Kombination mit Alexa 594 konnte dadurch der bestmögliche Markierungsgrad erzielt werden. Dargestellt sind ausschließlich die *FRET-sensitized* Fluoreszenzsignale (rotfarbende Populationen), um die signifikante Verschiebung der MF-Population in Richtung kleinerer Signalverhältnisse bei Substratzugabe stärker hervorzuheben **(B)**. Die Magnesium-induzierte Strukturänderung des Proteins **(C)** ist ebenfalls verifizierbar. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	2,186	1,111	0,0200	0,750	1,000
B	2,182	1,219	0,0200	0,750	1,000
C	2,182	1,219	0,0200	0,750	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	1,00	0,66	5,70	-0,0185	0,1961	0.4934	-0.0616
B	1,00	0,66	5,70	-0,0185	0,1961	0.4934	-0.0616
C	1,00	0,66	5,70	-0,0185	0,1961	0.4934	-0.0616

Für die dynamische FRET-Linie (Gleichung 3-26) wurden folgende Paramenter verwendet:

Abbildung	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,66	5,70	2,5	5,6	0,0000	0,0000	1,3190	-1,7866
B	0,66	5,70	2,5	5,6	0,0000	0,0000	1,3190	-1,7866
C	0,66	5,70	2,5	5,6	0,0000	0,0000	1,3190	-1,7866

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.1.9 Zusammenfassung

4.1.9.1 Problematik des Auffindens geeigneter ssAnPRT-Varianten

Proteinbiochemie. Die Schwierigkeit dieses Teilprojektes war das Auffinden geeigneter ssAnPRT-Varianten, die eine strukturelle Änderung durch Substratbindung, beziehungsweise während der Katalyse zeigten. Nur wenige der in dieser Arbeit vorgestellten Varianten konnten, trotz der Umklonierung in einen neuen pQE40-Vektor, erfolgreich in ausreichenden Mengen hergestellt werden. Ein Beispiel hierzu ist die Einzel-Cystein-Variante ssAnPRT(S14C). Während mit der Doppel-Cystein-Variante ssAnPRT(S14C, S254C) mit Hilfe von zwei Liter Kulturmedium eine Proteinausbeute von ungefähr 2000 µg erreicht werden konnte, war selbst bei einem 10 L-Kulturansatz eine maximale Ausbeute an ssAnPRT(S14C) von nur 200 µg möglich. Ein Großteil der produzierten Proteine war unlöslich und verblieb somit nach dem Zellaufschluss im Zentrifugat (*Inclusion bodies*).

Fluoreszenzmarkierung. Eine weitere Problematik stellte die Markierung von ssAnPRTmit Fluoreszenzfarbstoffen dar. Die in Kapitel 3.1.3.3 vorgestellte Methode der Proteinmarkierung war die Konsequenz aus der mangelnden Stabilität von ssAnPRT in Abwesenheit von reduzierenden Additiven, wie zum Beispiel β-Mercaptoethanol, sowie die Anwesenheit von polaren Fluoreszenzfarbstoffen. Besonders zeigte sich dies bei monomerem ssAnPRT(I36C, S39C, M47D, K280C), die nach dem AV-Modell eine theoretische Abstandsänderung von Donor und Akzeptor von ungefähr 13 Å aufzeigen sollte. Diese Variante aggregierte sofort bei Unterschreitung einer bestimmten Konzentration an Reduktionsmittel. Eine Fluoreszenzmarkierung war selbst in Anwesenheit von TCEP auf einer IMAC-Säule nicht möglich, so dass diese Variante keine Verwendung in dieser Arbeit fand. Ebenfalls wurde eine Kopplung mit Atto555 und Atto647N an ssAnPRT(S254C) in Erwägung gezogen. Aufgrund des relativ großen Försterradius von 70 Å wären Änderungen der Proteinstruktur während der Katalyse trotz des großen Abstandes Aminosäuren-Reste (C_β-

C_β-Abstand: 85 Å) wesentlich besser erkennbar gewesen, als mit der Farbstoff-Kombination Alexa 488 und 647 (Försterradius: 52 Å). Eine erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung konnte auch hier nicht realisiert werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe nicht an die Cystein koppelten.

Proteinstruktur. Geringfügige Veränderungen in der Proteinstruktur durch den Einbau von Cysteinen in ssAnPRT, bzw. durch Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe, sind nicht völlig auszuschließen. Die aus dem AV-Modell ermittelten Daten wären somit unter Messbedingungen nicht direkt vergleichbar. Das AV-Modell selbst ist ebenfalls nur eine Näherung von möglichen FRET-Abständen, da weitere Effekte, wie elektrostatische Wechselwirkungen und Strukturänderungen aufgrund der Maleimidkopplung, unberücksichtigt bleiben. Die „geschlossene“ Röntgenkristallstruktur zeigt außerdem nur ein geschlossenes Protomer. Konformationen, bei denen beide Protomere sich im geschlossenen Zustand befinden, wurden durch smFRET und Struktursimulationen nachgewiesen. Trotzdem ist das AV-Modell einer einfachen C_β-Abstandsberechnung überlegen, da es nachweislich errechnete, dass die gewählten ssAnPRT-Varianten sich nur bedingt zur Untersuchung der katalytischen Strukturänderung eigneten. Es zeigte sich, dass die durch Fluoreszenzmarkierung erkennbare intramolekulare Abstandsänderung für alle vorgestellten ssAnPRT-Varianten (außer für E5C+K280C) zwischen den ausgetauschten Aminosäuren im Bereich von einem Ångström lag. Dies war bei Erstellung der neuen ssAnPRT-Varianten noch nicht erkennbar, da hier der C_β-Abstand zwischen den Aminosäuren als entscheidendes Kriterium gewählt wurde, und das AV-Modell bis dato nicht etabliert war. Die Idee, durch den dynamischen Austausch der Monomeruntereinheiten von Wildtyp und fluoreszenzmarkierter Variante den intramolekularen FRET-Abstand zu isolieren, wurde somit verworfen.

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von funktionellen ssAnPRT-Varianten konnten in dieser Arbeit keine quantitativen Aussagen über das Ausmaß der konformellen Änderung der Proteinstruktur während der Katalyse getroffen werden. Die vorliegenden Daten reichen jedoch aus, um ein dynamisches Modell des Katalyseweges von ssAnPRT zu etablieren.

4.1.9.2 Abschließende Interpretation der Ergebnisse

Assoziationsgleichgewicht. Die homodimere Anthranilat-Phosphoribosytransferase neigt bei starker Verdünnung zur Dissoziation in seine Monomeruntereinheiten. Die Ergebnisse aus Rohrbeck (2007) konnten damit bestätigt werden, ebenso die Dissoziationskonstante K_D von ungefähr 400 nM. Ein dynamischer Monomeraustausch konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Das Assoziationsgleichgewicht ist somit ausschließlich von der Konzentration der Protomere abhängig.

Monomerisierung. Entgegen den Erwartungen aus dem AV-Modell konnten ebenfalls konformelle Änderungen an ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C)DA gezeigt werden. Nach Schwab et al. (2008) hat die Monomerisierung einen destabilisierenden Einfluss auf das Protomer und somit auch auf die Tertiärstruktur (Schwab*, et al.*; 2008). Ein strukturell anderer Verlauf der Konformationsänderung während der Katalyse wäre somit vorstellbar.

Katalysemodell. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen wurde ein Modell der Katalyse entwickelt, wie es in Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26 B schematisch gezeigt wurde. Im APO-Zustand (ohne Substrate) ist ssAnPRT ein flexibles Protein, dessen Dynamik sich bei Raumtemperatur im Millisekundenbereich bewegt. In Anwesenheit von Anthranilsäure und 5-Phosphoribosyl-α1-Pyrophosphat (PRPP) tritt bereits eine erkennbare Konformationsänderung der Proteinstruktur ein, die mit einer stark verringerten Flexibilität einhergeht. Die Zugabe von katalytisch aktiven Magnesiumionen bewirkte eine weitere, deutlich ausgeprägtere Strukturänderung durch mögliche Bildung eines AS-Mg-PRPP-Komplexes innerhalb der Substratbindetasche von ssAnPRT, wie er schon in Schlee et al. (2009) beschrieben wurde. Dies zeigte sich insbesondere durch das Auftreten einer weiteren Relaxationszeit von 298 µs. Diese Konformationsänderung ist bedeutend größer, als im AV-Modell erwartet wurde. Da die Substrate in der Röntgenkristallstruktur, die als „geschlossene Konformation“ bekannt ist, noch zu weit entfernt sind (AS II: 5,9 Å und AS I: 12,0 Å), um miteinander in einer nukleophilen Substitution zu reagieren, ist eine stärkere Änderung der Proteinstruktur für die Reaktion erforderlich. Durch geometrische Struktursimulation wurde deutlich, dass solche Proteinkonformationen möglich sind. Deutlich wurde auch, dass die offene Konformation („open“, O) bei ssAnPRT aufgrund der Geschwindigkeitskonstanten dominierend ist, und es sich bei Substratstättigung um einen dreistufigen Katalyseprozess handelt (Abbildung 4-26 B und Abbildung 4-31).

A

Substrat-bedingung	OO	OC	CC
ohne	73,0%	27,0%	0,0%
AS PRPP	55,6%	36,2%	8,2%
AS PRPP Mg^{2+}	48,8%	42,8%	9,2%

B

C

Substrat-bedingung	k_{OC} [ms^{-1}]	k_{CO} [ms^{-1}]	K_{dyn} OO → OC	t_R [ms]	k_{OC} [ms^{-1}]	k_{CC} [ms^{-1}]	K_{dyn} OC → CC	t_R [ms]
ohne	0,147	0,397	0,37	1,84	-	-	-	-
AS PRPP	-	-	-	-	0,064	0,281	0,23	2,90
AS PRPP Mg^{2+}	0,117	0,210	0,56	3,06	1,290	2,070	0,62	0,298

Abbildung 4-29 Zusammenfassung der kinetischen Beschreibung des Katalyseweges von ssAnPRT. (A) Prozentuale Anteile am dyamischen Prozess (vgl. Gleichung 8-1, Anhang)der untersuchten Substratbedingung, tabellarisch und **(B)** grafisch. **(C)** Geschwindigkeitskonstanten *k* und Gleichgewichtskonstanten K_{dyn} (vgl. Gleichung 8-2, Anhang) für die untersuchten Substratbedingungen.

Trotz der Sättigung mit Substraten bleibt der Anteil der geschlossene Konformation („closed“, C) deutlich unter 10%, obwohl dieser nach Zugabe von Magnesium deutlich an Dynamik gewinnt (Abbildung 4-29 C). Nach Schlee et al. (2009) tritt bei Mg^{2+}-Konzentrationen über 0,1 mM eine Inhibierung der Katalyse durch die Bindung eines Mg_2-PRPP-Komplexes an ssAnPRT ein, der in den unproduktiven AS-Mg_2-PRPP-Zustand übergehen kann. Somit verharrt das Enzym wahrscheinlich im halboffenen Zustand und der Übergang zur geschlossenen Konformation wird verhindert.

Nach den vorliegenden Erkenntnissen ist die Produktfreisetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des katalytischen Zyklus, der nach Schlee et al. (2009) im Sekundenbereich liegt (Umsatzzahl k_{off} = 0,33 s^{-1} bei 37 °C). Das Öffnen und Schließen des Enzyms erfolgte bei Raumtemperatur bereits deutlich schneller. Die Bildung des AS-Mg-PRPP-Komplexes scheint durch Energiegewinn die Triebkraft zu sein, die das Protein zur

Konformationsänderung veranlasst. Der Energiegewinn durch die Abspaltung von Pyrophosphat wird vermutlich für die eigentliche Reaktion zu PRA gebraucht.

Résumé. Durch die vorliegende Kombination aus verschiedenen Teckniken der Fluoreszenzspektroskopie und Analyseverfahren ist es gelungen, strukturelle Änderung von ssAnPRT während der Katalyse und die Scharnierbewegung unter Zuhilfenahme des AV-Modells nachzuweisen und ein dynamisches Modell der Katalysedynamik zu etablieren. Des Weiteren konnten Aussagen über das Assoziationsgleichgewicht der Protomere getroffen werden. Insbesondere die Kombination aus FCCS und dPDA („*Combined dynamic PDA*“, cdPDA) war richtungsweisend für die Identifizierung der dynamischen Intermediate des Katalysezyklus. Die Zuordnung der ermittelten Relaxationzeiten zu den einzelnen Proteinkonformationen ist eindeutig. Eine genauere Beschreibung der Architektur der Scharnierbewegung war aufgrund der mangelnden Generierung funktioneller ssAnPRT-Varianten nicht möglich.

4.2 Modellsystem II: Untersuchung der konformalen Zustände des ABC-Transporters *Lactococcal Multidrug Resistance Protein A*

Die Untersuchung der Scharnierbewegung der Transmembrandomäne (TMD), sowie die noch unbekannte Strukturänderung der Nukleotidbindenen Domäne (NBD) von LmrA aus *Lactococcus Lactus* während des Substrat-Transportes machte es erforderlich, die verschiedenen Stadien des Bindungs- und Beförderungsprozesses zu fixieren. Aufgrund der Annahme, dass Konformationsänderungen der Nukleotidbindenden Domäne (NBD) zu einer entsprechenden Konformationsänderung der Transmembrandomäne (TMD) führt, wurde mit Hilfe von 10 mM ATP (Stadium II, Abbildung 1-7) und 10 mM ADP, 10 mM Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) sowie 5 mM Berylliumfluorid (BeF_X) (Stadium III, Abbildung 1-7) die Konformationen von LmrA während des Transportzykluses „eingefroren". Die hierfür erforderliche Proteinproduktion und Fluoreszenzmarkierung wurde von Dr. Ute Hellmich vom Institut für Biophysikalische Chemie der Goethe Universität Frankfurt am Main durchgeführt. Die Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung erfolgte am Institut für Molekulare Physikalische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

4.2.1 Fluoreszenzmarkierung von LmrA

Die Positionen für die Fluoreszenzmarkierung wurden so gewählt, dass sowohl Konformationsänderungen der Transmembrandomäne, als auch der Nukleotidbindenden Domäne erfasst werden konnten (Abbildung 4-30). Dazu wurden mittels „*site-directed*" Mutagenese das Serin an Position 282 in der TMD (α-Helix 6, Ecker, *et al.*; 2004), sowie Alanin an Position 573 in der NBD, gegen Cysteine mutiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mittels Thiol-Maleinid-Kopplung mit den Fluoreszenzfarbstoffen *Alexa Fluor® 488 C_5 Maleimid* (Donor) und *Alexa Fluor® 647 C_2 Maleimid* (Akzeptor). Der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff an Position 282 berechnete sich nach dem AV-Modell zu $\langle R_{DA} \rangle_{FRET} = 52$ Å (TMD) und an Position 573 $\langle R_{DA} \rangle_{FRET} = 44$ Å (NBD), so dass theoretisch eine ausreichende Transfereffizenz für den FRET gewährleistet war. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte nach (Hellmich*, et al.*; 2009) auf einer IMAC-Säule. Danach wurden mit ATP, bzw. ADP, $MgSO_4$, und BeF_X, die verschiedenen Transportzustände fixiert.

Die Markierungseffizienz für LmrA(S282C)DA betrug 14% für Alexa 488 und 5% für Alexa 647, entsprechend für LmrA(A573C)DA 11% (Alexa 488) und 10% (Alexa647).

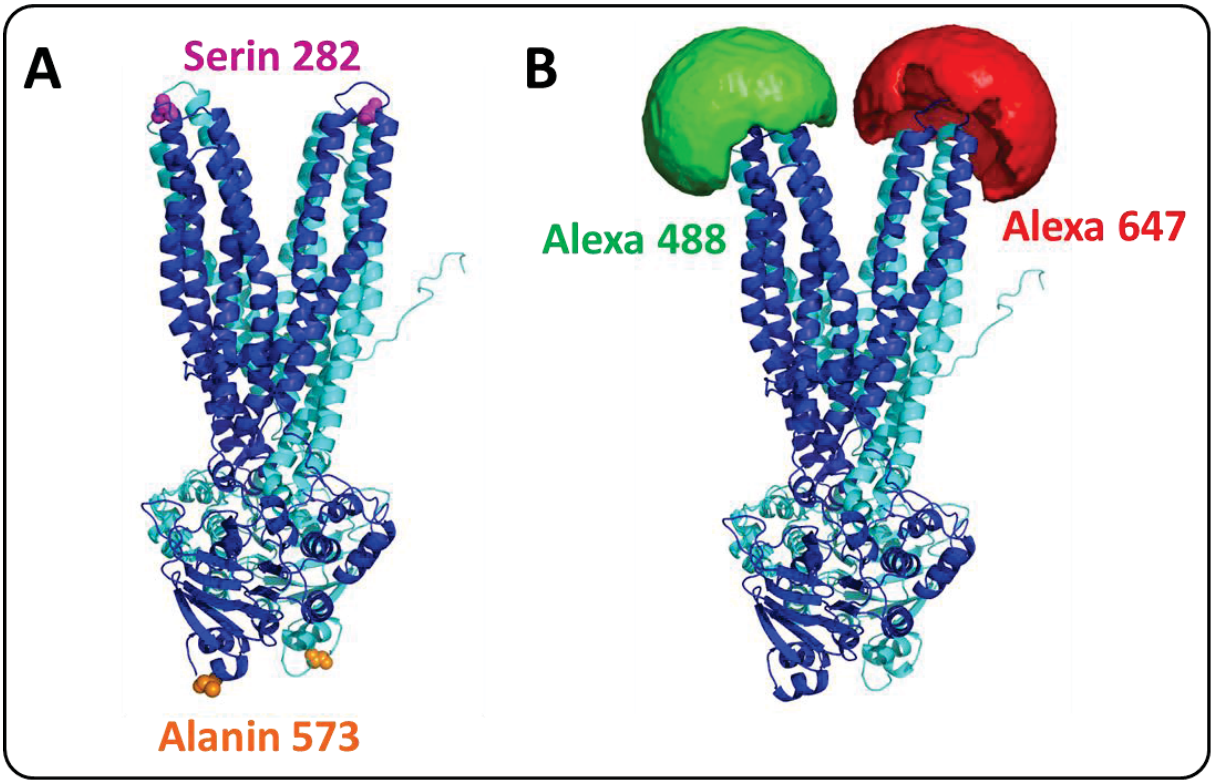


Abbildung 4-30: Fluoreszenzmarkierung an LmrA. (A) Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch Einbau von Cysteinen in die Proteinstruktur an der Aminosäure Serin an Position 282 (TMD), sowie an Alanin an Postition 573 (NBD). **(B)** Das AV-Modell berechnete den Abstand zwischen einem Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff an Position 282 zu $\langle R_{DA} \rangle_{FRET} = 52$ Å (als Aufenthaltswahrscheinlichkeiten dargestellt) und an Position 573 zu $\langle R_{DA} \rangle_{FRET} = 44$ Å. Das Homologiemodell wurde am Institut für Biochemie der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf (Schmitz; 2007), erstellt.

4.2.2 Stabilisierung von LmrA mittels Detergenz

Aufgrund seiner Eigenschaften als Membranprotein musste LmrA für die Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen mittels Detergenz stabilisiert werden. Aus diesem Grund wurde durch Zugabe im 100fachen Überschuss zur Proteinkonzentration (500 pM) die Detergenzien 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC), bzw. n-Hexadecyl-phosphocholin (FOS-Choline®-16), gelöst im Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5), getestet. Um die Auswirkungen der Interaktionen zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Detergenz zu erforschen, wurde das wildtypische LmrA ohne Cystein-Mutationen „DA-fluoreszenzmarkiert“ und mit smFRET untersucht (Abbildung 4-31). Dabei zeigte sich, dass Alexa 488, wahrscheinlich durch seinen hydrophoben Charakter, eine starke Affinität zu

POPC besitzt (Abbildung 4-31 A), während FOS-Choline®-16 einen deutlich geringeren Einfluss auf den Farbstoff hat (Abbildung 4-31 B). Der Einfluss der Detergenzien auf den Akzeptor-Farbstoff Alexa 647 konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Möglicherweise adsobiert der Donor-Farbstoff im Falle von POPC am Detergenz und Protein, der Akzeptorfarbstoff erfährt eine Ad- und Desorption, welche in einer Pseudodynamik resultiert. Bei FOS-Choline®-16 scheint dieser Effekt nicht aufzutreten. Der Grund für die ausgeprägte HF-Population könnte eine Interkalation der Farbstoffe in die Proteinstruktur sein. Aufgrund der geringen Zählrate im Histogramm erwies sich FOS-Choline®-16 als das geeignetere Detergenz.

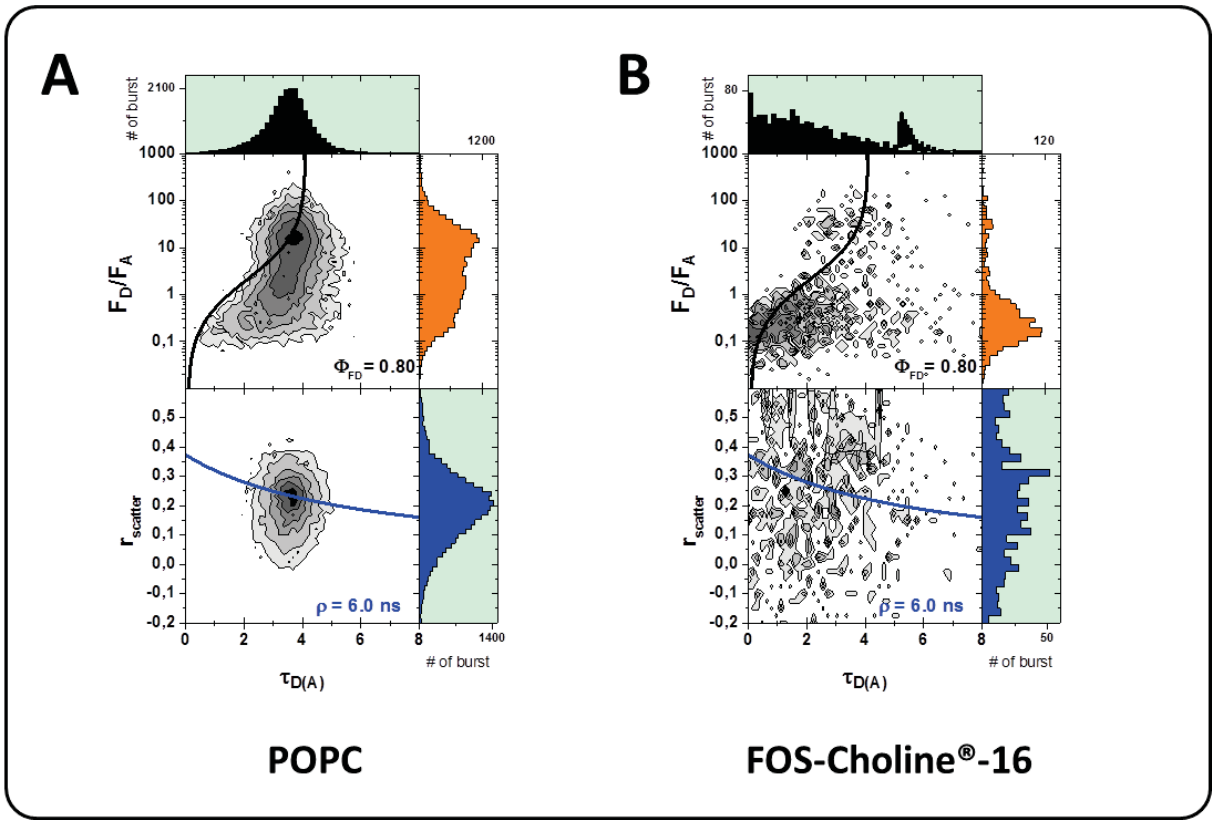


Abbildung 4-31: Untersuchung der Affinität der Fluoreszenfarbstoffe zum Detergenz und zu wildtypischen LmrA mit smFRET. Die Pseudofluoreszenzmarkierung erfolgte mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und 647 in **(A)** Anwesenheit von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC), wobei eine starke Affinität von Alexa 488 zu erkennen ist. Der pseudodynamische FRET-Anteil ist wahrscheinlich ein Resultat von Ad- und Desorption von Alexa 647. **(B)** Die Pseudofluoreszenzmarkierung in Anwesenheit von FOS-Choline®-16. Die starke Affinität des Donors zum Protein/Detergenz-Komplex ist deutlich weniger ausgeprägt. Die signifikant erkennbare HF-Population deutet auf eine Interkalation beider Farbstoffe in die Proteinstruktur hin. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	3,247	1,512	0,0170	0,4000	1,0000
B	0,630	0,547	0,0100	0,6700	1,0000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,80	0,32	4,1	-0,0358	0,2726	0,4934	-0,0443
B	0,80	0,32	4,1	-0,0358	0,2726	0,4934	-0,0443

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der verschiedenen Stadien des Transportmechanismus

4.2.3.1 Untersuchung der Transmembrandomäne

Die Identifizierung struktureller und dynamischer Zustände der TMD in LmrA erfolgte mit eTCSPC und Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie. Die ermittelten Fluoreszenzlebensdauern aus eTCSPC, sowie die daraus ergebenen Fluoreszenzquantenausbeuten sind für LmrA(S282C)DA bei verschiedenen Transportzuständen in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Tabelle 4-8: Fluoreszenzlebensdauern von LmrA(S282C)DA aus eTCSPC. Φ_{FA} wurde mit $\Phi_{ref(A)} = 0{,}33$ und $\tau_{ref(A)} = 0{,}989$ ns bestimmt (Ex: Anregungswellenlänge, Em: Emissionswellenlänge).

LmrA(S282C)DA	Zustand I APO	Zustand II + ATP	Zustand III + ADP + $MgSO_4$ +BeF_X
$\tau_{x\,D(A)}$ [ns] (X) Ex 495 nm Em 520 nm	3,334 (0,444) 1,761 (0,305) 0,417 (0,251)	3,927 (0,721) 1,936 (0,171) 0,426 (0,108)	3,601 (0,658) 1,397 (0,265) 0,440 (0,077)
$\tau_{x\,A}$ [ns] (X) Ex 650 nm Em 670 nm	2,184 (0,705) 1,520 (0,295)	2,261 (0,313) 1,723 (0,687)	2,183 (0,495) 1,618 (0,505)
$\langle\tau\rangle_x^A$ [ns]	**2,04**	**1,92**	**1,94**
Φ_{FA}	**0,68**	**0,64**	**0,65**

Die Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des APO-Zustandes (Zustand I, Abbildung 1-7) der TMD (Abbildung 4.4-3 A) zeigte eine nicht klar lokalisierte FRET-Verteilung entlang der statischen FRET-Linie mit einer dynamischen Komponente zwischen

$\tau_1 =$ 3,3 ns und $\tau_2 =$ 1,8 ns (Tabelle 4-8). Die Inkubation mit ATP änderte die strukturelle Konformation von LmrA insoweit (Transportzustand II, Abbildung 1-7), dass ein geringer Energietransfer zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen stattfand, wie es durch Abnahme der Fluoreszenzsignale im FRET-Anteil zu erkennen ist (Abbildung 4-32 B). Ein dynamischer Fluoreszenzanteil ist dadurch nicht mehr zu erkennen. Zudem erscheint im Histogramm für die Fluoreszenzanisotropie $r_{scatter}$ (Abbildung 4-32 B, unteres Diagramm) eine weitere Population, für die eine Rotationskorrelationszeit von ρ = 0,7 ns angenommen wurde. Im Transportzustand III (Abbildung 1-7) erscheint eine neue, klar umrissene LF-Population ohne dynamisches Verhalten (Abbildung 4-32 C). Die beiden Anisotropie-Populationen waren im Transportzustand III etwa gleich stark ausgeprägt.

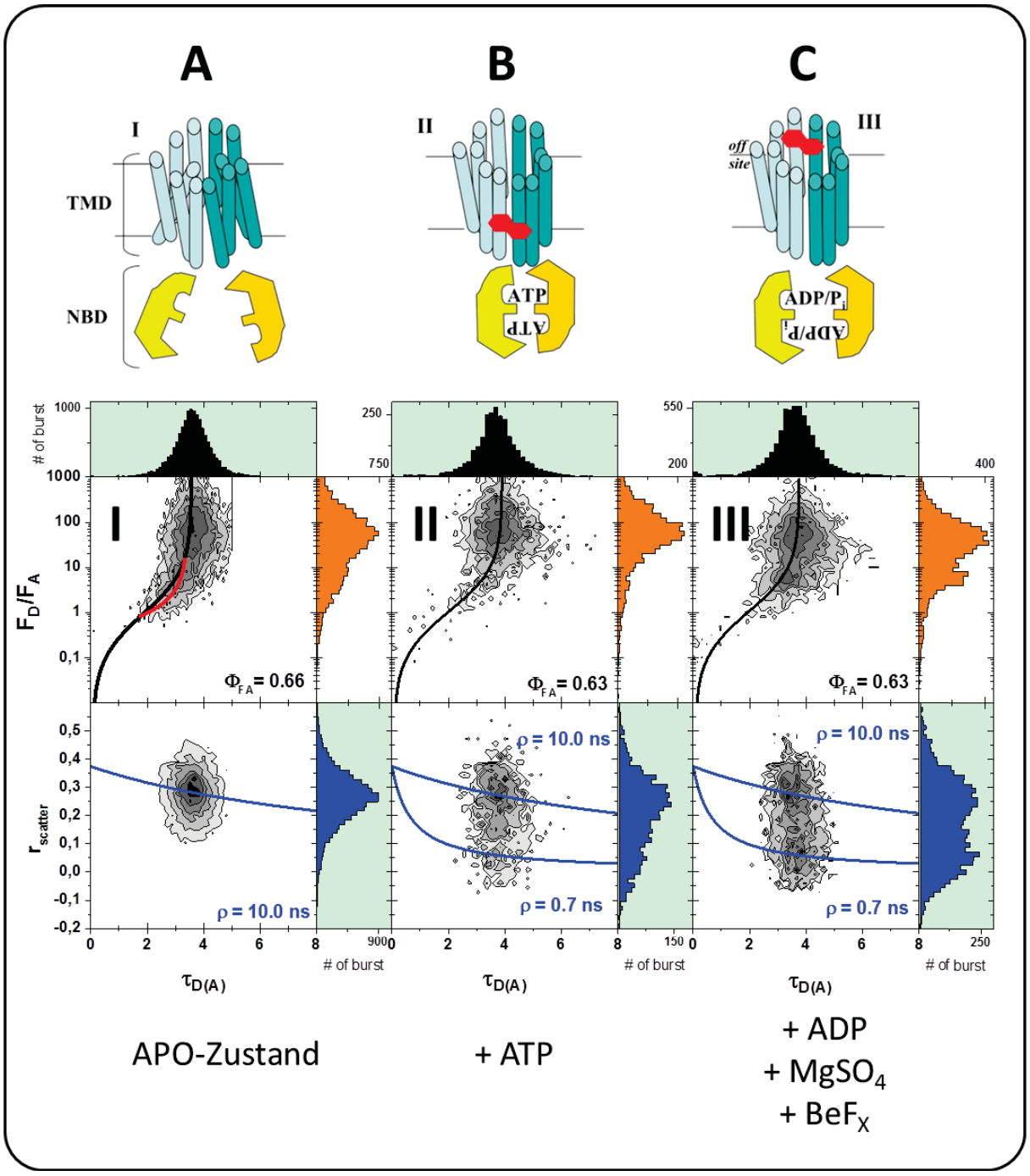


Abbildung 4-32: Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung an LmrA(S282C)DA. (A) Im APO-Zustand (I) besitzt die TMD einen dynamischen Anteil (rote Linie). Die Abweichung von der statischen-FRET-Linie (schwarz) ist allerdings nur geringfügig. **(B)** Durch Inkubation mit ATP geht LmrA in einen strukturierteren Zustand über (II), der in einem geringeren FRET von Donor zu Akzeptor resultiert. Der dynamische Anteil ist dadurch nicht mehr zu erkennen. **(C)** In Zustand III erscheint eine neue, klar umrissene LF-Population auf der statischen FRET-Linie. Für die Zustände II und III kann eine zweite kurze Rotationskorrelationszeit ρ = 0,7 ns verifiziert werden. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	2,2600	0,8750	0,0170	0,4000	1,000
B	2,7530	1,1730	0,0170	0,4000	1,000
C	2,7080	1,1140	0,0170	0,4000	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,71	0,66	3,56	-0.0486	0.3225	0.4787	-0.0398
B	0,78	0,63	3,90	-0.0397	0.2883	0.4902	-0.0425
C	0,75	0,63	3,76	-0.0431	0.3017	0.4856	-0.0414

Für die dynamische FRET-Linie (Gleichung 3-26) wurden folgende Paramenter verwendet:

Abbildung	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,66	3,56	1,95	3,32	0,0000	0,0000	1,2898	-0,9681

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

Die TMD ist offensichtlich kein starres Gerüst, sondern bleibt im APO-Zustand flexibel. Die Inkubation mit ATP bewirkt eine strukturelle Änderung, so dass der FRET zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen kaum noch verifiziert werden kann. Daher kann auch keine Aussage über die Dynamik dieses Zustandes getroffen werden. Strukturierter ist LmrA im Zustand III nach Inkubation mit ADP, $MgSO_4$ und BeF_X durch Auftreten einer weiteren LF-Population mit einer klar definierten Histogramm-Verteilung. Bemerkenswert ist das Auftreten der Anisotropie-Population mit ρ = 0,7 ns für die Zustände II und III. Die Interpretation dieses Ergebnisses lässt auf eine mögliche Dissoziation des Homodimers schließen.

4.2.3.2 Untersuchung der Nukleotidbindenen Domäne

Die Scharnierbewegung der Nukleotidbindenen Domäne, die mit Hilfe von LmrA(A573C)DA analog zu LmrA(S282C)DA mit smFRET und eTCSPC untersucht wurde, zeigte ebenfalls einen dynamischen Anteil im APO-Zustand (Transportzustand I, Abbildung 4-33 A). Die Grenzzustände für die Fluoreszenzlebensdauer betragen $\tau_1 =$ 1,9 ns und $\tau_2 =$ 3,7 ns (Tabelle 4-9). Nach Inkubation mit ATP konnte dieser Zustand ebenfalls fixiert werden (Abbildung 4-33 B). Auch hier erscheint im Histogramm der Fluoreszenzanisotropie $r_{scatter}$ (Abbildung 4-33 B, unteres Diagramm) eine weitere Population mit ρ = 0,7 ns, welche eine noch stärkere Ausprägung im Transportzustand III (Abbildung 4-33 C) erfährt. Wie bereits bei der TMD beobachtet wurde, tritt eine weitere FRET-Population stärker in Erscheinung, die im

Gegensatz LmrA(S282C)DA auf einer dynamischen FRET-Linie mit den Fluoreszenzlebensdauer-Grenzzuständen von $\tau_1 =$ 1,9 ns und $\tau_2 =$ 3,7 ns (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Fluoreszenzlebensdauern von LmrA(A573C)DA aus eTCSPC. Φ_{FA} wurde mit $\Phi_{ref(A)} =$ 0,33 und $\tau_{ref(A)} =$ 0,989 ns bestimmt (Ex: Anregungswellenlänge, Em: Emissionswellenlänge).

LmrA(A573C)DA	Zustand I APO	Zustand II + ATP	Zustand III + ADP + $MgSO_4$ +BeF_X
$\tau_{x\,D(A)}$ [ns] (X)	3,234 (0,365) 1,653 (0,323) 0,389 (0,312)	3,689 (0,771) 1,236 (0,161) 0,459 (0,068)	3,615 (0,567) 1,699 (0,246) 0,541 (0,187)
$\tau_{x\,A}$ [ns] (X)	2,133 (0,469) 1,521 (0,531)	1,914 (0,541) 1,392 (0,459)	1,991 (0,488) 1,394 (0,512)
$\langle\tau\rangle_x^A$ [ns]	**1,86**	**1,72**	**1,74**
Φ_{FA}	**0,62**	**0,57**	**0,58**

Die NBD bleibt, wie TMD, im APO-Zustand flexibel. Die Dynamik der NBD ist im F_D/F_A-Diagramm deutlicher als für die TMD zu erkennen. Mit ATP konnte die Scharnierbewegung, die sich über zwei Protomere erstreckt, erfolgreich fixiert werden. Das Auftreten einer dynamischen FRET-Population nach Inkubation mit ADP, $MgSO_4$ und BeF_X war unerwartet und deutet auf eine neue dynamische Substruktur der NBD hin, die mit den Substraten nicht fixiert werden kann. Die Anisotropie-Population mit ρ = 0,7 ns für die Transportzustände II und III tritt auch für die NBD auch. Es ist daher keine spezifische Eigenschaft der TMD, sondern betrifft das gesamte Dimer.

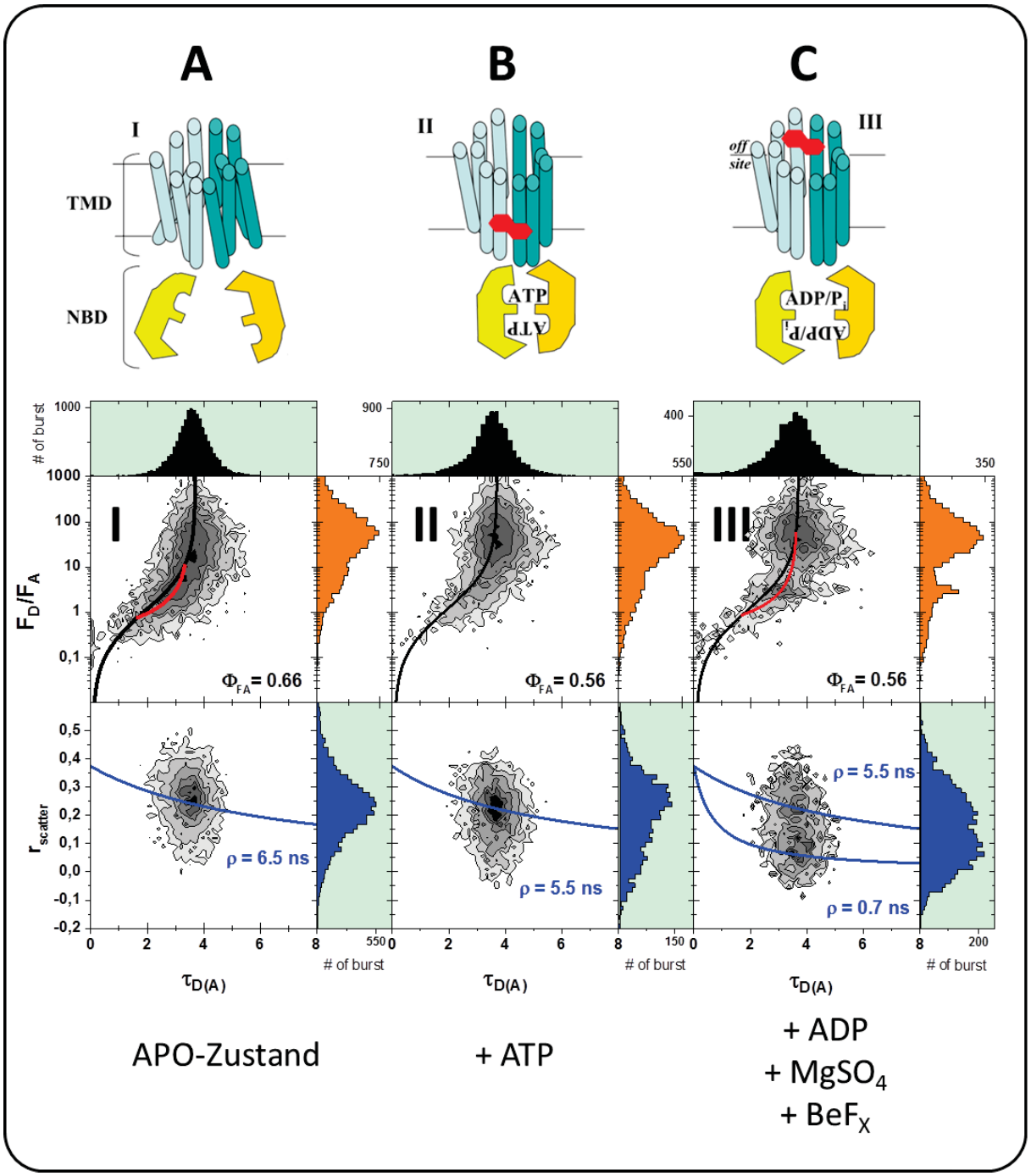


Abbildung 4-33: Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung an LmrA(A573C)DA. Wie bereits für die Variante S282C-DA erkennbar war, kann auch für die Nukleotidbindende Domände im APO-Zustand (I) eine dynamische 1komponente (rote Linie) identifiziert werden. **(B)** Die Inkubation mit ATP fixiert auch hier die Konformation des Proteins. Ein dynamischer Anteil kann aufgrund der Verbreiterung der FRET-Population angenommen, aber durch eTCSPC-Daten nicht bestätigt werden. **(C)** Hingegen konnte für den Zustand III durch die deutliche Hervorhebung einer LF-Population, wie schon für LmrA(S282C)DA auf der statischen FRET-Linie zu erkennen ist, erneut ein dynamischer Anteil eindeutig gezeigt werden (rote Linie). Im Histogramm für die Anisotropie erscheint, wie bereits auch für die Transmembrandomäne, in den Zuständen II und III eine Rotationskorrelationszeit von ρ = 0,7 ns, wie sie bereits für LmrA(S282C)DA bestimmt wurde. Weitere Parameter für die Erstellung der 2D-Histogramme sind im Anhang aufgeführt. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

Abbildung	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
A	2,2600	0,8750	0,0170	0,4000	1,000
B	2,7530	1,1730	0,0170	0,4000	1,000
C	2,7080	1,1140	0,0170	0,4000	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,75	0,60	3,70	-0.0446	0.3075	0.4836	-0.0409
B	0,74	0,56	3,70	-0.0446	0.3075	0.4836	-0.0409
C	0,74	0,56	3,70	-0.0446	0.3075	0.4836	-0.0409

Für die dynamischen FRET-Linien (Gleichung 3-26) wurden folgende Paramenter verwendet:

Abbildung	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
A	0,60	3,70	1,87	3,32	0,0000	0,0000	1,3437	-1,1471
C	0,56	3,70	1,91	3,66	0,0000	0,0000	1,3081	-1,1141

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.2.4 Zusammenfassung

Den Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopischen Messungen ist eine Reihe von Versuchen zur Fluoreszenzmarkierung mit unterschiedlichen Cystein-Varianten von LmrA vorrangegangen. Aufgrund der Vorlage eines Homologiemodelles ist eine Zugänglichkeit der eingebauten Cystein-Aminosäurereste schwer vorherzusagen. Ein Ansatz bietet hierfür die Veröffentlichung von Poelarends und Konings (Poelarends*, et al.*; 2002), die die Zugänglichkeit einiger Cystein-Varianten untersucht haben. Der Einsatz von Detergenzien bei der Fluoreszenzmarkierung ist aufgrund ihres unspezifischen Bindungsverhaltens an Proteinen problematisch und äußert sich in einer geringen Markierungseffizienz. Mit den LmrA-Varianten S282C und A573C ist es erstmals gelungen, eine hinreichende Fluoreszenzmarkierung an den Cystein-Kopplungsstellen zu generieren, so dass strukturelle Änderungen des Membranproteins während des Transportprozesses erkennbar waren. Die beobachtbaren Dynamiken im APO-Zustand von LmrA sind wahrscheinlich auf eine Notwendigkeit zur Flexibilisierung bei Aufnahme eines Substrates, bzw. von ATP, zurückzuführen. Aufgrund der Änderung der FRET-Verteilungen beim Übergang in die anderen Transportzustände ist eine Beteiligung der fluoreszenzmarkierten sechsten α-Helix der TMD am Transportzyklus, wie er in Ecker et al. (2004) postuliert wurde, anzunehmen. Bei beiden Proteinvarianten trat im dritten Transportzustand eine weitere, klar umrissene FRET-Population auf, die auf das Erscheinen einer weiteren Substruktur hindeutet. Die Dynamiken der NBD im Transportzustand III (Abbildung 4.4-4 C) sind hingegen nicht hinreichend

erklärbar und auch in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es ist wahrscheinlich, dass der Assoziations- und Dissoziationsprozess des ADP für die beobachteten Dynamiken der NBD im dritten Transportzustand verantwortlich ist. Eine genauere Quantifizierung der strukturellen Änderung während des Transportprozesses lassen die vorliegenden Daten nicht zu, so dass der Transportmechanismus nicht zufriedenstellend erklärt werden.

Aufgrund der unspezifischen Wechselwirkungen zwischen fluoreszenzmarkiertem Protein, Substraten und Detergenz sind andere Stabilisierungsmaßnahmen für Einzelmolekül-spektroskopischen Untersuchungen erforderlich. Ein Lösungsansatz bietet die funktionelle Rekonstitution integraler Membranproteine in nanoskaliden Phospholipid-Doppelschichtsystemen (Abbildung 4-34), den sogenannten *Nanodiscs*^{TM} (Bayburt*, et al.*; 2002a, Bayburt*, et al.*; 2003, Bayburt*, et al.*; 2002b). Diese selbstorganisierenden Modellmembranen bestehen aus zwei amphipathischen Gerüstproteinen (MSP, engl. *membrane scaffold protein*), in denen Lipoproteine von hoher Dichte (HDL, *high density lipoprotein*) integriert sind. Der strukturelle Aufbau der Nanodiscs ermöglicht eine stärkere Solubilisierung integraler Membranproteine in ihrer funktionellen Form. Dadurch sind sie analytischen Methoden zugänglich, die bisher nur für lösliche Proteine möglich waren. Da bereits eine Vielzahl von Membranproteinen in Nanodiscs rekonstituiert, und das Verfahren standarisiert und kommerzialisiert wurde, ist eine erfolgreiche Integration von LmrA in Nanodiscs und anschließende Fluoreszenzmarkierung durch weitere Forschungsarbeit wahrscheinlich.

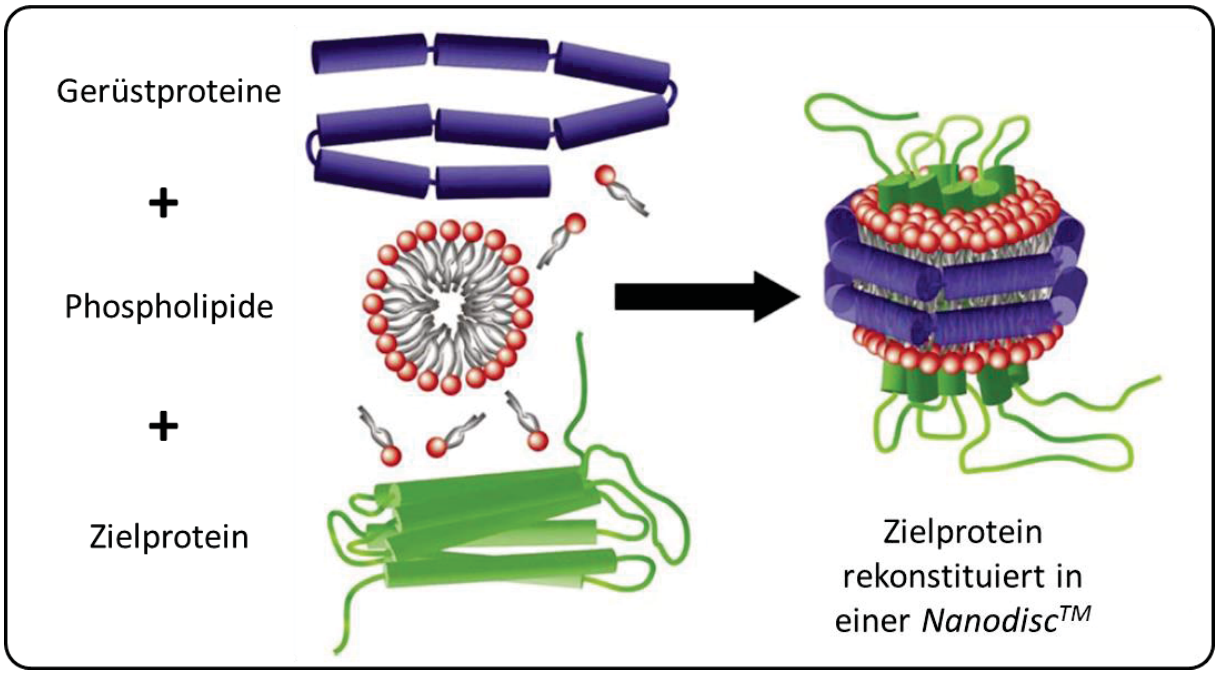


Abbildung 4-34: Integration eines integralen Membranproteins in ein nanoskalides Phospholipid-Doppelschichtsystem (*Nanodiscs*^{TM}). *Nanodiscs*^{TM} bestehen aus Lipoproteine von hoher Dichte, die durch zwei Gerüstproteine zusammengehalten werden. In die Phospholipid-Schicht können integrale Membranproteine rekonstituiert werden. Modifizierte Abbildung aus Leitz et al. (2006), *BioTechniques* (Leitz*, et al.*; 2006).

4.3 Modellsystem III: Untersuchungen zur strukturellen Dynamik von *Postsynaptic Density Protein 95*

Die qualitative und quantitative Untersuchung der strukturellen Dynamik von PSD-95 wurde mit Hilfe von Doppel-Cystein-Varianten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden alle natürlich vorkommenden Cysteine mit Hilfe eines *QuikChange Lightning Multi Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) entfernt und durch Serine ersetzt. Mit der gleichen Methode wurden Cysteine an der gewünschten Stelle des Proteins für die Fluoreszenzmarkierung über Maleimid-Gruppen eingebaut. Die Mutagenese erfolgte im Vektor pET28a, die Expression im Bakterium *Rosetta* der Firma Novagen. Für die Aufreinigung von PSD-95 erfolgte durch IMAC, Anionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie. Der *His_6-Tag* wurde nach der IMAC mit TEV (engl., *Tobacco Etch Virus*) Protease entfernt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte in 25 mM Hepes, 300 mM NaCl und 0,5 mM TCEP bei pH 7.4 über Nacht bei 4°C. Dabei wurde *Alexa Fluor® 488 C_5 Maleimid* und *Alexa Fluor® 647 C_2 Maleimid* im Verhältnis eins zu fünf relativ zur Proteinkonzentration eingesetzt. Nicht reagierter Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Hilfe einer Entsalzungssäule (Sephadex G-50, GE Healthcare) entfernt. Der Markierungsgrad für jede Probe betrug über 90 Prozent (McCann*, et al.*; 2012). Die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Arbeiten, sowie die Fluoreszenzmarkierung, wurden vom Institut für Physiologie und Biophysik an der *Stony Brook* Universität durchgeführt. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und deren Analyse erfolgte im Rahmen dieser Arbeit am Institut für Molekulare Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und wurden mit *Pulsed Interleaved Excitation* (PIE), sowie mit eTCSPC und seTCSPC, realisiert.

4.3.1 Übersicht der untersuchten Domänen-Interaktionen in PSD-95

Für diese Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene Varianten von PSD-95 mit Fluoreszenzmarkern an verschiedenen Domänen untersucht, um deren dynamische Beziehung untereinander zu identifizieren und zu quantifizieren. Der Schwerpunkt der Untersuchungen bildete die dynamische Interaktion zwischen den PDZ-Domänen 2 und 3, sowie der Interaktionen zwischen den Domänen im Proteinkomplex aus Guanylat-Kinase

(GuK), der *SCR Homology 3*-Domäne (SH3) und PDZ 3 untereinander. Eine Übersicht der untersuchten Interaktionen zeigt Abbildung 4-35.

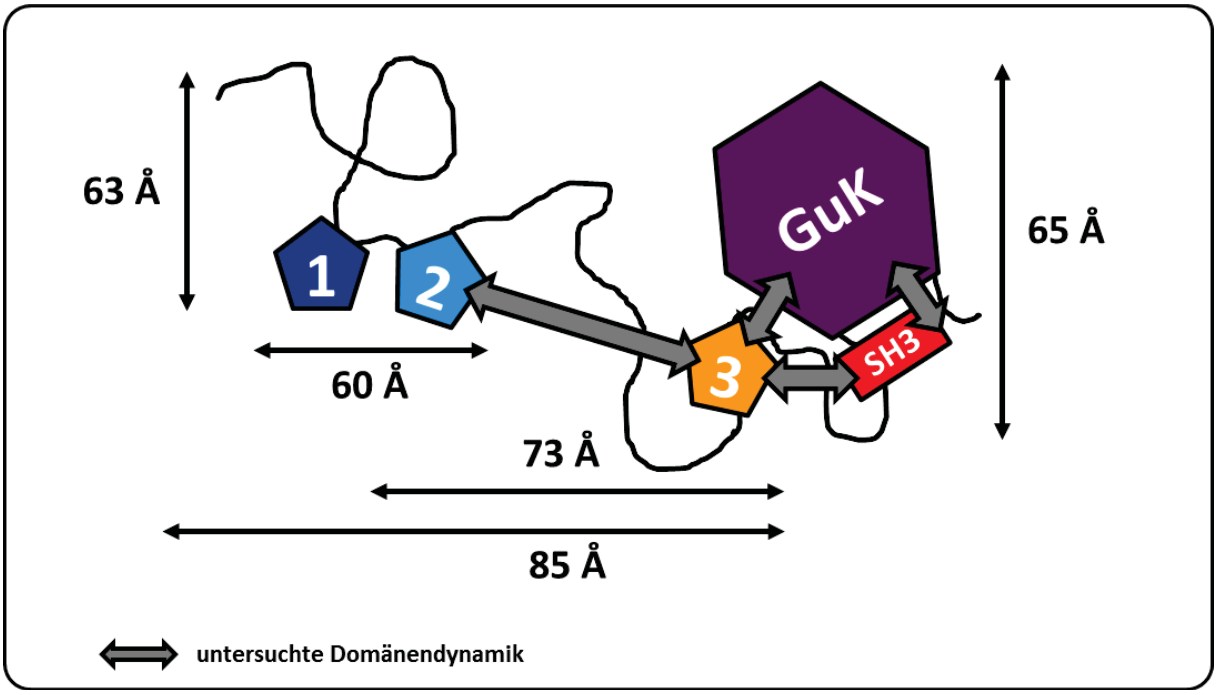


Abbildung 4-35: Schematische Zeichnung von PSD-95. Dargestellt ist die volle Länge des Proteins mit den Domänen PDZ 1 bis 3, der inaktiven Guanylat-Kinase (GuK), sowie der Domäne *SCR Homology 3*. Die durchschnittlichen Proportionen des Proteins sind als schwarze Doppelpfeile dargestellt und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den smFRET-Ergebnissen aus McCann et al. (2012). Die in dieser Arbeit untersuchten Domänen-Interaktionen sind als graue Doppelpfeile dargestellt.

4.3.2 Analyse der Messdaten

4.3.2.1 Untersuchung auf Messartefakte

Die Ergebnisse der zweifarbigen Fluoreszenzanregung im Einzelmolekülmaßstab (PIE) wurden auf experimentelle Artefakte, wie Akzeptorbleichung und unvollständige Fluoreszenzmarkierung, untersucht. Effekte durch Adsorption von fluoreszenzmarkiertem PSD-95 an die Wand der Probenkammer wurden durch Auftragung der FRET-Transfereffizienz E(PIE) gegen die Messzeit T verifiziert, sind aber aufgrund des geringen Adsorptionsverhaltens von PSD-95 nicht relevant. Der Anteil der Photozerstörung des Akzeptors wurde durch Auftragung der Transfereffizenz E(PIE) gegen die Differenz der mittleren Burstzeiten der grünen und roten Fluoreszenzemission T_{GX}-T_{RR} entfernt (Kudryavtsev, *et al.*; 2012), indem nur jene Photonen selektiert wurden, deren zeitliche

Differenz zwischen 0,7 und -0,7 ms lagen. Durch anschließende Auftragung der Transfereffizenz E_{PIE} gegen die Stöchiometrie S_{PIE} (Kudryavtsev, *et al.*; 2012) wurde der reine FRET-Anteil extrahiert. Der so erhaltene Datenextrakt wurde anschließend mit den Untergrund-korrigierten originalen Messdaten überlagert dargestellt.

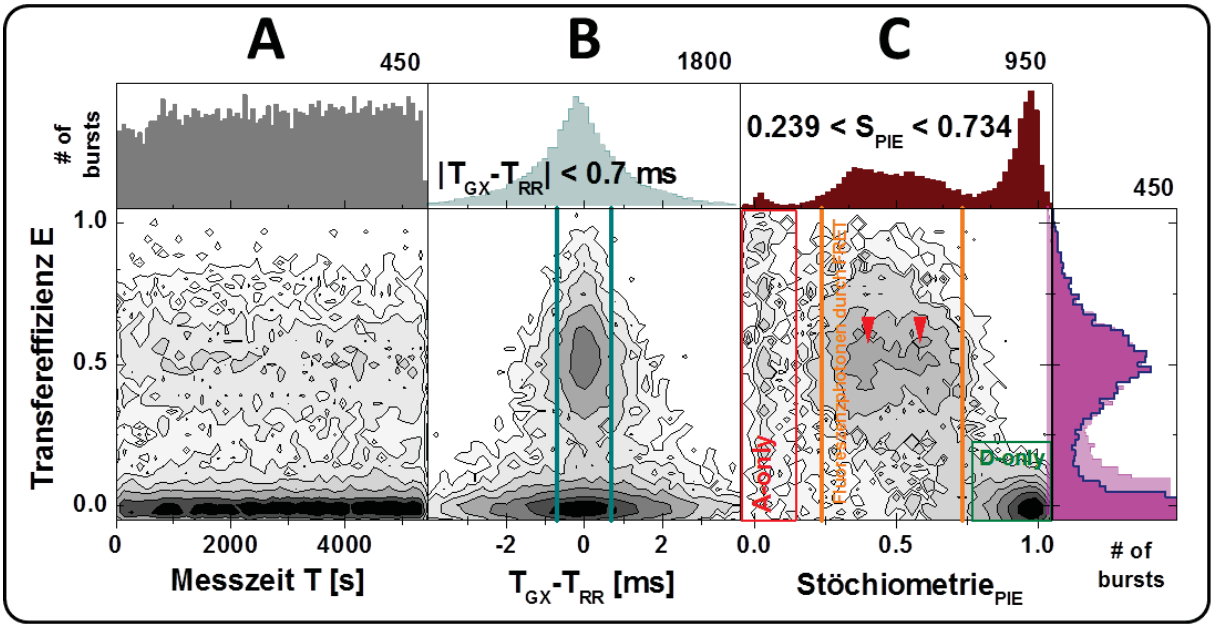


Abbildung 4-36: Datenaufbereitung der MFD(PIE)-Messungen anhand PSD-95(S510C, K591C)DA. (A) Durch Auftragung der Transfereffizienz E aufgetragen gegen die Messzeit werden Absorptionseffekte des Proteins an die Probenkammer erkennbar. Diese waren für PSD-95 nicht erkennbar. **(B)** Mit der Auftragung E gegen die Differenz der mittleren Zeit der grünen und roten Fluoreszenzemission T_{GX}-T_{RR} wird durch Selektion eines bestimmten Zeitintervalls (in diesem Fall zwischen -0,5 und 0,5 ms) der Anteil der Akzeptor-Photozerstörung von den übrigen Messdaten isoliert. **(C)** Die Selektion des Fluoreszenzanteils durch FRET (orange), sowie der Donor- (grün) und Akzeptorphotonen (rot) erfolgte durch Auftragung von E gegen die Stöchiometrie (Kudryavtsev, *et al.*; 2012). Erkennbar sind für diese fluoreszenzmarkierte PSD-95-Variante zwei unterschiedliche Akzeptorhelligkeiten (rote Pfeile) aufgrund der statistischen Fluoreszenzmarkierung mit zwei Kopplungsstellen.

4.3.2.2 Akzeptor-Fluoreszenzanisotropie

Mit PIE ist es möglich die Fluoreszenzanisotropie des Akzeptorfarbstoffes separat zu betrachten. Die Messung der Beweglichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes gibt Aufschluss über lokale Interaktionen mit der Proteinhülle. Die Ergebnisse der Fluoreszenzanisotropie-Messungen für den an PSD-95 gekoppelten Akzeptorfluoreszenzfarbstoff Alexa 647 r_A, aufgetragen gegen die fluoreszenzgewichtete Akzeptor-Fluoreszenzlebensdauer $\langle\tau_A\rangle_f$, ist in Abbildung 4-37 gezeigt. Die mittleren Rotationskorrelationszeiten ρ für die verschiedenen

DA-fluoreszenzmarkierten Varianten von PSD-95 differieren zum Teil erheblich voneinander. So wurden für PSD-95(Y236C, S398C)DA und PSD-95(S398C, R492C)DA mittlere Rotationskorrelationszeiten von jeweils 10 ns detektiert (Abbildung 4-37 A und B), während für PSD-95(S398C, E621C)DA 20 ns registriert wurden (Abbildung 4-37 C). Offensichtlich existieren einer oder mehrere Bereiche in der PDZ3-Domäne, die mit dem Akzeptorfluoreszenzfarbstoff so interagieren, dass er starr an der Proteinhülle gehalten wird. Dies hat Auswirkungen auf den Orientierungsfaktor κ^2 und somit auch auf die Akzeptor-Fluoreszenzquantenausbeute. Kalinin et al. stellte bereits fest, dass eine Verteilung der Akzeptorquantenausbeute Φ_{FA} als eine Verteilung von FRET-Abständen R_{DA} missinterpretiert werden kann (Kalinin*, et al.*; 2010a). Es besteht über κ^2 somit ein Zusammenhang zur Fluoreszenzanisotropie *r*, da diese sowohl von der Rotationskorrelationszeit des Proteins, als auch von der (eingeschränkten) Mobilität des Fluorophoren abhängt. Für PSD-95(S510C, K591C)DA und PSD-95(H477C, K591C)DA wurden Rotationskorrelationszeiten von 4,2 bzw. 5,2 ns detektiert, die aufgrund des kurzen C_2-Linkers von gekoppeltem Alexa 647 als normal bezeichnet werden können.

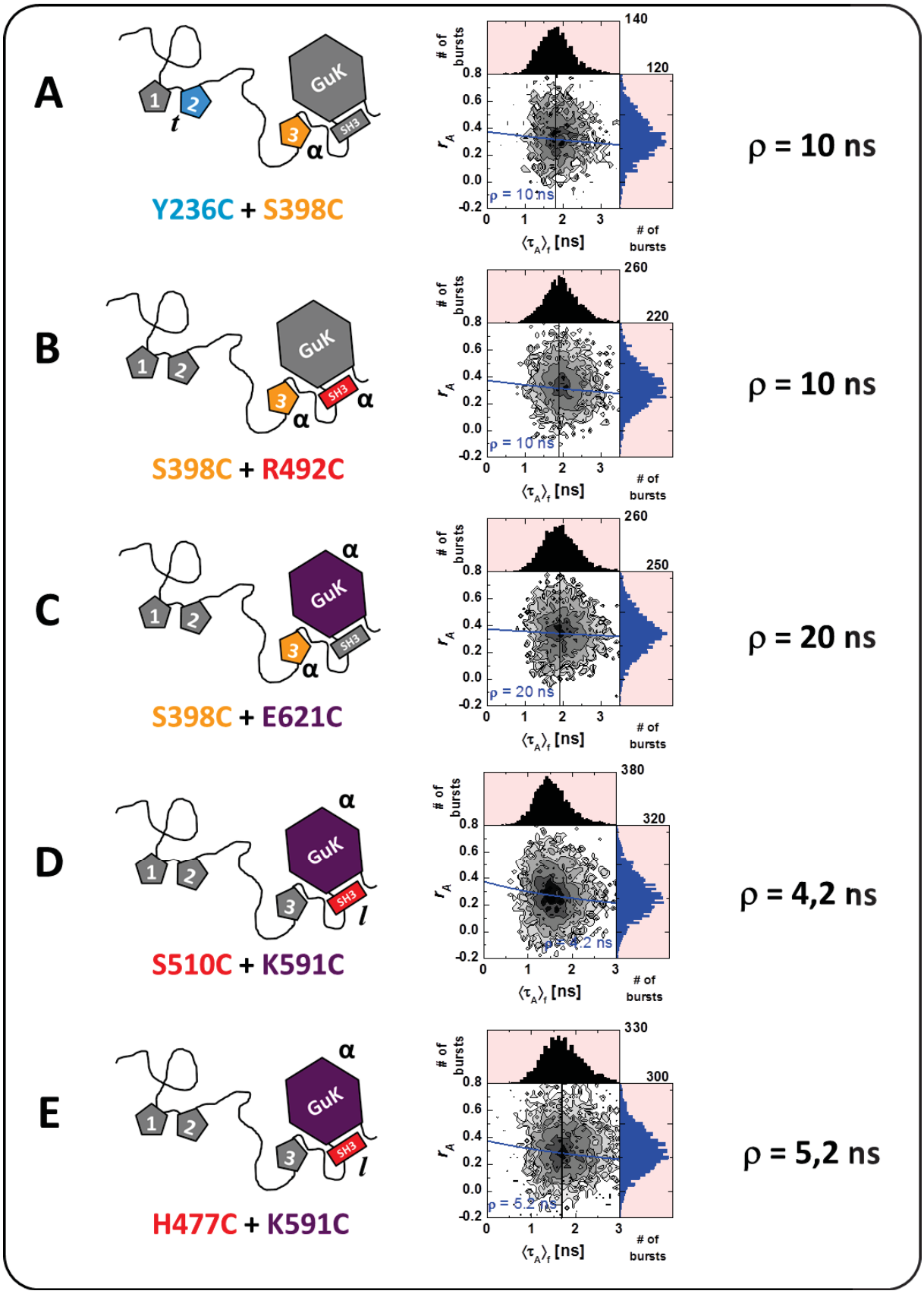


Abbildung 4-37: Fluoreszenzanisotropie (PIE) des an PSD-95 gekoppelten Akzeptorfluoreszenzfarbstoffes. Indizes für die Fluoreszenzfarbstoff-Position: α → α-Helix, β → β-Faltblatt, *l* (lange unstrukturierte Proteinkette, die Sekundärstrukturen miteinander verbinden, engl. *loop*), *t* (kurze unstrukturierte Proteinkette, engl. *turn*). Weitere Erläuterungen sind im Text beschrieben.

4.3.2.3 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten wurde mit seTCSPC der Einzelmolekül-Fluoreszenzdaten durchgeführt. Diese dienen der Ermittlung der FRET-Linien bei der 2D-Histogrammauftragung der Messdaten aus der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie. Die Gewinnung der Fluoreszenzphotonen erfolgte durch Selektion der D-only- und A-only-Population aus dem Transfereffizenz E (PIE) vs. Stöchiometrie-2D-Histogramm. Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden mit Hilfe von Gleichung 3-13 und mit $\tau_{ref(D)}$ = 4,1 ns und $\Phi_{ref(D)}$ = 0,80, sowie $\tau_{ref(A)}$ = 1,0 ns und $\Phi_{ref(A)}$ = 0,33 als Referenzen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-10 aufgeführt. Für die wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten aus seTCSPC verwendet. Die vorgestellte Methode zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeuten mit seTCSPC berücksichtigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Markierungsposition des Fluoreszenzfarbstoffes. Eine vollständige Übereinstimmung mit den Daten aus eTCSPC konnte nicht erreicht werden (Tabelle 4-11). Vergleicht man die erhaltenen Fluoreszenzquantenausbeuten des Akzeptors mit den ermittelten Anisotropien aus Kapitel 4.3.2.2 wird deutlich, dass die Immobilität des Akzeptorfarbstoffes in einer größeren Fluoreszenzquantenausbeute resultiert.

Tabelle 4-10: Ermittelte Fluoreszenzlebensdauern und -quantenausbeuten aus seTCSPC.

Variante	Y236C+S398C	S398C+R492C	S398C+E621C	S510C+K591C	H477C+K591C
Donor-Zerfallshistogramm (D-only)					
τ_X **[ns] (** x **)**	4,032 (0,848) 1,260 (0,285)	4,076 (0,715) 1,603 (0,285)	3,968 (0,744) 1,152 (0,285)	3,724 (0,802) 0,805 (0,198)	4,111 (0,702) 2,074 (0,298)
$\langle\tau\rangle_X$ **[ns]**	3,780	3,370	3,280	3,150	3,500
$\langle\tau\rangle_f$ **[ns]**	3,770	3,740	3,690	3,580	3,750
Φ_{FD}	**0,67**	**0,67**	**0,65**	**0,63**	**0,70**
Donor-Zerfallshistogramm (DA, FRET-Population)					
τ_X **[ns] (** x **)**	3,679 (0,587) 1,397 (0,413)	3,297 (0,334) 0,945 (0,666)	3,393 (0,360) 0,880 (0,640)	3,142 (0,488) 1,095 (0,552)	3,250 (0,470) 1,177 (0,530)
$\langle\tau\rangle_X$ **[ns]**	2,740	1,731	1,790	2,013	2,150
$\langle\tau\rangle_f$ **[ns]**	3,200	2,442	2,600	2,528	2,650
Akzeptor-Zerfallshistogramm (A-only)					
τ_X **[ns] (** x **)**	1,812 (1,000)	1,885 (1,000)	1,907 (1,000)	1,520 (1,000)	1,680 (1,000)
$\langle\tau\rangle_X$ **[ns]**	1,812	1,885	1,907	1,520	1,680
$\langle\tau\rangle_f$ **[ns]**	1,812	1,885	1,907	1,520	1,680
Φ_{FA}	**0,50**	**0,52**	**0,52**	**0,42**	**0,46**
ρ_{SMD} **[ns]**	**10**	**10**	**20**	**4,2**	**5,2**

Tabelle 4-11: Ermittelte Fluoreszenzlebensdauern und -quantenausbeuten aus eTCSPC.

Variante	S510C+K591C	H477C+K591C	S398C+E621C	S398C+R492C	Y236C+S398C
PSD-95 (Donor/Akzeptor)					
τ_x **[ns] (** X **)**	**3,668 (0,412)**	**3,913 (0,398)**	**3,797 (0,472)**	**3,923 (0,482)**	**3,863 (0,604)**
	1,706 (0,322)	1,776 (0,342)	1,714 (0,274)	1,729 (0,295)	1,807 (0,230)
	0,441 (0,266)	0,444 (0,260)	0,438 (0,254)	0,397 (0,223)	0,448 (0,166)
χ^2	1,163	1,146	1,087	1,178	1,162
Φ_{FD}	**0,83**	**0,88**	**0,85**	**0,88**	**0,88**
PSD-95 (Akzeptor only)					
τ_x **[ns] (** X **)**	2,062 (0,120)	2,211 (0,149)	2,335 (0,156)	2,602 (0,054)	2,413 (0,077)
	1,320 (0,663)	1,422 (0,535)	1,613 (0,622)	1,775 (0,611)	1,691 (0,500)
	0,715 (0,217)	0,316 (0,868)	0,904 (0,222)	0,998 (0,335)	1,013 (0,424)
χ^2	1,149	1,149	1,071	1,175	1,188
$\langle\tau\rangle_x$ **[ns]**	**1,390**	**1,501**	**1,690**	**1,683**	**1,583**
Φ_{FA}	**0,46**	**0,50**	**0,56**	**0,56**	**0,53**

4.3.2.4 Ermittlung der Dynamiken mit spezies-selektiver Fluoreszenzkreuzkorrelation

Für die spezies-selektive Fluoreszenzkreuzkorrelation wurde auf *burst*-Analyse nach Kapitel 4.3.2.1 verzichtet, um eventuellen Informationsverlust zu vermeiden. Um einen ausreichenden Unterschied der generierten Zerfallshistogramme zu gewährleisten, wurde für die Kreuzkorrelation die Photonen des D-only/LF-Anteils (LF-Anteil), sowie des VHF-Anteils (*„very high FRET“*) selektiert und als sogenannte *Burst-ID*s gespeichert. Die Selektion wurde in F_D/F_A vs τ_{DA} -2D-Histogrammen vorgenommen, die selektierten Bereiche für die jeweilige PSD-95-Variante ist in Abbildung 4-38 dargestellt.

Die Generierung der fFCS-Filter wurde mit vier Komponenten (IRF, LF, VHF, direkte Akzeptoranregung), die auf die gemessen Fluoreszenzdaten angewendet wurden, realisiert. Die Spezies-selektive Fluoreszenzkreuzkorrelation erfolgte anschließend zwischen LF/VHF und VHF/LF (SCCF), sowie zwischen LF/LF und VHF/VHF (SACF). Für die SCCF wurde Gleichung 4-7 mit einem Korrelations- und drei Antikorrelationstermen verwendet:

$$G(t_c) = offset + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1+\frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{z_0}{\omega_0}\right)^{-2} \frac{t_c}{t_{diff}}}} \cdot \left(x_B \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{rB}}\right)} \right) \cdot \left(1 - A \cdot \left(x_1 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r1}}\right)} + x_2 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r2}}\right)} + (1 - x_1 - x_2) \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r3}}\right)} \right) \right)$$

Gleichung 4-7

Entsprechend wurde Gleichung 4-8 mit vier Korrelationstermen für die SACF eingesetzt:

$$G(t_c) = offset + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1+\frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{z_0}{\omega_0}\right)^{-2} \frac{t_c}{t_{diff}}}} \cdot \left(x_{Tr} \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{rTr}}\right)} \right) \cdot \left(1 - \left(x_1 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r1}}\right)} + x_2 \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r2}}\right)} + (1 - x_1 - x_2) \cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{r3}}\right)} \right) \right)$$

Gleichung 4-8

Die mathematische Anpassung zwischen den vier Korrelationskurven erfolgte für die Amplituden der Antikorrelationsterme der SCCF, beziehungsweise der Korrelationsterme der SACF, jeweils für global. Die Relaxationszeiten hingegen wurden global aus den beiden SCCF und SACF ermittelt (Böhmer*, et al.*; 2002, Felekyan*, et al.*; 2012).

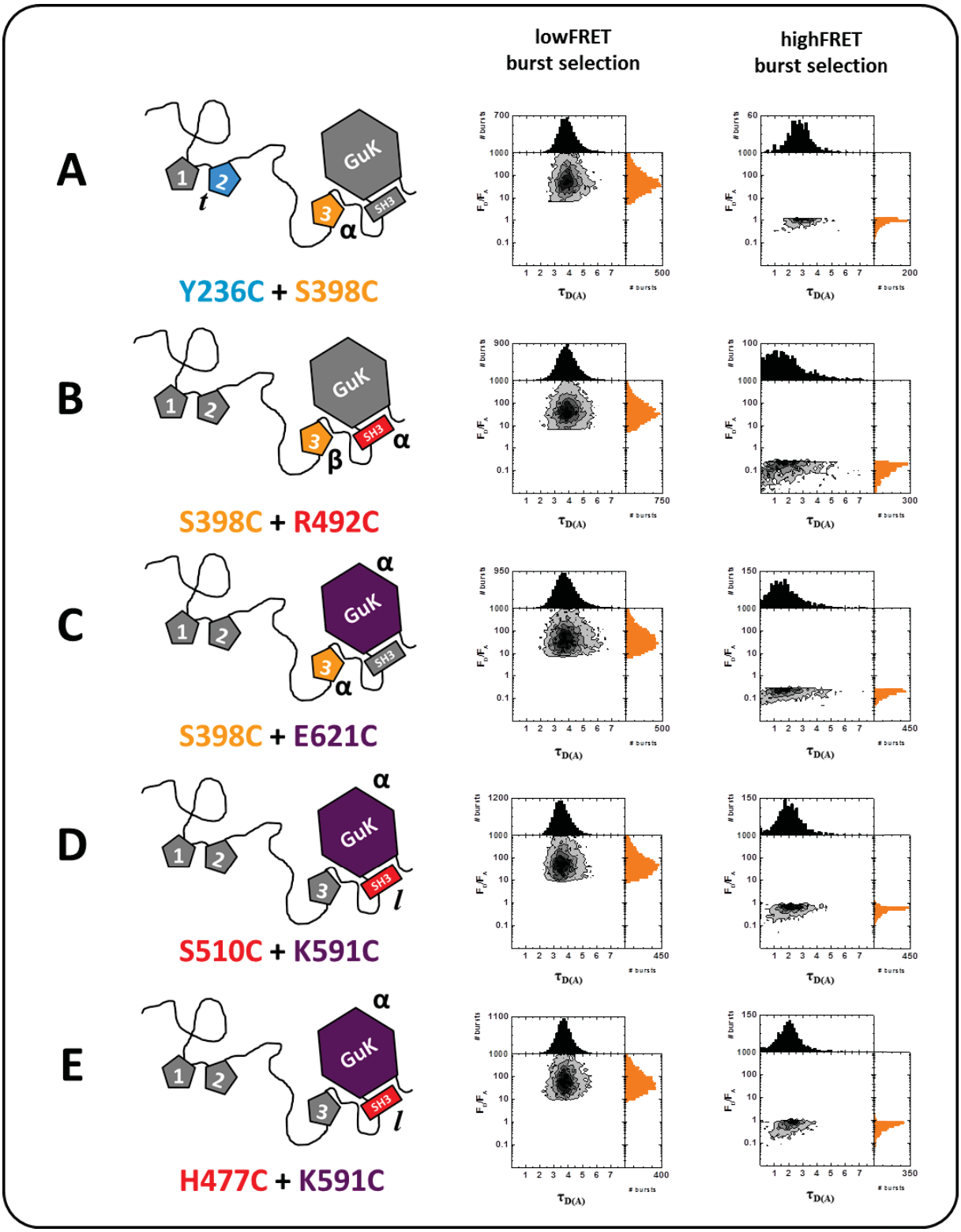


Abbildung 4-38: Selektion der Photonen für die Generierung der SCCF für die PIE-Messungen. Die Selektion der Photonen erfolgte aus den F_D/F_A vs τ_{DA}-2D-Histogrammen. Die Speicherung erfolgte als sogenannte *Burst-IDs*, die alle ermittelten Informationen der Photonen bei der Auswertung der Messdaten enthalten. Indizes für die Fluoreszenzfarbstoff-Position: α → α-Helix, β → β-Faltblatt, *l* (lange unstrukturierte Proteinkette, engl. *loop*), *t* (kurze unstrukturierte Proteinkette, engl. *turn*).

4.3.3 Computerunterstützte Untersuchung der lokalen Flexibilitäten der betrachteten Domänen

Die Identifizierung lokaler Flexibilitäten an den gewählten Fluoreszenz-markierungspositionen ist für die Interpretation der für die quantifizierten dynamischen Prozesse der verschiedenen Domänen in PSD-95 von Bedeutung. Sie gibt zusammen mit den aus fFCS ermittelten Relaxationszeiten Aufschluss über die Art der vorliegenden Dynamik. Zu diesem Zweck wurden die lokalen Flexibilität durch das Computerprogramm *CNAnalysis* (*Constraint Network Analysis*, engl., http://cpclab.uni-duesseldorf.de/cna/) ermittelt, welches die thermische Denaturierung einzelner Domänen oder Domänengruppen simuliert (Krüger*, et al.*; 2013, Pfleger*, et al.*; 2013b). Der Stabilitätsindex r_i [kcal/mol] ist ein Maß für die thermale Rigidität und lässt somit auf das Ausmaß der biomolekularen Flexibilität der Proteinregion schließen (Pfleger*, et al.*; 2013a). Je höher dieser Wert ist, desto größer die Flexibilität. Die Ergebnisse für die einzelnen PSD95-Domänen sind in Abbildung 4-39 dargestellt. Wie zu erwarten, besitzen die Proteinbereiche mit den Mutationen Y236C, H477C und S510C hohe lokale Flexibilität (r_i = 0 kcal/mol), da hier die Peptidkette unstrukturiert ist. Mit $r_i \approx$ -2 kcal/mol liegen die Mutationen S398C, K591C und E621C im oberen mittleren Bereich der lokalen Flexibilität. Die Mutationen befinden sich in α-Helices, jedoch sind diese zum Teil sehr kurz, so dass eine erhöhte lokale Flexibilität möglich ist. Weitgehend starr verhält sich nur der Proteinbereich um die Mutation R492C mit r_i = -4,6 kcal/mol, der in einem α-helikalen Bereich der SH3-Domäne lokalisiert ist.

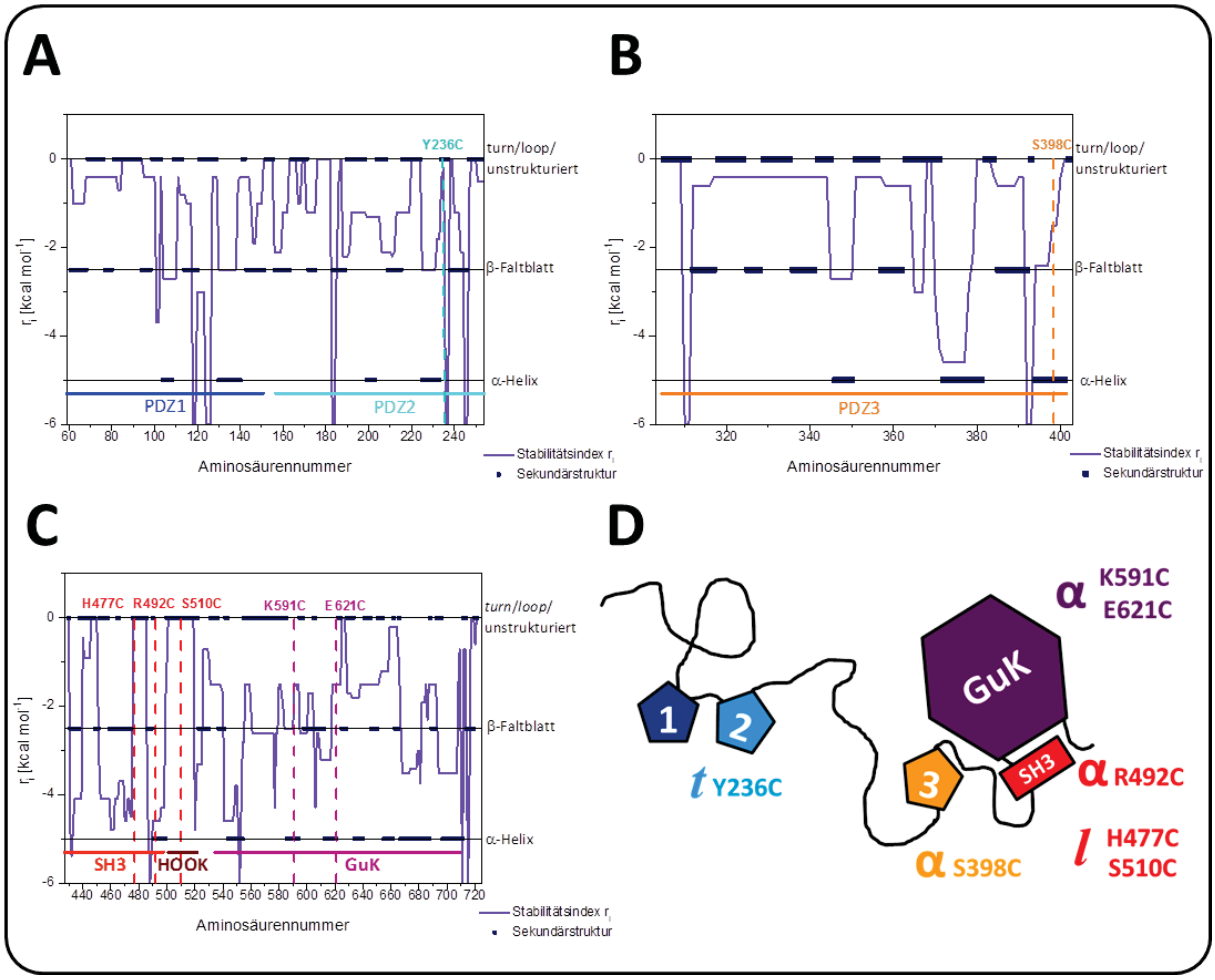


Abbildung 4-39: Bestimmung lokaler Flexibilitäten von PSD-95 durch simulierte thermische Entfaltung. (A) Bestimmung des Stabilitätsfaktors r_i der PDZ1- und PDZ2-Domäne (PDB-ID: 3GSL), **(B)** der PDZ3-Domäne (PDB-ID: 3I4W) und **(C)** der SH3- und GuK-Domäne (PDB-ID: 1KJW). Die *hook region* (engl. Harkenregion) der SH3-Domäne ist separat dargestellt. **(D)** Schematische Darstellung aller verwendeten PSD-95-Mutationen und deren Lokalisierung. Indizes für die Fluoreszenzfarbstoff-Position: α → α-Helix, β → β-Faltblatt, *l* (lange unstrukturierte Proteinkette, engl. *loop*), *t* (kurze unstrukturierte Proteinkette, engl. *turn*).

4.3.4 Analyse der Domänen-Dynamiken

4.3.4.1 Domänendynamik zwischen PDZ2 und PDZ3

Die Dynamik zwischen den Domänen PDZ2 und PDZ3 wurde mit der DA-fluoreszenzmarkierten Mutante PSD-95(Y236C, S398C) untersucht. Der Linker ist charakterisiert durch eine ungefaltete Peptidkette mit 52 Aminosäuren, aus dem sich ein relativ großer Spielraum für verschiedene Abstände zwischen diesen beiden Domänen ergibt. Wie in Abbildung 4-40 A zu erwarten war, ist daher die Effizienz des FRET aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit für einen großen Abstand zwischen den PDZ-Domänen, geringer und somit das F_D/F_A-Verhältnis größer. Mit seTCSPC der selektierten PIE-*bursts* konnten zwei Grenzzustände mit den Fluoreszenzlebensdauern τ_1 = 1,4 ns (41%) und τ_2 = 3,7 ns (59%) bestimmt werden, welche nach Gleichung 2-13 und Gleichung 2-14 einem Abstand zwischen Donor und Akzeptor von 47,6 Å und 100,7 Å entspricht. Das Maximum der Hauptpopulation im F_D/F_A-Histogramm liegt bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 3,0 ns (65,2 Å) und liegt klar auf der dynamischen FRET-Linie zwischen τ_1 = 1,40 ns und τ_2 = 3,68 ns. Für die untersuchte Domäneninteraktion konnten mit der Spezies-selektiven Fluoreszenzkreuzkorrelation die Relaxationszeiten t_{R1} = 0,1 µs (Anteil am Gesamtprozess: 61%), t_{R2} = 2,95 µs (21%) und t_{R3} = 124 µs (18%) ermittelt werden. Aufgrund der dominierenden Amplitude von t_{R1} kann mit hoher Wahrscheinlichkeit diese Relaxationszeit der Dynamik der ungefalteten Peptidkette zwischen PDZ2 und PDZ3 zugeordnet werden.

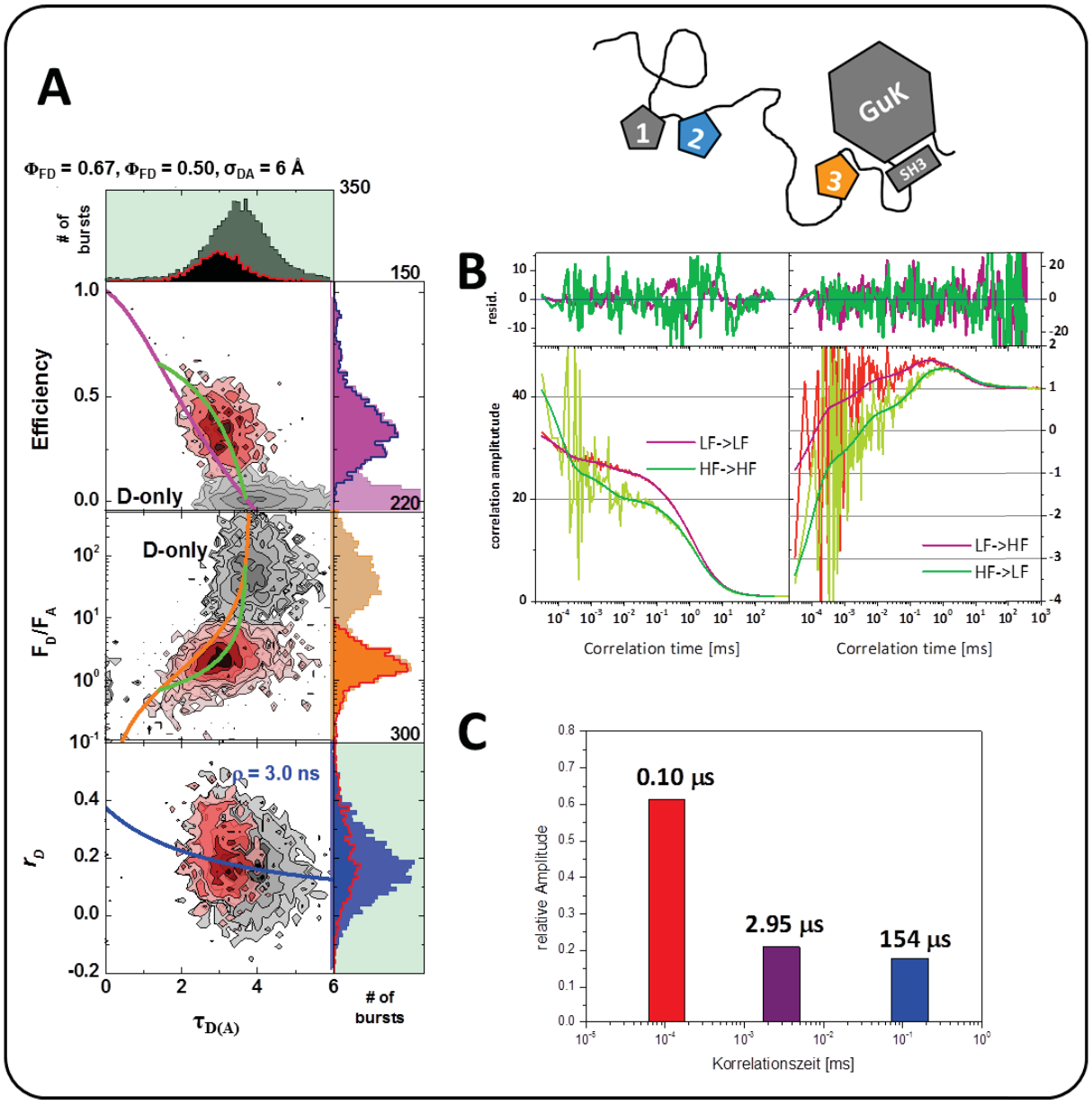


Abbildung 4-40: Analyse der Dynamiken zwischen den PDZ-Domänen 2 und 3. (A) Im 2D-MFD Histogramm ist die Transfereffizienz E (oberes Histogramm), das Verhältnis von Donor- und Akzeptorfluoreszenz F_D/F_A (mittleres Histogramm), sowie die Fluoreszenz-Anisotropie r_D (unteres Histogramm) gegen die Donor-Fluoreszenzlebensdauer in Anwesenheit des Akzeptors $\tau_{D(A)}$ aufgetragen. Die Einzelmolekülmessungen aus *Two-color Pulsed Interleaved Excitation* (graues/schwarzes Histogramm) und die selektierte FRET-Fluoreszenz (rotes Histogramm) sind überlagernd dargestellt. Die statischen FRET-Kurven ist in im E-Histogramm magenta, im F_D/F_A - Histogramm in orange dargestellt. Die dynamischen FRET-Kurven sind jeweils in hellgrün dargestellt und wurden mit den ermittelten Fluoreszenzlebensdauern aus seTCSPC erstellt. Die Perrin-Linie (blau) im Fluoreszenzanisotropie-Histogramm wurde so angepasst, dass sie das Fluoreszenzmaximum durchläuft. Mit Hilfe der Spezies-selektiven Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie **(B)** konnten Domänen-Dynamiken bestätigt und quantifiziert werden. Dargestellt sind die SACFs von LF zu LF, bzw. von HF zu HF (linke Korrelationskurven) und die SCCFs der beiden selektierten Spezies. **(C)** Insgesamt konnten für die Interaktion zwischen PDZ 2 und 3 drei Relaxationszeiten ermittelt werden: t_{R1} = 0,10 µs (61%), t_{R2} = 2,95 µs (21%) und t_{R3} = 154 µs (18%). Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen (Gleichung 3-24) und dynamischen (Gleichung 3-26) FRET-Linien sind folgende Parameter ermittelt worden:

Histogramm	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	B_{yellow} [kHz]	Crosstalk	det.eff. g. ch.	det.eff. r. ch.
	0,5090	0,1560	0,3090	0,008	1,5000	1,000
	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]			
	0,67	0,50	3,77			
statische Eff.-Linie	A_0	A_1	A_2	A_3	A_4	
	0,0134	-0,1528	0,5345	0,4486	-0,0273	
dynamische Eff.-Linie	C_0	C_1	C_2	C_3	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
	0,0000	0,0000	1,1495	-0,5440	1,40	3,68
statische FRET-Linie	A_0	A_1	A_2	A_3		
	-0,0479	0,2740	0,6637	-0,0647		
dynamische FRET-Linie	C_0	C_1	C_2	C_3	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
	0,0000	0,0000	1,1495	-0,5440	1,40	3,68

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.3.4.2 Domänendynamik zwischen PDZ3 und SH3

Die PDZ 3-Domäne ist über eine 15 Aminosäuren lange Peptidkette über die SH3-Domäne mit der GuK-Domäne verbunden. Bei der Betrachtung der Interaktion zwischen PDZ3 und SH3 ist daher von einer vergleichbaren Flexibilität wie für die Domäneninteraktion für PDZ2 und PDZ3 zu erwarten. Das DA-Fluoreszenzmarkierte PSD-95(S398C, R492C) zeigt erwartungsgemäß ein kleineres F_D/F_A-Verhältnis im Gegensatz zu der vorherigen Variante Y236C+ S398C, aufgrund der geringeren Abstandsverteilung zwischen Donor- und Akzeptor-Farbstoff (Abbildung 4-41 A). Auch hier konnten durch seTCSPC zwei FRET-Fluoreszenzlebensdauern, τ_1 = 0,95 ns (67%) und τ_2 = 3,3 ns (33%), ermittelt werden, die einem Donor/Akzeptor-Abstand von R_{DA1} = 43,5 Å und R_{DA2} = 72,8 Å entspricht. Das Maximum der FRET-Population liegt bei einer Fluoreszenzlebensdauer von ungefähr 2 ns (5 Å). Die Quantifizierung der Dynamik mit SCCF ergab drei Relaxationszeiten zu t_{R1} = 0,12 µs (21%), t_{R2} = 5,83 µs (49%) und t_{R3} = 212 ms (30%).

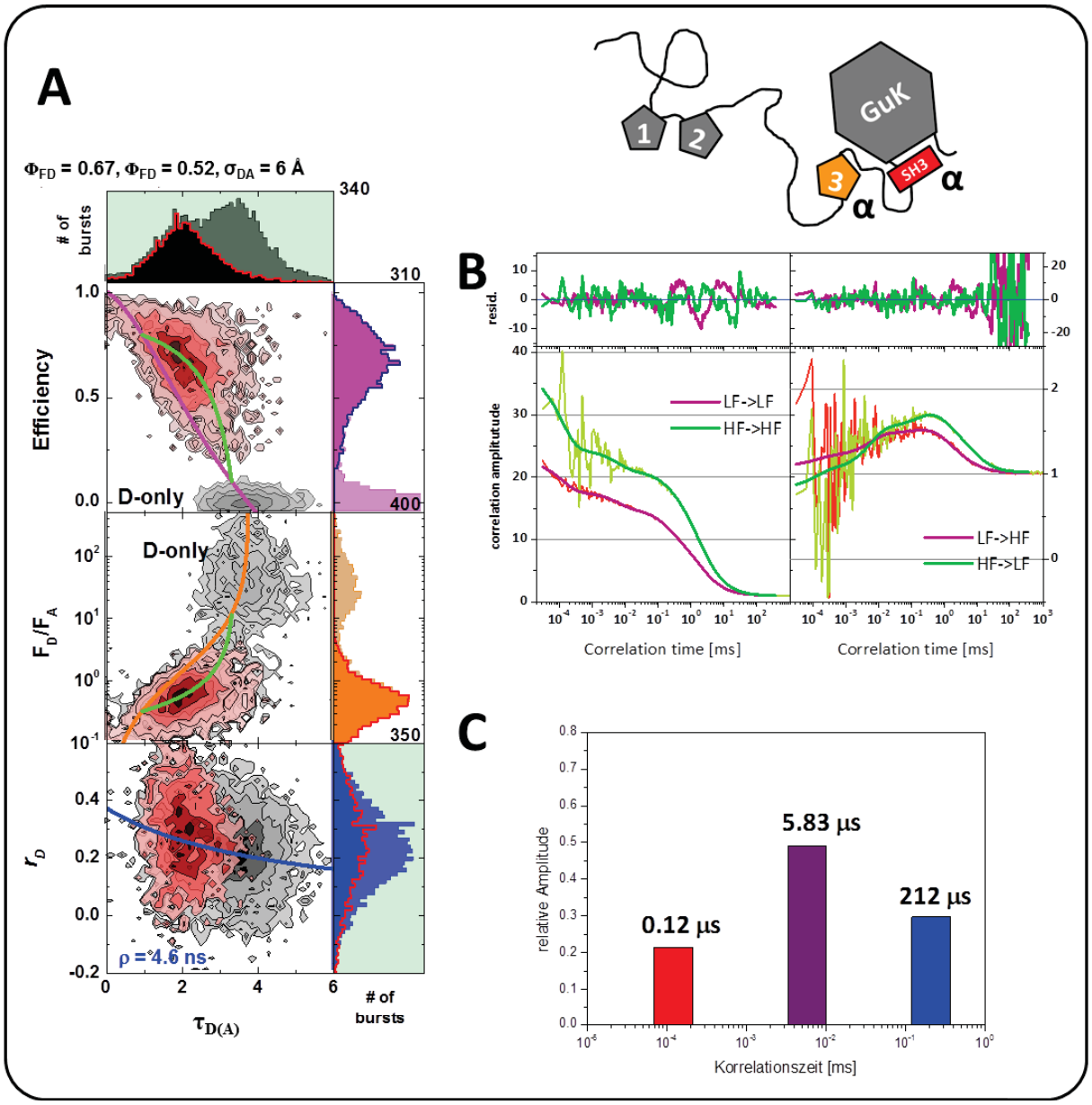


Abbildung 4-41: Analyse der Dynamiken zwischen PDZ3 und SH3. (A) 2D-MFD-Histogramme aus PIE (graues/schwarzes Histogramm) und den selektierten FRET-*bursts* (rotes Histogramm). Aufgetragen ist die Transfereffizienz E (oberes Histogramm), das Verhältnis von Donor- und Akzeptorfluoreszenz F_D/F_A (mittleres Histogramm mit den entsprechenden statischen und dynamischen FRET-Linien, sowie die Fluoreszenz-Anisotropie r_D (unteres Histogramm) mit der Perrin-Gleichung (durchzogene blaue Linie). **(B+C)** Mit den SACFs und SCCFs (vergleiche vorheriges Kapitel) ließen sich die Relaxationszeiten t_{R1} = 0,12 µs (21%), t_{R2} = 5,83 µs (49%) und t_{R3} = 212 µs (30%) ermitteln. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen (Gleichung 3-24) und dynamischen (Gleichung 3-26) FRET-Linien sind folgende Parameter ermittelt worden:

Histogramm	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	B_{yellow} [kHz]	Crosstalk	det.eff. g. ch.	det.eff. r. ch.
	0,5090	0,1560	0,3090	0,008	1,5000	1,000
	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]			
	0,67	0,52	3,74			
statische Eff.-Linie	A_0	A_1	A_2	A_3	A_4	
	0,0131	-0,1520	0,5412	0,4253	-0,0251	
dynamische Eff.-Linie	C_0	C_1	C_2	C_3	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
	0,0000	0,0000	1,3809	-1,2406	0,95	3,30
statische FRET-Linie	A_0	A_1	A_2	A_3		
	-0,0501	0,2896	0,6319	-0,0610		
dynamische FRET-Linie	C_0	C_1	C_2	C_3	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
	0,0000	0,0000	1,3809	-1,2406	0,95	3,30

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.3.4.3 Domänendynamik zwischen PDZ3 und GuK

Mit der Doppelmutante PSD-95(S398C, E621C)DA wurde die Proteindynamik zwischen der PDZ3- und der GuK-Domäne untersucht. Die PDZ3-Domäne ist nicht direkt mit der GuK-Domäne verbunden, sondern besitzt die SH3-Domäne als Zwischenglied. Wie im F_D/F_A-Histogramm in Abbildung 4-42 A durch eine geringfügige Verbreiterung der FRET-Population (rotes Histogramm) zu erkennen ist, scheint die Dynamik zwischen den beiden Domänen langsamer zu verlaufen, als für die zuvor erwähnten PSD-95-Varianten. Die Fluoreszenzlebensdauern der FRET-Population ermittelten sich mit seTCSPC zu τ_1 = 0,88 ns (64%, R_{DA1} = 42,9 Å) und τ_2 = 3,4 ns (36%, R_{DA2} = 78,4 Å). Der längere FRET-Abstand von R_{DA2} ist durch die zwischen PDZ3 und GuK gelegene SH3-Domäne zu erklären. Das ungefähre *burst*-Maximum der FRET-Spezies liegt bei ca. τ_f = 2,5 (58,8 Å).Durch SCCF (Abbildung 4-42 C) konnten die Relaxationszeiten t_{R1} = 0,78 µs (43%), t_{R2} = 20,9 µs (24%) und t_{R3} = 334 µs (33%) ermittelt werden, welche den Eindruck langsamerer Domänenbewegungen aus den 2D-Histogrammen bestätigen.

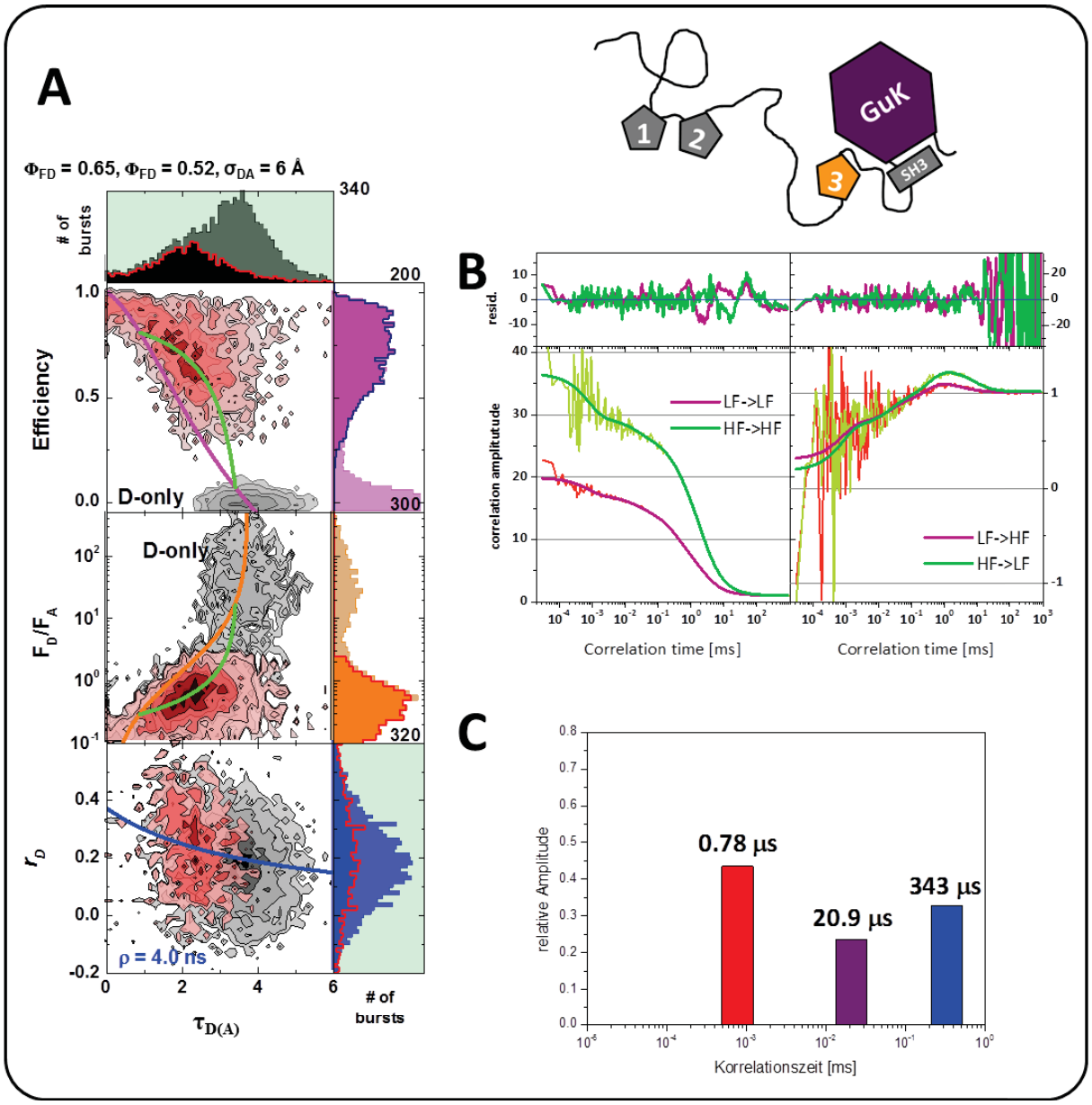


Abbildung 4-42: Analyse der Dynamiken zwischen PDZ3 und GuK. (A) 2D-MFD-Histogramme aus PIE (graues/schwarzes Histogramm) und den selektierten FRET-*Bursts* (rotes Histogramm). Aufgetragen ist die Transfereffizienz E (oberes Histogramm), das Verhältnis von Donor- und Akzeptorfluoreszenz F_D/F_A (mittleres Histogramm mit den entsprechenden statischen und dynamischen FRET-Linien, sowie die Fluoreszenz-Anisotropie r_D (unteres Histogramm) mit der Perrin-Gleichung (durchzogene blaue Linie). **(B+C)** Mit den SACFs und SCCFs (vergleiche vorheriges Kapitel) ließen sich die Relaxationszeiten t_{R1} = 0,78 µs (43%), t_{R2} = 20,9 µs (24%) und t_{R3} = 343 µs (33%) ermitteln. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen (Gleichung 3-24) und dynamischen (Gleichung 3-26) FRET-Linien sind folgende Parameter ermittelt worden:

Histogramm	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	B_{yellow} [kHz]	Crosstalk	det.eff. g. ch.	det.eff. r. ch.
	0,5090	0,1560	0,3090	0,008	1,5000	1,000
	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]			
	0,65	0,52	3,69			
statische Eff.-Linie	A_0	A_1	A_2	A_3	A_4	
	0,0144	-0,1609	0,5465	0,4581	-0,0280	
dynamische Eff.-Linie	C_0	C_1	C_2	C_3	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
	0,0000	0,0000	1,3527	-1,1861	0,88	3,40
statische FRET-Linie	A_0	A_1	A_2	A_3		
	-0,0492	0,2729	0,6809	-0,0663		
dynamische FRET-Linie	C_0	C_1	C_2	C_3	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
	0,0000	0,0000	1,3527	-1,1861	0,88	3,40

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.3.4.4 Domänendynamik zwischen SH3 und GuK

Die Domänen-Interaktion zwischen SH3 und GuK mit PSD-95(S510C, K591C)DA und PSD-95(H477C, K591C)DA kennzeichnet sich durch eine kurze verbindende Peptidkette zwischen den beiden Domänen. Da sich die Fluoreszenzfarbstoffe an unstrukturierten Peptidbereichen der SH3-Domäne koppeln können, sollte bei dieser Untersuchung die *loop-Dynamik* im Vordergrund stehen. Die SCCF konnte erneut drei Relaxationszeiten ermitteln. Für PSD-95(S510C, K591C)DA betragen diese t_{R1} = 1,32 µs (54%), t_{R2} = 26,4 µs (32%) und t_{R3} = 295 µs (14%), für PSD-95(H477C, K591C)DA t_{R1} = 0,1 µs (41%), t_{R2} = 5,8 µs (39%) und t_{R3} = 183 µs (20%). Für die ermittelte Relaxationszeit t_{R1} wurde für die mathematische Anpassung der Korrelationskurve ein minimaler Wert von 0,1 µs gesetzt, da die Schwankungen in der Korrelationsamplitude für kleinere Korrelationszeiten zu groß wurden. Es ist daher möglich, dass für längere Messzeiten die mathematische Anpassung verbessert und für t_{R1} kleinere Relaxationszeiten ermittelt werden können. Die FRET-Fluoreszenzlebensdauern für PSD-95(S510C, K591C)DA ermittelten sich mit seTCSPC zu τ_1 = 1,1 ns (55%, R_{DA1} = 45,4 Å) und τ_2 = 3,1 ns (45%, R_{DA2} = 71,0 Å). Das ungefähre *burst*-Maximum der FRET-Spezies liegt bei ca. $\tau_{FRETmax}$ = 2,3 ns (57,3 Å). Für PSD-95(H477C, K591C)DA berechneten sich die Fluoreszenzlebensdauern zu τ_1 = 1,18 ns (53%, R_{DA1} = 45,5 Å) und τ_2 = 3,3 ns (47% R_{DA2} = 69,7 Å), sowie das ungefähre *burst*-Maximum der FRET-Spezies zu ungefähr $\tau_{FRETmax}$ = 2,7 (60,9 Å). Vergleicht man diese Werte mit den Parametern, die aus dem AV-Modell gewonnen worden (Abbildung 4-45), so ergibt sich für PSD-95(H477C, K591C) mit 59,0 Å eine sehr gute Übereinstimmung mit $\tau_{FRETmax}$. Dies bedeutet gleichzeitig, dass keine eindeutigen

dynamischen Grenzzustände existieren, sondern dass sich die Strukturänderung um einen Abstandsmittelwert bewegt. Für PSD-95(S510C, K591C)DA ist die Übereinstimmung aus dem AV-Modell mit 49,9 Å nicht eindeutig und deutet somit auf komplexere Zustände in dieser Proteinregion hin. Die in diesem Bereich des Proteins befindliche „Haken-Region“ scheint hier die Ursache zu sein.

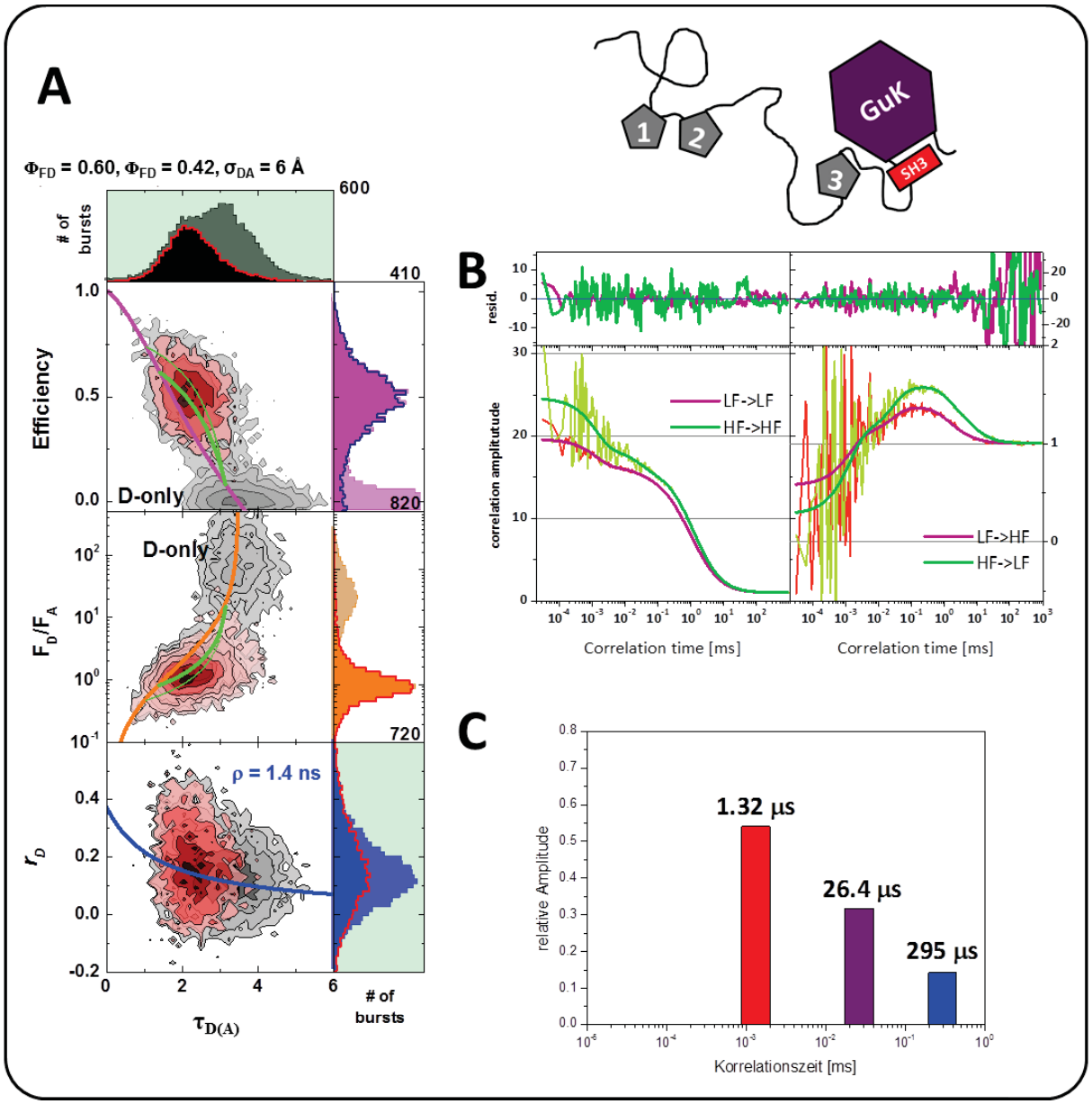


Abbildung 4-43: Analyse der Dynamiken zwischen SH3 und GuK (PSD-95(S510C+K591C)DA). (A) 2D-MFD-Histogramme aus PIE (graues/schwarzes Histogramm) und den selektierten FRET-*bursts* (rotes Histogramm). Aufgetragen ist die Transfereffizienz E (oberes Histogramm), das Verhältnis von Donor- und Akzeptorfluoreszenz F_D/F_A (mittleres Histogramm mit den entsprechenden statischen und dynamischen FRET-Linien, sowie die Fluoreszenz-Anisotropie r_D (unteres Histogramm) mit der Perrin-Gleichung (durchzogene blaue Linie). **(B+C)** Mit den SACFs und SCCFs (vergleiche vorheriges Kapitel) ließen sich die Relaxationszeiten t_{R1} = 1,32 µs (54%), t_{R2} = 26,4 µs (32%) und t_{R3} = 295 µs (14%) ermitteln. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen (Gleichung 3-24) und dynamischen (Gleichung 3-26) FRET-Linien sind folgende Parameter ermittelt worden:

Histogramm	**B_{green} [kHz]**	**B_{red} [kHz]**	**B_{yellow} [kHz]**	**Crosstalk**	**det.eff. g. ch.**	**det.eff. r. ch.**	
	0,5090	0,1560	0,3090	0,008	1,5000	1,000	
	Φ_{FD}	**Φ_{FA}**	**τ_{D0} [ns]**				
	0,63	0,42	3,58				
statische Eff.-Linie	**A_0**	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**A_4**		
	0,0172	-0,1795	0,5726	0,4667	-0,0277		
dynamische Eff.-Linie	**C_0**	**C_1**	**C_2**	**C_3**		**τ_1 [ns]**	**τ_2 [ns]**
	0,0000	0,0000	1,1152	-0,3376		1,41	3,14
statische FRET-Linie	**A_0**	**A_1**	**A_2**	**A_3**			
	-0,0547	0,2852	0,6877	-0,0640			
dynamische FRET-Linie	**C_0**	**C_1**	**C_2**	**C_3**		**τ_1 [ns]**	**τ_2 [ns]**
	0,0000	0,0000	1,5519	-1,7366		1,05	3,14

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

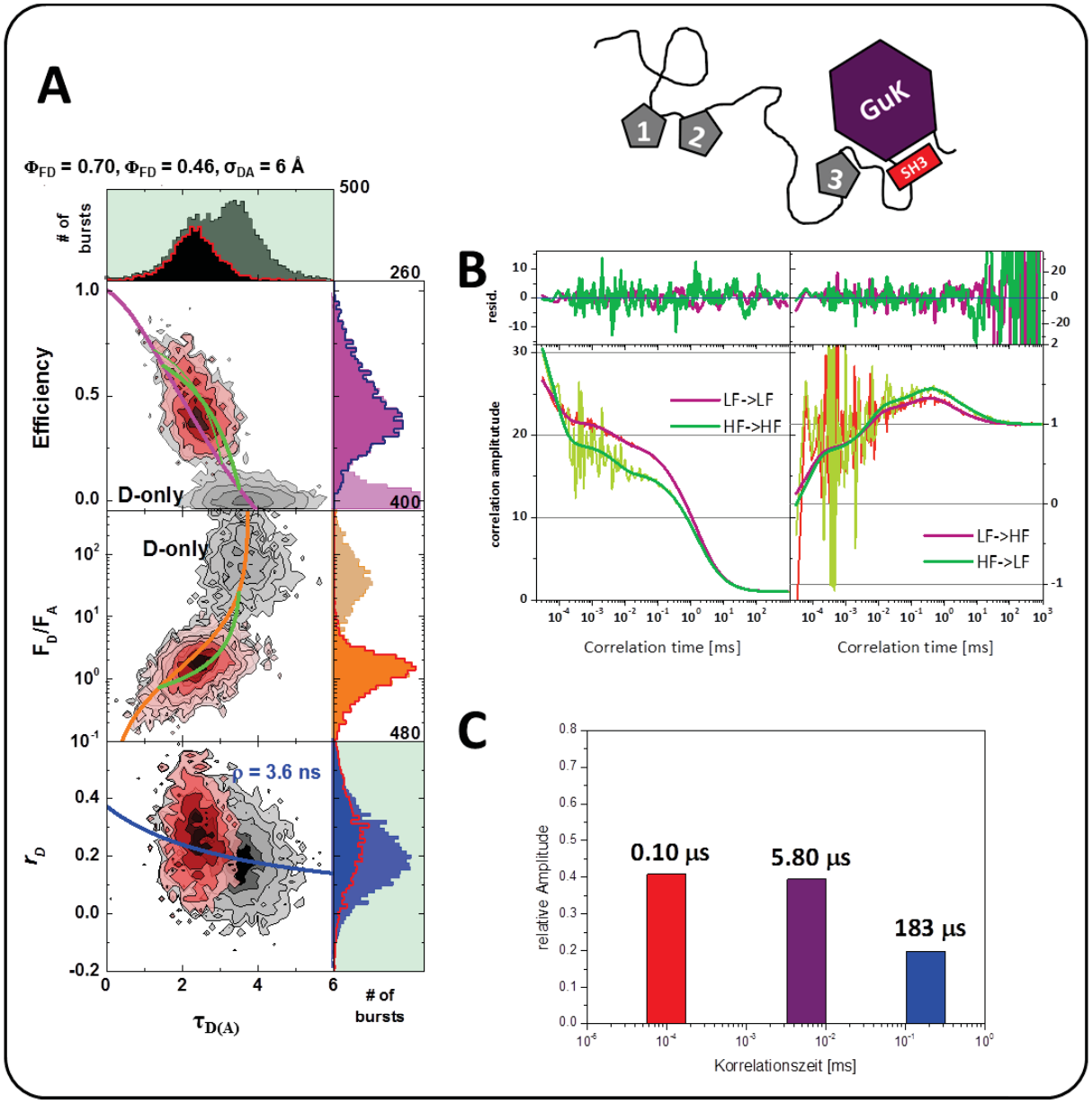


Abbildung 4-44: Analyse der Dynamiken zwischen SH3 und GuK (PSD-95(H477C+K591C)). (A) 2D-MFD-Histogramme aus PIE (graues/schwarzes Histogramm) und den selektierten FRET-*bursts* (rotes Histogramm). Aufgetragen ist die Transfereffizienz E (oberes Histogramm), das Verhältnis von Donor- und Akzeptorfluoreszenz F_D/F_A (mittleres Histogramm mit den entsprechenden statischen und dynamischen FRET-Linien, sowie die Fluoreszenz-Anisotropie r_D (unteres Histogramm) mit der Perrin-Gleichung (durchzogene blaue Linie). **(B+C)** Mit den SACFs und SCCFs (vergleiche vorheriges Kapitel) ließen sich die Relaxationszeiten t_{R1} = 0,1 µs (41%), t_{R2} = 5,80 µs (39%) und t_{R3} = 183 µs (20%) ermitteln. Aufgrund des hohen Signalrauschens bei Korrelationszeiten unter 100 ns wurde die mathematische Anpassung so gewählt, dass die Relaxationszeiten keine Werte unter 100 ns annehmen. Daher ist es möglich, dass in Wirklichkeit t_{R1} kleiner als 100 ns ist. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen (Gleichung 3-24) und dynamischen (Gleichung 3-25) FRET-Linien sind folgende Parameter ermittelt worden:

Histogramm	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	B_{yellow} [kHz]	Crosstalk	det.eff. g. ch.	det.eff. r. ch.
	0,5090	0,1560	0,3090	0,008	1,5000	1,000
	Φ_{FD} 0,70	Φ_{FA} 0,46	τ_{D0} [ns] 3,75			
statische Eff.-Linie	A_0 0,0110	A_1 -0,1359	A_2 0,5168	A_3 0,3981	A_4 -0,0228	
dynamische Eff.-Linie	C_0 0,0000	C_1 0,0000	C_2 1,2210	C_3 -0,7616	τ_1 [ns] 1,16	τ_2 [ns] 3,20
statische FRET-Linie	A_0 -0,0498	A_1 0,3039	A_2 0,5736	A_3 -0,0534		
dynamische FRET-Linie	C_0 0,0000	C_1 0,0000	C_2 1,2528	C_3 -0,8736	τ_1 [ns] 1,16	τ_2 [ns] 3,20

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

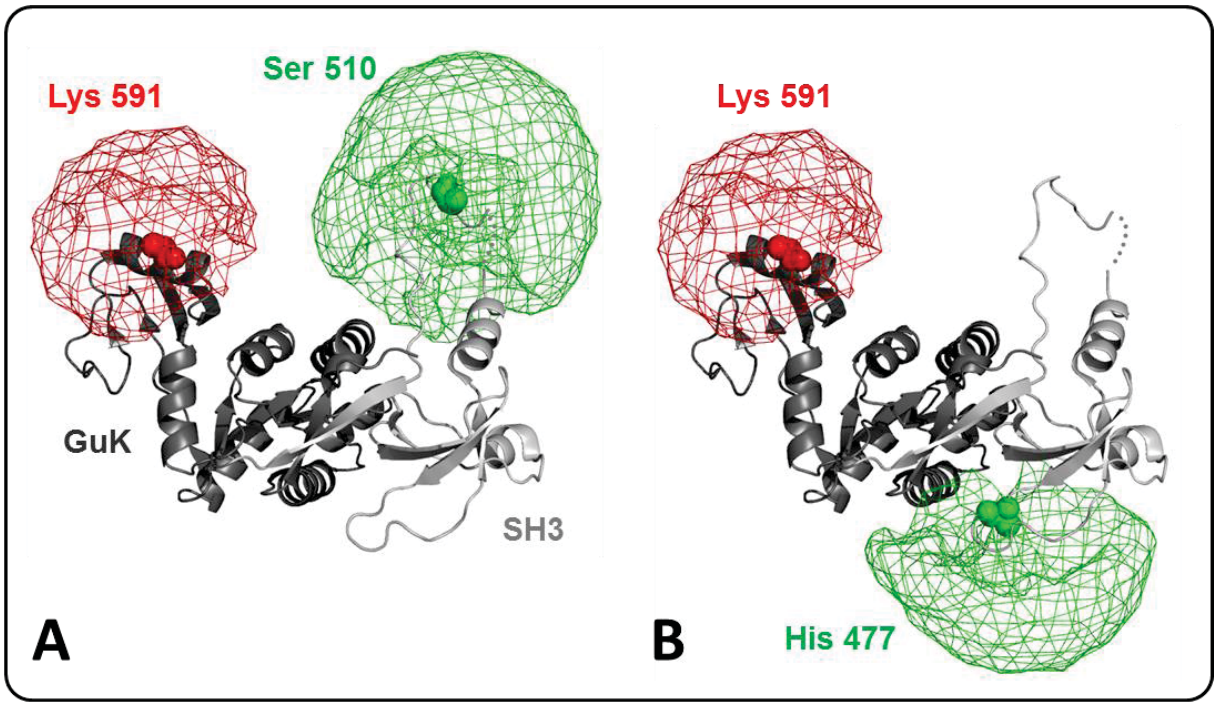


Abbildung 4-45: Fluoreszenzmarkierungspositionen der PSD-Varianten zur Bestimmung der *loop*-Dynamik. Die gegen Cysteine ausgetauschten Aminosäuren sind als Karlottenmodell, der errechnete Aufenthaltsraum der Fluoreszenzfarbstoff ist als sphärisches Netz (Donor: grün, Akzeptor: rot) dargestellt. **(A)** PSD-95(S510C, K591C) mit den Parametern: $R_{C\beta}$- $R_{C\beta}$ = 43,8 Å (Röntgenkristallstruktur, PDB-ID: 1KJW), R_{mp} = 47,1 Å, $<R_{DA}>$ = 49,7 Å (σR_{DA} = 10,4 Å) und $<R_{DA}>_{FRET}$ = 49,9 Å (aus AV-Modell) **(B)** $R_{C\beta}$- $R_{C\beta}$ = 47,5 Å (Röntgenkristallstruktur, PDB-ID: 1KJW), R_{mp} = 58,5 Å, $<R_{DA}>$ = 60,4 Å (σR_{DA} = 8,1 Å) und $<R_{DA}>_{FRET}$ = 59,0 Å (aus AV-Modell).

4.3.5 Lokalisierung von PDZ3 relativ zu GuK und SH3

McCann et al. (2012) lokalisierte mit den durchschnittlichen FRET-Distanzen von 44 fluoreszenzmarkierten PSD-95-Varianten die Position der PDZ3-Domäne relativ zur SH3- und GuK-Domäne unter Zuhilfenahme des Programms CNS v1.3 (Brunger*, et al.*; 1998). Mit Hilfe des institutseigenen Programms *FRET Positioning and Screening* v1.1 (FPS) und mit nur zwei ermittelten FRET-Abständen aus eTCSPC sollte das Ergebnis aus McCann et al. qualitativ überprüft werden. Die eTCSPC-Daten und die daraus ermittelten FRET-Abstände nach Gleichung 2-13 und Gleichung 2-14 für die Simulation wurden aus den Messungen von PSD-95(S398C, R492C)DA und PSD-95(S398C, E621C) entnommen und sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst.

Tabelle 4-12: Bestimmung der FRET-Abstände aus eTCSPC. Die rot-markierten Abstände wurden für die Struktursimulation mittels FPS eingesetzt.

Variante	Y236C+S398C	S398C+R492C	S398C+E621C	S510C+K591C	H477C+K591C
R^1_{DA} [Å] (A_1)	47.676 (0.129)	**35.850 (0.147)**	**42.039 (0.271)**	42.934 (0.319)	37.280 (0.182)
τ_1	1.39 ns	0.36 ns	0.81 ns	0.89 ns	0.44 ns
R^2_{DA} [Å] (A_2)	90.311 (0.816)	54.043 (0.253)	68.053 (0.337)	65.675 (0.434)	53.368 (0.338)
τ_2	3.59 ns	2.07 ns	3.10 ns	2.98 ns	2.00 ns
X_{Donly}	0.055	0.600	0.392	0.247	0.480
χ^2_r	1.168	1.152	1.113	1.198	1.149

Die Simulation der Orientierung der PDZ3-Domäne relativ zur SH3- und GuK-Domäne erfolgte mit modifizierten Röntgenkristallstrukturen (PDZ3: PDB-ID 1BFE, SH3/GuK: PDB-ID 1KJW), so dass freie Kopplungsstellen am Cβ-Atom der zu markierenden Aminosäure zur Verfügung stellt wurden. Diese Modifikationen bestehen aus einer Löschung aller Atome der entsprechenden Aminosäure bis zum Cβ-Atom durch einfaches Entfernen der Eintragungen

im pdb-Skript. Die Positionierung der PDZ3-Domäne erfolgte mit den aus Tabelle 4-12 aufgeführten Grenzabstände mit einer Standardabweichung von +/- 5 Å und zehn möglichen Lösungen für die Orientierung. Weitere Lösungsmöglichkeiten verbesserten die Simulation nicht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-46 A gezeigt.

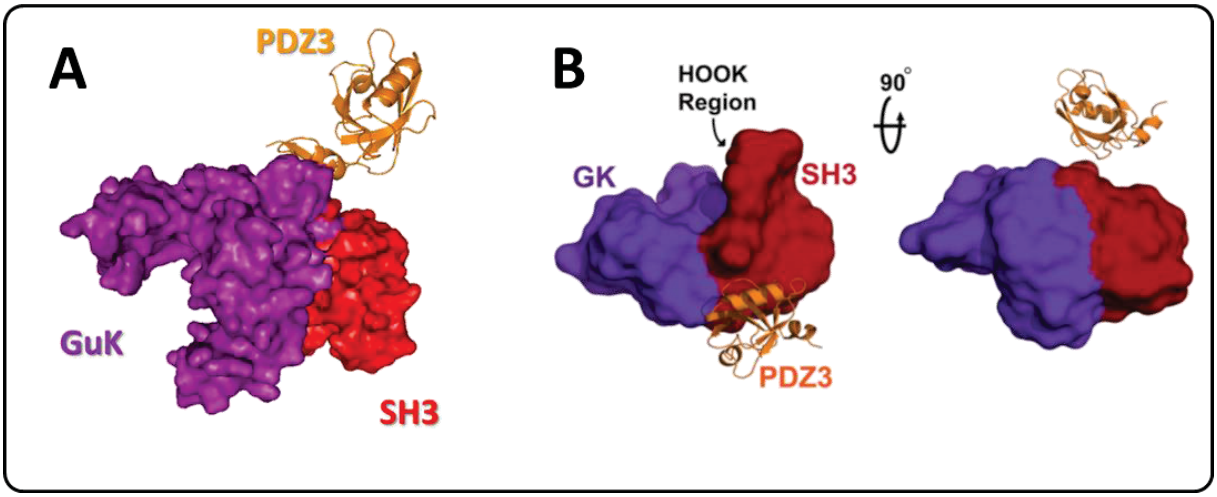


Abbildung 4-46: Lokalisierung der PDZ 3-Domäne relativ zu den Domänen GuK und SH3. (A) Lokalisierung der PDZ 3-Domäne aus den FRET-Abständen der eTCSPC-Daten (Tabelle 4-12) für PSD-95(S398C, R492C)DA und PSD-95(S398C, E621C)DA und Zuhilfenahme des AV-Modells. **(B)** Lokalisierung der PDZ 3-Domäne aus McCann et al. (2012). Beide Orientierungsmodelle zeigen eine sehr gute Übereinstimmung.

Im Vergleich zu Abbildung 4-46 B (McCann, et al.; 2012) konnte eine sehr gute Übereinstimmung der Lokalisierung der PDZ3-Domäne mit Hilfe von unabhängig generierten Daten erreicht werden. Aufgrund der Vielzahl an gemessenen fluoreszenzmarkierten PSD-95-Varianten in McCann et al. (2012) ist die dort beschriebene Lokalisierung wesentlich genauer. Die Einbeziehung der größeren FRET-Abstände in die Simulation erbrachte erwartungsgemäß weitere Orientierungsmöglichkeiten der PDZ3-Domäne, die jedoch durch das Fehlen der Peptidkette zwischen PDZ3 und SH3 nicht alle sinnvolle Positionen lieferten.

4.3.6 Zusammenfassung

Dieses Teilprojekt veranschaulicht die Möglichkeiten mit der Multiparameter-Fluoreszenz-Einzelmolekülspektroskopie schnelle Proteindynamik quantitativ zu charakterisieren. Für die Domänen-Interaktionen in PSD-95 konnten multiple Zeitskalen im Mikro- und dreistelligen Nanosekundenbereich ermittelt werden. Es wurden sowohl globale Interdomänendynamik, als auch lokale Strukturdynamik gefunden. Des Weiteren konnte zusammen mit den Ergebnissen aus McCann et al. (2012) nachgewiesen werden, dass die Tertiärstruktur von PSD-95 erhalten bleibt und dass die Domänenkomplexe aus PDZ1 und 2, sowie aus PDZ3, SH3 und GuK voneinander unabhängige sub-Tertiärstrukturen sind. Ebenso war es möglich mit den Daten aus McCann et al. (2012), sowie den Daten aus der Einzelmolekül-Spektroskopie eine statistisch gemittelte Lokalisierung der PDZ3-Domäne vorzunehmen. Somit ist PSD-95 ein dynamisches Konstrukt aus Proteindomänen, dass Interaktionen mit Protein- und Rezeptornetzwerken innerhalb der postsynaptischen Region sichert, obwohl das zellulare Umfeld sehr komplex ist (Funke*, et al.*; 2005).

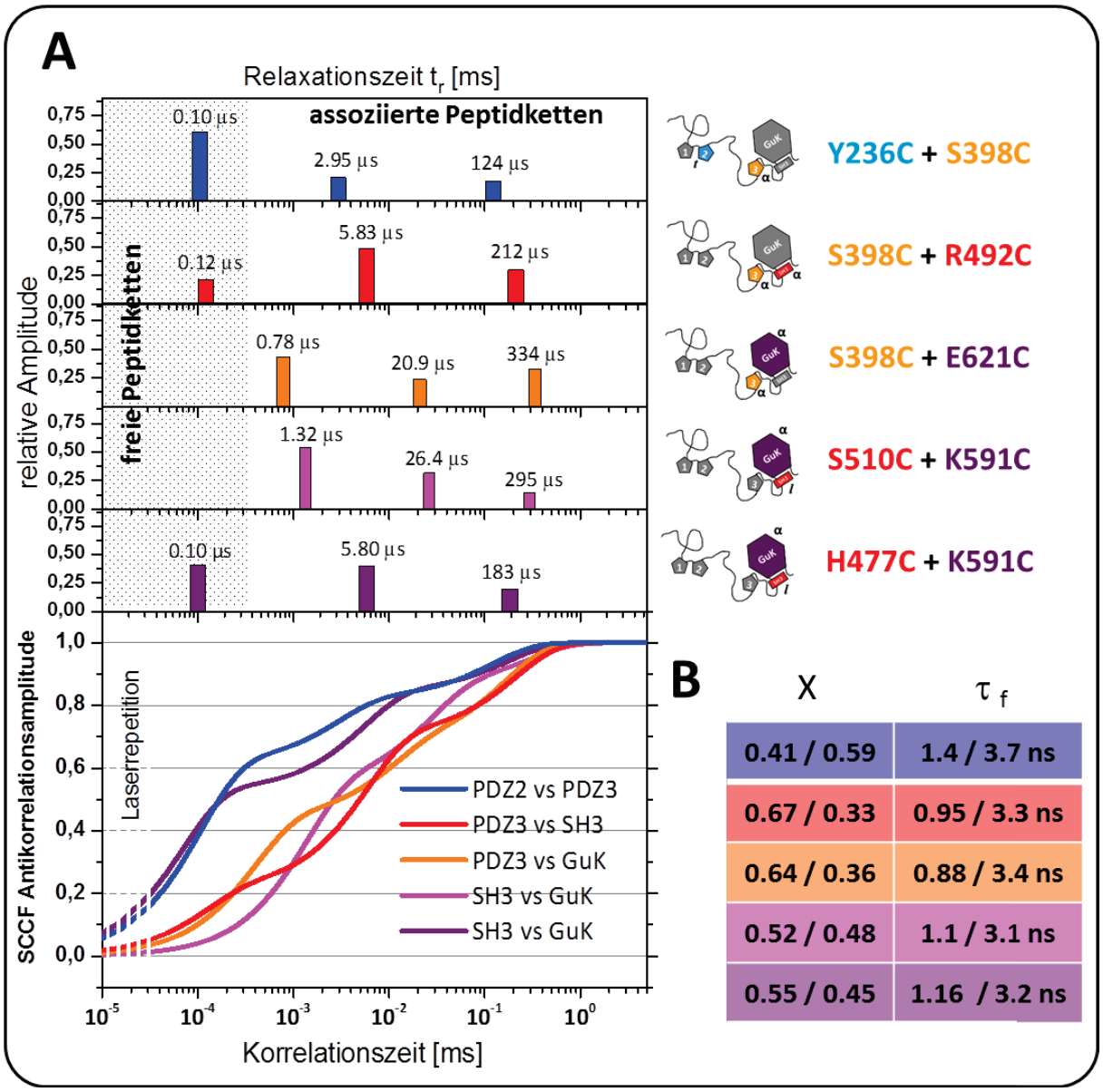


Abbildung 4-47: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen. (A) Ergebnisse der Spezies-selektiven Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Dargestellt sind die ermittelten Relaxationszeiten der verschiedenen PSD-95-Varianten (obere Balkendiagramme), sowie die Antikorrelationsterme der SCCF (unteres Diagramm). Die Dynamik von freien und assoziierten Peptidketten konnte voneinander unterschieden werden. **(B)** SeTCSPC-Untersuchungen aus den FRET-Populationen zeigen jeweils zwei mittlere Fluoreszenzlebensdauern. Indizes für die Fluoreszenzfarbstoff-Position: α → α-Helix, β → β-Faltblatt, *l* (lange unstrukturierte Proteinkette, engl. *loop*), *t* (kurze unstrukturierte Proteinkette, engl. *turn*). Die Teilrelaxationszeiten, $t_{R(12)}$ und $t_{R(21)}$, sind für die Hauptamplitude dargestellt.

Bei einer genaueren Betrachtungsweise der ermittelten Relaxationszeiten und deren Amplituden aus der Spezies-selektiven Fluoreszenz-Kreuzkorrelation (Abbildung 4-47) können Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Dynamik von PSD-95 gezogen werden. Aufgrund der dominierenden Amplitude von t_{R1} (61%) in PSD-95(Y236C, S398C)DA im Vergleich zu den anderen untersuchten PSD-95-Varianten ist anzunehmen, dass die Dynamik

der langen Peptidkette zwischen den Domänen PDZ2 und PDZ3 im Bereich von 100 ns liegt. Bei der Betrachtung der Interaktion zwischen der GuK- und der SH3-Domäne fällt auf, dass der die unstrukturierte Peptidkette mit der H477C-Mutation deutlich flexibler ist, als die mit der S510C-Mutation. Da sich die Peptidkette mit der S510C-Mutation in der sogenannten *hook region* (engl., Harken-Region) befindet, scheint dieser Bereich der SH3-Domäne eine besondere Bedeutung für die Interaktion mit anderen Domänen zu besitzen. Bereits in Vandanapu et al. (2009) wurde vermutet, dass die *hook region* durch ihre ausgeprägte α-Helix in der Lage ist mit der GuK-Domäne zu interagieren, und dass die Flexibilität dieser Region ein entscheidendes Kriterium bei dieser Interaktion ist (Vandanapu*, et al.*; 2009). Beide Beispiele zeigen, dass es bei geeigneter Kombination der verschiedenen fluoreszenzmarkierten PSD-95-Varianten möglich ist, einzelne dynamische Komponenten zuzuordnen. Dabei konnte eine Korrelation von Struktur und Dynamik ermittelt werden, bei der zwischen der schnellen Peptidkettendynamik und der langsameren Wechselwirkungen zwischen den Domänen im Mikrosekundenmaßstab unterschieden werden konnten. Aus den ermittelten seTCSPC-Daten konnten in allen Fällen zwei FRET-Lebensdauern ermittelt werden, denen zwei mittlere FRET-Abstände zugeordnet werden konnten (Abbildung 4-47 B). Jedoch wurden für die untersuchten Domäneninteraktionen, bei denen die PDZ3-Domäne beteiligt war, drei Relaxationszeiten gefunden, die auf mindestens vier Zustände hinweisen. Aufgrund dieser Tatsache kann ein lineares FRET-Modell ausgeschlossen werden (Abbildung 4-48 A), da hierfür der Anzahl der Zustände eine entsprechende Fluoreszenzlebensdauer existieren muss. Wahrscheinlicher ist die Existenz eines parallelen FRET-Modells, mit unterschiedlichen LF- und HF-Populationen bei gleicher mittlerer Fluoreszenzlebensdauer, jedoch unterschiedlicher Relaxationszeiten (Abbildung 4-48 B). Betrachtet man diese Ergebnisse zusammen mit der erforderlichen Funktionsweise von PSD-95 als Gerüstprotein liegt die Vermutung nahe, dass es Interaktionsbereiche für die Kopplung der Domänen untereinander existieren. Die untersuchten Domänen besitzen eine verschiedenartige Affinität zueinander, die unterschiedliche Wechselwirkungen mit jeweiligen Relaxationszeiten eingehen.

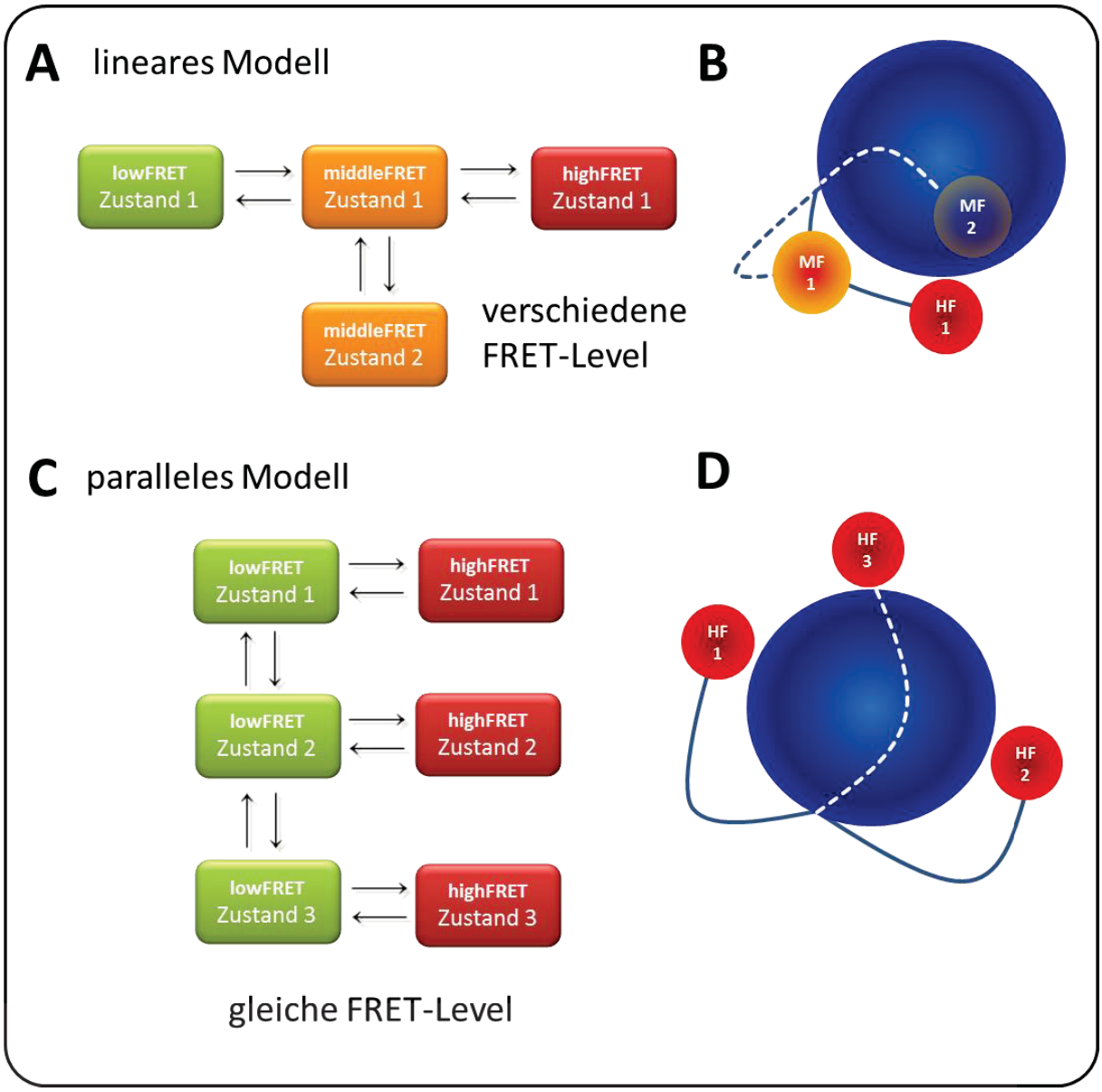


Abbildung 4-48: Modellsysteme für dynamische FRET-Zustände. (A) Beim linearen Modell verläuft der Weg vom lowFRET (LF)- zum highFRET (HF)-Zustand über Intermediat-Zustände. **(B)** Beim parallelen Modell existieren mehrere unterschiedliche LF- und HF-Zustände, die ineinander übergehen können. Dieses Modell korrespondiert zu den Ergebnissen der Spezies-selektiven Fluoreszenz-Kreuzkorrelation für PSD-95.

4.4 Modellsystem IV: Untersuchungen zur Proteinfaltung anhand von T4 Lysozym

Schwerpunkt dieses Projekts ist der Einfluss einer zunehmenden Harnstoffkonzentration auf Sekundär- und Tertiärstruktur des Lysozyms des T4 Phagen (T4L). Zu diesem Zweck wurde zur Analyse der Sekundärstruktur die Elliptizität durch Zirkular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie bei steigender Harnstoffkonzentration von pseudowildtypischen T4L und von den seinen Varianten S44TAG+R119C und R8TAG+P86C gemessen. Die im wildtypischen T4L vorkommenden Cysteine (Cys54 und Cys97) wurden durch Threonin (54) und Alanin (97) ersetzt. Anstelle des Stopp-Codons wurde die unnatürliche Aminosäure para-Acetylphenylalanin (pAcF) durch Cotransformation eines dafür optimierten tRNA/tRNA-Synthetase-Paares eingebaut. Eine ähnliche Vorgehensweise erfolgte für die Untersuchung der Stabilität der Tertiärstruktur mit Hilfe von Ensemble-Fluoreszenztitrationen. Die T4L-Varianten wurden dazu durch den Einbau der künstlichen Aminosäure 4-Acetylphenylalanin (Donor-Kopplung) und einem Cystein-Aminosäurerest (Akzeptor-Kopplung) selektiv fluoreszenzmarkiert (Kapitel 3.1.4.3). Für T4L(S44pAcF, R119C)DA wurden zusätzlich Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen vorgenommen.

4.4.1 Fluoreszenzmarkierung von T4L

Die Fluoreszenzmarkierung der T4L-Varianten erfolgte nach der in Kapitel 3.1.4.3 beschriebenen Methode mit den Fluoreszenzfarbstoffen *Alexa Fluor® 488 Hydroxylamin* und *Alexa Fluor® 647 Maleimid*. Eine schematische Darstellung der Markierungspositionen ist in Abbildung 4-49 A dargestellt. Die Markierungseffizienzen ermittelten sich nach Kapitel 3.2.1 für T4L(R8pAcF, P86C)DA zu 104% für Alexa 488 und 91% für Alexa 647, sowie für T4L(S44pAcF, R119C)DA zu 77% (A488) und 93% (A647) (Abbildung 4-49 B). Die Ursache für Markierungseffizienzen über 100% liegt in vielen Fällen an einer Vergesellschaftung des fluoreszenzmarkierten Proteins mit freiem Farbstoff und lässt sich meistens nicht vollständig verhindern.

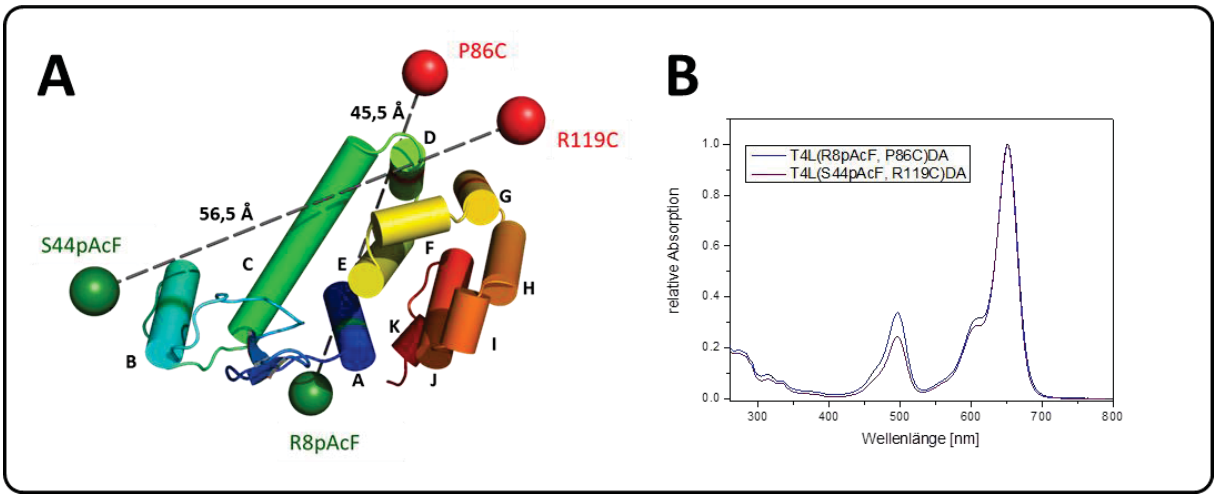


Abbildung 4-49: Fluoreszenzmarkierung von T4L. (A) Schematische Darstellung der Markierungspositionen für die Fluoreszenzfarbstoffe. Die mittlere Position der Farbstoffe sind als grüne (A488) und rote (A647) Kugeln, die Position der entsprechenden Kopplungsaminosäure als grüne oder rote Ringe an den Helices dargestellt. **(B)** Absorptionsspektrum von T4L(R8pAcF, P86C)DA und T4L(S44pAcF, R119C)DA zur Ermittlung der Markierungseffizienz. Die Spektren sind auf das Maximum der Absorption bei 650 nm (A647) normiert.

4.4.2 Zirkularer Dichroismus bei verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen

Die Präparation der T4L-Mutanten wurde nach Kapitel 3.2.3.1.1 durchgeführt. Mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 nm pro Minute wurden CD-Spektren für die verschiedenen Harnstoffkonzentrationen in einem Bereich von 260 bis 200 nm aufgenommen (Abbildung 4-50 A). Die so erhaltenen Werte bei 222 nm für die Elliptiziät Θ_λ ($mgrad$) wurden nach Gleichung 4-9 in die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest $\left\langle {}^{R}\Theta_\lambda \right\rangle$ $\left(grad \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}\right)$ umgerechnet:

$$100 \cdot \frac{\Theta_\lambda}{c \cdot d \cdot n} \qquad \text{Gleichung 4-9}$$

Θ_λ Elliptizität in $grad$

c Proteinkonzentration in mol/l

d Schichtdicke der Probenküvette in cm

n Anzahl der Aminosäurereste

Die so berechneten Elliptizitäten bei 222 nm wurden anschließend gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen (Abbildung 4-50 B). Dabei ist deutlich der sigmoidale Verlauf der Datenpunkte erkennbar. Der steile Anstieg zwischen 4500 mM und 5500 mM

Harnstoff der mittleren molaren Elliptizität je Aminosäurerest kennzeichnet den Übergangsbereich vom nativen zum denaturierten Zustand des Proteins.

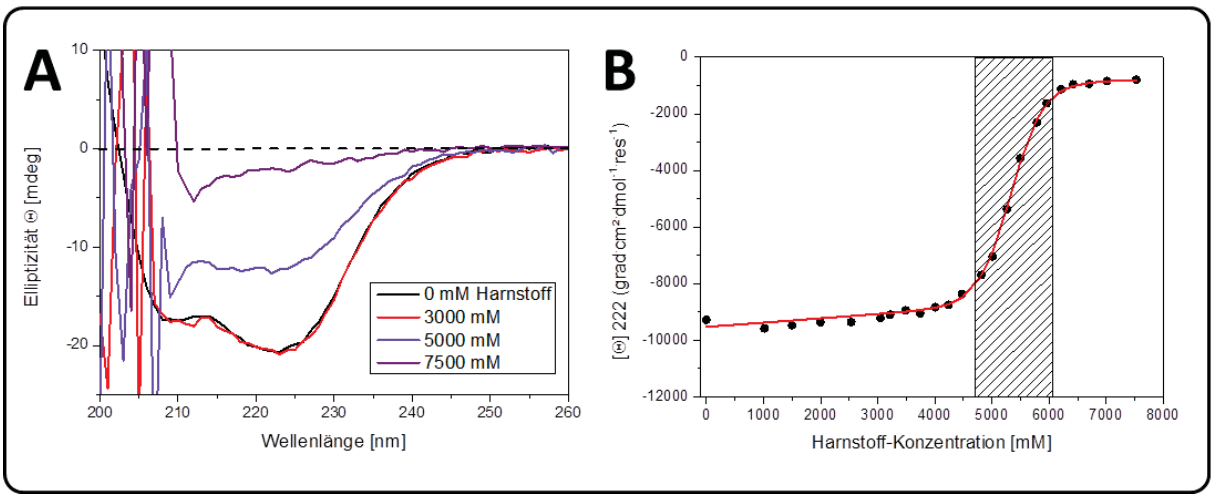


Abbildung 4-50: Bestimmung der Elliptizität von wildtypischen T4L mittels Zirkular-Dichroismus (CD). (A) Überlagerte CD-Spektren von T4L inkubiert bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen. Deutlich ist der Übergang vom strukturierten α-Helix-dominierten Protein zum unstrukturierten Bereich (*random coil*) zu erkennen. **(B)** Die bei 222 nm erhaltene Elliptizität wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet und gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. Der sigmoidale Verlauf der Messpunkte kennzeichnet den Übergang vom nativen zum denaturierten Zustand von T4L (schraffierter Bereich).

Die Quantifizierung des Übergangszustandes erfolgte durch eine mathematische Anpassung mit einer sigmoidalen Kurve (Gleichung 4-10) durch die Messpunkte (Santoro*, et al.*; 1988).

$$Y_{obs} = \frac{Y_D + \beta_D \cdot c + \left(Y_N + \beta_N \cdot c\right) \cdot e^{-(\Delta G^0 + m \cdot c)/RT}}{1 + e^{-(\Delta G^0 + m \cdot c)/RT}} \qquad \text{Gleichung 4-10}$$

Y_{obs}	Beschreibung der beobachteten Größe
$Y_{D/N}$	Achsenabschnitt für den linearen denaturierten bzw. nativen Bereich
$\beta_{D/N}$	Steigung für den linearen denaturierten bzw. nativen Bereich
m	Steigung im mittleren Kurvenbereich
c	Harnstoffkonzentration
ΔG^0	freie Enthalpie für den Entfaltungsprozess

Zur Veranschaulichung von Gleichung 4-10 sind die wichtigsten Parameter in Abbildung 4-51 dargestellt.

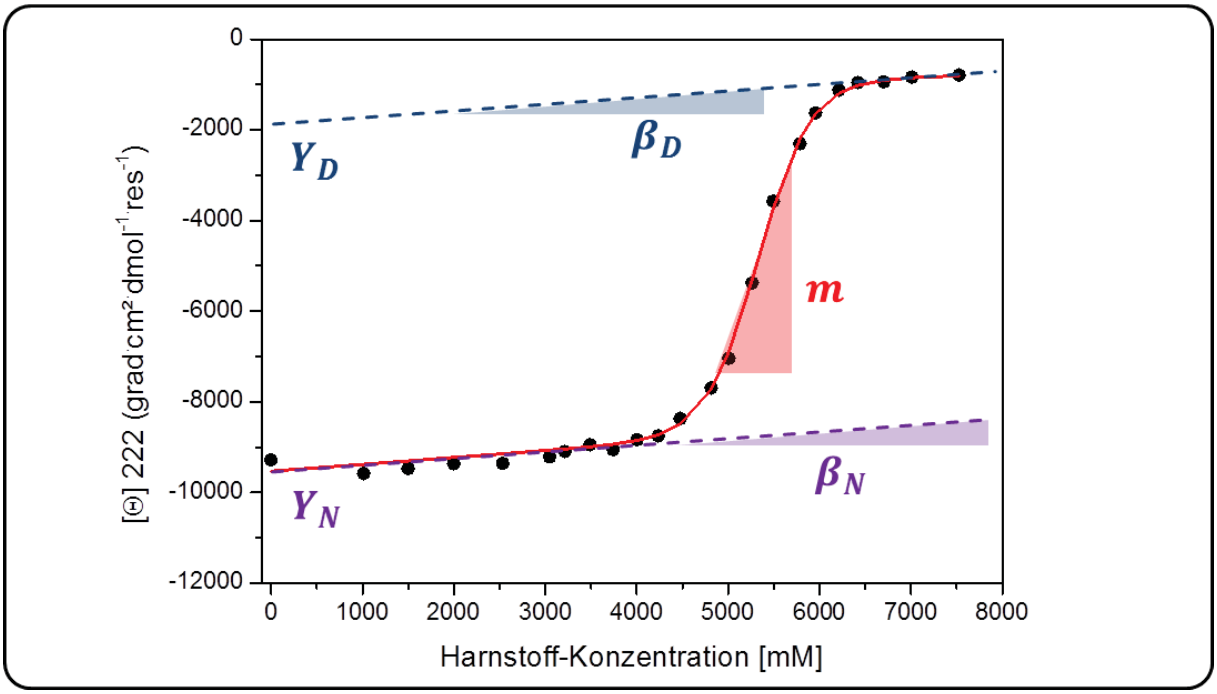


Abbildung 4-51: Mathematische Anpassung des sigmoidalen Verlaufs der Messdaten aus Abbildung 4-50 B. Der Verlauf der Messdaten kann in drei Bereiche unterteilt werden: den nativ-linearen Bereich zwischen 0 und 4000 mM Harnstoff mit Y_N als Y-Achsenabschnitt und β_N als Steigung , einen steil ansteigenden Bereich der Elliptizität zwischen 4000 und 5500 mM Harnstoff mit der Steigung m, sowie den denaturiert-linearen Bereich von 5500 bis 7500 mM (entsprechend Y_D und β_N). Die rote sigmoidale Kurve durch die Messpunkte stellt die mathematische Anpassung dar.

Zusammen mit Gleichung Gleichung 4-11 konnten die Übergangskonzentration $c_{transition}$ (Street*, et al.*; 2008) von nativen in den denaturierten Proteinzustand, sowie die dafür erforderliche freie Enthalpie für den Entfaltungsprozess (Gleichung 4-10) ermittelt werden.

$$c_{transition}[mM] = \frac{\Delta G^0}{|m|} \cdot 1000 \qquad \text{Gleichung 4-11}$$

Für wildtyptisches T4L (Abbildung 4.3-2) ergibt sich für die Übergangskonzentration 4943 mM und für die freie Enthalpie ΔG^0 10,9 kcal/mol.

4.4.2.1 Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf den Entfaltungsprozess

Für die Untersuchung des Einflusses von Fluoreszenzmarkern auf den Denaturierungsprozess wurde die Elliptizität von markierten und unmarkierten T4L(S44pAcF, R119C) und damit die Übergangskonzentration $c_{transition}$ sowie die freie Enthalpie für den Entfaltungsprozess ΔG^0 bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-52 dargestellt.

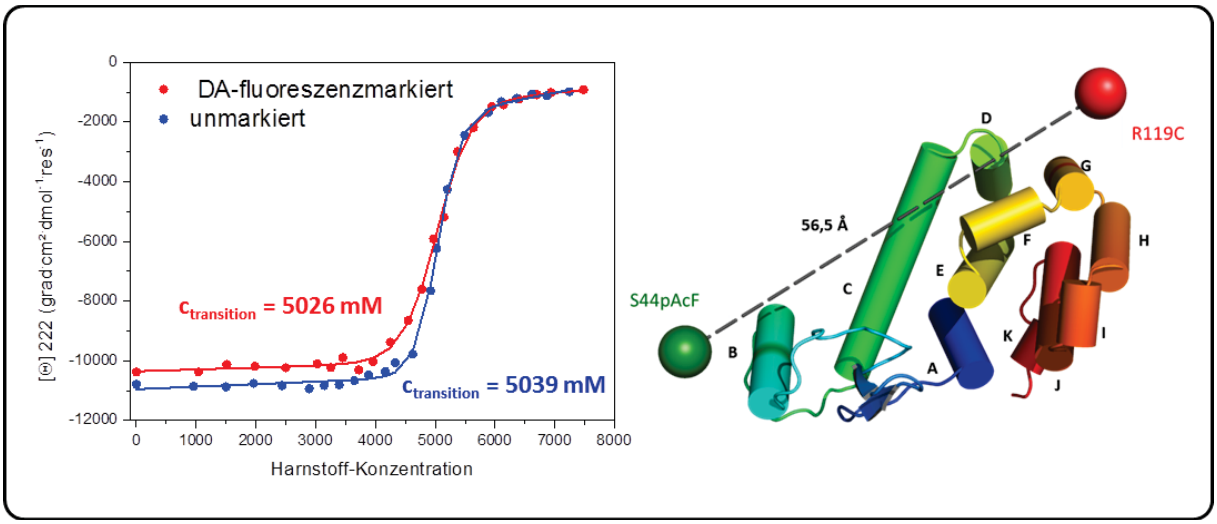


Abbildung 4-52: Vergleich der Elliptiztäten zwischen fluoreszentmarkiertem und unmarkiertem T4L(S44pAcF, R119C). Die linke Bildhälfte zeigt im Vergleich den Verlauf der Ellipitzitäten mit der Harnstoffkonzentration zwischen T4L(S44pAcF, R119C) (blau) und T4L(S44pAcF, R119C)DA (rot). Die rechte Bildhälfte zeigt schematisch die Position der Kopplungsstellen (C_β-Atome) für die Fluoreszenzfarbstoffe (grün für den Donor, rot für den Akzeptor; PDB-ID: 172L).

Mit einer Übergangskonzentration $c_{transition}$ von 5039 mM (T4L(S44pAcF, R119C)) und 5026 mM (T4L(S44pAcF, R119C)DA) ist der Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf struktureller Ebene als nicht signifikant einzustufen. Hingegen haben die an T4L gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Einfluss auf die für den Denaturierungsprozess erforderliche Energie. Diese liegt für T4L(S44pAcF, R119C)DA bei $\Delta G^0 = 10{,}4$ kcal/mol und ist damit im Vergleich zu T4L(S44pAcF, R119C) ($\Delta G^0 = 15{,}5$ kcal/mol) um einen Drittel geringer.

4.4.2.2 Beeinflussung der Interaktion zwischen den α-Helices A und E

Bei der Untersuchung der T4L-Variante R8pAcF+P86C mit Hilfe des Zirkular-Dichroismus konnte ein zweistufiger Übergangsprozess beobachtet werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Kato, *et al.*; 2007, Llinas, *et al.*; 1999, Llinás, *et al.*; 1998, Lu, *et al.*; 1992), interagieren die N-terminale α-Helix mit dem Donor-Fluoreszenzmarker und die C-terminale Subdomäne mit dem Akzeptor-Fluoreszenzmarker in einem dynamischen Prozess (Bouvignies, *et al.*; 2011) miteinander. Es ist anzunehmen, dass diese Domäneninteraktion durch das Einbringen der künstlichen Aminosäure 4-Acetylphenylalanin beeinflusst wurde und dies wiederum in einem Intermediatzustand resultiert. Die Auftragung der mittleren molaren Elliptizität je Aminosäurerest $\left\langle {}^{R}\Theta_{\lambda} \right\rangle$ gegen die Harnstoffkonzentration ist in Abbildung 4-53 dargestellt.

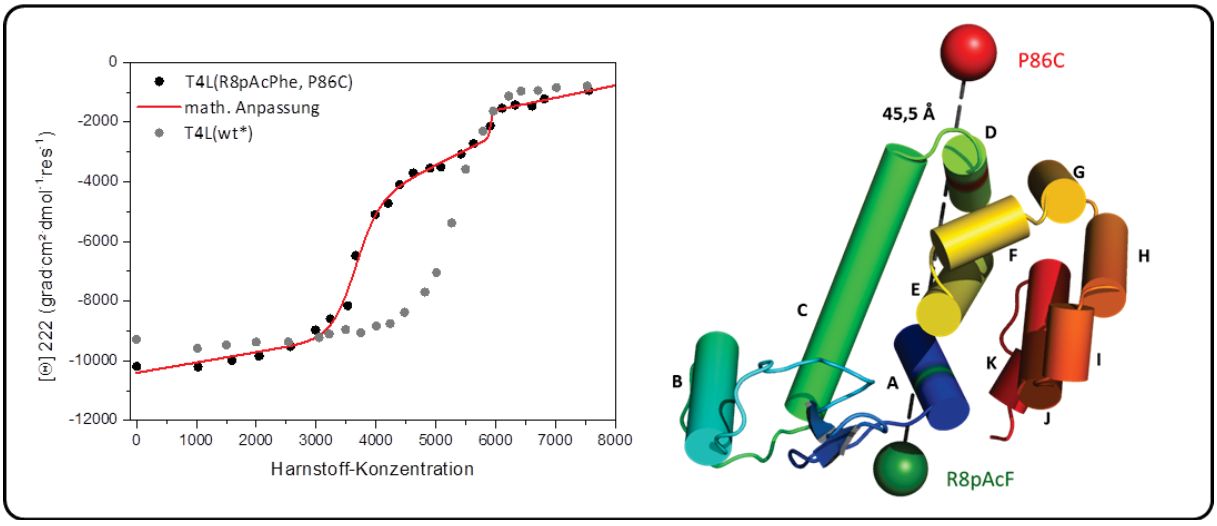


Abbildung 4-53: Zweistufiger Denaturierungsprozess in T4L(R8pAcF, P86C). Die linke Bildhälfte zeigt den Verlauf der Ellipitzitäten mit der Harnstoffkonzentration (schwarz). Deutlich ist der zweistufige Übergangsprozess bei 3678 mM und 5911 mM Harnstoff erkennbar (vgl. Gleichung 4-12). Im Vergleich dazu ist als graue Datenpunkte der Messdatenverlauf des Pseudowildtyps dargestellt. Die rechte Bildhälfte zeigt schematisch die Position der Kopplungsstellen (C_{β}-Atome) für die Fluoreszenzfarbstoffe (PDB-ID: 172L).

Die Quantifizierung des Übergangsprozesses nach Santoro et al. (1988) und Street et al. (2008) ist in Tabelle 4-13 zusammengefasst. Entsprechend eines zweistufigen Übergangsprozesses wurde Gleichung 4-10 entsprechend angepasst:

$$Y_{obs} = \frac{Y_N + \beta_N \cdot c + (Y_I + \beta_I \cdot c) \cdot A + (Y_D + \beta_D \cdot c) \cdot A \cdot B}{1 + A \cdot (1 + B)}$$ Gleichung 4-12

$A = e^{-(\Delta G^0_{NI} + m_{NI} \cdot c)/RT}$

$B = e^{-(\Delta G^0_{IU} + m_{IU} \cdot c)/RT}$

Y_I Achsenabschnitt für den intermediaten Bereich

β_I Steigung für den intermediaten Bereich

$m_{NI/IU}$ Steigung im Kurvenbereich vom nativen zum intermediaten, bzw. intermediaten zum ungefaltenen Zustand

$\Delta G^0_{NI/IU}$ freie Enthalpie für den Entfaltungsprozess vom nativen zum intermediaten, bzw. intermediaten zum ungefaltenen Zustand

Tabelle 4-13: Zusammenfassung der Übergangsparameter von T4L(R8pAcF, P86C) nach Street et al. (2008).

	Übergang 1	**Übergang 2**
$c_{transition}$	3678 mM	5911 mM
ΔG^0	10,7 kcal/mol	184,1 kcal/mol

4.4.3 Untersuchung der Strukturänderung mit Ensemble-Fluoreszenztitrationen

Die Untersuchung von mehrstufigen Übergangsprozessen in T4L wurde mit Hilfe der Ensemble-Fluoreszenzspektroskopie realisiert. Zu diesem Zweck wurde D- und DA-fluoreszenzmarkiertes T4L schrittweise mit 8 molarem Harnstoff-Puffer (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4-Puffer, pH 7,5) auf eine definierte Harnstoffkonzentration eingestellt und die Änderung der Fluoreszenzsignale F_D (Anregungswellenlänge (Ex): 495 nm, Detektionswellenlänge (Em): 520 nm), F_A (Ex: 650 nm, Em: 670 nm) sowie $F_{D(A)}$ (Ex: 495 nm, Em: 670 nm) beobachtet.

4.4.3.1 Optimierung des Fluoreszenztitration

Die Genauigkeit der Messmethode, wie in Kapitel 3.2.3.1.2 beschrieben, wurde mit einer Fluoreszenztitration mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 untersucht. Zu diesem Zweck wurde die lineare Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals auf die Farbstoffkonzentration bei Titration mit reinem Wasser genutzt (Abbildung 4-54 A) und mit einer Titration mit dem Probenpuffer verglichen (Abbildung 4-54 B).

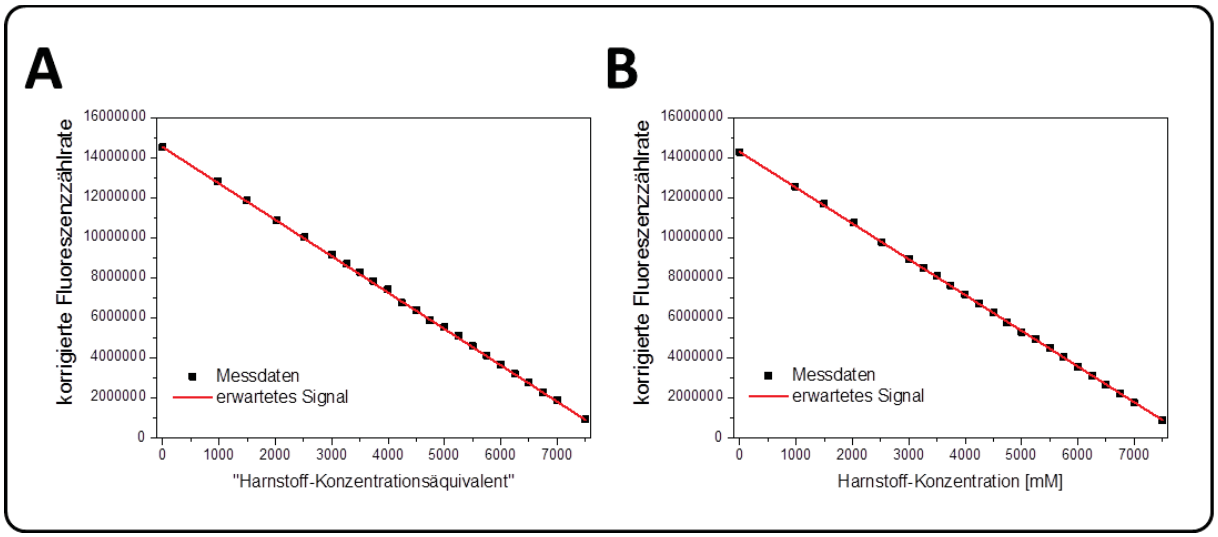


Abbildung 4-54: Überprüfung der Qualität des Homogenisierungsvorganges. (A) Schrittweise Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 488 mit Reinstwasser mit der nach Tabelle 4.3-3 beschriebenen Methode. Im Vergleich zum erwarteten Signal (rote Linie) konnte mit den tatsächlichen Messdaten (schwarze Punkte) eine sehr gute Übereinstimmung erhalten werden. **(B)** Schrittweise Verdünnung mit 8 M Harnstoff gelöst in Probenpuffer. Auch hier konnte eine sehr gute Übereinstimmung der Messdaten mit dem erwarteten Signal erreicht werden.

Der Vergleich der Fluoreszenztitrationen aus Abbildung 4-54 hat gezeigt, dass Viskositätseffekte mit der in Tabelle 3-17 vorgestellten Messmethode weitgehend unterdrückt werden können.

Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignales von der Harnstoffkonzentration wurde ebenfalls untersucht, um eventuelle daraus resultierende Effekte zu berücksichtigen. Es zeigte sich jedoch, dass der Einfluss der Harnstoffkonzentration auf das Untergrundsignal zu vernachlässigen ist (Abbildung 4-55).

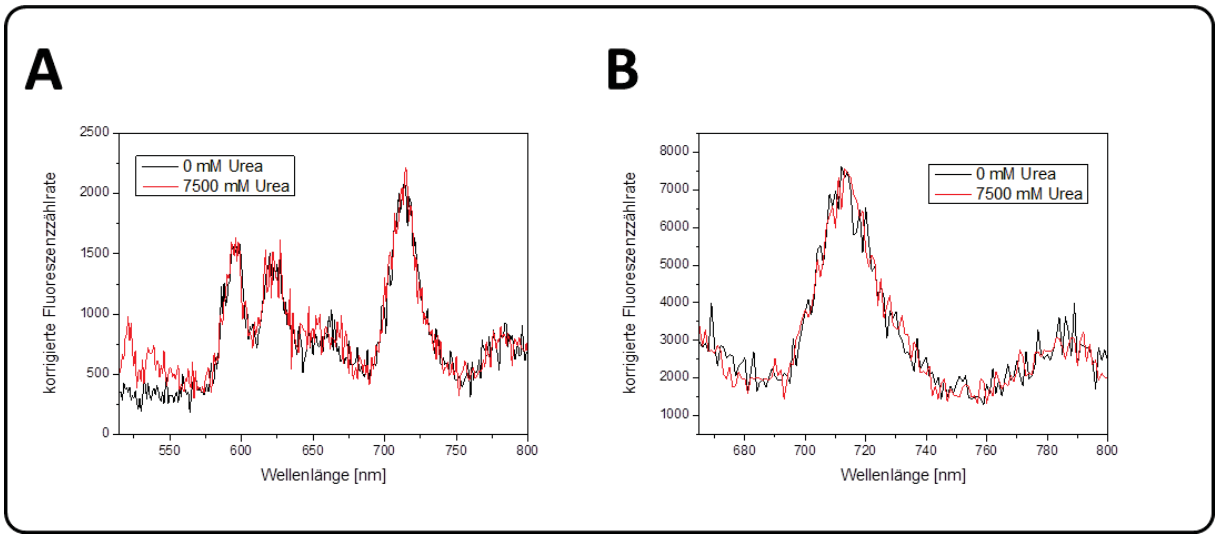


Abbildung 4-55: Einfluss des Harnstoff-haltigen Probenpuffers auf das Fluoreszenzsignal. (A) Fluoreszenzspektrum des Probenpuffers bei Donoranregung (Anregung bei 495 nm, Detektion zwischen 520 und 800 nm). **(B)** Fluoreszenzspektrum des Probenpuffers bei Akzeptoranregung (Anregung bei 650 nm, Detektion zwischen 670 und 800 nm). Der Einfluss von Harnstoff im Probenpuffer kann aufgrund beider Fluoreszenzspektren als Vernachlässigbar angesehen werden.

4.4.3.2 Korrekturfaktoren zu Ermittlung des Fluoreszenzsignals aufgrund von Strukturänderungen

Zur Ermittlung der Änderung des Fluoreszenzsignals aufgrund struktureller Änderung von T4L bei Anstieg der Harnstoffkonzentrationen mussten verschiedene Korrekturen und Korrekturfaktoren angewendet werden. Als erster Schritt wurde das Detektorsignal der fluoreszierenden Probe um den Untergrund korrigiert (Gleichung 4-13):

$$F_{D/DA/A} = S_{D/DA/A} - B_{D/DA/A} \qquad \text{Gleichung 4-13}$$

Wobei das Untergrundsignal für den 7,5 M Harnstoff-Puffer bei den entsprechenden Anregungs- und Detektionswellenlängen verwendet wurde. Da sich bei Zugabe des Harnstoff-Puffers das Probenvolumen und damit einhergehend das Fluoreszenzsignal ändert, musste ein Korrekturfaktor f_c für die Volumenänderung angewandt werden (Gleichung 4-14):

$$f_c = \frac{V_{Total}}{V_{Start}} \qquad \text{Gleichung 4-14}$$

Bei deutlicher Steigerung des Probenvolumens ist außerdem eine Erweiterung des Anregungs- und Detektionsspaltes (engl. *Slit*) des Fluoreszenzspektrometers erforderlich. Hierzu wurde bei einer definierten Harnstoffkonzentration jeweils Messungen aktueller und nachfolgender *Slit*-Einstellung vorgenommen. Damit ergibt sich ein weiterer Korrekturfaktor f_s, der sich ausschließlich auf die Messreihe mit den nachfolgenden *Slit*-Einstellungen bezieht (Gleichung 4-15):

$$f_s = \frac{S_{Slit(alt)}}{S_{Slit(neu)}} \qquad \text{Gleichung 4-15}$$

Bei der Untersuchung des Fluoreszenzsignales bei direkter Donor- und Akzeptoranregung konnte festgestellt werden, dass aufgrund steigender Harnstoffkonzentrationen eine Änderung der Quantenausbeuten von Donor- und Akzeptorfarbstoff zu erkennen war (Abbildung 4-56). Um den Einfluss der Fluoreszenz-Quantenausbeute herauszurechnen, wurde ein weiterer Korrekturfaktor eingeführt (Gleichung 4-16), der sich auf das Fluoreszenzsignal bei reiner Pufferlösung bezieht:

$$f_{\Phi}^{D/A} = \frac{F_{0mM\ \ Harnstoff}^{D/A}}{F_{XmM\ \ Harnstoff}^{D/A}} \qquad \text{Gleichung 4-16}$$

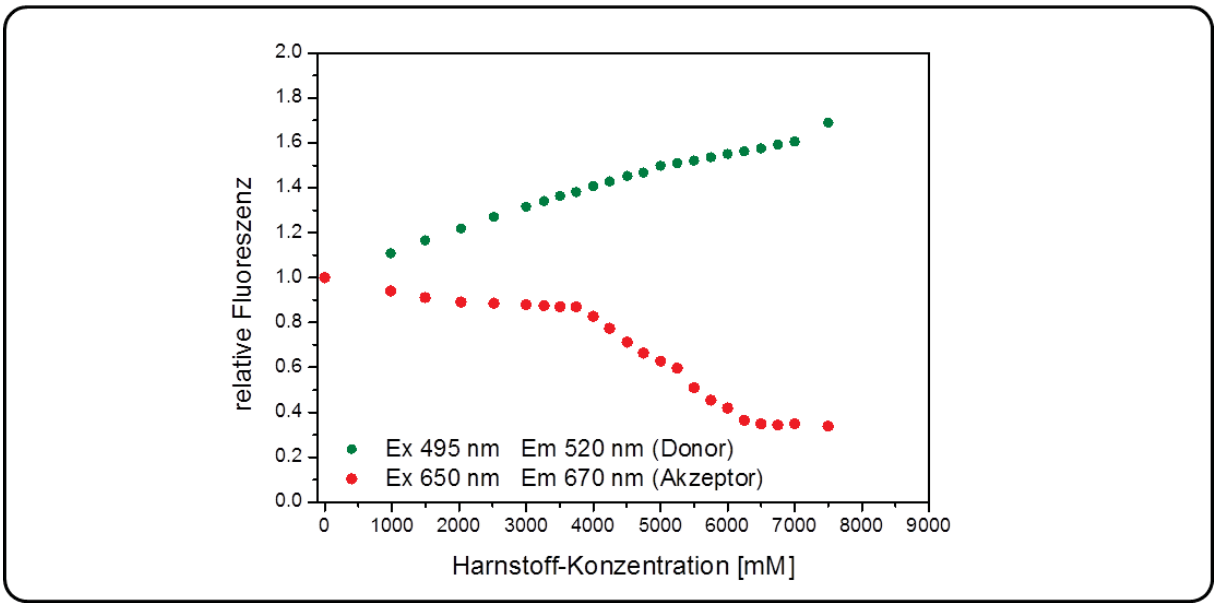


Abbildung 4-56: Einfluss des Harnstoff-haltigen Probenpuffers auf die Helligkeit der Fluorophore von T4L(S44pAcF, R119C)DA. Der Einfluss des Harnstoffes auf Donor- und Akzeptor-Farbstoff ist unterschiedlich ausgeprägt und lässt sich mit direkter Anregung des Donors und Akzeptors bei gleichzeitiger Detektion am entsprechenden Fluoreszenzmaximum ermitteln. Dieser Einfluss muss als Korrekturfaktor (Gleichung 4.3-6) bei der Betrachtung der Signaländerung aufgrund des Denaturierungsprozesses von T4L eingebracht werden.

4.4.3.3 Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen im Vergleich zur ermittelten Elliptizität

Für die Bestimmung der Änderung des FRET aufgrund der Strukturänderung von T4L während des Denaturierungsprozesses wurden vier verschiedene Fluoreszenzanregungs- und emissionsbereiche gewählt. Entsprechend Kapitel 4.4.3.2 wurde das Fluoreszenzsignal der ausschließlich mit dem Donor markierten Probe (F_D, Ex 495 nm , Em 520 nm), sowie das Fluoreszenzsignal bei direkter Anregung des Akzeptors einer DA-markierten Probe (F_A, Ex 650 nm,) zur Bestimmung der Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute bei Zunahme der Harnstoffkonzentration herangezogen. Des Weiteren wurden das Donor-Fluoreszenzsignal (F_D(A); Ex 495 nm, Em 520 nm), sowie das Akzeptor-Fluoreszenzsignal bei Anregung des Donors (F_A(D); Ex 495 nm, Em 670 nm) detektiert (Abbildung 4-57 A und B).

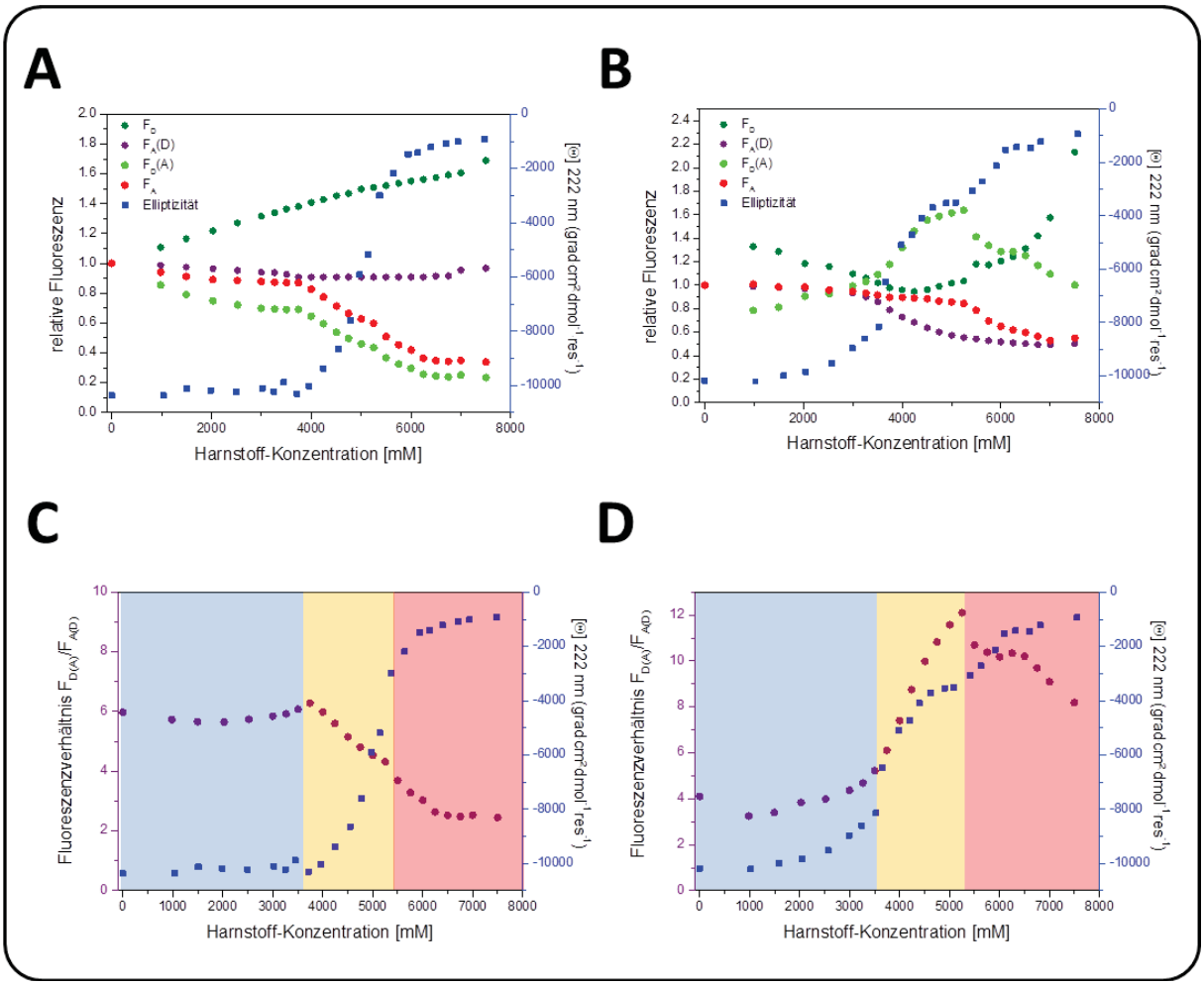


Abbildung 4-57: Untersuchung auf mehrere struktureller Zustände in T4 Lysozym mit Ensemble-Fluoreszenztitration. (A) Verlauf der relativen Fluoreszenz mit der Harnstoffkonzentration für die Fluoreszenzanregungs- und emissionsbereiche Ex 495 nm/Em 520 nm (F_D, D-markierte Probe), Ex 495 nm/Em 670 nm (F_A(D), DA-markierte Probe), Ex 495 nm/Em 520 nm (F_D(A), DA-markierte Probe) und Ex 650 nm/Em 670 nm (F_A, DA-markierte Probe) der T4L-Variante S44pAcF+R119C, sowie für **(B)** T4L(R8pAcF, P86C) im Vergleich zur mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest. **(C)** Fluoreszenzverhältnis F_D(A)/F_A(D) und mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest aus (A) aufgetragen gegen die Harnstoffkonzentration für T4L(S44pAcF, R119C) sowie für die **(D)** T4L-Variante R8pAcF+P86C (Datensatz (B)).

Um mit Hilfe des FRET mehrstufige strukturelle Änderungen von T4L bei Zunahme der Harnstoffkonzentration zu identifizieren, wurde das Fluoreszenzverhältnis F_D(A)/F_A(D) gebildet, um den Einfluss der Strukturänderung auf den Donor und den Akzeptor gleichwertig zu behandeln. Der Verlauf der Fluoreszenz-Messdaten für die T4L-Varianten S44pAcF+R119C (Abbildung 4-57 A und C) und R8pAcF+P86C (Abbildung 4-57 B und D) im Vergleich zur mittleren molaren Elliptizität je Aminosäurerest aufgetragen. Der Vergleich für beide Varianten zeigt, dass der Übergangsprozess vom nativen zum denaturierten Zustand sowohl mit der CD- als auch mit der Fluoreszenzspektroskopie äquivalent verfolgt werden kann, wogegen die Fluoreszenzdaten eine detailliertere Betrachtung der strukturellen Änderung zulassen. Obwohl eine genaue Beschreibung der strukturellen Abläufe während

des Denaturierungsprozesses von T4L bei Steigerung der Harnstoffkonzentration nicht möglich ist, zeigen die Ergebnisse, dass die Entfaltung mehrstufig und mit linear verlaufenden Anteilen verläuft. Ein scharfer Übergangsprozess, wie er zum Teil aus Messungen der Elliptizität anzunehmen ist, liegt hingegen nicht vor.

4.4.4 Untersuchung des Denaturierungsverlaufes der T4L-Variante S44pAcF+R119C mit eTCSPC

Für die Erstellung der 2D-Histogramme aus Einzelmolekül-spektroskopischen Messungen (siehe darauffolgendes Kapitel) wurden für die genaue Ermittlung der statischen FRET-Linien die Fluoreszenzquantenausbeuten der gekoppelten Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoffe mit eTCSPC bestimmt. Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden dabei mit T4L(S44pAcF, R119C)+A488 und T4L(S44pAcF, R119C)+A647, sowie mit Hilfe von Gleichung 3-13 berechnet. Dabei wurde festgestellt, dass die Fluoreszenquantenausbeute des Donors mit steigender Harnstoffkonzentration abnimmt, während die Fluoreszenz-Quantenausbeute des Akzeptors um ungefähr 30% ansteigt (Abbildung 4-58 A und B). Die ermittelten Fluoreszenzlebensdauern aus eTCSPC liefern außerdem Rückschlüsse auf verschiedene FRET-Spezies und damit auf verschiedene konformelle Zustände von T4L. Die ermittelten Daten aus eTCSPC sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst.

Tabelle 4-14: Fluoreszenzlebensdauern der T4L-Variante S44pAcF+R119C(DA) aus eTCSPC der Proben für die Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchung bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen c_{Urea}. Der rotmarkierte Bereich diente der Untersuchung der Änderung der Fraktionsgröße x während des Denaturierungsvorganges (vgl. Abbildung 4-58).

c_{Urea}:	0 M	2,0 M	3,0 M	4,0 M	4,5 M	5,0 M	5,5 M	6,0 M	6,5 M	7,0 M	7,5 M
τ_1	3,090	3,929	3,936	3.839	3.851	3.698	3.674	3.734	3.680	3.653	3.700
(x_1)	0,380	0,282	0,271	0,295	0,310	0,509	0,547	0,613	0,550	0,565	0,656
τ_2	1,826	2,144	2,196	2.147	2.224	1.871	1.740	2.043	1.795	1.747	1.999
(x_2)	0,480	0,515	0,518	0,510	0,491	0,332	0,199	0,242	0,198	0,187	0,226
τ_3	0,551	0,675	0,688	0.639	0.684	0.454	0.228	0.556	0.228	0.218	0.536
(x_3)	0,140	0,211	0,211	0,195	0,200	0,159	0,254	0,145	0,252	0,248	0,118
$\langle\tau_{DA}\rangle_f$	2.950	2.899	2.893	2.881	2.939	3.166	3.314	3.352	3.324	3.322	3.370

Vergleicht man die mittlere fluoreszenzgewichtete Fluoreszenzlebensdauer $\langle \tau_{DA} \rangle_f$ der FRET-Population in Bezug auf die Harnstoffkonzentration, so ist festzustellen, dass ein äquivalentes Verhalten zu den Messungen der Elliptizität besteht (Abbildung 4-58 C). Bei der Auftragung der Spezies-Fraktion x für τ_1 und τ_2 gegen die Harnstoffkonzentration ist erkennbar, dass der Messdatenverlauf des Anteils der τ_1-Spezies eine ähnliche Kurvenform aufweist, wie die Messdaten aus der CD-Spektroskopie. Der Messdatenverlauf für die τ_2-Spezies verläuft hingegen genau entgegengesetzt. Damit wird deutlich, dass τ_1 nicht nur *Donor-only* markierten Proteinen zuzuordnen ist, sondern eine Spezies im Denaturierungsprozess darstellt. Nimmt man ein vollständig denaturiertes Protein bei einer Harnstoffkonzentration ab 6000 mM an, wie es aus den CD-Messungen zu entnehmen ist, so stellt die τ_1-Spezies die dominierende Population in diesem Bereich dar, während sich die τ_2-Spezies signifikant verkleinert. Die τ_3-Spezies könnte eine weitere Subspezies im Denaturierungsprozess darstellen. Aufgrund des schwer zu charakterisierenden Messdatenverlaufes der τ_3-Spezies wurde auf eine weitere Betrachtung verzichtet.

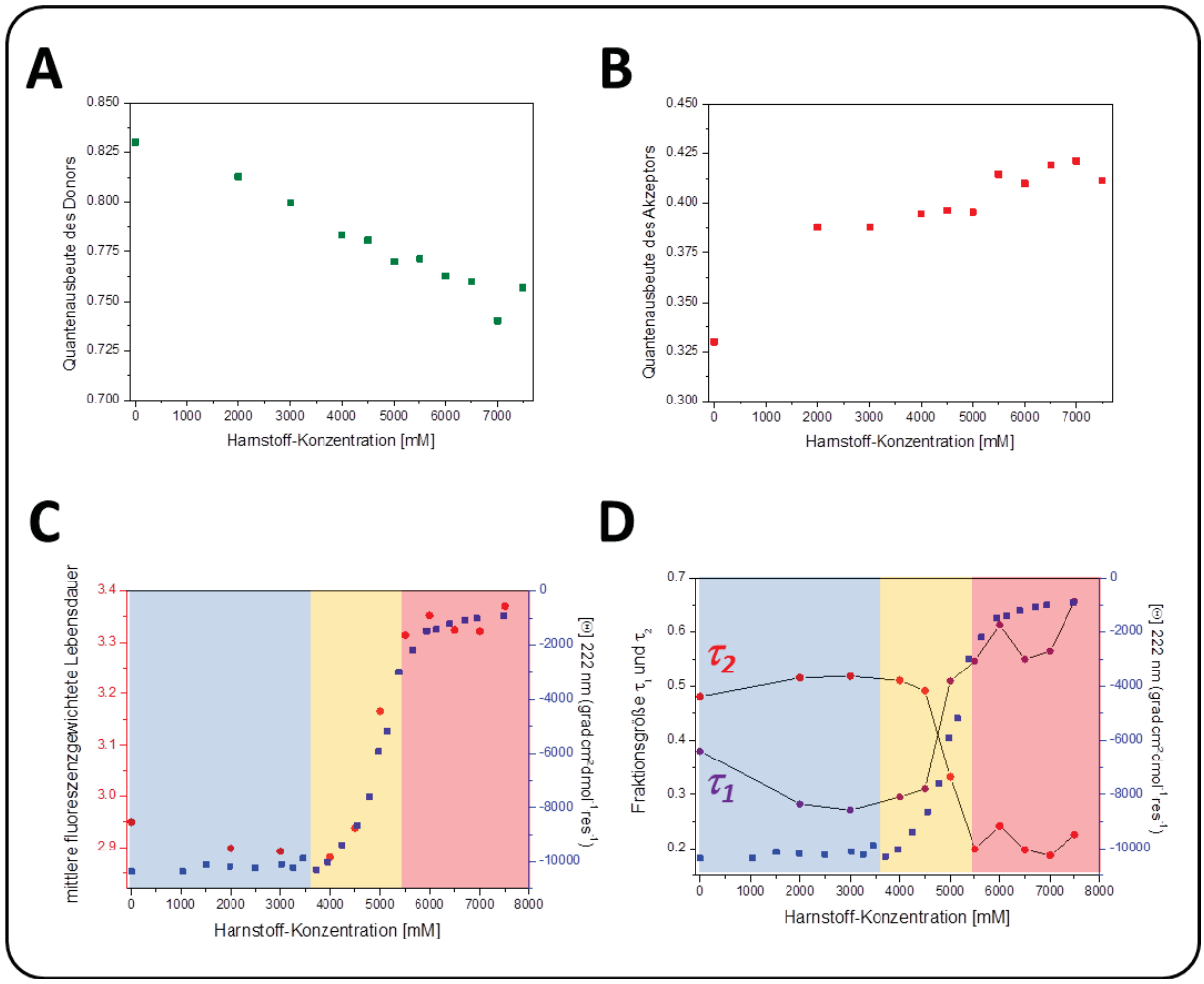


Abbildung 4-58: Spektroskopische Daten aus eTCSPC von T4L(S44pAcF, R119C)DA. (A) Quantenausbeute des Donors (Alexa 488) bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen aus eTCSPC. **(B)** Quantenausbeute des Akzeptors (Alexa 647) bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen aus eTCSPC. **(C)** Mittlere fluoreszenzgewichtete Lebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors aufgetragen im Vergleich zur mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest gegen die Harnstoffkonzentration. Der sigmoidale Verlauf beider Messdaten ist nahezu identisch. **(D)** Auftragung der spezies-gewichteten Fraktionen von τ_1 (violette Messpunkte) und τ_2 (rote Messpunkte) aus eTCSPC-Messungen (vgl. Tabelle 4-14) im Vergleich zur mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest.

4.4.5 Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchung der T4L-Variante S44pAcF+R119C(DA)

Durch eine genauere Betrachtung der T4L-Variante S44pAcF+R119C(DA) mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie sollte das Auftreten von Intermediaten während des Entfaltungsprozesses untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde mit zehn verschiedenen Harnstoffkonzentrationen die Änderung des Fluoreszenzverhältnisses F_D/F_A gegen $\tau_{D(A)}$, aufgetragen und verfolgt. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag dabei auf Harnstoffkonzentrationen zwischen 4500 und 6000 mM (Abbildung 4-59). Als Referenz dienten die Fluoreszenzsignale von T4L(S44pAcF, R119C)DA in Abwesenheit von Harnstoff, wobei das Maximum der FRET-Population durch eine grüne Linie in Abbildung 4-59 gekennzeichnet wurde. Die statischen FRET-Linien wurden mit den im Histogramm gezeigten Fluoreszenzquantenausbeuten generiert, die aus den Daten aus Abbildung 4-58 A und B entnommen wurden. Nach Zugabe von 2000 mM Harnstoff ist eine geringfügige Verschiebung der FRET-Population in Richtung kleinerem F_D/F_A entlang der statischen FRET-Linie zu erkennen. Das Maximum der FRET-Population bei $\tau_{D(A)} \approx 2{,}3$ ns verharrt bis zu einer Harnstoffkonzentration von 4500 mM bei diesem Fluoreszenzverhältnis. Ab 5000 mM bis zu der Endkonzentration von 7500 mM Harnstoff ändert sich das Fluoreszenzverhältnis in umgekehrter Richtung. Des Weiteren ist bei zunehmender Harnstoffkonzentration zu erkennen, dass sich die LF-Population ($\tau_{D(A)} \approx 3{,}9$ ns) signifikant vergrößert, jedoch nicht die dominierende Spezies bei einer Harnstoffkonzentration von 7500 mM ist. Die Hauptpopulation liegt bei $\tau_{D(A)} \approx 3{,}5$ ns und wäre somit dem ungefaltenen Protein zuzuordnen.

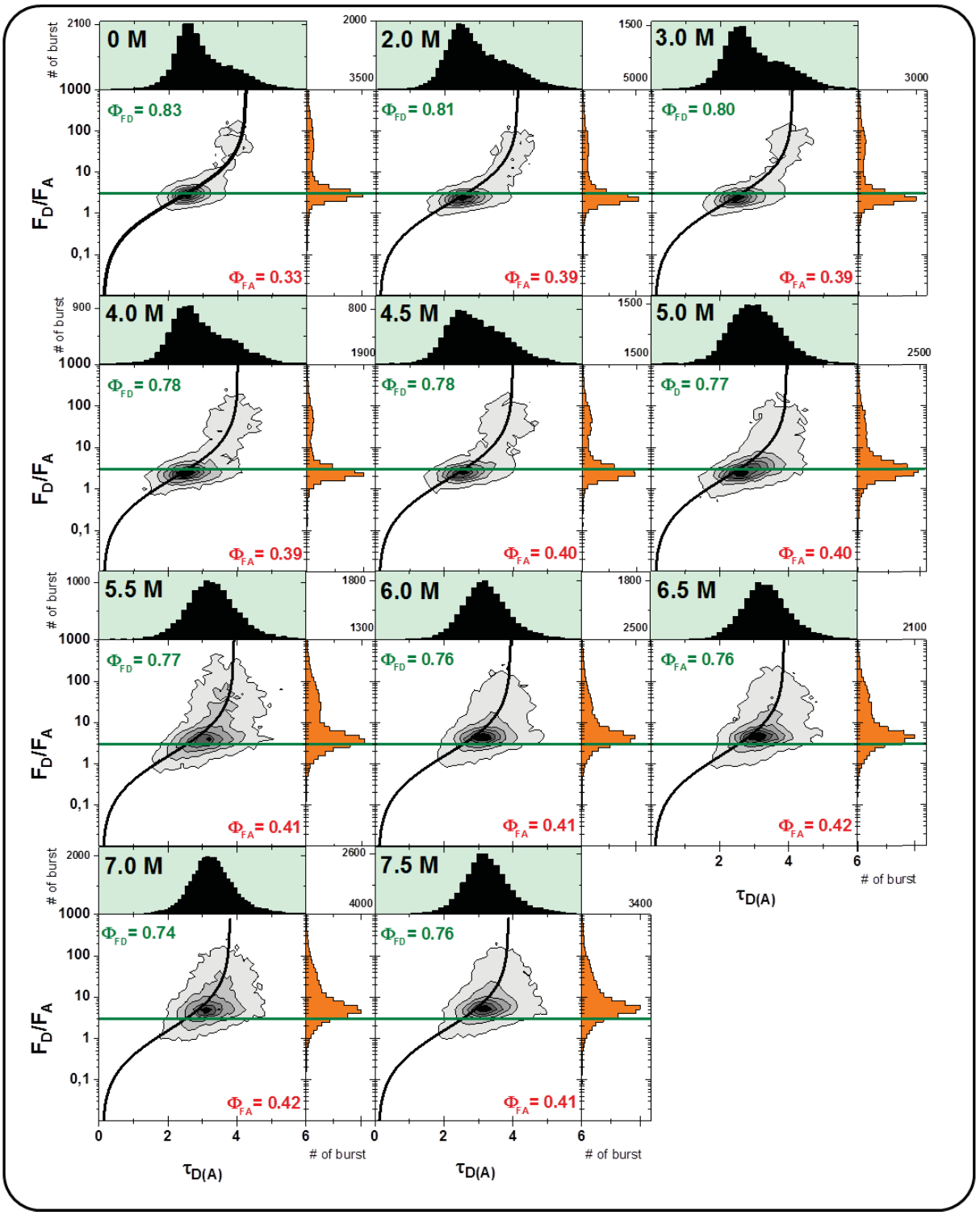


Abbildung 4-59: Untersuchung des Entfaltungsprozesses von T4L(S44pAcF, R119C)DA mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie. In den 2D-Histogrammen ist das Fluoreszenzverhältnis F_D/F_A gegen die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ für verschiedene Harnstoffkonzentrationen aufgetragen. Die statische FRET-Linie (schwarze durchzogene Linie) mit den aus eTCSPC ermittelten Fluoreszenz-Quantenausbeuten Φ_D und Φ_A, sowie die dynamische FRET-Linie (rote durchzogene Linie) mit den aus eTCSPC ermittelten Grenzfluoreszenz-Lebensdauern τ_1 und τ_2, sind für jede Harnstoffkonzentration separat ermittelt worden. Für die Erstellung der 2D-Histogramme und der statischen FRET-Linien (Gleichung 3-24) sind folgende Parameter ermittelt worden:

$c_{Harnstoff}$	B_{green} [kHz]	B_{red} [kHz]	Crosstalk	det.eff. gr. ch.	det.eff. r. ch.
0 M	1,5930	0,7690	0,0180	0,7500	1,000
2.0 M	2,4200	1,1070	0,0170	0,7700	1,000
3.0 M	1,9480	1,0110	0,0170	0,7700	1,000
4.0 M	2,7830	1,2350	0,0170	0,7700	1,000
4.5 M	2,4840	1,1680	0,0170	0,7700	1,000
5.0 M	2,4560	1,0440	0,0170	0,7700	1,000
5.5 M	3,1360	1,2980	0,0170	0,7700	1,000
6.0 M	3,0540	1,1340	0,0170	0,7700	1,000
6.5 M	2,4280	1,0890	0,0170	0,7700	1,000
7.0 M	2,7690	1,2180	0,0170	0,7700	1,000
7.5 M	3,5640	1,3910	0,0170	0,7500	1,000

	Φ_{FD}	Φ_{FA}	τ_{D0} [ns]	c_0	c_1	c_2	c_3
0 M	0,83	0,33	4,25	-0.0330	0.2608	0.4978	-0.0454
2.0 M	0,81	0,39	4,14	-0.0350	0.2694	0.4946	-0.0446
3.0 M	0,80	0,39	4,09	-0.0360	0.2734	0.4931	-0.0442
4.0 M	0,79	0,39	4,04	-0.0370	0.2780	0.4914	-0.0438
4.5 M	0,78	0,40	4,00	-0.0377	0.2808	0.4904	-0.0436
5.0 M	0,77	0,40	3,97	-0.0385	0.2841	0.4892	-0.0433
5.5 M	0,77	0,41	3,93	-0.0393	0.2874	0.4880	-0.0430
6.0 M	0,77	0,41	3,94	-0.0390	0.2860	0.4885	-0.0431
6.5 M	0,76	0,42	3,87	-0.0406	0.2924	0.4863	-0.0426
7.0 M	0,75	0,42	3,81	-0.0420	0.2982	0.4842	-0.0421
7.5 M	0,76	0,41	3,89	-0.0403	0.2913	0.4867	-0.0427

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Kapitel 3.2.3.3.

4.4.6 Zusammenfassung

4.4.6.1 Charakterisierung der Interdomänen-Kommunikation

Die Kombination aus Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie implizierte ein kompliziertes Modell des Denaturierungsprozesses von T4L. Ein wichtiger Hinweis auf Intermediate zeigte die Verfolgung des Entfaltungsprozesses der T4L-Variante R8pAcF+P86C (Kapitel 4.4.2.2). Durch die Mutation in Helix A konnte ohne Fluroeszenzmarkierung eine zweistufige Denaturierung beobachtet werden, die mit wildtypischen T4L nicht erkennbar war. Der Einbau von 4-Acetylphenylalanin in Helix A resultierte also in einem alternativen Denaturierungspfad, der nur mit einer veränderten Interaktion der Helix A mit dem übrigen Regionen des Proteins erklärbar ist. Somit wirkt sich der Einbau von 4-Acetylphenylalanin strukturverändernd auf T4L aus. Lu und Dahlquist vermuteten bereits 1992 in ihren NMR-Studien, dass bei der Zurückfaltung von T4L eine Übergangsstruktur zwischen Helix A und E entsteht, da diese Proteinregion vom Deuteriumaustausch um das 20 bis 180fache relativ zu der übrigen Struktur geschützt war (Lu*, et al.*; 1992). Ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen der N-

und der C-terminalen Subdomäne lieferten auch die Untersuchungen von Llinás und Marqusee (Llinás*, et al.*; 1998). Durch Permutation der T4L-Sequenz konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass die isolierte C-terminale Subdomäne stabiler, die isolierte N-Terminale hingegen deutlich instabiler gegenüber dem Wildtyp ist. Llinás und Marqusee vermuteten deshalb, dass die C-terminale Subdomäne die N-terminale durch einen „*communication link*“ (engl., Kommunikationsverbindung) stabilisiert. Ein weiteres Jahr später ermittelten Llinás und Marqusee, zusammen mit Gillespie und Dahlquist, die freie Enthalpie für den Entfaltungsprozess für 110 verschiedene T4L-Aminosäuren (Llinas*, et al.*; 1999) für das native Protein durch NMR-Spektroskopie (Abbildung 4-60 A und B). Die Verteilung der freien Enthalpie zeigte, dass die Helices A (N-terminalen Subdomäne), E, H (C-terminalen Subdomäne) und das C-terminale Ende der Helix C die stabilste Proteinregion bilden. Weitere Indizien auf eine stabilisierende Wirkung von Helix E auf Helix A finden sich in Kato et al. (Kato*, et al.*; 2007) und Bouvignies et al. (Bouvignies*, et al.*; 2011). Da mit NMR-Spektroskopie Informationen über lokale strukturelle Dynamiken durch Bestimmung von Relaxationszeiten erhalten werden können, kann somit auch der Ordnungsparameter S^2 bestimmt werden. S^2 kann Werte zwischen 0 (freie Bewegung) und 1 (fixierte Lage des Verbindungsvektors) annehmen. Kato und Bouvignies zeigten auf, dass S^2 für Helix A und E nahezu identisch bei ungefähr 1 liegen, also sich relativ starr verhalten (Abbildung 4-60 C). Da Helix A gerade einmal sieben Aminosäuren umfasst, wäre hier von einer stärkeren strukturellen Dynamik auszugehen, unter der Voraussetzung, dass es keine stabilisierenden Einflüsse gibt. Der Einbau der künstlichen Aminosäure 4-Acetylphenylalanin stört offensichtlich diese Domäneninteraktion, die in einen zweistufigen Denaturierungsprozess resultiert und stellt somit ein weiteres Indiz für einen Entfaltungsprozess mit Intermediaten dar.

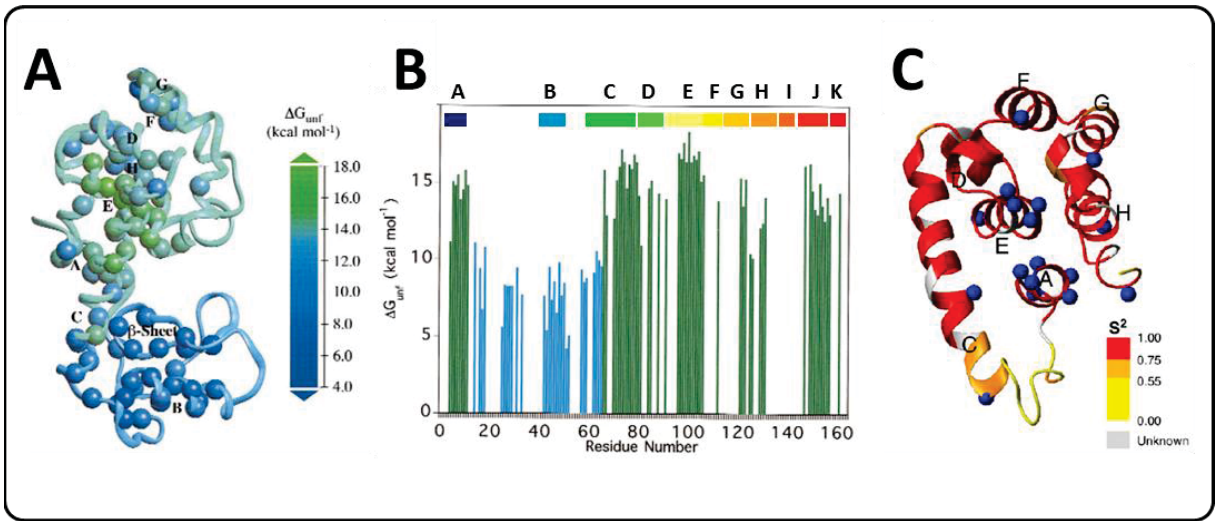


Abbildung 4-60: Stabilisierung von Helix A durch die C-terminale Subdomäne in T4L. (A) Verteilung der freien Enthalpie des Entfaltungsprozesses innerhalb der Proteinstruktur (Llinas*, et al.*; 1999). Abgebildet ist die Kristallstruktur von T4L mit den individuell bestimmten Enthalpien ΔG_{unf} für die jeweilige Aminosäure durch NMR-Spektroskopie. Die jeweilige Größe von ΔG_{unf} ist farblich von dunkelblau (kleine Werte für ΔG_{unf}) bis grün gekennzeichnet (große Werte für ΔG_{unf}). **(B)** Verteilung der freien Enthalpie des Entfaltungsprozesses ΔG_{unf} in der Reihenfolge der Proteinsequenz (Llinas*, et al.*; 1999). **(C)** Proteinrückrat-Dynamiken von T4L mit dem deletierten Proteinbereich zwischen Ile17 und Ile58 (Kato*, et al.*; 2007). Die Ordnungsparameter S^2 für die Helices A und E sind nahezu identisch und weisen auf eine räumliche Einschränkung in der Bewegung hin.

4.4.6.2 Intermediatzustände in T4L

Ein weiteres Indiz für Intermediate zeigen eTCSPC- und smFRET-Messungen der T4L-Variante S44pAcF+R119C-DA. Aus Abbildung 4-59 war ersichtlich, dass mit zunehmender Harnstoffkonzentration bis 4500 mM die Haupt-FRET-Population im nativen Bereich (0 mM Harnstoff, grüne Linie) sich geringfügig in Richtung kleinerer Fluoreszenzverhältnisse F_D/F_A bewegt. Da sich die Elliptizität in diesem Bereich, wie auch das Fluoreszenzverhältnis F_D/F_A der Ensemble-Fluoreszenztitrationen nicht wesentlich ändert, bleibt die Sekundärstruktur von T4L in diesem Konzentrationsbereich intakt. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Verschiebung von einem nativen Zustand N_1 zu einem weiteren nativen Zustand N_2 handelt. Gleichzeitig nimmt der Anteil der LF-Population bei einer Fluoreszenzlebensdauer von ungefähr 3,8 ns stetig zu, erreicht bei 5500 mM seinen Höhepunkt und flacht anschließend wieder ab. Dabei wird die stärkste Zunahme zwischen 4500 und 5500 mM Harnstoff beobachtet. Vergleicht man dies mit den aus der CD-Spektroskopie ermittelten Daten, so liegen diese Konzentrationen im Umschlagsbereich vom nativen in den denaturierten Zustand. Nimmt man intermediäre Zustände auf dem Weg zur Entfaltung des Proteins an, so ist ein Auftreten der Intermediate in diesem

Konzentrationsbereich am wahrscheinlichsten. Den Intermediaten wäre somit die LF-Population zuzuordnen. Bei 7500 mM zeigt die Elliptiziät ein völlig ungefaltetes Protein. Die Hauptpopulation in diesem Konzentrationsbereich liegt für die smFRET-Daten oberhalb der grünen Linie und wäre somit dem denaturierten Zustand U zuzuordnen. Die wesentlichen Erkenntnisse aus den smFRET-Messungen ist in Abbildung 4-61 A zusammengefasst. Mit den Daten aus eTCSPC können die Ergebnisse der smFRET-Messungen bestätigt und weiter verdeutlicht werden. In Abbildung 4-61 B sind die speziesgewichteten Fraktionen von τ_1 und τ_2 aus den eTCSPC-Messungen (vgl. Tabelle 4-14) im Vergleich zur mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest aufgetragen. Ordnet man τ_1 den Intermediaten I und τ_2 den nativen Zuständen $\mathrm{N_1/N_2}$ zu, so erkennt man am Umschlagspunkt, dass die Fraktion der Intermediate zunimmt, die native Fraktion hingegen abnimmt. Die Schwankungen ab 5500 mM Harnstoff sind insoweit zu erklären, dass eTCSPC nicht mehr in der Lage ist zwischen Intermediat und ungefalteten Zustand zu unterscheiden, weil die Fluoreszenzlebensdauern zu dicht beieinander sind. Mit den vorliegenden Daten lässt sich für das Entfaltungsmodell von T4 Lysozym zunächst schlussfolgern, dass es mehrere native Zustände gibt. Zwei native Zustände konnten eindeutig bestimmt werden. Da eine dritte Fluoreszenzlebensdauer mit eTCSPC für das native Protein bestimmt werden konnte, kann ein weiterer nativer Zustand angenommen werden. Ebenso wären dann weitere intermediate Zustände denkbar, wenn mehrere native Startkonfigurationen für T4L existieren. Aus den Daten lässt sich jedoch nur ein intermediater Zustand zuordnen, der bei Erhöhung der Harnstoffkonzentration in den ungefalteten Proteinzustand übergeht. Das Modell ist anschaulich in Abbildung 4-61 C zusammengefasst.

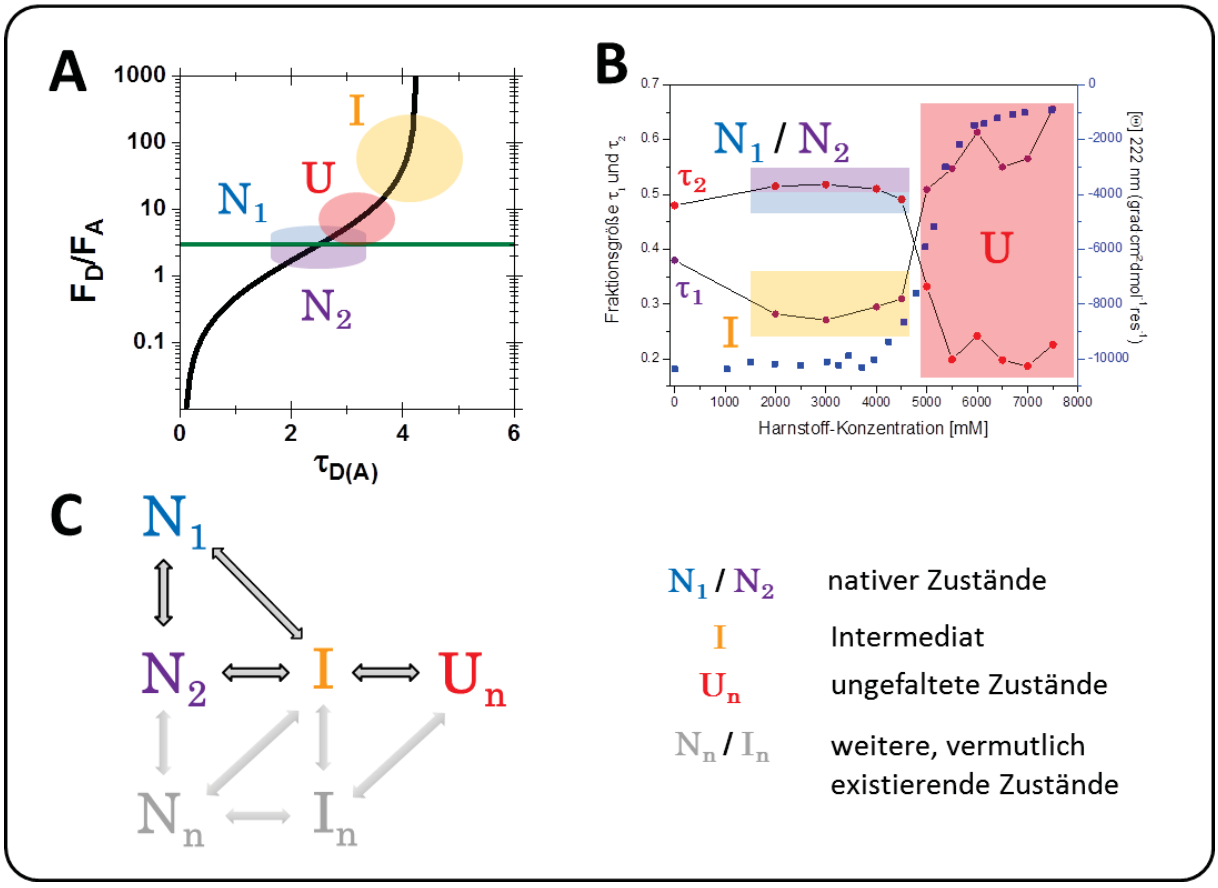


Abbildung 4-61: Modellbeschreibung des Entfaltungsprozesses bei von T4L(S44pAcF, R119C)DA. (A) Interpretation der smFRET-Daten aus Abbildung 4-60. **(B)** Auftragung der spezies-gewichteten Fraktionen von τ_1 und τ_2 aus eTCSPC-Messungen (vgl. Tabelle 4-14) im Vergleich zur mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest (siehe auch Abbildung 4-59). Die Zuordnung der verschiedenen T4L-Zustände für die Fraktionen ist farblich unterlegt. **(C)** Modellbeschreibung des Entfaltungsprozesses.

Betrachtet man den Verlauf der smFRET-Messung von T4L mit steigender Harnstoffkonzentration, so wird deutlich, dass das F_D/F_A-Verhältnis der Hauptpopulation bei 7500 mM Harnstoff deutlich kleiner ist, als das F_D/F_A-Verhältnis des Intermediatzustandes. Daher ist anzunehmen, dass der ungefaltete Zustand eine Struktur besitzt. Dieses Ergebnis ist zunächst unerwartet, da mit steigender Harnstoffkonzentration ein zunehmender Denaturierungsgrad und damit eine weitere Flexibilisierung der Aminosäurenkette zu erwarten wäre, die mit einem hohen F_D/F_A-Verhältnis einhergeht.

4.4.6.3 Mechanismus der chemisch induzierten Denaturierung

Ein Erklärungsversuch für die Ergebnisse aus smFRET liefern die Experimente von Sagle et al. (2009) mit Poly(N-isopropylacrylamid), kurz PNIPAM (Abbildung 4-62 A). PNIPAM ist ein thermoresponsives Polymer, welches als Modellprotein angewendet wird (Bruscolini*, et al.*; 2002, Schild*, et al.*; 1990). Aus Messungen der Interaktion zwischen PNIPAM und Harnstoff mit FTIR-Spektroskopie wird angenommen, dass ein Verknüpfungsmechanismus von Polymerrückrat und dem Harnstoff-Molekül existiert (Abbildung 4-62 B). Durch Bestimmung der Stokesradien mit Hilfe der analytischen Gelfiltration erkannte man, dass bis zu einer bestimmten Harnstoffkonzentration diese Verknüpfungen zunächst intramolekular verlaufen, bevor die intermolekulare Verknüpfung dominant wird (Abbildung 4-62 C). Ein vergleichbarer Mechanismus könnte für T4L angenommen werden, indem zunächst in einem Intermediat-Zustand die Protein-Sekundärstruktur, wie im CD-Spektrum erkennbar, aufgelöst wird, und anschließend sich eine neue Tertiär- oder Quartärstruktur durch komplexe Wechselwirkungen mit der Aminosäurekette und den Harnstoff-Molekülen ausbildet. Eine starke Vernetzung des Proteins bei hohen Harnstoff-Konzentrationen, wie es bei Sagle et al. der Fall war, ist jedoch unter Einzelmolekülbedingungen unwahrscheinlich.

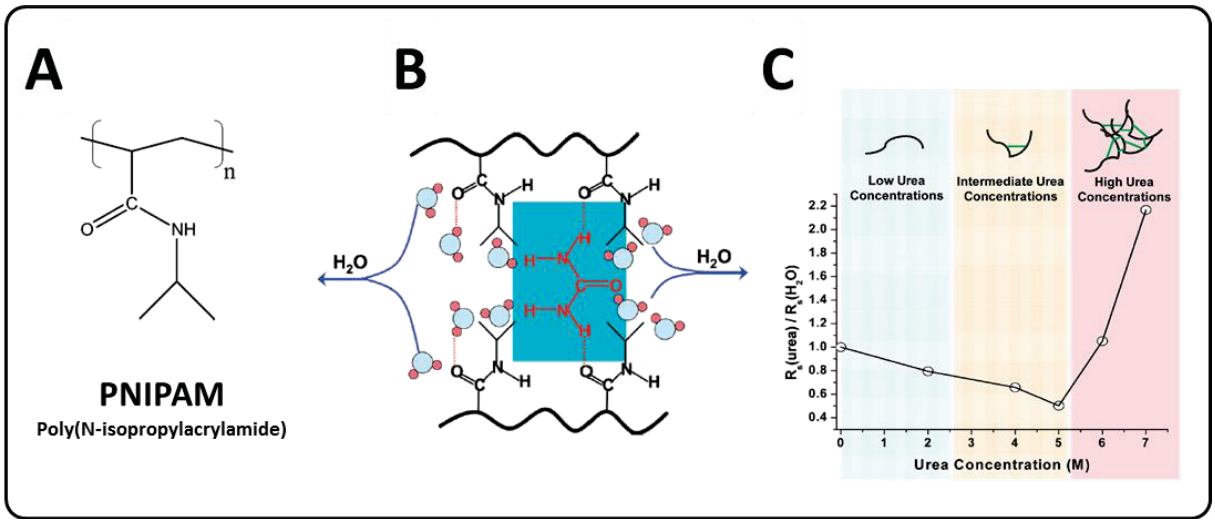


Abbildung 4-62: Einfluss von Harnstoff auf Poly(N-isopropylacrylamid). (A) Schematische Darstellung von PNIPAM. **(B)** Vermuteter Mechanismus der Vernetzung von PNIPAM mit Harnstoff. **(C)** Messung der Stokes-Radien von PNIPAM als Funktion der Harnstoffkonzentration durch analytische Gelfiltration. (Sagle*, et al.*; 2009)

5 Schlussbemerkung

Grundvoraussetzungen. Die Anforderung für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Proteinendynamiken liegt in der erfolgreichen Herstellung und Fluoreszenzmarkierung der gewählten Proteinvarianten. Die erste Hürde ist dabei der Einbau geeigneter reaktiver Gruppen in das Proteingerüst oder in ihrer Eliminierung. Anhand der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (Modellsystem I) wurde deutlich, dass der Einbau von Cysteinen zur Fluoreszenzmarkierung relativ einfach realisiert werden kann, jedoch aufgrund des Eingriffes in die Proteinstruktur nicht jede Variante stabil ist. Alle Cystein-Varianten von ssAnPRT neigten zu Dithiolbrücken, die unter Umständen zu Präzipitation führten, sobald Reduktionsmittel, wie β-Mercaptoethanol, aufgrund der Fluoreszenzmarkierung entfernt wurden. Der Einbau von künstlichen Aminosäuren, wie dies in T4 Lysozym (Modellsystem IV) möglich war, konnte aufgrund der Instabilität von ssAnPRT unter sauren pH-Bedingungen nicht realisiert werden. Eine weitere Hürde stellt die Fluoreszenzmarkierung selbst dar. Wie bei ssAnPRT deutlich wurde, führte die Änderung der chemischen Umgebung des Proteins durch Einwirken eines Farbstoffes ebenfalls zu Präzipitation. Der Einsatz von Detergenz zur Stabilisierung von Membranproteinen, wie bei es für das Lactococcal Multidrug Resistance Protein A (Modellsystem II) erforderlich war, kann ebenfalls zu ungewollten Wechselwirkungen zwischen Fluoreszenzfarbstoffen und dem Protein/Detergenz-Komplex resultieren. Die Stabilität und Funktionalität des fluoreszenzmarkierten Zielproteins ist die Grundvoraussetzung für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen. Für Membranproteine wäre dies zum Beispiel der Einbau in nanoskaliden Phospholipid-Doppelschichtsystemen (*Nanodiscs*^{TM}) ein Lösungsansatz.

Messdatenerfassung und Auswertung. Ein weiterer Baustein bei der Suche geeigneter Proteinvarianten ist die Kopplungsstelle für den Fluoreszenzfarbstoff. Insbesondere an ssAnPRT konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von C_β-Abständen in vielen Fällen ein ungeeignetes Verfahrung zur Ermittlung von möglichen FRET-Abständen ist. Am Institut für Molekulare Physikalische Chemie wurde dafür das in dieser Arbeit vorgestellte AV-Modell entwickelt, um näherungsweise mögliche Änderungen der FRET-Abstände anhand von Röntgenkristallstrukturen zu bestimmen. So ist es möglich, geeignete Proteinvarianten zur Kopplung von Fluoreszenzfarbstoff zu identifizieren, bevor diese eine praktische Anwendung finden.

Sind die oben genannten Voraussetzungen erfüllt, ist es mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie im Ensemble oder im Einzelmolekülmaßstab möglich, Änderungen der Tertärstruktur eines fluoreszenzmarkierten Proteins zu verfolgen. Voraussetzung ist dabei ein einwandfrei funktionierender und kalibrierter Messaufbau. Die Arbeitsgruppe entwickelte Methoden, wie die *Linker*-Korrektur oder die Spezies-selektive Fluoreszenzkreuzkorrelation, um Farbstoffeffekte zu identifizieren und in FRET-Modellbeschreibungen zu integrieren. Dadurch war es möglich, Proteindynamiken zu erkennen und zu quantifizieren, sowie von Farbstoffdynamiken und -pseudodynamiken zu separieren. Aufgrund der Bestimmung von Relaxationszeiten und deren Amplituden durch fFCS ist es möglich, Modellsysteme von Proteindynamiken zu etablieren, wie dies für PSD-95 realisiert werden konnte. Dabei ist die Kombination der Ergebnisse der verschiedenen spektroskopischen Techniken ebenfalls von Bedeutung. Mit der Verbindung der Daten aus Fluoreszenzkreuzkorrelation und dynamischem PDA konnte die Konformationsdynamik von ssAnPRT den verschiedenen FRET-Zuständen zugeordnet werden. Ebenso die Vereinigung der Ergebnisse aus Ensemble- und Einzelmolekülspektroskopie, TCSPC und CD-Spektroskopie lieferten die entscheidenden Hinweise auf die Vorgänge beim Harnstoff-induzierten Denaturierungsprozess des Lysozyms des T4-Phagen. Zukünftig wird die Ausweitung dieser Kombination aus verschiedenen Messtechniken (insbesondere zusammen mit Röntgenkristallograpie, SAXS, NMR, etc.) von entscheidender Bedeutung sein. Weitere Bausteine werden die MD-Simulation, sowie das am Institut für Molekulare Physikalische Chemie der Universität Düsseldorf entwickelte *FRET positioning an screening* (FPS) sein, um Bewegungsabläufe in Proteinen besser zu verstehen. Die Facetten der Fluoreszenzspektroskopie sind somit aussagekräftige Methoden, die auch in den kommenden Jahren ein spektroskopischer Maßstab darstellt.

Proteinfunktionalität, Dynamik und Stabilität. Zwanzig kanonische proteinogene Aminosäuren bilden Makromoleküle, deren Sequenz und Anordnung über ihre biologische Funktionalität entscheiden. Proteine passen ihre Funktionalität an den gegebenen Bedingungen an und sind dabei spezifisch. So vollzieht ssAnPRT (Modellsystem I) keinen kontinuierlichen Bewegungsablauf, der zur Reaktion zwischen den Substraten führt, sondern die Dynamik passt sich den Temperatur- und Allosteriebedingungen an. Ein weiterer, wichtiger Aspekt dieser Funktionalität sind die inter- und intraprotomeren Domänenkommunikationen durch polare und unpolare Wechselwirkungen. Ein Beispiel für

eine interprotomere Domänenkommunikation stellt ssAnPRT (Modellsystem I) dar, deren Kopf-an-Kopf-verknüpfte Protomere das gesamte Homodimer scheinbar stabilisieren. PSD-95 (Modellsystem III) und T4L (Modellsystem IV) sind dagegen Vertreter der intraprotomeren Domänenkommunikation, die, wie in T4L, zum einen eine stabilisierende Wirkung wie bei ssAnPRT auf das Protein haben, zum anderen, wie bei PSD-95 die Funktionalität als Strukturprotein in der Signaltransduktion und Interaktion mit weiteren Proteinen forciert. Insbesondere ist am Beispiel von PSD-95 erkennbar, dass die aktiven Zentren der Domänenkommunikation unterschiedliche Affinitäten mit jeweils unterscheidbaren Relaxationszeiten besitzen. Die Identifizierung und Quantifizierung von konformalen Proteinzuständen und Domänenkommunikationen wird das Verständnis über die Funktionalität von Proteinen weiter vertiefen. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie ist hierfür ein sehr geeignetes Hilfsmittel und wird in Zukunft weitere und bessere Ergebnisse liefern.

6 Literaturverzeichnis

Adkins S & Burmeister M (1996) Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. (Translated from eng) *Anal Biochem* 240(1):17-23 (in eng).

Ahmed A, Rippmann F, Barnickel G, & Gohlke H (2011) A Normal Mode-Based Geometric Simulation Approach for Exploring Biologically Relevant Conformational Transitions in Proteins. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51(7):1604-1622.

Anderson JM (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Current Biology* 6(4):382-384.

Antonik M, Felekyan S, Gaiduk A, & Seidel CAM (2006) Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. *Journal of Physical Chemistry B* 110(13):6970-6978.

Bayburt TH, Grinkova YV, & Sligar SG (2002a) Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Letters* 2(8):853-856.

Bayburt TH & Sligar SG (2002b) Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10):6725-6730.

Bayburt TH & Sligar SG (2003) Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers. *Protein Science* 12(11):2476-2481.

Böhmer M, Wahl M, Rahn HJ, Erdmann R, & Enderlein J (2002) Time-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 353(5-6):439-445.

Bolhuis H*, et al.* (1996) Multidrug resistance in Lactococcus lactis: Evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO Journal* 15(16):4239-4245.

Bouvignies G*, et al.* (2011) Solution structure of a minor and transiently formed state of a T4 lysozyme mutant. *Nature* 477(7362):111-117.

Brock TD, Brock KM, Belly RT, & Weiss RL (1972) Sulfolobus: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv für Mikrobiologie* 84(1):54-68.

Brunger AT*, et al.* (1998) Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 54(5):905-921.

Brunger AT, Strop P, Vrljic M, Chu S, & Weninger KR (2011) Three-dimensional molecular modeling with single molecule FRET. *Journal of Structural Biology* 173(3):497-505.

Bruscolini P, Buzano C, Pelizzola A, & Pretti M (2002) Lattice model for polymer hydration: Collapse of poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecular Symposia* 181:261-273.

Burkhardt K (2010) Aktivierung einer thermostabilen Anthranilat-Phosphoribosyltransferase durch gerichtete Evolution. Diplomarbeit (Universität Regensburg, Regensburg).

Clegg RM (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods in Enzymology* 211:353-388.

Dale RE & Eisinger J (1974) Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. *Biopolymers* 13:1573-1605.

Dale RE, Eisinger J, & Blumberg WE (1979) Orientational freedom of molecular probes - Orientation factor in intra-molecular energy transfer. *Biophysical Journal* 26(2):161-193.

Dean M, Rzhetsky A, & Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 11(7):1156-1166.

Dong X, Stothard P, Forsythe IJ, & Wishart DS (2004) PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue):W660-664 (in eng).

Ecker GF*, et al.* (2004) A three-dimensional model for the substrate binding domain of the multidrug ATP binding cassette transporter LmrA. *Molecular Pharmacology* 66(5):1169-1179.

Eggeling C, Fries JR, Brand L, Günther R, & Seidel CAM (1998) Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95:1556-1561.

Ehrenberg M & Rigler R (1974) Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chemical Physics* 4:390-401.

Enderlein J, Robbins DL, Ambrose WP, Goodwin PM, & Keller RA (1997) Statistics of single-molecule detection. *Journal of Physical Chemistry B* 101(18):3626-3632.

Felekyan S, Kalinin S, Sanabria H, Valeri A, & Seidel CA (2012) Filtered FCS: species auto- and cross-correlation functions highlight binding and dynamics in biomolecules. (Translated from eng) *Chemphyschem* 13(4):1036-1053 (in eng).

Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437(2):55-75.

Frauenfelder H, Sligar SG, & Wolynes PG (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* 254:1598-1603.

Fries JR, Brand L, Eggeling C, Köllner M, & Seidel CAM (1998) Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* 102:6601-6613.

Funke L, Dakoji S, & Bredt DS (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. . *Annu Rev Biochem* 74:219-245.

Galla HJ (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie* (Thieme, Stuttgart) 1. Ed.

Gerber HP*, et al.* (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263(5148):808-811.

Gerstein M (1994) Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry* 33(22):6739-6749.

González-Mariscal L, Betanzos A, & Ávila-Flores A (2000) MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 11(4):315-324.

Graziano V, McGrath WJ, Yang L, & Mangel WF (2006) SARS CoV main proteinase: The monomer-dimer equilibrium dissociation constant. *Biochemistry* 45(49):14632-14641.

Grimard V*, et al.* (2001) Structure and dynamics of the membrane-embedded domain of LmrA investigated by coupling polarized ATR-FTIR spectroscopy and 1H/2H exchange. *Biochemistry* 40(39):11876-11886.

Hellmich UA, Pfleger N, & Glaubitz C (2009) 19F-MAS NMR on Proteorhodopsin: Enhanced Protocol for Site-Specific Labeling for General Application to Membrane Proteins†. *Photochemistry and Photobiology* 85(2):535-539.

Higgins CF*, et al.* (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323(6087):448-450.

Holz MM, M. (2004) Influence of Additives on Hydrophobic Association in Polynary Aqueous Mixtures. in *Thermodynamic Properties of Complex Fluid Mixtures*, ed Report DR (Wiley-VCH, Weinheim), pp 150–183.

Horwitz JP*, et al.* (1964) Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-Beta-D-Glycopyranosides. (Translated from eng) *J Med Chem* 7:574-575 (in eng).

Hoskins R, Hajnal AF, Harp SA, & Kim SK (1996) The C. elegans vulval induction gene lin-2 encodes a member of the MAGUK family of cell junction proteins. *Development* 122(1):97-111.

Ivens A, Mayans O, Szadkowski H, Wilmanns M, & Kirschner K (2001) Purification, characterization and crystallization of thermostable anthranilate phosphoribosyltransferase from Sulfolobus solfataricus. *European Journal of Biochemistry* 268(8):2246-2252.

Kaldenhoff R (2003) *Praktische Biochemie* (Thieme, Stuttgart) 1. Ed.

Kalinin S, Felekyan S, Antonik M, & Seidel CAM (2007) Probability distribution analysis of single-molecule fluorescence anisotropy and resonance energy transfer. *Journal of Physical Chemistry B* 111(34):10253-10262.

Kalinin S, Felekyan S, Valeri A, & Seidel CAM (2008) Characterizing multiple molecular states in single-molecule multiparameter fluorescence detection by probability distribution analysis. *Journal of Physical Chemistry B* 112(28):8361-8374.

Kalinin S*, et al.* (2012) A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. (Translated from eng) *Nat Methods* 9(12):1218-1225 (in eng).

Kalinin S, Sisamakis E, Magennis SW, Felekyan S, & Seidel CAM (2010a) On the origin of broadening of single-molecule FRET efficiency distributions beyond shot noise limits. *Journal of Physical Chemistry B* 114(18):6197-6206.

Kalinin S, Valeri A, Antonik M, Felekyan S, & Seidel CAM (2010b) Detection of Structural Dynamics by FRET: A Photon Distribution and Fluorescence Lifetime Analysis of Systems with Multiple States. *Journal of Physical Chemistry B* 114(23):7983-7995.

Kasha M (1950) Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society* 9:14-19.

Kato H, Feng H, & Bai Y (2007) The Folding Pathway of T4 Lysozyme: The High-resolution Structure and Folding of a Hidden Intermediate. *Journal of Molecular Biology* 365(3):870-880.

Kawe M, Horn U, & Pluckthun A (2009) Facile promoter deletion in Escherichia coli in response to leaky expression of very robust and benign proteins from common expression vectors. (Translated from eng) *Microb Cell Fact* 8:8 (in eng).

Keith DJ & El-Husseini A (2008) Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse. (Translated from English) *Frontiers in Molecular Neuroscience* 1 (in English).

Keller RA*, et al.* (1996) Single-molecule fluorescence analysis in solution. *Applied Spectroscopy* 50(7):12A-32A.

Kelly SM, Jess TJ, & Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. (Translated from eng) *Biochim Biophys Acta* 1751(2):119-139 (in eng).

Kim E & Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 5(10):771-781.

Klán P & Wirz J (2009) *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice* pp 1-563.

Koshioka M, Sasaki K, & Masuhara H (1995) Time-Dependent Fluorescene Depolarization Analysis in Three Dimensional Microscopy. *Applied Spectroscopy* 49(2):224-228.

Krüger DM, Ahmed A, & Gohlke H (2012) NMSim Web Server: integrated approach for normal mode-based geometric simulations of biologically relevant conformational transitions in proteins. *Nucleic acids research* 40(W1):W310-W316.

Krüger DM, Rathi PC, Pfleger C, & Gohlke H (2013) CNA web server: rigidity theory-based thermal unfolding simulations of proteins for linking structure, (thermo-)stability, and function. *Nucleic acids research* 41(Web Server issue):W340-348.

Kudryavtsev V*, et al.* (2012) Combining MFD and PIE for accurate single-pair Forster resonance energy transfer measurements. (Translated from eng) *Chemphyschem* 13(4):1060-1078 (in eng).

Kühnemuth R & Seidel CAM (2001) Principles of Single Molecule Multiparameter Fluorescence Spectroscopy. *Single Molecules* 2(4):251-254.

Kuroki R, Weaver LH, & Matthews BW (1993) A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 lysozyme. *Science* 262(5142):2030-2033.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (Translated from eng) *Nature* 227(5259):680-685 (in eng).

Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer-Verlag, Heidelberg) 3. Ed.

Leitz AJ, Bayburt TH, Barnakov AN, Springer BA, & Sligar SG (2006) Functional reconstitution of β2-adrenergic receptors utilizing self-assembling Nanodisc technology. *BioTechniques* 40(5):601-612.

Lemke EA (2011) Site-specific labeling of proteins for single-molecule FRET measurements using genetically encoded ketone functionalities. (Translated from eng) *Methods Mol Biol* 751:3-15 (in eng).

Lesk AM & Chothia C (1984) Mechanisms of domain closure in proteins. *Journal of Molecular Biology* 174(1):175-191.

LIFEtechnologies (2014a) https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/fluorescence-quantum-yields-and-lifetimes-for-alexa-fluor-dyes.html.

LIFEtechnologies (2014b) https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/bodipy-dye-series.html.

Llinas M, Gillespie B, Dahlquist FW, & Marqusee S (1999) The energetics of T4 lysozyme reveal a hierarchy of conformations. *Nature Structural Biology* 6(11):1072-1078.

Llinás M & Marqusee S (1998) Subdomain interactions as a determinant in the folding and stability of T4 lysozyme. *Protein Science* 7(1):96-104.

Lu J & Dahlquist FW (1992) Detection and characterization of an early folding intermediate of T4 lysozyme using pulsed hydrogen exchange and two-dimensional NMR. *Biochemistry* 31(20):4749-4756.

Lubelski J, Mazurkiewicz P, Van Merkerk R, Konings WN, & Driessen AJM (2004) ydaG and ydbA of Lactococcus lactis encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. *Journal of Biological Chemistry* 279(33):34449-34455.

Lundberg KS*, et al.* (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus. (Translated from eng) *Gene* 108(1):1-6 (in eng).

Ma B, Shatsky M, Wolfson HJ, & Nussinov R (2002) Multiple diverse ligands binding at a single protein site: A matter of pre-existing populations. *Protein Science* 11(2):184-197.

Magde D, Elson EL, & Webb WW (1974) Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization. *Biopolymers* 13:29-61.

Margittai M*, et al.* (2003) Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 100:15516-15521.

Marino M*, et al.* (2006) Structural and mutational analysis of substrate complexation by anthranilate phosphoribosyltransferase from Sulfolobus solfataricus. (Translated from eng) *J Biol Chem* 281(30):21410-21421 (in eng).

Matthews BW & Remington SJ (1974) The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71(10):4178-4182.

Matthews BW, Remington SJ, Grutter MG, & Anderson WF (1981) Relation between hen egg white lysozyme and bacteriophage T4 lysozyme: Evolutionary implications. *Journal of Molecular Biology* 147(4):545-558.

Maus M*, et al.* (2001) An Experimental Comparison of the Maximum Likelihood Estimation and Nonlinear Least-Squares Fluorescence Lifetime Analysis of Single Molecules. *Analytical Chemistry* 73:2078-2086.

Mayans O, Ivens A, Nissen LJ, Kirschner K, & Wilmanns M (2002) Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry. *EMBO Journal* 21(13):3245-3254.

McCammon JA (1984) Protein dynamics. *Reports on Progress in Physics* 47(1):1-46.

McCann JJ*, et al.* (2012) Supertertiary structure of the synaptic MAGuK scaffold proteins is conserved. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39):15775-15780 (in eng).

McGee AW*, et al.* (2001) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Molecular Cell* 8(6):1291-1301.

Müller H-J (2001) *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg) 1. Ed.

Muschielok A*, et al.* (2008) A nano-positioning system for macromolecular structural analysis. *Nature Methods* 5(11):965-971.

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, & Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4(11):2411-2423.

Pfleger C, Radestock S, Schmidt E, & Gohlke H (2013a) Global and local indices for characterizing biomolecular flexibility and rigidity. *Journal of Computational Chemistry* 34(3):220-233.

Pfleger C, Rathi PC, Klein DL, Radestock S, & Gohlke H (2013b) Constraint network analysis (CNA): A python software package for efficiently linking biomacromolecular structure, flexibility, (thermo-)stability, and function. *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(4):1007-1015.

Poelarends GJ & Konings WN (2002) The transmembrane domains of the ABC multidrug transporter LmrA form a cytoplasmic exposed, aqueous chamber within the membrane. *Journal of Biological Chemistry* 277(45):42891-42898.

Qian Y & Prehoda KE (2006) Interdomain interactions in the tumor suppressor discs large regulate binding to the synaptic protein GukHolder. *Journal of Biological Chemistry* 281(47):35757-35763.

Rohrbeck D (2007) Untersuchungen zur molekularen Kinetik von Varianten der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase mit fluoreszenz-spektroskopischen Methoden. Diploma Thesis (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf).

Rosenberg MF*, et al.* (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO Journal* 20(20):5615-5625.

Rothwell PJ*, et al.* (2003) Multi-parameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 Reverse Transcriptase:primer/template complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1655-1660.

Sabanayagam CR, Eid JS, & Meller A (2005) Using fluorescence resonance energy transfer to measure distances along individual DNA molecules: Corrections due to nonideal transfer. *Journal of Chemical Physics* 122(6):61103-61107.

Sagle LB*, et al.* (2009) Investigating the hydrogen-bonding model of urea denaturation. *Journal of the American Chemical Society* 131(26):9304-9310.

Sanabria H*, et al.* (in Vorbereitung) Determination of biomolecular structures an their dynamics with fluorescence spectroscopic methods.

Santoro MM & Bolen DW (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27(21):8063-8068.

Schäfer FP (1973) *Dye lasers* (Springer-Verlag, Heidelberg).

Schaffer J*, et al.* (1999) Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence anisotropy. *Journal of Physical Chemistry A* 103(3):331-336.

Schild HG & Tirrell DA (1990) Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *Journal of Physical Chemistry®* 94(10):4352-4356.

Schlee S*, et al.* (2009) Activation of anthranilate phosphoribosyltransferase from Sulfolobus solfataricus by removal of magnesium inhibition and acceleration of product release. (Translated from eng) *Biochemistry* 48(23):5199-5209 (in eng).

Schmitz J (2007) Funktionale Charakterisierung des ABC-Transporters LmrA aus L. lactis. Masterarbeit (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf).

Schwab T (2010) Zusammenhang zwischen Quartärstruktur, Stabilität und katalytischer Aktivität am Beispiel der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase. (Universität Regensburg, Regensburg).

Schwab T, Skegro D, Mayans O, & Sterner R (2008) A Rationally Designed Monomeric Variant of Anthranilate Phosphoribosyltransferase from Sulfolobus solfataricus is as Active as the Dimeric Wild-type Enzyme but Less Thermostable. *Journal of Molecular Biology* 376(2):506-516.

Schweinberger E (2002) Multidimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen. Dissertation (Georg-August-Universität Göttingen).

Schwille P, Meyer-Almes FJ, & Rigler R (1997) Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical Journal* 72(4):1878-1886.

Selvin PR (1995) Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Methods in Enzymology* 246:301-335.

Shoichet BK, Baase WA, Kuroki R, & Matthews BW (1995) A relationship between protein stability and protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(2):452-456.

Sindbert S*, et al.* (2011) Accurate distance determination of nucleic acids via Forster resonance energy transfer: implications of dye linker length and rigidity. (Translated from eng) *J Am Chem Soc* 133(8):2463-2480 (in eng).

Sinha SC & Smith JL (2001) The PRT protein family. *Current Opinion in Structural Biology* 11(6):733-739.

Sisamakis E, Valeri A, Kalinin S, Rothwell PJ, & Seidel CAM (2010) Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection. pp 455-514.

Street TO, Courtemanche N, & Barrick D (2008) Protein folding and stability using denaturants. (Translated from English) *Biophysical Tools for Biologists: Vol 1 in Vitro Techniques* 84:295-+ (in English).

Teague SJ (2003) Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(7):527-541.

Tompa P (2012) On the supertertiary structure of proteins. *Nature Chemical Biology* 8(7):597-600.

Tsugita A & Inouye M (1968) Purification of bacteriophage T4 lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 243(2):391-397.

Uversky VN, Oldfield CJ, & Dunker AK (2005) Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *Journal of Molecular Recognition* 18(5):343-384.

Van Veen HW & Konings WN (1998) Structure and function of multidrug transporters. pp 145-158.

Van Veen HW, Margolles A, Müller M, Higgins CF, & Konings WN (2000) The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO Journal* 19(11):2503-2514.

Vandanapu RR*, et al.* (2009) Structural differences between the SH3-HOOK-GuK domains of SAP90/PSD-95 and SAP97. *Protein Expression and Purification* 68(2):201-207.

Vogrig A*, et al.* (2011) NMR evaluation of interactions between substituted-indole and PDZ1 domain of PSD-95. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(11):3349-3353.

Walla PJ (2009) *Modern Biophysical Chemistry* (Wiley-VCH Verlag, Weinheim) 1. Ed.

Widengren J, Mets Ü, & Rigler R (1995) Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study. *Journal of Physical Chemistry* 99:13368-13379.

Widengren J, Schweinberger E, Berger S, & Seidel CAM (2001) Two new concepts to measure fluorescence resonance energy transfer via fluorescence correlation spectroscopy: Theory and experimental realizations. *Journal of Physical Chemistry A* 105(28):6851-6866.

Wozniak A (2006) Multiparameter-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur molekularen Dynamik an einzelnen Oligonukleotiden. (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf).

Woźniak AK, Schröder G, Grubmüller H, Seidel CAM, & Oesterhelt F (2008) Single molecule FRET measures bends and kinks in DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 105:18337-18342.

Wu H*, et al.* (2000) Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *EMBO Journal* 19(21):5740-5751.

Yaffe MB (2002) MAGUK SH3 domains-swapped and stranded by their kinases? *Structure* 10(1):3-5.

Young TS, Ahmad I, Yin JA, & Schultz PG (2010) An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in E. coli. (Translated from eng) *J Mol Biol* 395(2):361-374 (in eng).

Zaitseva J*, et al.* (2006) A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer. (Translated from eng) *EMBO J* 25(14):3432-3443 (in eng).

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich im Laufe der letzten Jahre während meiner Promotion begleitet haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Claus A. M. Seidel danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit unter seiner Betreuung. Sein Engagement für die von mir bearbeiteten Projekte und vor allem seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und sein Ideenreichtum trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Prof. Dr. Vlada B. Urlacher für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank geht an die **Konrad-Adenauer-Stiftung**, die mich von November 2008 bis Oktober 2011 mit einem Stipendium unterstützte, sowie an deren Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner und **Herrn Dr. Thomas Schwab**, sowie sämtlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie II der Universität Regensburg für die Unterstützung des ssAnPRT-Projektes. **Frau Dr. Ute Hellmich** für ihre Hilfe bei LmrA.

H**errn Dr. Suren Felekyan, Herrn, Dr. Hugo Sanabria, Thomas Peulen, Herrn Dr. Ralf Kühnemuth, Herrn Dr. Jakub Kubiak, Dr. Evangelos Sisamakis, Dr. Richard Janissen** und H**errn Dr. Paul Rothwell** für die Unterstützung bei den Einzelmolekül-spektroskopischen Untersuchungen und deren Datenauswertung, sowie bei allen wissenschaftlichen und gerätetechnischen Fragestellungen.

Ein großes Dankeschön an meine fleißigen Korrekturleser, allen voran **Frau Dr. Annemarie Greife**, sowie **Herrn Dr. Nils Hanekop**, **Dr. Ralf Kühnemuth** und **Katherina Hemmen**.

Herrn Martin Schramm danke ich für die Umsetzung sämtlicher elektrotechnischer Ideen, die mir während meiner Zeit am Institut durch den Kopf gingen.

Des Weiteren möchte ich sämtlichen Mitarbeitern des **Instituts für Biochemie I** der Heinrich-Heine-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Schmitt für ihre stetige wissenschaftliche Unterstützung, sowie ihre freundliche Bereitstellung der Laboratorien der biologischen Sicherheitsstufe 1 danken.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit der letzten Jahre, allen voran **Herrn Bekir Bulat** und **Matthias Fröscher**. Ich werde unsere „Bagger-Pausen“ vermissen! Außerdem danke ich **Frau Veronika Mendorf**, **Frau Bettina Kerbl** und **Frau Bärbel Hofmann** für sämtliche bürokratischen Angelegenheiten, die in dieser Zeit aufgetaucht sind.

Mein größter Dank gilt meinen **Eltern** für ihre Unterstützung und aufmunternden Worten während dieser Zeit. Ohne sie wäre ich nicht da, wo ich heute bin…

8 Anhang

8.1 DNA- und Proteinsequenzen

8.1.1 Primer

Tabelle 8-1: Verwendete Primer für die Erstellung neuer ssAnPRT-Varianten (Kapitel 4.1.6).

Variante	Primer (5‘ → 3‘)
S14C	GAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATGTGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAA
S14C reverse	TTCAGCCTCATTAATTTCTAAATCACATTTATTTATGAGTTTTTTCAGAATTTCGTTAATGTTC
D15C	CGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCATGTTTAGAAATTAATGAGGCTGAAGAATTAGCT
D15C reverse	AGCTAATTCTTCAGCCTCATTAATTTCTAAACATGATTTATTTATGAGTTTTTTCAGAATTTCG
E17C	CGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTATGTATTAATGAGGCTGAAGAATTAGCTAAAGCTATAA
E17C reverse	TTATAGCTTTAGCTAATTCTTCAGCCTCATTAATACATAAATCTGATTTATTTATGAGTTTTTTCAGAATTTCG
G31C	GCTGAAGAATTAGCTAAAGCTATAATTAGATGTGAAGTTCCAGAGATTTTAGTAT
G31C reverse	ATACTAAAATCTCTGGAACTTCACATCTAATTATAGCTTTAGCTAATTCTTCAGC
I36E	AAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGGAATTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTAAG
I36E reverse	ATACTAAAATCTCTGGAACTTCACATCTAATTACTTAATGCTACTAAAATTGCTGATACTAATTCCTCTGGAACTTCTCCTCTAATTATAGCTT
S39C	TAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATGTGCAATTTTAGTAGCATTAAGA
S39C reverse	TCTTAATGCTACTAAAATTGCACATACTAAAATCTCTGGAACTTCTCCTCTA
M47D	GATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTAAGAGATAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGT
M47D reverse	ACAAAACCTACTATTTCATTTTTACTTTCACCTTTATCTCTTAATGCTACTAAAATTGCTGATACTAAAATC
G49C	CAGCAATTTTAGTAGCATTAAGAATGAAATGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTT
G49C reverse	AAACCTACTATTTCATTTTTACTTTCACATTTCATTCTTAATGCTACTAAAATTGCTG
S51C	AGTAGCATTAAGAATGAAAGGTGAATGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGC
S51C reverse	GCAAAACCTACTATTTCATTTTTACATTCACCTTTCATTCTTAATGCTACT
G168C	CGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGTGCATCAGGACTATTTTCAATATTCTAG
G168C reverse	CTAGAATATTGAAAATAGTCCTGATGCACAAAGTTTTTCTTACATTGGCAACG
S254C	AGTCAAGTTAAATGTAACTGATTTCGGCATATGTCCGATTCCAATAGAAAAGT
S254C reverse	CTAGAATATTGAAAATAGTCCTACTTTTCTATTGGAATCGGACATATGCCGAAATCAGTTACATTTAACTTGACT
K280C	CAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTTGTGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAAT
K280C reverse	ATTTTAATGAATTCAGCCACGTGTTCATCACAACCCAGAAATGCTCTAACTATTTTTATTG

Tabelle 8-2: Verwendete Primer für die Erstellung von T4L-Varianten (Kapitel 3.1.3.1.1).

Variante	Primer (5‘ → 3‘)
R8Amber	AATATATTTGAAATGTTATAGATAGATGAACGTCTTAGA
R8Amber reverse	TCTAAGACGTTCATCTATCTATAACATTTCAAATATATT
S44Amber	TCACTTAATGCTGCTAAATAGGAATTAGATAAAGCTATT
S44Amber reverse	AATAGCTTTATCTAATTCCTATTTAGCAGCATTAAGTGA
P86C	AGAAATGCTAAATTAAAATGTGTTTATGATTCTCTTGAT
P86C reverse	ATCAAGAGAATCATAAACACATTTTAATTTAGCATTTCT
R119C	GGATTTACTAACTCTTTATGTATGCTTCAACAAAAACGC
R119C reverse	GCGTTTTTGTTGAAGCATACATAAAGAGTTAGTAAATCC
T4Lfor (oe-PCR)	GGAATGGTGCATGCAAGGAGATGG
T4Lrev (oe-PCR)	GCC*GGATCC*TTATAGATTTTTATACGC

8.1.2 Plasmid- und Proteinsequenzen von ssAnPRT-Varianten

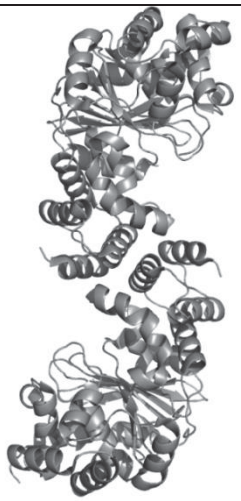
Protein: ssAnPRT(Wildtyp)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37573,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(S14C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATGTGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

0 M N I N E I L K K L 10	11 I N K C D L E I N E 20	21 A E E L A K A I I R 30	31 G E V P E I L V S A 40
41 I L V A L R M K G E 50	51 S K N E I V G F A R 60	61 A M R E L A I K I D 70	71 V P N A I D T A G T 80
81 G G D G L G T V N V 90	91 S T A S A I L L S L 100	101 V N P V A K H G N R 110	111 A V S G K S G S A D 120
121 V L E A L G Y N I I 130	131 V P P E R A K E L V 140	141 N K T N F V F L F A 150	151 Q Y Y H P A M K N V 160
161 A N V R K T L G I R 170	171 T I F N I L G P L T 180	181 N P A N A K Y Q L M 190	191 G V F S K D H L D L 200
201 L S K S A Y E L D F 210	211 N K I I L V Y G E P 220	221 G I D E V S P I G N 230	231 T F M K I V S K R G 240
241 I E E V K L N V T D 250	251 F G I S P I P I E K 260	261 L I V N S A E D S A 270	271 I K I V R A F L G K 280
281 D E H V A E F I K I 290	291 N T A V A L F A L D 300	301 R V G D F R E G Y E 310	311 Y A D H L I E K S L 320
321 D K L N E I I S M N 330	331 G D V T K L K T I V 340	341 V K S S G 345	

Molekulargewicht [Da]:	37589,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(D15C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCATGTTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

0 M N I N E I L K K L 10	11 I N K S C L E I N E 20	21 A E E L A K A I I R 30	31 G E V P E I L V S A 40
41 I L V A L R M K G E 50	51 S K N E I V G F A R 60	61 A M R E L A I K I D 70	71 V P N A I D T A G T 80
81 G G D G L G T V N V 90	91 S T A S A I L L S L 100	101 V N P V A K H G N R 110	111 A V S G K S G S A D 120
121 V L E A L G Y N I I 130	131 V P P E R A K E L V 140	141 N K T N F V F L F A 150	151 Q Y Y H P A M K N V 160
161 A N V R K T L G I R 170	171 T I F N I L G P L T 180	181 N P A N A K Y Q L M 190	191 G V F S K D H L D L 200
201 L S K S A Y E L D F 210	211 N K I I L V Y G E P 220	221 G I D E V S P I G N 230	231 T F M K I V S K R G 240
241 I E E V K L N V T D 250	251 F G I S P I P I E K 260	261 L I V N S A E D S A 270	271 I K I V R A F L G K 280
281 D E H V A E F I K I 290	291 N T A V A L F A L D 300	301 R V G D F R E G Y E 310	311 Y A D H L I E K S L 320
321 D K L N E I I S M N 330	331 G D V T K L K T I V 340	341 V K S S G 345	

Molekulargewicht [Da]:	37561,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(E17C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTATGTATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLCINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37547,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(G31C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGATGTGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}CEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37619,7	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(I36E)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGGAATTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATT
AAGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGAT
CAAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAA
CGTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAG
TAAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEELVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37589,5	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

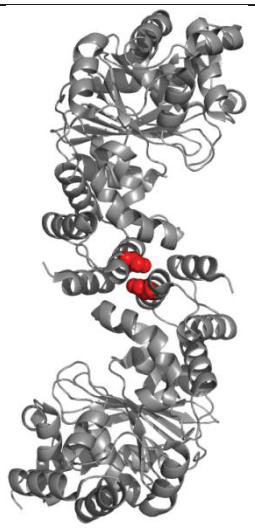
Protein: ssAnPRT(S39C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATGTGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVCA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37589,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(M47D)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAGATAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRDKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37557,5	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(G49C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAATGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKCE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37619,7	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

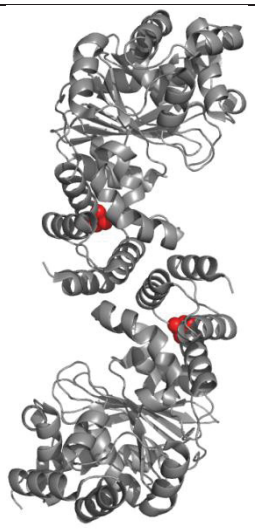
Protein: ssAnPRT(S51C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAATGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}CKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37589,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

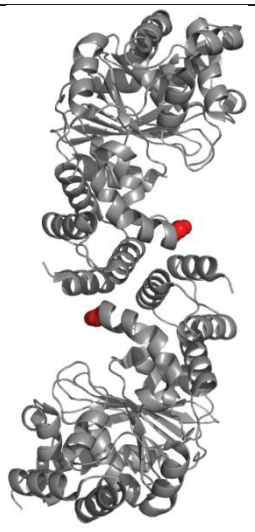
Protein: ssAnPRT(G168C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGTGTATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTGA
CTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTCA
AAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAGG
TAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTAAA
TGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTCCG
CAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAACAC
AGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATCAT
TTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTGA
AAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

0 M N I N E I L K K L 10	11 I N K S D L E I N E 20	21 A E E L A K A I I R 30	31 G E V P E I L V S A 40
41 I L V A L R M K G E 50	51 S K N E I V G F A R 60	61 A M R E L A I K I D 70	71 V P N A I D T A G T 80
81 G G D G L G T V N V 90	91 S T A S A I L L S L 100	101 V N P V A K H G N R 110	111 A V S G K S G S A D 120
121 V L E A L G Y N I I 130	131 V P P E R A K E L V 140	141 N K T N F V F L F A 150	151 Q Y Y H P A M K N V 160
161 A N V R K T L C I R 170	171 T I F N I L G P L T 180	181 N P A N A K Y Q L M 190	191 G V F S K D H L D L 200
201 L S K S A Y E L D F 210	211 N K I I L V Y G E P 220	221 G I D E V S P I G N 230	231 T F M K I V S K R G 240
241 I E E V K L N V T D 250	251 F G I S P I P I E K 260	261 L I V N S A E D S A 270	271 I K I V R A F L G K 280
281 D E H V A E F I K I 290	291 N T A V A L F A L D 300	301 R V G D F R E G Y E 310	311 Y A D H L I E K S L 320
321 D K L N E I I S M N 330	331 G D V T K L K T I V 340	341 V K S S G 345	

Molekulargewicht [Da]:	37619,7	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(S254C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATGTCCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGICPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37589,6	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(K280C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTTGTGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEILVSA^{40}
^{41}ILVALRMKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGC^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37548,5	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

Protein: ssAnPRT(S14C, S254C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATGTGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGATTTTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATTA
AGAATGAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGATC
AAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAAC
GTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAGT
AAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATGTCCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

0 M N I N E I L K K L 10	11 I N K C D L E I N E 20	21 A E E L A K A I I R 30	31 G E V P E I L V S A 40
41 I L V A L R M K G E 50	51 S K N E I V G F A R 60	61 A M R E L A I K I D 70	71 V P N A I D T A G T 80
81 G G D G L G T V N V 90	91 S T A S A I L L S L 100	101 V N P V A K H G N R 110	111 A V S G K S G S A D 120
121 V L E A L G Y N I I 130	131 V P P E R A K E L V 140	141 N K T N F V F L F A 150	151 Q Y Y H P A M K N V 160
161 A N V R K T L G I R 170	171 T I F N I L G P L T 180	181 N P A N A K Y Q L M 190	191 G V F S K D H L D L 200
201 L S K S A Y E L D F 210	211 N K I I L V Y G E P 220	221 G I D E V S P I G N 230	231 T F M K I V S K R G 240
241 I E E V K L N V T D 250	251 F G I C P I P I E K 260	261 L I V N S A E D S A 270	271 I K I V R A F L G K 280
281 D E H V A E F I K I 290	291 N T A V A L F A L D 300	301 R V G D F R E G Y E 310	311 Y A D H L I E K S L 320
321 D K L N E I I S M N 330	331 G D V T K L K T I V 340	341 V K S S G 345	

Molekulargewicht [Da]:	37605,7	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

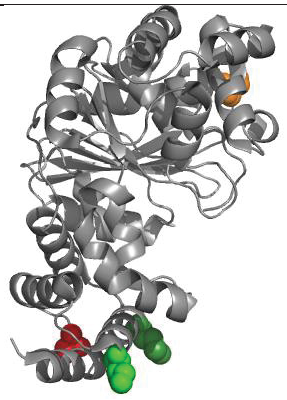
Protein: ssAnPRT(S14C, I36E, M47D, S254C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATGTGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGGAATTAGTATCAGCAATTTTAGTAGCATT
AAGAGATAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGAT
CAAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAA
CGTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAG
TAAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATGTCCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTAAAGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKCDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEELVSA^{40}
^{41}ILVALRDKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGICPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGK^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37605,5	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

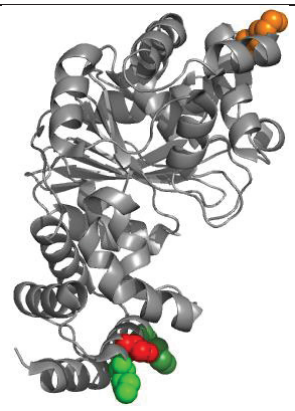
Protein: ssAnPRT(I36E, S39C , M47D, K280C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTAACGAAATTCTGAAAAAACTCATAAATAAATCAGATTTAGAAATTAATGAGGCTGAAG
AATTAGCTAAAGCTATAATTAGAGGAGAAGTTCCAGAGGAATTAGTATGTGCAATTTTAGTAGCATT
AAGAGATAAAGGTGAAAGTAAAAATGAAATAGTAGGTTTTGCTAGAGCAATGAGAGAATTAGCGAT
CAAAATAGACGTGCCCAACGCAATAGACACAGCTGGTACAGGTGGCGACGGATTAGGGACAGTAAA
CGTTAGTACCGCATCAGCTATCTTATTGAGTTTAGTTAATCCAGTTGCCAAACATGGTAATAGGGCAG
TAAGTGGTAAAAGCGGTAGCGCTGATGTTCTTGAGGCTTTAGGCTATAATATTATAGTTCCTCCAGAA
AGGGCAAAAGAACTAGTCAATAAAACGAATTTCGTTTTCCTCTTTGCACAATACTATCATCCTGCAAT
GAAGAACGTTGCCAATGTAAGAAAAACTTTGGGGATCAGGACTATTTTCAATATTCTAGGTCCATTG
ACTAATCCAGCTAATGCGAAGTATCAGTTAATGGGAGTATTTTCGAAAGATCACTTAGATTTACTGTC
AAAAAGTGCATATGAATTAGATTTCAATAAAATAATTTTGGTATATGGAGAGCCGGGTATAGATGAG
GTAAGTCCAATAGGAAATACTTTCATGAAAATAGTAAGTAAGCGCGGTATAGAGGAAGTCAAGTTA
AATGTAACTGATTTCGGCATATCACCGATTCCAATAGAAAAGTTAATAGTAAATTCTGCGGAGGATTC
CGCAATAAAAATAGTTAGAGCATTTCTGGGTTGTGATGAACACGTGGCTGAATTCATTAAAATTAAC
ACAGCAGTTGCGCTTTTTGCATTAGATAGAGTAGGCGATTTTAGAGAAGGTTATGAGTATGCTGATC
ATTTGATAGAAAAATCCTTGGATAAATTAAATGAGATAATCTCAATGAATGGTGATGTAACTAAACTG
AAAACGATAGTGGTGAAAAGTAGTGGT

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNINEILKKL^{10}	^{11}INKSDLEINE^{20}	^{21}AEELAKAIIR^{30}	^{31}GEVPEELVCA^{40}
^{41}ILVALRDKGE^{50}	^{51}SKNEIVGFAR^{60}	^{61}AMRELAIKID^{70}	^{71}VPNAIDTAGT^{80}
^{81}GGDGLGTVNV^{90}	^{91}STASAILLSL^{100}	^{101}VNPVAKHGNR^{110}	^{111}AVSGKSGSAD^{120}
^{121}VLEALGYNII^{130}	^{131}VPPERAKELV^{140}	^{141}NKTNFVFLFA^{150}	^{151}QYYHPAMKNV^{160}
^{161}ANVRKTLGIR^{170}	^{171}TIFNILGPLT^{180}	^{181}NPANAKYQLM^{190}	^{191}GVFSKDHLDL^{200}
^{201}LSKSAYELDF^{210}	^{211}NKIILVYGEP^{220}	^{221}GIDEVSPIGN^{230}	^{231}TFMKIVSKRG^{240}
^{241}IEEVKLNVTD^{250}	^{251}FGISPIPIEK^{260}	^{261}LIVNSAEDSA^{270}	^{271}IKIVRAFLGC^{280}
^{281}DEHVAEFIKI^{290}	^{291}NTAVALFALD^{300}	^{301}RVGDFREGYE^{310}	^{311}YADHLIEKSL^{320}
^{321}DKLNEIISMN^{330}	^{331}GDVTKLKTIV^{340}	^{341}VKSSG^{345}	

Molekulargewicht [Da]:	37564,5	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	11920	
	bei 280 nm	

8.1.3 Plasmid- und Proteinsequenzen von T4L-Varianten

Protein: T4L(pseudo-Wildtyp)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTTTTGAAATGCTGCGCATTGATGAAGGCCTGCGCCTGAAAATTTATAAAGATACCGAAG
GCTATTATACCATTGGCATTGGCCATCTGCTGACCAAAAGCCCGAGCCTGAACGCGGCGAAAAGCGA
ACTGGATAAAGCGATTGGCCGCAACTGCAACGGCGTGATTACCAAAGATGAAGCGGAAAAACTGTT
TAACCAGGATGTGGATGCGGCGGTGCGCGGCATTCTGCGCAACGCGAAACTGAAACCGGTGTATGA
TAGCCTGGATGCGGTGCGCCGCTGCGCGCTGATTAACATGGTGTTTCAGATGGGCGAAACCGGCGT
GGCGGGCTTTACCAACAGCCTGCGCATGCTGCAGCAGAAACGCTGGGATGAAGCGGCGGTGAACCT
GGCGAAAAGCCGCTGGTATAACCAGACCCCGAACCGCGCGAAACGCGTGATTACCACCTTTCGCACC
GGCACCTGGGATGCGTATAAAAACCTG

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNIFEMLRID^{10}	^{11}EGLRLKIYKD^{20}	^{21}TEGYYTIGIG^{30}	^{31}HLLTKSPSLN^{40}
^{41}AAKSELDKAI^{50}	^{51}GRNCNGVITK^{60}	^{61}DEAEKLFNQD^{70}	^{71}VDAAVRGILR^{80}
^{81}NAKLKPVYDS^{90}	^{91}LDAVRRCALI^{100}	^{101}NMVFQMGETG^{110}	^{111}VAGFTNSLRM^{120}
^{121}LQQKRWDEAA^{130}	^{131}VNLAKSRWYN^{140}	^{141}QTPNRAKRVI^{150}	^{151}TTFRTGTWDA^{160}
^{161}YKNL^{164}			

Molekulargewicht [Da]:	18635,4	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	25440	
	bei 280 nm	

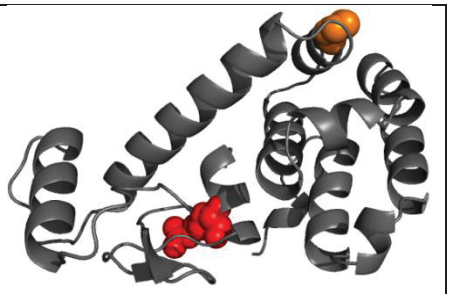
Protein: T4L(R8Amber, P86C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTTTTGAAATGCTGTAGATTGATGAAGGCCTGCGCCTGAAAATTTATAAAGATACCGAAG
GCTATTATACCATTGGCATTGGCCATCTGCTGACCAAAAGCCCGAGCCTGAACGCGGCGAAAAGCGA
ACTGGATAAAGCGATTGGCCGCAACTGCAACGGCGTGATTACCAAAGATGAAGCGGAAAAACTGTT
TAACCAGGATGTGGATGCGGCGGTGCGCGGCATTCTGCGCAACGCGAAACTGAAATGTGTGTATGA
TAGCCTGGATGCGGTGCGCCGCTGCGCGCTGATTAACATGGTGTTTCAGATGGGCGAAACCGGCGT
GGCGGGCTTTACCAACAGCCTGCGCATGCTGCAGCAGAAACGCTGGGATGAAGCGGCGGTGAACCT
GGCGAAAAGCCGCTGGTATAACCAGACCCCGAACCGCGCGAAACGCGTGATTACCACCTTTCGCACC
GGCACCTGGGATGCGTATAAAAACCTG

Aminosäure-Sequenz:

0 M N I F E M L **pAcF** I D 10	11 E G L R L K I Y K D 20	21 T E G Y Y T I G I G 30	31 H L L T K S P S L N 40
41 A A K S E L D K A I 50	51 G R N C N G V I T K 60	61 D E A E K L F N Q D 70	71 V D A A V R G I L R 80
81 N A K L K C V Y D S 90	91 L D A V R R C A L I 100	101 N M V F Q M G E T G 110	111 V A G F T N S L R M 120
121 L Q Q K R W D E A A 130	131 V N L A K S R W Y N 140	141 Q T P N R A K R V I 150	151 T T F R T G T W D A 160
161 Y K N L 164			

Molekulargewicht [Da]:	18692,3	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	25440	
	bei 280 nm	

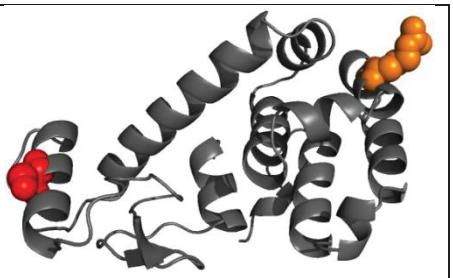
Protein: T4L(S44Amber, R119C)

Plasmid-DNA-Sequenz:

ATGAACATTTTTGAAATGCTGCGCATTGATGAAGGCCTGCGCCTGAAAATTTATAAAGATACCGAAG
GCTATTATACCATTGGCATTGGCCATCTGCTGACCAAAAGCCCGAGCCTGAACGCGGCGAAATAGGA
ACTGGATAAAGCGATTGGCCGCAACTGCAACGGCGTGATTACCAAAGATGAAGCGGAAAAACTGTT
TAACCAGGATGTGGATGCGGCGGTGCGCGGCATTCTGCGCAACGCGAAACTGAAACCGGTGTATGA
TAGCCTGGATGCGGTGCGCCGCTGCGCGCTGATTAACATGGTGTTTCAGATGGGCGAAACCGGCGT
GGCGGGCTTTACCAACAGCCTGTGTATGCTGCAGCAGAAACGCTGGGATGAAGCGGCGGTGAACCT
GGCGAAAAGCCGCTGGTATAACCAGACCCCGAACCGCGCGAAACGCGTGATTACCACCTTTCGCACC
GGCACCTGGGATGCGTATAAAAACCTG

Aminosäure-Sequenz:

^{0}MNIFEMLRID^{10}	^{11}EGLRLKIYKD^{20}	^{21}TEGYYTIGIG^{30}	^{31}HLLTKSPSLN^{40}
^{41}AAK**pAcF**ELDKAI^{50}	^{51}GRNCNGVITK^{60}	^{61}DEAEKLFNQD^{70}	^{71}VDAAVRGILR^{80}
^{81}NAKLKPVYDS^{90}	^{91}LDAVRRCALI^{100}	^{101}NMVFQMGETG^{110}	^{111}VAGFTNSLCM^{120}
^{121}LQQKRWDEAA^{130}	^{131}VNLAKSRWYN^{140}	^{141}QTPNRAKRVI^{150}	^{151}TTFRTGTWDA^{160}
^{161}YKNL^{164}			

Molekulargewicht [Da]:	18702,4	
Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]:	25440	
	bei 280 nm	

8.2 Abstände aus dem AV-Modell für ssAnPRT

Tabelle 8-3: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(E5C, K280C).

	E5C-E5C			E5C-K280C			E5C-K280C			K280C-K280C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	32,3	30,0	2,3	45,4	40,7	4,7	59,1	53,8	5,3	98,6	87,6	11,0
R_{mp}	46,1	58,7	-12,6	47,0	20,1	26,9	72,8	92,1	-19,3	111,9	98,0	13,8
$\langle R_{DA} \rangle$	48,6	59,8	-11,2	48,8	22,7	26,1	74,3	92,8	-18,5	112,7	99,0	13,8
$\langle R_{DA} \rangle_E$	48,7	58,9	-10,2	49,0	27,2	21,9	72,9	91,1	-18,2	111,0	97,0	13,9

Tabelle 8-4: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(S14C, S254C).

	S14C-S14C			S14C-S254C			S14C-S254C			S254C-S254C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	23,9	18,2	5,7	42,7	29,5	13,3	49,7	41,8	7,8	85,2	78,2	7,1
R_{mp}	31,7	25,1	6,6	38,4	29,8	8,6	57,1	56,5	0,6	92,3	85,9	6,4
$\langle R_{DA} \rangle$	34,3	28,2	6,1	40,8	32,8	8,0	58,7	58,1	0,5	93,3	87,1	6,2
$\langle R_{DA} \rangle_E$	38,0	33,7	4,3	42,8	37,2	5,6	57,0	56,6	0,4	89,4	83,6	5,8

Tabelle 8-5: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(D15C, S254C).

	D15C-S14C			D15C-S254C			D15C-S254C			S254C-S254C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	25,9	20,6	5,3	44,8	45,7	-0,9	44,3	36,2	8,2	85,2	78,2	7,1
R_{mp}	29,6	22,6	7,0	47,1	34,4	12,7	52,0	52,1	-0,1	92,3	85,9	6,4
$\langle R_{DA} \rangle$	31,8	25,5	6,2	48,9	36,6	12,3	53,7	53,7	0,0	93,3	87,1	6,2
$\langle R_{DA} \rangle_E$	36,3	31,1	5,2	49,1	39,9	9,2	53,0	53,0	0,0	89,4	83,6	5,8

Tabelle 8-6: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(E17C, S254C).

	E17C-S14C			E17C-S254C			E17C-S254C			E17C-S254C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	39,4	34,8	4,6	46,2	45,8	0,4	49,0	44,0	5,0	85,2	78,2	7,1
R_{mp}	51,7	46,3	5,4	51,5	31,8	19,7	59,4	59,7	-0,3	92,3	85,9	6,4
$\langle R_{DA} \rangle$	53,5	48,3	5,2	53,1	34,4	18,7	61,1	61,4	-0,3	93,3	87,1	6,2
$\langle R_{DA} \rangle_E$	53,1	48,7	4,4	52,3	38,3	14,1	59,5	59,8	-0,3	89,4	83,6	5,8

Tabelle 8-7: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(G31C, S254C).

	G31C-S14C			G31C-S254C			G31C-S254C			S254C-S254C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	24,9	24,9	0,1	59,4	54,0	5,4	51,3	44,3	6,9	85,2	78,2	7,1
R_{mp}	25,7	28,6	-3,0	67,9	48,9	19,0	64,5	63,9	0,6	92,3	85,9	6,4
$\langle R_{DA} \rangle$	28,2	30,9	-2,7	69,2	50,7	18,5	66,1	65,6	0,6	93,3	87,1	6,2
$\langle R_{DA} \rangle_E$	33,4	35,4	-2,0	66,8	50,6	16,2	64,7	64,1	0,6	89,4	83,6	5,8

Tabelle 8-8: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(G49C, S254C).

	G49C-S14C			G49C-S254C			G49C-S254C			S254C-S254C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	15,4	13,7	1,8	50,6	40,0	10,5	39,4	30,7	8,7	85,2	78,2	7,1
R_{mp}	11,8	12,2	-0,4	50,8	44,0	6,9	42,3	42,0	0,2	92,3	85,9	6,4
$\langle R_{DA} \rangle$	17,1	16,8	0,2	52,4	45,5	6,9	44,0	43,8	0,3	93,3	87,1	6,2
$\langle R_{DA} \rangle_E$	21,9	21,8	0,1	51,9	46,6	5,3	45,3	45,1	0,2	89,4	83,6	5,8

Tabelle 8-9: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(S51C, S254C).

	S51C-S14C			S51C-S254C			S51C-S254C			S254C-S254C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	26,9	22,7	4,2	48,4	49,2	-0,8	40,9	35,3	5,6	85,2	78,2	7,1
R_{mp}	26,8	20,1	6,8	50,9	38,9	12,0	47,2	47,7	-0,4	92,3	85,9	6,4
$\langle R_{DA} \rangle$	28,8	22,7	6,0	52,5	40,8	11,7	48,9	49,3	-0,4	93,3	87,1	6,2
$\langle R_{DA} \rangle_E$	34,0	28,0	6,0	52,0	43,0	9,0	49,2	49,5	-0,3	89,4	83,6	5,8

Tabelle 8-10: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(N162C, K280C).

	N162C-N162C			N162C-K280C			N162C-K280C			K280C-K280C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	16,2	14,6	1,6	60,8	56,2	4,7	45,5	35,0	10,5	98,6	87,6	11,0
R_{mp}	17,2	12,0	5,1	71,0	53,1	17,9	52,4	51,0	1,4	111,9	98,0	13,8
$\langle R_{DA} \rangle$	21,5	18,0	3,5	72,1	54,4	17,7	54,0	52,6	1,4	112,7	99,0	13,8
$\langle R_{DA} \rangle_E$	27,3	23,1	4,2	69,6	53,6	16,1	53,3	52,1	1,2	111,0	97,0	13,9

Tabelle 8-11: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für ssAnPRT(G168C, K280C).

	G168C-G168C			G168C-K280C			G168C-K280C			K280C-K280C		
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$	23,6	23,0	0,6	62,0	59,1	2,9	37,3	28,8	8,6	98,6	87,6	11,0
R_{mp}	39,5	36,0	3,5	75,2	63,7	11,5	40,4	39,1	1,3	111,9	98,0	13,8
$\langle R_{DA} \rangle$	41,5	37,7	3,7	76,3	65,0	11,3	42,2	41,1	1,0	112,7	99,0	13,8
$\langle R_{DA} \rangle_E$	42,5	39,4	3,1	75,0	63,5	11,5	43,5	42,7	0,8	111,0	97,0	13,9

Tabelle 8-12: C_β-Abstände und Abstände aus dem AV-Modell (offene Konformation R_{open}, PDB ID: 1O17; geschlossene Konformation R_{closed}, PDB ID: 1ZYK) für monomeres ssAnPRT(S39C, K280C).

							S39C-K280C					
Abstand [Å]	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR	R_{open}	R_{closed}	ΔR
$R_{C\beta-C\beta}$							49,4	38,6	10,8			
R_{mp}							61,0	45,3	15,7			
$\langle R_{DA} \rangle$							62,4	47,0	15,4			
$\langle R_{DA} \rangle_E$							60,8	47,7	13,1			

8.3 Gleichungen

$$X^{(Zustand\ 1)} = \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}}$$ Gleichung 8-1

mit $X^{(Zustand\ 2)} = 1 - X^{(Zustand\ 1)}$

$$K_{dyn} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$$ Gleichung 8-2

9 Veröffentlichungen und Manuskripte

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder werden für die Veröffentlichung vorbereitet:

Publikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Supertertiary structure of the synaptic MAGuK scaffold proteins is conserved

J. J. McCann, L. Zheng, D. Rohrbeck, S. Felekyan, R. Kühnemuth, R. B. Sutton, C. A. M. Seidel, and M. E. Bowen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS), **2012**, Vol. 109, No. 39, 15775 - 15780, *Manuskript auf den folgenden Seiten*

The catalytic intermediats of Anthranilate phosphoribosyltransferase from Sulfolobus solfataricus reveal multiple FRET states in exchange

D. Rohrbeck, S. Felekyan, E. Sisamakis, T. Schwab, R. Sterner and C.A.M. Seidel, *Manuskript in Vorbereitung*

Deciphering folding and unfolding pathways of Phage T4 Lysozyme

K. Hemmen, D. Rodnin, D.Rohrbeck, H. Sanabria, S. Felekyan and C.A.M. Seidel, *Manuskript in Vorbereitung*

Mapping the inter-domain dynamics of hub-protein PDS-95

J. Kubiak, D. Rohrbeck, S. Felekyan, T. Peulen, R. Kühnemuth, J. J. McCann, M. E. Bowen, C. A. M. Seidel, *Manuskript in Vorbereitung*

Weitere Publikationen:

Osteoblastic potency of bone marrow cells cultivated on functionalized biometals with cyclic RGD-peptide

M. Jäger, C. Böge, R. Janissen, D. Rohrbeck, T. Hülsen, S. Lensing-Höhn, R. Krauspe and M. Herten, *Journal of Biomedical Materials Research* Part A, **2013**, Vol. 101, No. 10, 2905 - 2914

The Iron/Electrolyte Interface at Extemely Large Curent Densities.

M. Lohrengel, C. Rosenkranz and D. Rohrbeck, Microchimica Acta, Vol. 156, **2006**, 163 -166

The Dynamic Quaternary Structure of the Synaptic MAGuK Scaffold Proteins is Conserved

James J McCann[a], Liqiang Zheng[b] Daniel Rohrbeck [c], Suren Felekyan [c], Ralf Kühnemuth [c], R Bryan Sutton[d], Claus A.M. Seidel[c] and Mark E. Bowen[b*]

Departments of [a]Pharmacological Sciences, [b]Physiology & Biophysics, Stony Brook University, Stony Brook, New York, 11794 [c]Institut für Physikalische Chemie, Legrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstraβe 1, Geb 26.32, 40225 Düsseldorf, Germany. [d]Cell Physiology and Molecular Biophysics, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, TX, 79430.

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES; Biophysics and Computational Biology

*To whom correspondence should be addressed: mark.bowen@sunysb.edu

ABSTRACT

Scaffold proteins form a dynamic framework to organize signal transduction by conjoining modular protein-binding domains. Scaffolds contain folded domains that are well understood but also disordered regions, which provide a challenge to structural biology. The folded domain structures for the scaffold protein PSD-95 were long known but such fragmentary knowledge lacks methods to assemble these pieces. We used 64 distance restraints from single molecule fluorescence to describe the native state ensemble of this canonical scaffold protein. Our approach represents a solution to describing the flexibility in any multi-domain protein. The five domains in PSD-95 partitioned into two independent supramodules. Comparative structural analysis of synaptic MAGuK homologues showed a conservation of this supramodular organization. Intramolecular interactions were limited to neighboring domains, which did not interact without being tethered. Although MAGUK proteins are flexible, there are conformational preferences encoded in the primary sequence.

/body

Nature relies on scaffold proteins to provide the physical constraints necessary for efficient signal transduction. Scaffold proteins interact with multiple pathway components to hold the signal transduction machinery in close proximity. Scaffolds are often composed of modular, protein-binding domains linked together in series by intrinsically disordered linkers (1). The presence of disorder may be a defining feature for scaffolds and other proteins that interact with multiple binding partners (2).

The high effective concentrations brought about by domain tethering can give rise to unexpected interactions between the protein-binding domains. In some cases, canonical protein-binding domains fold together into an inseparable structural supramodule (3). While much has been learned by studying truncated fragments, we need to put the pieces back together. Such questions are difficult to address because disorder presents a fundamental challenge to structural biology.

The Membrane-Associated Guanylate Kinase (MAGuK) scaffold proteins regulate signaling at cellular junctions (4). There are four MAGuKs in excitatory synapses (PSD-95, PSD-93 SAP97 and SAP102), which share the same arrangement of three PDZ domains and an SH3 domain preceding an inactive Guanylate Kinase domain (GuK). The sequence identity is greater than 70% in the binding-domains but falls to less than 20% within the linkers. Physiological studies have suggested that the four MAGuKs are not functionally redundant (5, 6) but their individual protein-binding domains are structurally identical.

In this paper, we used single-molecule, fluorescence resonance energy transfer (smFRET) to describe the conformational ensemble for full-length PSD-95 in solution. FRET has been long used to define the 3D relationship between individual components or domain fragments (7-10). We found that the five domains of PSD-95 partition into two independent “supramodules.” While the interdomain linkers permit dynamics they do not impart isotropic domain positioning. Homologous measurements in SAP97 and SAP102 showed that this organization is conserved in the other synaptic MAGuKs. This study represents the first unambiguous assignment of domain positioning in a full-length scaffold protein and the most extensive characterization of a dynamic protein structure with smFRET.

RESULTS

Ensemble Measurement of Compaction in PSD-95

The elution time in analytical size exclusion chromatography (SEC) is sensitive to both protein shape and the density of domain packing. From the elution time, we calculated the apparent molecular weight for PSD-95 relative to globular protein standards (Fig. 1). The apparent molecular weight for full-length PSD-95 was larger than expected indicating that the domains are not tightly packed. To probe domain interactions, we compared the difference between the actual and apparent molecular

weight (ΔMW) for a series of PSD-95 truncation constructs. The single PDZ domains had a ΔMW of zero as expected for compact, folded domains (E- G; Fig. 1). For SH3-GuK and PDZ3-SH3-GuK, ΔMW was slightly negative indicating that PDZ3 localizes closely to the SH3-GuK domain (H-I; Fig. 1). In contrast, the PDZ1-2 tandem shows a positive ΔMW (D; Fig. 1). Structures of the PDZ tandem have revealed an extended rod-like conformation (11). Constructs containing the N-terminus or the PDZ2-3 linker showed significantly higher ΔMW (B-C; Fig. 1). The deviation for the full-length protein is primarily attributable to these two linkers, which are either disordered or in an extended conformation.

smFRET Analysis of Domain Organization in PSD-95

We introduced and characterized 30 different labeling sites in the full-length protein (Fig. S1A and B). We made 65 FRET measurements to sample all possible domain combinations multiple times using different labeling sites. PSD-95 was labeled with Alexa555 and Alexa647 and measured with Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy equipped with an EMCCD camera running at 100 ms/frame. Proteins were encapsulated in immobilized phospholipid vesicles. A representative smFRET experiment, from raw data to computational analysis, is included in the Supporting Information (Fig S1C-J).

Single PSD-95 molecules showed stable FRET levels until photobleaching (Fig S1C). Variations in the smFRET signal can indicate dynamics (12), but PSD-95 showed little signal variance (Fig. S1D). Most smFRET histograms showed single Gaussian peaks (Fig S1E, Table S1). The narrow peak widths are similar to what we have measured in DNA (13) but also in random coil proteins with rapid dynamics (14). Thus, individual measurements are compatible with either a static structure or dynamics. Only 7 out of 65 histograms deviated from this by showing either a width greater than 0.2 or a systematic deviation from a Gaussian peak shape (*asterisks*, Table S1).

Distinguishing between a static and dynamic conformation is not possible with one EMCCD smFRET measurement. However, “oversampling” the domain position using different labeling site combinations did reveal dynamics. There is no time averaging in a static structure so measurements using different labeling sites show a dispersion of mean FRET. Time-averaging from dynamics makes FRET insensitive to labeling position. Similarly limited dispersion is also seen in NMR resonances of disordered proteins (15). To analyze FRET dispersion, we calculated the variance of mean FRET (VMF) using either PDZ1 (Fig. 2A) or GuK (Fig. 2B) as the reference domain. VMF compares measurements using different labeling sites as opposed to variance in the smFRET signal.

The domains in PSD-95 partitioned into two categories based on VMF. Domains with a well-defined conformation such as the PDZ1-2 tandem (Fig. 2A) and SH3-GuK (Fig. 2B), which have both been crystallized (11, 16, 17), showed a large VMF. The

VMF for PDZ3 to GuK was similar to that for SH3-GuK. This agrees with our SEC data which also suggested that PDZ3 associates with SH3 or GuK. In contrast, only PDZ2 showed a high VMF relative to PDZ1. The low VMF of PDZ1 to all the other domains suggests that the PDZ1-2 tandem undergoes isotropic motion relative to the rest of PSD-95. The narrow smFRET peak widths and lack of signal variance suggest rapid dynamics across the PDZ2-3 linker (12).

PDZ3 Localizes Near the SH3-GuK Interface in Full-Length PSD-95

Based on their location within the GuK domain (Fig. 3A), the smFRET measurements between PDZ3 and GuK could be grouped into three clusters with statistically different mean FRET efficiencies (Fig. 3B). Measurements between 3 labeling sites in SH3 and 3 labeling sites in PDZ3 (Fig. 3C) showed a complex dependence on labeling position (Fig. 3D). Using this qualitative analysis, we sought a labeling combination that would result in FRET near 1 between PDZ3 and SH3-GuK. However, none of our measurements showed smFRET greater than 0.78. This suggests that PDZ3 undergoes motional averaging. Some smFRET measurements to PDZ3 showed wide or irregularly shaped smFRET distributions (Table S1), which is consistent with dynamics (12). Dynamics between PDZ3 and SH3 were also suggested by a recent NMR study on a PDZ3-SH3 fragment (18). Our data is incompatible with isotropic motion. We conclude that PDZ3 undergoes dynamic binding to a defined site near the SH3-GuK interface with a high probability of occupying the position defined by our smFRET restraints.

Structural Modeling of the PDZ3-SH3-GuK Supramodule

Several approaches have been developed to generate molecular models from FRET data (9, 19-21). We used the Crystallography and NMR System (CNS) to model the position of PDZ3 relative to SH3-GuK because CNS is well established for macromolecular refinement and was recently adapted to use smFRET data (10, 22). Our experiments measured distances between fluorescent dyes attached to PSD-95. Dyes with flexible linkers introduce uncertainty about the dye position but minimize interactions with the protein. To relate the dye position to the protein backbone, we ran 200 trials of simulated annealing in CNS for each labeling site (Fig. S1F). This generated a large “dye cloud” of possible positions (Fig S1G). We took the mean dye position and used this fixed pseudo-atom position to apply our distance restraints (10, 21). A single pseudo-atom position neglects rapid dye motions but these motions are averaged in our data because they are several orders of magnitude faster than our time resolution.

To convert FRET to distance, we calculated the Förster radius (R_0) for each FRET pair using empirically measured photophysical parameters (Table S1). We assumed free rotation of the dyes (orientation factor, $\kappa^2 = 2/3$) based on our steady state

anisotropy measurements (Table S1). Also analysis of the distribution of dye positions from simulated annealing showed an isotropic distribution (Fig. S1G).

For the docking calculations, PDZ3 and GuK were held rigid along with the core of the SH3 domain. Backbone torsion angles in the PDZ3-SH3 linker and the extended loops of the SH3 domain were allowed free rotation. From 500 trials with randomly assigned starting orientations, we identified a best-fit model with an RMSD between dye pseudoatom positions in the model and the smFRET distance restraints of 7.79 Å (Figure 4A, Table S2). The lower scoring models showed the same position for PDZ3 and differed only in the conformation of the SH3 loops (Fig. S2A).

Our docking model positioned PDZ3 close to the interface between SH3 and GuK with the closest point of approach being 5 Å from SH3. The lack of direct contact is consistent with our model not representing the limiting, fully-bound state. This location for PDZ3 does not involve the canonical SH3 or GuK ligand-binding sites (Fig. S2B). This position for PDZ3 in PSD-95 is substantially different than that observed in the distantly related MAGUK, zonula occludens 1 (ZO-1) (23) (Fig. S2C). Given the very low sequence conservation some structural divergence is not surprising. Nonetheless, our data confirms that a PDZ-SH3-GuK supramodule is the fundamental structural unit in the extended MAGuK family.

The sources of error and uncertainty in FRET modeling have been attributed primarily to uncertainty in R_0 (24). Our standard deviation for replicate measurements of mean FRET is small (typically >0.01) so this error contributes little. From the dye simulations, we calculated the uncertainty in the interdye distance and orientation of the fluorescent dyes. The uncertainty associated with interdye-distance is moderate (average RMSD = 7.7 Å, Fig S1H, Table S2). The mean κ^2 from our dye cloud was 0.641, which is close to the standard $\kappa^2 = 2/3$ approximation. However, the distribution of “instantaneous” κ^2 (Fig. S1I) for each conformation in the dye cloud introduces a larger uncertainty (average RMSD = 15.1 Å. Fig. S1J, Table S2). This assumes that all dye conformations are equally probable and not time averaged, but must represent the extreme in our uncertainty. Though the uncertainty for each individual measurement is high, the overall uncertainty for the docking is much lower. The RMSD for unrestrained regions due to uncertainties in the dye position was 2.56 Å (Fig. S2C) and 3.98 Å due to uncertainties in both the position and orientation (Fig. S2D). This is because of the large number of restraints oversampled the domain position leaving few solutions to the docking calculation.

A Model for the Native State Conformational Ensemble of Full-length PSD-95

Surprisingly, a comparison of 10 measurements in PSD-95 truncations found no differences in smFRET compared to the full-length protein (Fig. S3). Interactions between non-sequential domains appear to play no role in the organization of PSD-95. The four interdomain interfaces within PSD-95 span a continuum of stability. The

stability of domain interactions scaled with the linker length. The PDZ tandem and SH3-GuK have the shortest linkers and are the most stable, while PDZ2-3 have the longest linker and show random coil dynamics.

The PDZ1-2 tandem and the PDZ3-SH3-GuK supramodule appear independent. Using the Gaussian chain model, we predicted a measured FRET of ~0.4 for domains connected by a 67 residue random-coil linker. The average FRET value for all measurements between PDZ3 and PDZ1 or PDZ2 was 0.41 ± 0.08 (Table S1). Thus, the PDZ2-3 linker imparts the mean domain separation of a relaxed, random coil. Our data suggests that full extension is not an intrinsic property of the linkers in PSD-95. Measurements between the N-terminus and PDZ3 suggest that the longest, average dimension of PSD-95 in solution would be ~13.5 nm. Our smFRET model is in good agreement with SAXS and EM studies (25, 26), which also suggested that PSD-95 adopts a compact configuration in solution (Fig. 4B).

Conformational dynamics of PSD-95.

To analyze dynamics, we used confocal microscopy and multi-parameter fluorescence detection (MFD) (27). MFD allows FRET to be calculated based on both fluorescence intensity and fluorescence lifetime. Comparing these two parameters of FRET can distinguish static and dynamic structures (28). To study the dynamics of PDZ3, we labeled full-length PSD-95 with Alexa488 and Alexa647 in PDZ3 and either GuK, SH3 or PDZ2 (Table S1. Samples 34, 44 and 53, respectively). All samples were analyzed using 2D plots of the FRET indicator, F_D/F_A (ratio of D and A fluorescence), against donor lifetime, $\tau_{D(A)}$ (Fig5, upper panels). In all samples we found two species: D-only and a FRET-population highlighted in red, which were identified using two-color pulsed-interleaved excitation (PIE) (29). For all samples, the FRET species fell on the dynamic FRET line (full line) rather than the theoretical static FRET line (dashed line). The samples differed in FRET efficiency and peak width as well as their limiting FRET states (dotted lines) as taken from fits to the sub-ensemble lifetime decays (Fig. 5 C). The limiting donor lifetimes allow us to characterize the compact high-FRET state τ_1 = 0.8 ns (interdye distances of R_{DA} = 41 Å) and the more extended low-FRET state τ_2 = 3.4 ns (R_{DA} = 72 Å).

For PDZ3 relative to SH3-GuK (Fig. 5 A and B) the peaks are very broad, which indicates complex dynamics with a slow relaxation time on the order of the diffusion time (1.7 ms) and faster relaxation times (10-100 µs). The equilibrium is shifted towards the high FRET state as the peak is closer to τ_1. In contrast, the FRET peak for PDZ2-3 (Fig. 5C) is narrower indicating a faster relaxation time of approximately 0.1 ms. The equilibrium is shifted towards the extended conformation confirming the VMF analysis. The fluorescence cross-correlation functions (FCCS) have a prominent anti-correlation signature in the sub-millisecond time range (Fig. 5D). A formal fit revealed relaxation

times of approximately 1 μs, 100 μs and an additional third slow term of 1.7 ms. The existence of multiple scales for domain motions is a hallmark of protein dynamics (30).

Modeling the Dynamic Loops of the SH3 domain

The extended loops in the PSD-95 SH3 domain were poorly resolved in the crystal structure (17). We scanned labeling positions through these loops to examine their conformation (Fig S4). Refinements identified a lowest energy configuration of the pseudo-atom positions that is consistent with a family of loop conformations. To validate our model for the SH3 loops, we performed a 100 nanosecond, fully-solvated, all-atom molecular dynamics simulation based on the SH3-GuK crystal structure. The SH3 domain showed rapid reorganization, while the GuK domain remained relatively unchanged (Fig. 5A). The SH3 domain showed limited motion within the folded core, but the elongated loops were highly dynamic (Fig. 5B). Both our family of smFRET models and the conformational ensemble from the MD simulation show fluctuations of a similar magnitude (Fig. 5B). In particular, the HOOK loop (491 to 533) adopted a mean configuration significantly different from the extended conformation partially modeled in the crystal structure.

Conservation of Quaternary Structure in Synaptic MAGuK Homologues

To identify major structural differences in the synaptic MAGuKs, we introduced labeling sites into homologous positions in both SAP97 and SAP102 based on sequence alignments to PSD-95 (Fig. S5). All four measurements between PDZ1 and PDZ2 were identical in the three MAGuKs homologues (Fig. 7A). This implies a nearly identical structure for the PDZ1-2 tandem. Measurements between PDZ1 or PDZ2 and PDZ3 indicate a similar separation between the supramodules in PSD-95 and SAP102, with SAP97 showing a larger separation (Fig. 7B). Measurements between PDZ3 and the GuK domain revealed differences between MAGuK proteins (Fig. 7C). This suggests structural differences in the mean position for PDZ3. However the magnitude of the difference in terms of distance (RMSDs of 4.7 Å and 2.3 Å for SAP97 and SAP102, respectively) wouldn't suggest a wholly different binding site for PDZ3 in SAP97 or SAP102. Thus, the organization of domains into two supramodules appears to be conserved.

DISCUSSION

PSD-95 and the other synaptic MAGuKs play critical roles in synaptogenesis, receptor clustering and the modulation of synaptic plasticity (4). The available high resolution structures from PSD-95 represent the most tightly associated domains with the shortest interdomain linkers. Moving beyond the study of truncated fragments remains a challenge for proteins with intrinsic disorder.

Signal transduction proteins are macromolecular entities, so the quaternary structure of scaffolds could impose geometrical constraints on complex formation and activity. Numerous studies have shown that linker sequence (31), linker length (32), domain order (33) and interdomain interactions can alter scaffolding activity (34, 35). This suggests that although scaffolds contain disorder, their quaternary structure is a critical element of their biological activity. PSD-95 is a dynamic assembly of domains. Their connection assures the interaction in a crowded cellular environment.

Electron tomographic reconstructions of the synapse identified membrane-associated filaments containing PSD-95 (36). Their 20 nm length would imply a complete extension of a PSD-95 monomer. However, EM immuno-localization in synapses also measured the distances between PDZ3 or a C-terminal tag and the synaptic cleft (36, 37). The similarity of these measurements suggests that PDZ3 and GuK are equidistant from PDZ1. The 8nm separation measured between PDZ1 and PDZ3 also agrees well with our smFRET measurements. Thus, immuno-EM measurements in synapses are compatible with our model for PSD-95. If PSD-95 retains a compact configuration in synapses, then the vertical filaments may not correspond to PSD-95 monomers but rather complexes containing PSD-95.

Our measurements in neutral phospholipid vesicles capture PSD-95 in its lowest energy “ground state.” Although PSD-95 might not maintain this state in the synapse, this represents the ensemble encoded in the primary sequence. Native interactions which are not present in our experiments could alter the conformation. Such effects are unpredictable and could explain the biochemical differences between the closely related MAGuK isoforms.

METHODS

Additional details are provided in SI Text.

Single Molecule TIRF FRET Experiments

Recombinant protein samples were purified and fluorescently labeled with a mixture of Alexa Fluor 555 C_2 Maleimide and Alexa Fluor 647 C_2 maleimide as described previously (38). PSD-95 was encapsulated in 100 nm liposomes, which were immobilized to a quartz slide for Total Internal Reflection illumination with alternating laser excitation at 532 nm (~7.5 mW before prism) and 633 nm (~3 mW before prism). Emission was collected using an Andor iXon EMCCD camera (Andor Technologies, Belfast, UK). To correct for distortions in the measured donor and acceptor intensities we used per molecule gamma normalization based upon acceptor photobleaching events (13).

Multiparameter Fluorescence Detection

PSD-95 was labeled with Alexa Fluor 488 C_5 maleimide and Alexa Fluor 647 C_2 maleimide. Samples were excited at 496 nm (40 μW) using a pulsed, linearly polarized argon-ion laser (Sabre®, Coherent) focused by an 60x 1.2 NA water immersion objective (Olympus). Fluorescence emission was detected by 4 single photon counting avalanche photodiodes (SPCMAQR-14, Laser Components, Germany, for the acceptor, and PDM050CTC, MPD, Italy, for the donor. Laser beam diameter and a pinhole in the detection path provided a detection volume of about 2 fl. Detector outputs were registered by SPC 132 counting boards (Becker & Hickel, Berlin).

Molecular Dynamics Simulations

Molecular dynamics simulations of the SH3-GuK structure (39) were run at the High Performance Computing Center (HPCC) facilities at Texas Tech University using GROMACS 4.5 (40). Simulations were performed in a cubic box of water using boundary conditions at constant temperature and pressure (NPT). The simulation was run for 100 ns in total.

Rigid Body Structural Refinement

As we have done previously (38), the distance restraints were applied to the mean dye position, which was estimated using CNS version 1.3 (41). FRET restraint were modeled as a harmonic square well potential, with values closer to R_0 having less uncertainty (10). The energy function included a repulsive term for non-bonded interactions and the distance restraints but lacked electrostatics and the attractive van der Waals terms (42). Cluster analysis of 500 simulations using different randomly generated starting positions was used to isolate similar structures. The best-fit model was identified based upon the difference between FRET distant restraints and the model results (22).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Suzanne Scarlata and Stuart McLaughlin for assistance with fluorometry. We benefited from conversations with Steven Kaiser and Urszula Golebiewska. The authors acknowledge the National Institutes of Health for funding to M.E.B. (MH081923) and the German Science Foundation for funding to C.A.M.S (SFB590).

References

Figure legends

Figure 1: Probing Domain Organization in PSD-95 with Analytical Size Exclusion Chromatography.

(A) Schematic representation of the domain order in PSD-95. The truncated PSD-95 constructs used in the SEC experiments are depicted in the table. Filled cells indicate the domain composition. For the SEC analysis, each fragment was designated by a letter in line with the associated row. **(B)** Logarithm of the molecular weight (MW) is plotted against the normalized elution volume (V_e/V_o). Fragments are identified by the letter shown next to each data point. Error bars indicate replicate measurement errors. The black line was calculated using globular protein standards. **(C)** The difference between apparent molecular weight from SEC and formula weight (ΔMW) is shown for each PSD-95 fragment. Fragments are identified by the letters beneath the plot.

Figure 2: Variance of Mean FRET Distinguishes Static and Dynamic Structures
(A) Variance of mean FRET (VMF) for measurements between PDZ1 and the other domains in PSD-95 (indicated beneath the panel). VMF characterizes replicate measurements using different labeling sites to oversample the domain position. VMF for previously published measurements between PDZ1 and PDZ2 were significantly higher than measurements to PDZ3 or GuK (* $p = 0.046$, Brown-Forsythe test for unequal variance) **(B)** VMF for measurements between GuK and the other domains in PSD-95 (indicated beneath the panel). The VMF between GuK and PDZ3 or SH3 were indistinguishable from each other but significant higher than measurements to PDZ1 or PDZ2. (** $p = 0.048$)

Figure 3: PDZ3 Has a Defined Position Relative to the SH3 and GuK Domains
(A) Residues used for labeling in smFRET measurements to PDZ3 are shown as spheres in the carton representation of the GuK domain. Coloring denotes whether these sites showed high FRET (red, K591, Q621 and A640), mid FRET (green, R671 and H702) or low FRET (blue, E572 and S606) **(B)** Mean FRET for each measurements between PDZ3 and GuK plotted against the grouped labeling positions from panel A. Error bars indicate the standard deviations for each set of measurements. The mean FRET of these groups are statistically different (*$p = 0.033$, one-way ANOVA). **(C)** Labeling sites in SH3 (left) and PDZ3 (right) used in interdomain smFRET measurements. Residues used as labeling-sites are shown as spheres. Residues in SH3 are colored according to their FRET dependence in measurements to PDZ3 (cyan; R492 and C445; magenta, T482). **(D)** Dependence of mean smFRET efficiency on labeling site position for measurements between SH3 and PDZ3. Curves are colored according to the labeling sites are depicted in panel C. The PDZ3 site is denoted beneath the plot.

Figure 4: A Model for Full-Length PSD-95 in Solution
(A) Best-fit model from rigid body docking using smFRET restraints to position PDZ3 (orange) relative to SH3 (red) and GuK (purple). The SH3-GuK supramodule is shown

as surface representation while PDZ3 is depicted as cartoon representation. Arrow indicates the SH3 HOOK domain. The left and right images are related by a 90° rotation as indicated. **(B)** Cartoon model for the quaternary structure of full-length PSD-95. Domains positioning and the average dimensions (indicated in the panel) are in accordance with our smFRET restraints. This represents one snapshot image of a dynamic protein that changes conformation on the submillisecond timescale.

Figure 5: Probing PDZ3 Dynamics with Multiparamater Fluorescence Detection.
PSD-95 was labeled in PDZ3 and **(A)** GuK (sample #34), **(B)** SH3 (#44) or **(C)** PDZ2 (#53) (labeling scheme Table S1). 2D-MFD plots in the upper panel show the FRET indicator, F_D/F_A (ratio of D and A fluorescence) against the donor fluorescence lifetime in the presence of the acceptor ($\tau_{D(A)}$, Inset plot, top). The expected curve for static FRET is represented by the dashed line, while that for dynamic FRET is shown in black. The FRET populations identified by PIE are shown in red. The equations for the FRET lines are given in the Supporting Information. The associated bottom panels show the corresponding anisotropies, which indicate sufficient dye mobility. **(D)** Sub-ensemble lifetime fit for the FRET population of #53 confirms the existence of two limiting FRET states with τ_1 = 0.8 ns (34 %) and τ_2 = 3.4 ns (66 %). **(E)** Fluorescence cross correlation spectroscopy (FCCS) curve for the FRET bursts of #52 confirm the multi-time scale dynamics. The data was fit to a diffusion and relaxation model (blue line, See Supporting Information). The pure diffusion component is illustrated by the dashed line.

Figure 6: Resolving SH3 Domain Loop Configurations with Molecular Dynamics and smFRET .
(A) The root mean squared deviation (RMSD) as a function of time is plotted for the protein backbone relative to the starting structure during an 100 ns all-atom molecular dynamics simulation of the SH3-GuK domain fragment (red, SH3 domain; purple, GuK domain). The SH3 domain showed a rapid reorganization that stabilized after ~30 nanoseconds. **(B)** The root mean squared fluctuation (RMSF) for each C_α atom in the SH3 domain during the molecular dynamics simulation (black line) is plotted along with the RMSF from our ensemble of smFRET-derived models (grey diamonds). Because the core of the SH3 domain was held rigid in our docking calculations, the RMSF can only be calculated for freely moving atoms within the extended loops. The regions containing secondary structural elements (α-helices as cylinders and β-sheets as arrows) are indicated above the panel.

Figure 7: Quaternary Structure is Conserved Across the MAGUK Family of Scaffold Proteins
Each panel shows smFRET histograms for a set of measurements made between homologous positions in PSD-95 (black), SAP97 (grey) and SAP102 (dashed). The

number in each panel indicates the labeling site combination in PSD-95 according to Table S1. Sequence alignments are shown in Fig S5. Measurements made between **(A)** PDZ1 and PDZ2, **(B)** either PDZ1 or PDZ2 and PDZ3 and **(C)** PDZ3 and the GuK domain. Mean smFRET and peak widths from these experiments are listed in Table S4.

1. Good MC, Zalatan JG, & Lim WA (2011) Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332(6030):680-686.
2. Cortese MS, Uversky VN, & Dunker AK (2008) Intrinsic disorder in scaffold proteins: getting more from less. *Prog Biophys Mol Biol* 98(1):85-106.
3. Feng W & Zhang M (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* 10(2):87-99.
4. Funke L, Dakoji S, & Bredt DS (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 74:219-245.
5. Bassand P, Bernard A, Rafiki A, Gayet D, & Khrestchatisky M (1999) Differential interaction of the tSXV motifs of the NR1 and NR2A NMDA receptor subunits with PSD-95 and SAP97. *Eur J Neurosci* 11(6):2031-2043.
6. Kim E & Sheng M (1996) Differential K+ channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases. *Neuropharmacology* 35(7):993-1000.
7. Margittai M*, 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.
8. Rasnik I, Myong S, Cheng W, Lohman TM, & Ha T (2004) DNA-binding Orientation and Domain Conformation of the E. coli Rep Helicase Monomer Bound to a Partial Duplex Junction: Single-molecule Studies of Fluorescently Labeled Enzymes. *Journal of Molecular Biology* 336(2):395-408.
9. Mekler V*, et al.* (2002) Structural Organization of Bacterial RNA Polymerase Holoenzyme and the RNA Polymerase-Promoter Open Complex. *Cell* 108(5):599-614.
10. Choi UB*, et al.* (2010) Single-molecule FRET-derived model of the synaptotagmin 1-SNARE fusion complex. *Nat Struct Mol Biol* 17(3):318-324.
11. Sainlos M*, et al.* (2011) Biomimetic divalent ligands for the acute disruption of synaptic AMPAR stabilization. *Nat Chem Biol* 7(2):81-91.
12. Gopich IV & Szabo A (2007) Single-Molecule FRET with Diffusion and Conformational Dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B* 111(44):12925-12932.
13. McCann JJ, Choi UB, Zheng L, Weninger K, & Bowen ME (2010) Optimizing methods to recover absolute FRET efficiency from immobilized single molecules. *Biophys J* 99(3):961-970.
14. Choi UB, McCann JJ, Weninger KR, & Bowen ME (2011) Beyond the random coil: stochastic conformational switching in intrinsically disordered proteins. *Structure* 19(4):566-576.
15. Dyson HJ & Wright PE (2004) Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* 104(8):3607-3622.

16. McGee AW*, et al.* (2001) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell* 8(6):1291-1301.
17. Tavares GA, Panepucci EH, & Brunger AT (2001) Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell* 8(6):1313-1325.
18. Zhang J, Petit CM, King DS, & Lee AL (2011) Phosphorylation of a PDZ domain extension modulates binding affinity and interdomain interactions in the PSD-95 MAGUK. *J Biol Chem*.
19. Muschielok A*, et al.* (2008) A nano-positioning system for macromolecular structural analysis. *Nat Meth* 5(11):965-971.
20. Schröder GF & Grubmüller H (2004) FRETsg: Biomolecular structure model building from multiple FRET experiments. *Computer Physics Communications* 158(3):150-157.
21. Woźniak AK, Schröder GF, Grubmüller H, Seidel CAM, & Oesterhelt F (2008) Single-molecule FRET measures bends and kinks in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(47):18337-18342.
22. Vrljic M*, et al.* (2010) Molecular mechanism of the synaptotagmin-SNARE interaction in Ca2+-triggered vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 17(3):325-331.
23. Pan L, Chen J, Yu J, Yu H, & Zhang M (2011) The Structure of the PDZ3-SH3-GuK Tandem of ZO-1 Protein Suggests a Supramodular Organization of the Membrane-associated Guanylate Kinase (MAGUK) Family Scaffold Protein Core. *Journal of Biological Chemistry* 286(46):40069-40074.
24. Knight JL, Mekler V, Mukhopadhyay J, Ebright RH, & Levy RM (2005) Distance-Restrained Docking of Rifampicin and Rifamycin SV to RNA Polymerase Using Systematic FRET Measurements: Developing Benchmarks of Model Quality and Reliability. *Biophysical Journal* 88(2):925-938.
25. Fomina S*, et al.* (2011) Self-directed assembly and clustering of the cytoplasmic domains of inwardly rectifying Kir2.1 potassium channels on association with PSD-95. *Biochim Biophys Acta* 1808(10):2374-2389.
26. Nakagawa T*, et al.* (2004) Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions. *Neuron* 44(3):453-467.
27. Sisamakis E, Valeri A, Kalinin S, Rothwell PJ, & Seidel CAM (2010) Chapter 18 - Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection. *Methods in Enzymology*, ed Nils GW (Academic Press), Vol Volume 475, pp 455-514.
28. Kalinin S, Valeri A, Antonik M, Felekyan S, & Seidel CAM (2010) Detection of Structural Dynamics by FRET: A Photon Distribution and Fluorescence Lifetime Analysis of Systems with Multiple States. *The Journal of Physical Chemistry B* 114(23):7983-7995.
29. Kudryavtsev V*, et al.* (2012) Combining MFD and PIE for Accurate Single-Pair Förster Resonance Energy Transfer Measurements. *ChemPhysChem* 13(4):1060-1078.
30. Henzler-Wildman K & Kern D (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature* 450(7172):964-972.

31. Uversky VN, Oldfield CJ, & Dunker AK (2005) Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J Mol Recognit* 18(5):343-384.
32. Gerber HP*, et al.* (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263(5148):808-811.
33. Imamura F, Maeda S, Doi T, & Fujiyoshi Y (2002) Ligand binding of the second PDZ domain regulates clustering of PSD-95 with the Kv1.4 potassium channel. *J Biol Chem* 277(5):3640-3646.
34. Qian Y & Prehoda KE (2006) Interdomain interactions in the tumor suppressor discs large regulate binding to the synaptic protein GukHolder. *J Biol Chem* 281(47):35757-35763.
35. Wu H*, et al.* (2000) Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *EMBO J* 19(21):5740-5751.
36. Chen X*, et al.* (2008) Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11):4453-4458.
37. Chen X*, et al.* (2011) PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *J Neurosci* 31(17):6329-6338.
38. McCann JJ, Zheng L, Chiantia S, & Bowen ME (2011) Domain orientation in the N-Terminal PDZ tandem from PSD-95 is maintained in the full-length protein. *Structure* 19(6):810-820.
39. McGee AW & Bredt DS (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem* 274(25):17431-17436.
40. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, & Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 4(3):435-447.
41. Brunger AT*, et al.* (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 5):905-921.
42. Brunger AT, Strop P, Vrljic M, Chu S, & Weninger KR (2010) Three-dimensional molecular modeling with single molecule FRET. *J Struct Biol*.

Supporting Information for "The Dynamic Quaternary Structure of the Synaptic MAGuK Scaffold Proteins is Conserved" by McCann, Zheng, Rohrbeck, Felekyan, Kühnemuth, Sutton, Seidel and Bowen

Supporting Methods

Protein Expression and Purification and Labeling

Full-length PSD-95 was cloned into pet28a (Novagen, Madison, WI). Fragments of PSD-95 were subcloned into the pPROEX vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). SAP97 (β isoform, residues 66-911) and SAP102 ($\propto$ isoform, residues 47-849) were also cloned into pPROEX. The N-terminal L27 domain from SAP97 was removed to prevent multimerization. The full-sequence of all proteins is shown in Fig. S5. All constructs were expressed as 6-His fusion proteins in Rosetta bacteria (Novagen, Madison, WI). The affinity tags were removed with Tobacco Etch Virus (TEV) protease. Proteins were purified by using a mixture of nickel affinity, anion exchange and size exclusion chromatography.

Native cysteine residues in the wild type proteins were mutated to serines and cysteines for labeling were re-introduced at desired locations using the QuikChange Lightning Multi Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Labeling sites were carefully chosen to be surfaced exposed based on available high resolution structures. Mutagenesis and labeling did not affect protein folding as assessed by analytical chromatography. Proteins were labeled in 25 mM Hepes, 300 mM NaCl 0.5 mM TCEP pH 7.4 with an equimolar ratio of Alexa Fluor 555 C_2 Maleimide and Alexa Fluor 647 C_2 maleimide at a 5 fold molar excess over protein. Alexa 555 is the FRET donor (D) while Alexa 647 serves as the FRET acceptor (A). Unreacted dyes were removed by desalting on Sephadex G-50 (GE Healthcare. Piscataway, NJ). Labeling efficiency was using greater than 90% for all proteins assessed by UV-Vis spectroscopy using the manufacturer's extinction coefficients for the dyes and calculated extinction coefficients for the proteins. The random labeling strategy that we employ creates a distribution of doubly-labeled species (AA, AD, DA, DD). The homo-labeled species are easily resolved in the smFRET analysis and excluded from the histograms. The two hetero-labeled species are treated equally and assumed to be equivalent.

Fluorescence Microscopy

Quartz slides (G. Finkenbeiner, Waltham, MA) were cleaned by sequential sonication in detergent, acetone, ethanol and potassium hydroxide. Slides were coated with biotinylated Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) followed by streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Labeled samples were diluted sufficient to capture 200-400 molecules per field of view, typically picomolar. Samples were probed

with Alternating Laser Excitation to confirm the presence of a single donor dye and a single acceptor dye within a diffraction limited spot. Donor excitation used a circularly polarized, 20 mW diode-pumped 532 nm continuous wave laser, while acceptor excitation used a 25 mW laser diode at 633 nm (Newport Corporation, Irvine, CA). Mechanical shutters (Uniblitz, Rochester, NY) were used to alternate the laser excitation. For data collection, the laser power was typically ~7.5 mW. Donor and acceptor images were split using an Optosplit Image Splitter (Cairn Research Ltd, Faversham, UK) equipped with a 645 nm dcxr dichroic mirror (Chroma Technology, Bellows Falls, VT), a 585/70 bandpass filter (Chroma) and a 670/30 bandpass filter (Semrock, Rochester, NY).

Data Analysis

Data collection and processing was done as described previously (1, 2). Single molecules were identified based on acceptor fluorescence using a 10 frame average image. Single molecules were selected as pixels with intensity values 7 fold higher than the background fluorescence that are also the local maxima within a 3 x 3 pixel window and separated by 5 or more pixels from any neighboring maxima. Local background fluorescence is determined from the median pixel value within a 32 x 32 pixel window. Local background is calculated separately for each laser phase and subtracted from each frame of the movie.

Donor and acceptor images are mapped on to one another using a normalized 2-D cross-correlation of a separately collected image of immobilized fluorescent beads with a broadband emission spectrum such that each bead has emission in both channels. These initial offset values provide the starting point for an empirical search for the donor dye, as was done with the acceptor, by identifying the local maxima within a 3 x 3 pixel about the initial position derived from the beads. The value for the single molecule intensity is taken as the sum of the four most intense pixels within the 3 by 3 matrix centered on the maxima. The average selected peak appears as a centered, 2D circular Gaussian peak. The location of the empirically-found peak is used to calculate intensity at each frame of the movie.

FRET efficiency (E) is calculated from the background corrected intensities of acceptor (I_A) and donor (I_D) as:

$$E = \frac{I_A}{(I_A - \gamma I_D)} \tag{S1}$$

Direct excitation of acceptor by the 532 nm laser were measured using singly-labeled proteins. γ correction and leakage of donor excitation through the optical filters into the acceptor channel was calculated using a 20 point average intensity of both channels around the hand-select acceptor photobleach point.

Analytical Size Exclusion Chromatography

Purified proteins in 20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM DTT pH 7.5 were run on either a Shodex PROTEIN KW 802.5 (Showa Denko America, Inc., New York, NY) or a Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Piscataway, NJ). The elution profile was monitored by absorbance at 280 nm. The columns were calibrated using globular protein standards of known molecular weight ranging from 1.35 kDa to 670 kDa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). This generated a standard curve of normalized elution time versus molecular weight (Fig 1B), which was used to calculate the apparent molecular weight (i.e. the mass of a compactly-folded protein with same R_h) for the unknown samples. To normalize the elution time (V_e), we divided by the void volume of the column (V_0) as (V_e/V_0). The actual molecular weights for PSD-95 and the truncation constructs were taken from their chemical formula weights.

Ensemble Fluorescence Measurements

Donor quantum yield and fluorescence anisotropy were measured for each FRET construct by doubly-labeling full-length PSD-95 with Alexa Fluor 555 C_2 Maleimide followed by desalting with Sephadex G-50 (GE Healthcare) to remove unreacted dye. Fluorescent emission spectra were collected using an ISS PC1 photon counting spectorofluorimeter (ISS Inc., Champaign, IL). The average quantum yield for both site was measured relative to free Alexa 555 (QY=0.1), which was calibrated using relative to Rhodamine 101 in ethanol and Cresyl Violet in methanol (1). The steady state anisotropy was measured relative to free Alexa 555 (0.22) with Glanz Thompson polarizers in the L format.

Single Molecule Multi-Parameter Fluorescence Detection (MFD) Experiments

One-color pulsed excitation MFD for single molecule measurements was performed by using a confocal epi-illuminated microscope (IX 70, Olympus). The excitation of the sample was effected by a pulsed linearly polarized argon-ion laser at 496 nm laser (Sabre®, Coherent) and 40 µW power at objective. The laser was focused into the sample droplet (sample concentration ~ 100 pM) with an Olympus 60x 1.2 NA water immersion objective. The emitted fluorescence signal was collected by the same objective. Laser beam diameter and a pinhole in the detection path provided a detection volume of about 2 fl. Beam splitters divided the fluorescence light into parallel and perpendicular components and into two different spectral regions (“green” and “red”). After passing through band pass filters (HQ 533/46 for green, HQ720/150 for red), the photons were detected by 4 single photon avalanche photodiodes (SPCMAQR-14, Laser Components, Germany, for the red channels, and PDM050CTC, MPD, Italy, for the green channels). Detector outputs were registered by SPC 132 counting boards (Becker & Hickel, Berlin). For each photon the arrival time after the laser pulse, the time since the last photon and the number of the detector at which the photon was registered. Two-color excitation pulsed-interleaved excitation (PIE) was performed by

using a confocal epi-illuminated microscope (IX 71, Olympus). The excitation of the sample was effected by two pulsed linearly polarized fiber coupled diode lasers at 485 and 634 nm (LDH) which were controlled by a multichannel pulsed diode laser driver "Sepia" @ 32 MHz (all laser equipment: Picoquant Berlin, Germany) and 50 µW power at objective. The signal detection was performed with the same equipment as for one color excitation. All measurements were performed in 20 mM TRIS/HCl pH 7.5, 200 µM Trolox and 50 nM unlabeled PSD-95.

2D MFD-Plots: Theoretical F_D/F_A -$\tau_{D(A)}$ dependence in the presence of fast linker dynamics (Fig. 5 A-C, upper panel)

In the case of an elementary F_D/F_A-$\tau_{D(A)}$ relation of a single DA distance the equation is given by:

$$\left(\frac{F_{\mathrm{D}}}{F_{\mathrm{A}}}\right)_{\mathrm{static}} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{\mathrm{FA}}} \cdot \frac{\tau_{\mathrm{D(A)}}}{\tau_{\mathrm{D(0)}} - \tau_{\mathrm{D(A)}}} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{\mathrm{FA}}} \cdot \left(\frac{\tau_{\mathrm{D(0)}}}{\tau_{\mathrm{D(A)}}} - 1\right)^{-1} . \qquad \text{(S2)}$$

Due to R_{DA}-distributions by dye-linker movements deviations from equation S2 are expected. This dynamic averaging results in a multi-exponential fluorescence decay of the donor, so that the FRET indicator F_D/F_A is related to the so called $\langle\tau\rangle_{x,L}$ "species-average lifetime", which results in equation S3:

$$\left(\frac{F_{\mathrm{D}}}{F_{\mathrm{A}}}\right)_{\mathrm{static}} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{\mathrm{FA}}} \cdot \left(\frac{\tau_{\mathrm{D(0)}}}{\langle\tau\rangle_{x,L}} - 1\right)^{-1} \qquad \text{(S3)}$$

In practice, it is impossible to determine $\langle\tau\rangle_{x,L}$ because a fluorescence burst contains several 100 photons with multiple donor lifetimes. Therefore, the maximum likelihood estimator (MLE) was used to receive the "fluorescence-weighted average lifetime $\langle\tau\rangle_f$, which is given by equation S4:

$$\langle\tau\rangle_f = \sum_i f_i \tau_i \qquad \text{with} \qquad f_i = \frac{x_i \tau_i}{\sum_i x_i \tau_i} \qquad \text{(S4)}$$

Since there is no way to describe the analytical relationship between the different averaged lifetimes, empirical polynomials with the coefficients c_i were used to calculate $\langle\tau\rangle_{x,L}$ as a function of the experimentally accessible $\langle\tau\rangle_f$:

$$\langle\tau\rangle_{x,L} = \sum_{i=0}^{n} c_i \left(\langle\tau\rangle_f\right)^i \qquad \text{(S5)}$$

The coefficients were obtained from simulations, taking into account a specified linker length. For the dynamic FRET indicator F_D/F_A one can derive:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \frac{\tau_1\tau_2}{\tau_{D(0)}[\tau_1+\tau_2-\langle\tau\rangle_f]-\tau_1\tau_2} \quad \text{(S6a)}$$

τ_1 and τ_2: lifetimes of two FRET species. If linker movement needs to be included the corrected dynamic FRET indicator F_D/F_A can formally be described equivalently by replacing $\langle\tau\rangle_f$ with a polynomial $\langle\tau\rangle_{d,L} = \sum_{i=0}^{n} c_i \left(\langle\tau\rangle_f\right)^i$:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn} = \frac{\Phi_{FD(0)}}{\Phi_{FA}} \frac{\tau_1\tau_2}{\tau_{D(0)}[\tau_1+\tau_2-\langle\tau\rangle_{d,L}]-\tau_1\tau_2} \quad \text{(S6b)}$$

All parameters needed for Eq. S6b are compiled in Tab. S3.

2D MFD-Plots: Theoretical r-$\tau_{D(A)}$ dependence (Fig. 5 A-C, lower panel)

In the 2D MFD-plot of scatter corrected steady state anisotropy $r_{scatter}$ against the donor fluorescence lifetime in presence of acceptor $\tau_{D(A)}$ the curves (full, dashed, dotted) follow the Perrin equation $r = r_0/(1+\tau/\rho)$ with a fundamental anisotropy r_0 = 0.375. The values for the mean rotational correlation time ρ are shown in the diagrams.

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) (Fig. 5 E)

The model function for the cross-correlation function $G(t_c)$ with the correlation time t_c in Figure 5E is given by

$$G(t_c) = \text{offset} + \frac{1}{N}\cdot\frac{1}{1+\frac{t_c}{t_d}}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{z_0}{\omega_0}\right)^{-2}\frac{t_c}{t_d}}}\cdot\left(1-A\cdot\left(x_1\cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{x1}}\right)}+x_2\cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{x2}}\right)}+(1-x_1-x_2)\cdot e^{-\left(\frac{t_c}{t_{x3}}\right)}\right)\right) \quad \text{(S7)}$$

In Eq. 7 N corresponds to the number of molecules, z_0/ω_0 axial ratio of confocal detection volume element, t_d is the characteristic diffusion time, A is the total amplitude of all anti-correlation terms, x_i is the fractional amplitude and t_{xi} is relaxation time of the individual relaxation term.

Rigid Body Structural Refinement

The fluorescent dyes used in this study are conjugated to reduced cysteine residues by a flexible linker. The efficiency of energy transfer will be dependent on the

distance between dye molecules, which will vary as the dye is allowed to freely rotate. To account for this uncertainty, CNS version 1.3 (2) was used to estimate the average position of each fluorescence dye relative to the protein backbone. As the structures and transition dipole moments for Alexa 555 and Alexa 647 are unpublished, Cy3 and Cy5 were utilized for all docking calculations. For each labeling site, 200 simulations in which PDZ3 (residues 306-402) was positioned away from SH3-GuK domains (residues 430-724) were performed in which the fluorescent dye was allowed to freely rotate relative to the fixed domain structure (3-6). The mean position of the center of mass of each dye was used to apply smFRET-derived distance restraints, calculated from:

$$r = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1\right)^{1/6} \quad \text{(S8)}$$

where R_0 the Förster radius and E is the measured mean FRET efficiency. The Förster radius for each sample was calculated based upon the measured fluorescence quantum yield (Table S1) and published values for the spectral overlap and donor quantum yield. κ^2 was assumed to be 2/3 based upon the isotropic distribution of dye positions at each labeling site. The average calculated Förster radius was 57.16 ± 1.39 Å. The uncertainty in each FRET restraint was modeled as harmonic square well potentials, with value closer to R_0 having less uncertainty (7). In addition to a repulsive term for non-bonded interactions and unfavorable torsion angles, an exponential penalty for deviations from smFRET distance restraints was applied. Neither electrostatic interactions nor solvent effects were included in this simplified modeling. The final exponential FRET penalty for each simulation was used to determine the goodness of fit. Cluster analysis was used to identify similar solutions to the FRET restraints (8). For determination of the loop orientation of the SH3 domain, residues 437-455, 477-484 and 502-520 were allowed to freely sample alternate torsion angles in order to best fit the FRET data, while the rest of the structure (residues 430-720 excluding these loops) was fixed.

Molecular Dynamics Simulations

We modeled residues 503-507 in the SH3-GuK structure (PDB ID: 1KJW (9)) using MODELLER (10). The MODELLER output was then used in molecular dynamics GROMACS 4.5 (11). The AMBER99SB force field (12) was used with the TIP3P water model. Energy was minimized using the conjugate gradient approach, which converged within 52 ps. Simulations were performed in a cubic box of water using boundary conditions at constant temperature and pressure (NPT). Long-range electrostatic forces were computed using the PME technique. The final all-atom simulation of 1KJW involved 4747 protein atoms, 25236 water molecules, 79 Na+ and 73 Cl- ions. The simulation was run for 100 ns in total. Similar results were observed when using other force fields in the simulation.

Uncertainty in the PDZ3-SH3-GuK Modeling

Uncertainty in the relationship between the measured FRET efficiency and calculated distance can arise from two sources: uncertainties in the positioning of the fluorescent dye relative to the protein backbone and uncertainties in the Förster's radius (R_0). To estimate the magnitude of these uncertainties, simulated annealing of the fluorescent dyes was repeated using our best-fit model of the PDZ3-SH3-GuK complex in which the fluorescent dyes and the extended loops of the SH3 domain were allowed to move freely. For each labeling site combination, 1000 simulations were performed (500 for each dye combination) to sample the geometric volume accessible to the fluorescent dye. The root-mean squared distributions for the distances between the two centers of mass for each dye are shown in Table S2. These values reflect the uncertainty for each individual measurement due to the positioning of the dye with respect to the protein backbone. For each simulation, an instantaneous value for κ^2 could be calculated based upon the angles between the transition dipole moments of Cy3 and Cy5 (13) using the following equation:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D cos\theta_A)^2 \quad \text{(S9)}$$

in which θ_T is the angle between the two transition dipole moment and θ_D and θ_A are the angles between dipole moments of the donor and acceptor and the vector connecting the two fluorophores (14). The distribution of κ^2 values was strongly skewed toward values approaching zero (Figure S1I), but the average values for all labeling sites were close to the 2/3 approximation (Table S2). If it is assumed that each dye position and orientation could be maintained for time periods longer than the fluorescence lifetime of the dyes (~ns), the instantaneous κ^2 values would affect the measured FRET efficiency. An effective distance (r_{eff}) between dyes (the distance that would generate the same FRET efficiency is $\kappa^2 = 2/3$) can be calculated using the following equation:

$$r_{eff} = \left(\frac{2}{3}\kappa^2\right)^{1/6} \text{ (14)} \quad \text{(S10)}$$

The RMSD values for effective distances between dyes for each labeling site are shown in Table S2. These values report the uncertainty for each individual measurement due to the uncertainty in dye position and orientation.

Despite the relatively high uncertainties calculated for each individual measurement, the large number of labeling site combinations within the PDZ3-SH3-GuK complex means that the uncertainty of our overall model will be less than the uncertainty of each measurement. To calculate this overall uncertainty, docking simulations upon our best-fit model were performed in which the center of mass of each dye was restrained within a harmonic square well potential equal to the mean uncertainty of each individual measurement (7.7 Å for uncertainties due to dye position

only and 15.1 Å for uncertainties dye to dye position and orientation) (Fig S2D). PDZ3 was allowed to move as a rigid body and the extended loops of SH3 were unrestrained. A family of structures was then generated which reflect configurations which would be indistinguishable based upon the assumed uncertainties (Figure S2E & F). The RMSD of the unrestrained regions was found to be 2.56 Å when the uncertainty of the dye position was accounted for and 3.98 Å when the uncertainty of the dye position and orientation was assumed.

A systematic miscalculation of the Förster's radius (R_0) could alter the distance restraints determined from our mean smFRET efficiencies. R_0 can be empirically calculated based upon the following formula:

$$R_0 = \left(\frac{0.162\, Q_0\, \kappa^2 J}{\pi^5 n^4 N_A}\right)^{1/6} \quad \text{(S11)}$$

Where Q_0 is fluorescence quantum yield, κ^2 is the orientation factor, J is the spectral overlap integral, n is the index of refraction and N_A is Avogadro's number. No changes in the fluorescence emission spectrum were observed for any labeling site combination, so any changes in R_0 must arise from changes in either κ^2 or the quantum yield. The mean quantum yield for all labeling sites in PDZ3-SH3-GuK was found to 0.201 $\pm$ 0.029 (Table S1). The mean κ^2 value from our dye simulations was found to be 0.642 $\pm$ 0.099 (Table S2). Using these values an empirical value for R_0 was found to be 56.8 $\pm$ 2.0 Å which agrees with our experimentally determined value of 55.0 Å.

Calculating Distances for Tethered Domains

The root mean squared separation between isotropically rotating domains (R_{RMS}) was calculated based upon an idealized Gaussian polymer calculated using:

$$R_{RMS} = 2 l_p N l \quad \text{(S12)}$$

in which l_p is the persistence length (0.40 for all calculations (15)), N is the number of amino acids and l in the virtual length of an amino acid (0.36 Å for all measurements). The hydrodynamic radius of each tethered domain (calculated from SEC) was added to this value to account for the difference between the linker attachment point and the center of mass of each domain. This distance was converted to FRET efficiency using a Gaussian weighted probability distribution (16).

Supporting References

1. McCann JJ, Choi UB, Zheng L, Weninger K, & Bowen ME (2010) Optimizing methods to recover absolute FRET efficiency from immobilized single molecules. *Biophys J* 99(3):961-970.

2. Brunger AT*, et al.* (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 5):905-921.
3. Doyle DA*, et al.* (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85(7):1067-1076.
4. Tochio H, Hung F, Li M, Bredt DS, & Zhang M (2000) Solution structure and backbone dynamics of the second PDZ domain of postsynaptic density-95. *J Mol Biol* 295(2):225-237.
5. Tavares GA, Panepucci EH, & Brunger AT (2001) Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell* 8(6):1313-1325.
6. Long JF*, et al.* (2003) Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *J Mol Biol* 327(1):203-214.
7. Choi UB*, et al.* (2010) Single-molecule FRET-derived model of the synaptotagmin 1-SNARE fusion complex. *Nat Struct Mol Biol* 17(3):318-324.
8. Vrljic M*, et al.* (2010) Molecular mechanism of the synaptotagmin-SNARE interaction in Ca2+-triggered vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 17(3):325-331.
9. McGee AW & Bredt DS (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem* 274(25):17431-17436.
10. Marti-Renom MA*, et al.* (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:291-325.
11. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, & Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 4(3):435-447.
12. Hornak V*, et al.* (2006) Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65(3):712-725.
13. Iqbal A, Wang L, Thompson KC, Lilley DM, & Norman DG (2008) The structure of cyanine 5 terminally attached to double-stranded DNA: implications for FRET studies. *Biochemistry* 47(30):7857-7862.
14. van der Meer BW (2002) Kappa-squared: from nuisance to new sense. *J Biotechnol* 82(3):181-196.
15. Zhou HX (2004) Polymer models of protein stability, folding, and interactions. *Biochemistry* 43(8):2141-2154.
16. Choi UB, McCann JJ, Weninger KR, & Bowen ME (2011) Beyond the random coil: stochastic conformational switching in intrinsically disordered proteins. *Structure* 19(4):566-576.
17. McGee AW*, et al.* (2001) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell* 8(6):1291-1301.
18. Pan L, Chen J, Yu J, Yu H, & Zhang M (2011) The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 suggests a supramodular organization of the MAGUK family scaffold protein core. *J Biol Chem*.
19. Korkin D*, et al.* (2006) Structural modeling of protein interactions by analogy: application to PSD-95. *PLoS Comput Biol* 2(11):e153.

Supporting Figure Legends

Figure S1: smFRET Experimental Setup and Representative Data

(A) High resolution structures of each of the domains in PSD-95 (3-4, 6, 17). The Protein Databank ID code for each structure is indicated beneath that structure. These structures were used in all subsequent modeling and to select sites that were mutated to cysteine for the purpose of fluorescence labeling. **(B)** Topology diagram of PSD-95 detailing the secondary structural elements in the five folded domains. Arrows represent β-sheets and cylinders represent $\propto$-helices. Yellow stars indicate residues utilized for dye labeling based on their surface exposure in the structures above. The use of multiple labeling sites in each domain allows for more precise structural refinements. For the complete list of pairs of labeling positions used in this study, see Supporting Table 1. Cysteines were introduced in pairs using these sites and labeled with maleimide conjugated fluorescent dyes to make the smFRET measurements. The raw data and analysis for sample 27, which is fluorescently labeled at residues 374 (in PDZ3) and 671 (in GuK), is provided as a representative data set. **(C)** An example trace showing stable intensities of donor (green) and acceptor (red) dyes until photobleaching. The sequence of illuminating lasers is shown above the trace. A 635 nm (red) laser was used to identify molecules containing acceptor dyes and a 532 nm (green) laser was used to measure fluorescence transfer. **(D)** The histogram of the FRET efficiency from the single trace shown in panel A after individual γ normalization. **(E)** The histogram of FRET efficiency for all selected molecules from sample 26. **(G)** Our best-fit model of the PDZ3-SH3-GuK complex is represented as a grey cartoon. The center of mass for dyes tethered to residues 374 (green) and 671 (red) from 2000 simulations are shown as spheres. At each site, dyes were able to freely rotate. For each simulation the **(H)** distance between dyes, **(I)** instantaneous κ^2 value and **(J)** effective dye separation were calculated. Histograms of each of these terms are projected to the right of each graph.

Figure S2: Statistics and Uncertainties of Our PDZ3-SH3-GuK Model

(A) Ten representative structures of our best-fit PDZ3-SH3-GuK complex. Residues that were held fixed are colored blue, while unrestrained regions are colored yellow. PDZ3 adopts an identical position in all ten models, while multiple conformations of the SH3 loops can satisfy our smFRET-derived distance restraints equally well. **(B)** Structural alignment (against the GuK domain) of our best-fit smFRET model of PSD3-SH3-GuK from PSD-95 (blue) and the crustal structure of PDZ3-SH3-GuK from ZO-1 (orange) (18), a similar scaffold protein. The GuK domain of PSD-95 is shown as a grey surface. **(C)** Two models of PDZ3-SH3-GuK from PSD-95 based upon comparative patch analysis (19) (red and pink) aligned against our smFRET mode (blue). Again, the SH3 and GuK domains are shown as a grey surface. **(D)** For each labeling site combination,

the uncertainty (σ) in the positioning of the fluorescent dyes relative to the protein backbone was calculated as the RMSD for the mean dye separation calculated from 2000 simulations of freely rotating dyes (red circles, see Fig. S1H). This value, normalized by the mean separation (R), is plotted against the mean dye separation normalized by the calculated Förster's radius for that sample (R_0). The uncertainty in the effective dye separation after the incorporation of an instantaneous κ^2 term (purple squares, see Fig. S1J) was also calculated for each labeling site combination and plotted against the normalized mean separation. The mean errors for a single measurement based on these two uncertainties were found to be 15.9 ± 5.3% and 38.6 ± 7.4%. **(E)** Ten representative structures in which the mean dye positions for each labeling site were allowed to deviate from our best-fit model by the average value attributed the uncertainty due to the position of the fluorescent dye relative to the protein backbone. Residues that were held fixed are colored blue, while unrestrained regions are colored red The overall RMSD for all models was 2.56 Å. **(F)** Ten representative structures in which the mean dye position for each labeling site were allowed to deviate from our best-fit model by the average value attributed to the uncertainty due to the position and orientation of the dyes. Residues that were held fixed are colored blue, while unrestrained regions are colored purple. The overall RMSD for all models was 3.98 Å.

Figure S3: Domain Organization is Maintained in Truncated Fragments of PSD-95
(A) Histograms of smFRET efficiencies measured between identical labeling sites in SH3 and GuK in both full-length PSD-95 (black) and the SH3-GuK fragment (grey), which is construct I in Fig. 1A. The specific labeling site combination is indicated by the number within the panel (Table S1). **(B)** Histograms of smFRET efficiencies measured between identical labeling sites in PDZ3 and SH3-GuK in both full-length PSD-95 (black) and the PDZ3-SH3-GuK fragment (grey), which is construct H in Fig. 1A. The specific labeling site combination is indicated by the number within the panel (Table S1). (Left column) Measurements between PDZ3 and the SH3 domain. (Right column) Measurements between PDZ3 and the GuK domain. All measurements showed minimal differences in mean FRET or peak shape when measure in truncated fragments compared to the full-length protein.

Figure S4: Extracting Structural Information about the Extended Loops within the SH3 Domain
A structure of SH3 domain, sampled during our rigid body docking, is shown as a white cartoon with the C_α atoms for nine different labeling sites represented as grey spheres and labeled with their residue number. These sites sample different positions within three of the extended loops that were allowed conformation freedom during the refinement (residues 437:455, 477:484 and 502:520). For each loop, measurements were made between a single site in the GuK domain (either residue 591 or 671, shown as black spheres) and three different labeling positions within the loop. The mean smFRET efficiencies for each labeling combination are shown next to each labeling site in the SH3 domain and colored according to which loop they are in (Measurements made to residues 438, 445 and 455 within the loop region 437:455 are colored red.

Residues 482, 484 and 477 within the loop region 477:484 are colored cyan, and residues 492, 510 and 519 within the loop region 502:520 are colored green). Differences in mean smFRET efficiency were observed for all loop combinations. These differences represent structural information about the position and orientations of the SH3 loops with respect to the GuK domain. The positioning of residues 591 and 671 are not the best-fit positions founds in our model and only serve as an illustration.

Figure S5: Sequence Alignment for MAGuK Proteins
The amino acid sequences of PSD-95, SAP97 and SAP102 are aligned based upon sequence homology. Residues are color coded based upon the degree of conservation. 100% conserved residues are black, 50% conserved residues are grey and non-conserved residues are white. Colored boxes identical the well-folded domain regions: PDZ1 (cyan), PDZ2 (green), PDZ3 (orange), SH3 (red) and GuK (purple). Yellow stars indicate surface-exposed residues used in fluorescent labeling.

Supporting Table Legends

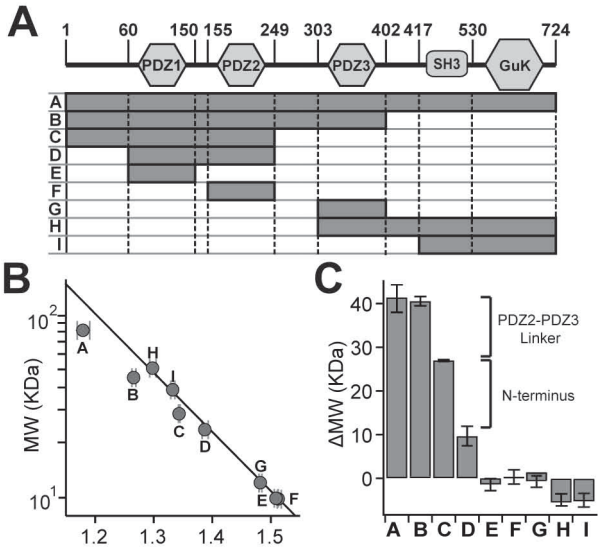
Table S1: Fluorescence Measurements All Labeling Site Combinations in PSD-95
The labeling positions, mean smFRET efficiencies, peak width from Gaussian fits, γ correction values, the number of molecules (N.O.M), ensemble quantum yields and steady-state anisotropies for all double cysteine PSD-95 constructs used for smFRET measurements. All measurements made between the same pair of domains are numbered by increasing mean smFRET efficiencies. * indicates labeling sites in which the width of smFRET histograms was greater than 0.2 and/or showed a deviation from a Gaussian peak shape.

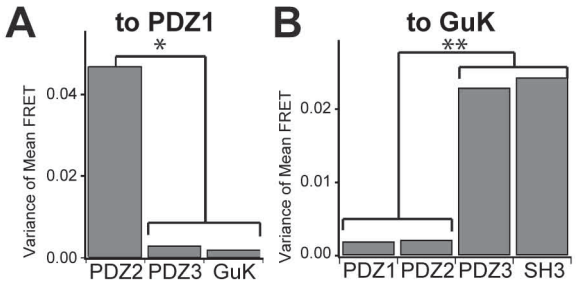
Table S2: Best-Fit Model of the PDZ3-SH3-GuK complex
smFRET derived distance restraints and the calculated distances for our best-fit model along with the calculated values for κ^2 and the uncertainties due to dye position and orientation are shown for all measurements made between PDZ3, SH3 and GuK domains. Residual values refer to the unresolved differences between these smFRET derived distance restraints and the calculated distances. The numbering here is the same as in Table S1.

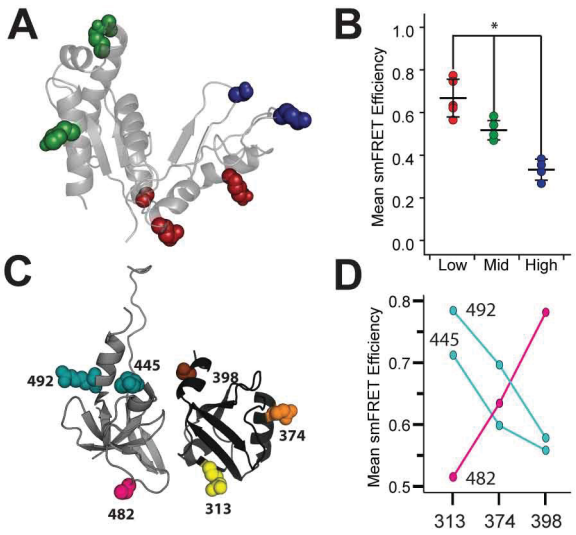
Table S3: Coefficients of polynomials to describe state and dynamic FRET lines
The fluorescence lifetimes of donor-only samples ($\tau_{D(0)}$), fluorescence quantum yields of the donor ($\Phi_{D(0)}$) and acceptor (Φ_F) and polynomial coefficients (c_0,c_1,c_2 and c_3) needed to fit the fluorescence-weighted average lifetime (see equation S5) and generate the static and dynamic FRET lines for each PSD-95 sample found in Figure 5.

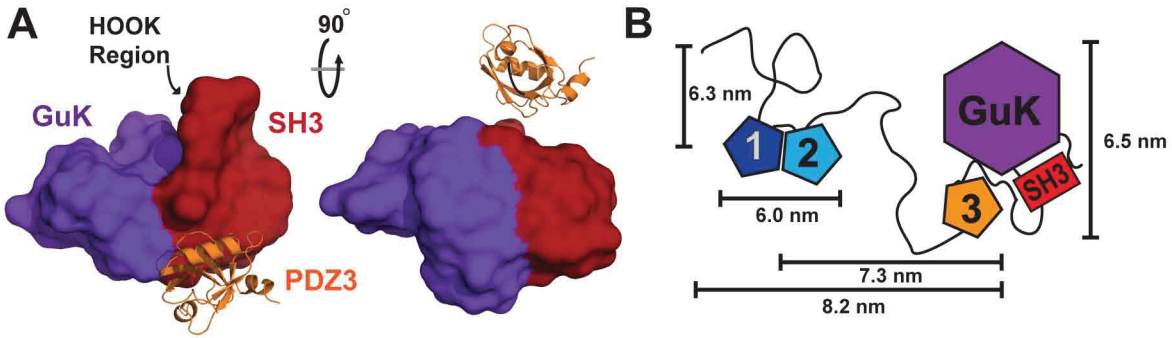
Table S4: Mean smFRET Efficiencies for Homologous Measurements in PSD-95, SAP97 and SAP102
The mean smFRET efficiencies and peak widths from Gaussian fits for homologous measurements between PDZ1 and PDZ2, either PDZ1 or PDZ2 and PDZ3, as well as

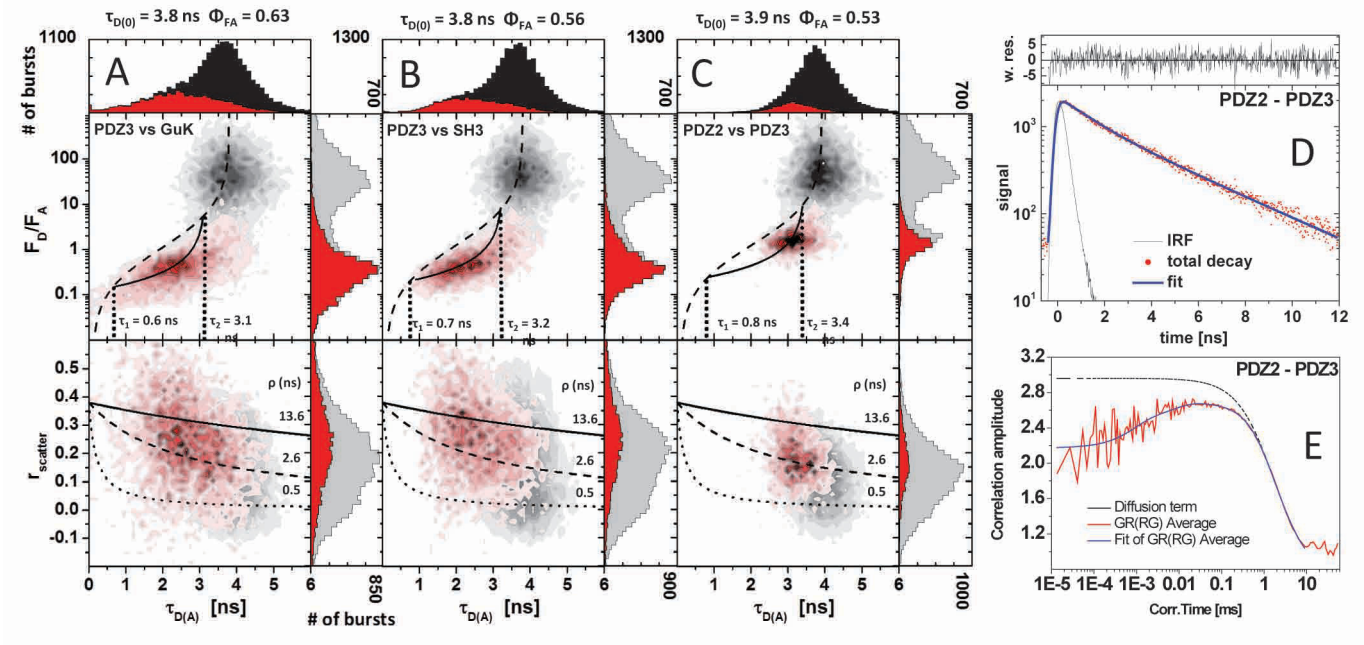
between PDZ3 and GuK in PSD-95, SAP97 and SAP102 are shown. The labeling site combinations in PSD-95 are indicated. For the homologous labeling positions in SAP97 and SAP102 refer to Fig. S5.

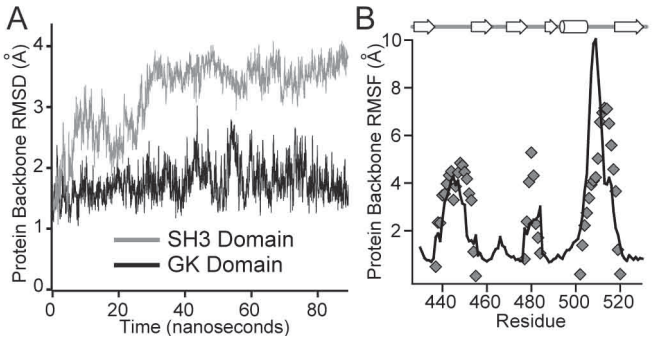

A
1
60
150
155
249
303
402
417
530
724
PDZ1
PDZ2
PDZ3
SH3
GuK
A
B
C
D
E
F
G
H
I
B
MW (KDa)
10^2
10^1
1.2
1.3
1.4
1.5
C
ΔMW (KDa)
40
30
20
10
0
PDZ2-PDZ3
Linker
N-terminus
A B C D E F G H I

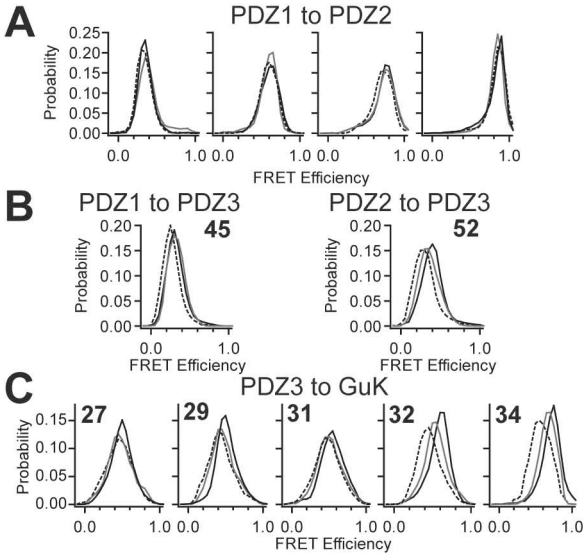

A
to PDZ1
*
Variance of Mean FRET
0.04
0.02
0.00
PDZ2
PDZ3
GuK
B
to GuK
**
Variance of Mean FRET
0.02
0.01
0.00
PDZ1
PDZ2
PDZ3
SH3


A
B
Mean smFRET Efficiency
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Low
Mid
High
C
492
445
398
374
482
313
D
Mean smFRET Efficiency
0.8
0.7
0.6
0.5
492
445
482
313
374
398


A
HOOK
Region
90°
GuK
SH3
PDZ3
B
6.3 nm
1
2
6.0 nm
GuK
3
SH3
6.5 nm
7.3 nm
8.2 nm


τD(0) = 3.8 ns ΦFA = 0.63
τD(0) = 3.8 ns ΦFA = 0.56
τD(0) = 3.9 ns ΦFA = 0.53
A
B
C
PDZ3 vs GuK
PDZ3 vs SH3
PDZ2 vs PDZ3
# of bursts
FD/FA
rscatter
τ1 = 0.6 ns
τ2 = 3.1 ns
τ1 = 0.7 ns
τ2 = 3.2 ns
τ1 = 0.8 ns
τ2 = 3.4 ns
ρ (ns)
13.6
2.6
0.5
τD(A) [ns]
w. res.
PDZ2 - PDZ3
D
signal
IRF
total decay
fit
time [ns]
E
Correlation amplitude
Diffusion term
GR(RG) Average
Fit of GR(RG) Average
Corr.Time [ms]


A
Protein Backbone RMSD (Å)
0
1
2
3
4
0
20
40
60
80
Time (nanoseconds)
SH3 Domain
GK Domain
B
Protein Backbone RMSF (Å)
2
4
6
8
10
440
460
480
500
520
Residue


A
PDZ1 to PDZ2
Probability
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.0
1.0
FRET Efficiency
B
PDZ1 to PDZ3
45
PDZ2 to PDZ3
52
C
PDZ3 to GuK
27
29
31
32
34

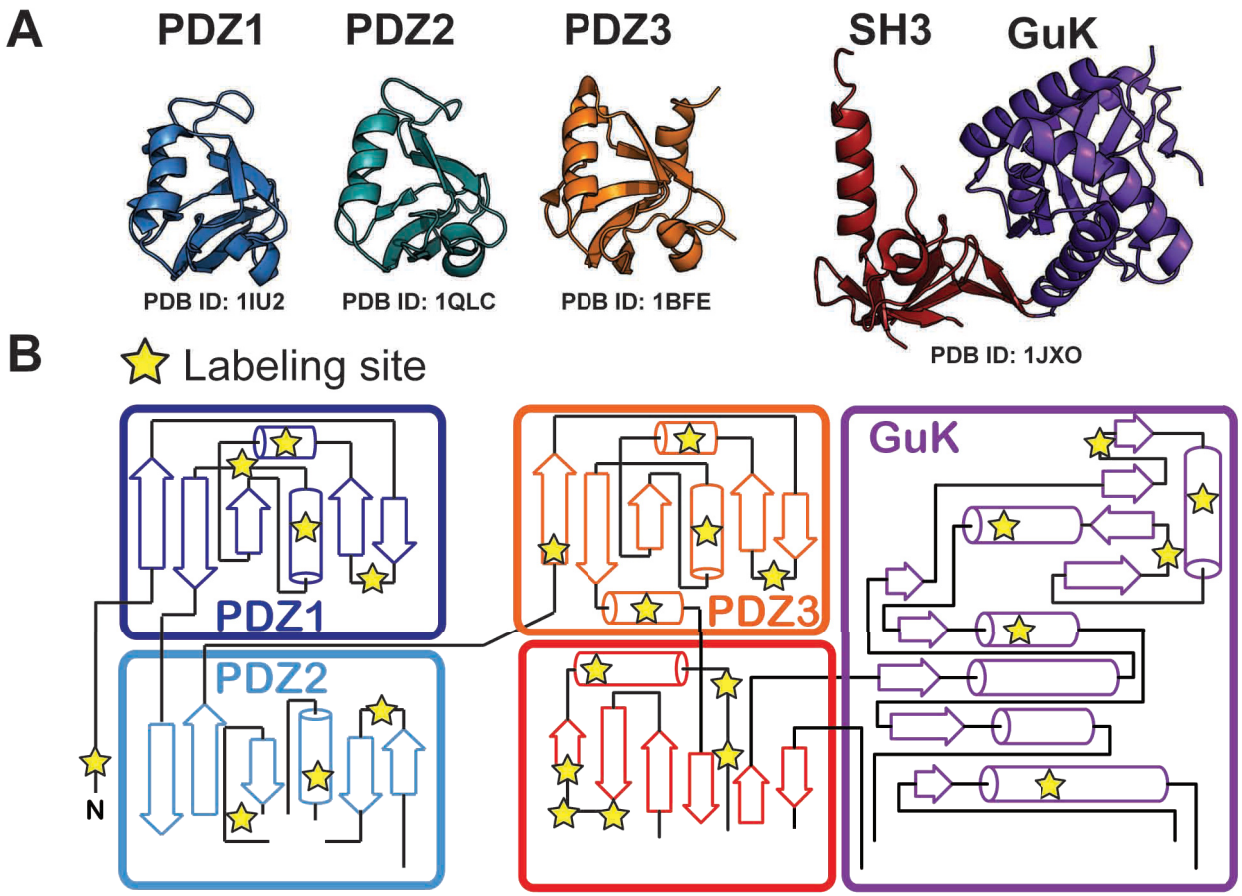

A
PDZ1
PDZ2
PDZ3
SH3
GuK
PDB ID: 1IU2
PDB ID: 1QLC
PDB ID: 1BFE
PDB ID: 1JXO
B
Labeling site
PDZ1
PDZ2
PDZ3
GuK
N

Figure S1

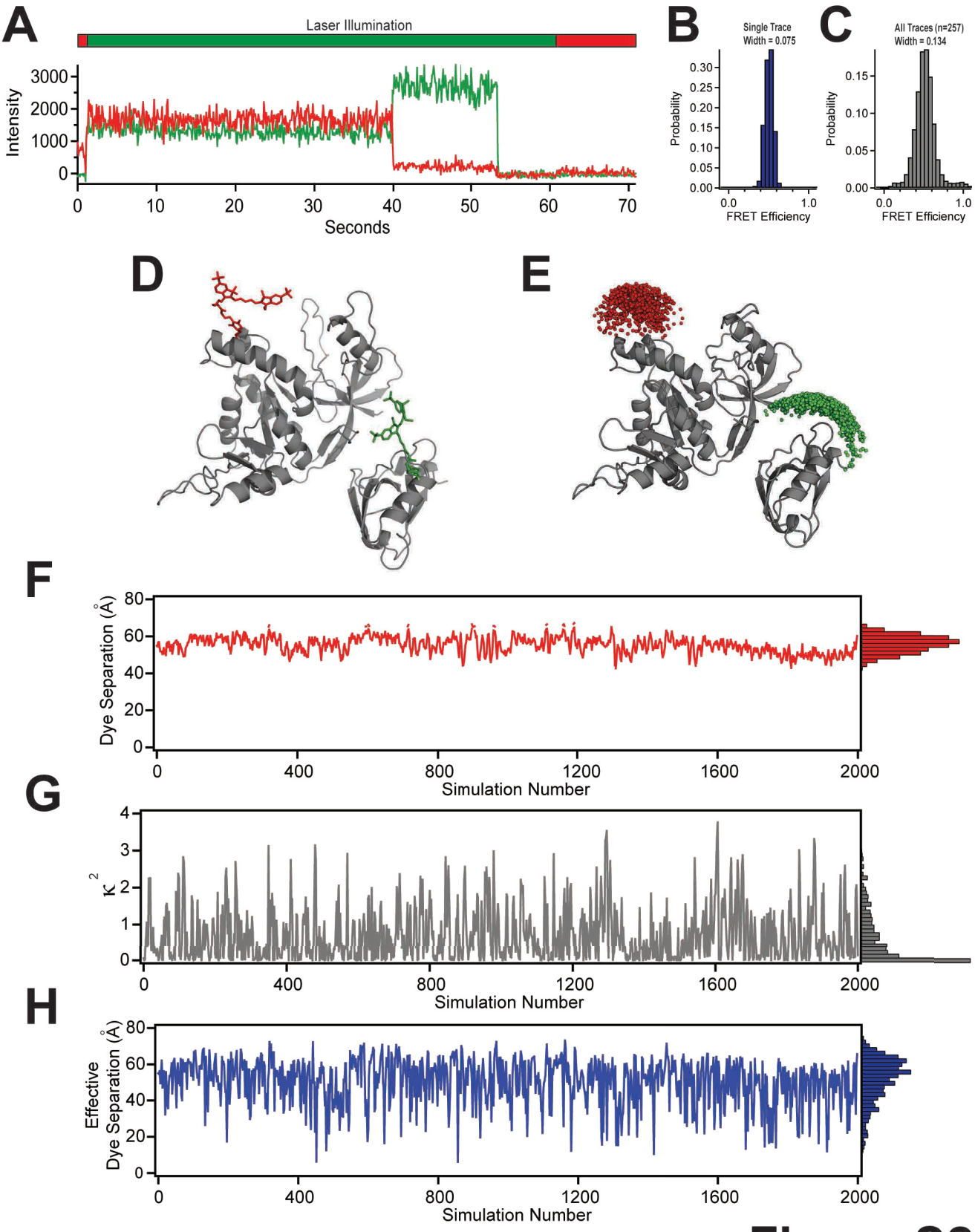

A
Laser Illumination
Intensity
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Seconds
B
Single Trace
Width = 0.075
Probability
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.0
1.0
FRET Efficiency
C
All Traces (n=257)
Width = 0.134
Probability
0.15
0.10
0.05
0.00
0.0
1.0
FRET Efficiency
D
E
F
Dye Separation (Å)
80
60
40
20
0
0
400
800
1200
1600
2000
Simulation Number
G
κ²
4
3
2
1
0
0
400
800
1200
1600
2000
Simulation Number
H
Effective
Dye Separation (Å)
80
60
40
20
0
0
400
800
1200
1600
2000
Simulation Number

Figure S2

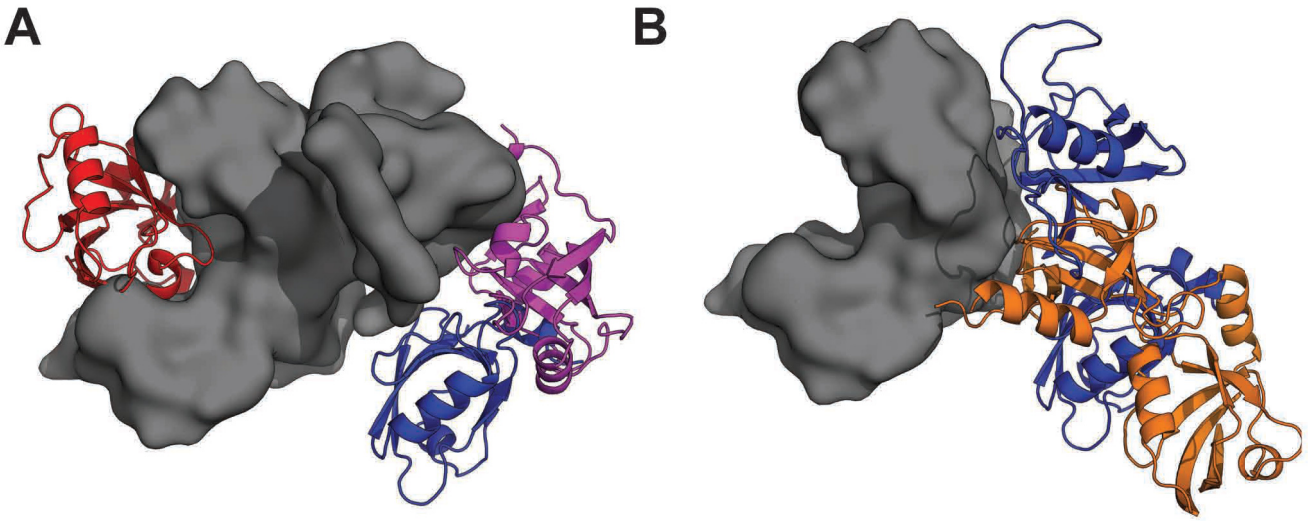


Figure S3

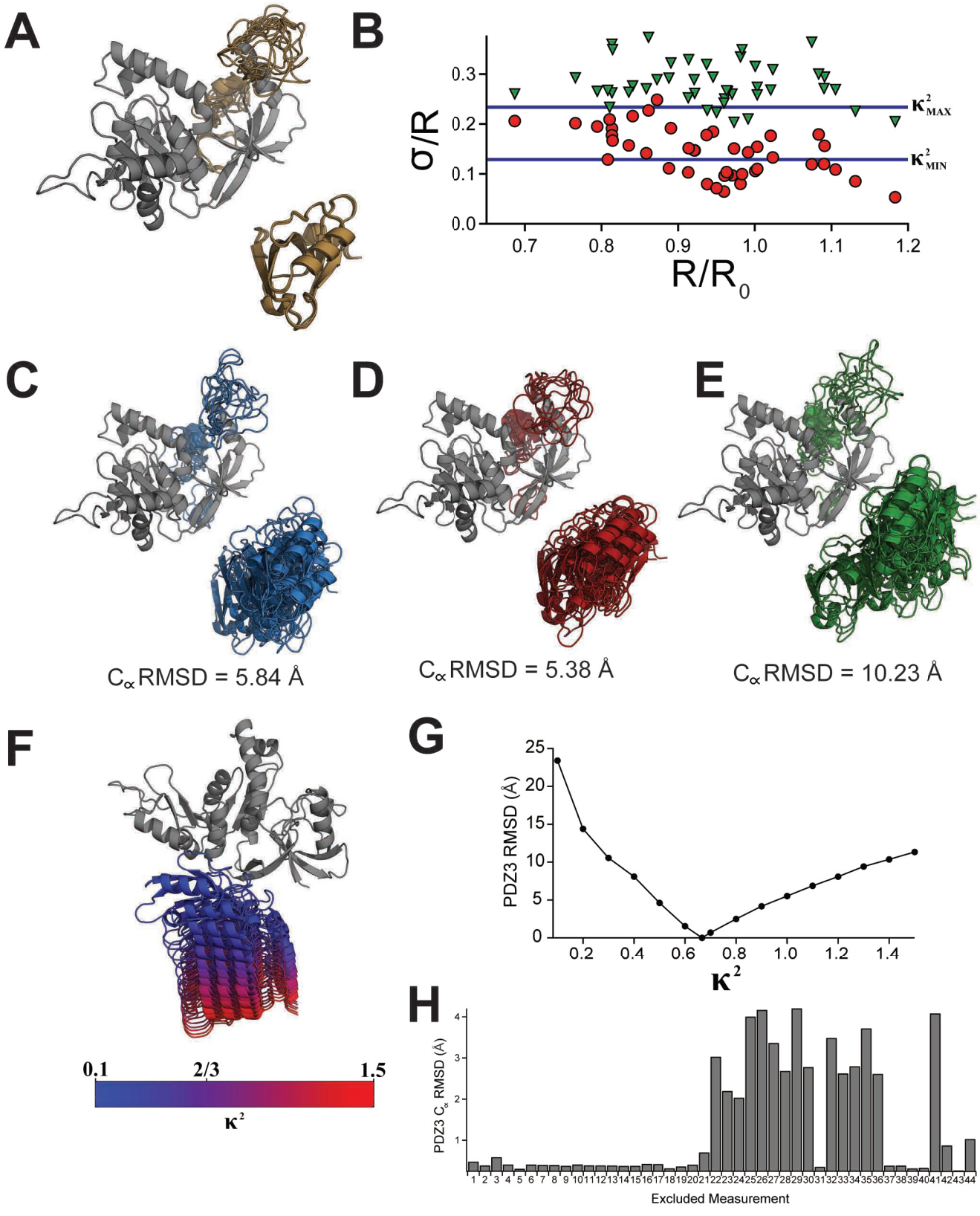

A
B
σ/R
R/R0
κ²MAX
κ²MIN
C
Cα RMSD = 5.84 Å
D
Cα RMSD = 5.38 Å
E
Cα RMSD = 10.23 Å
F
0.1
2/3
1.5
κ²
G
PDZ3 RMSD (Å)
κ²
H
PDZ3 Cα RMSD (Å)
Excluded Measurement

Figure S4

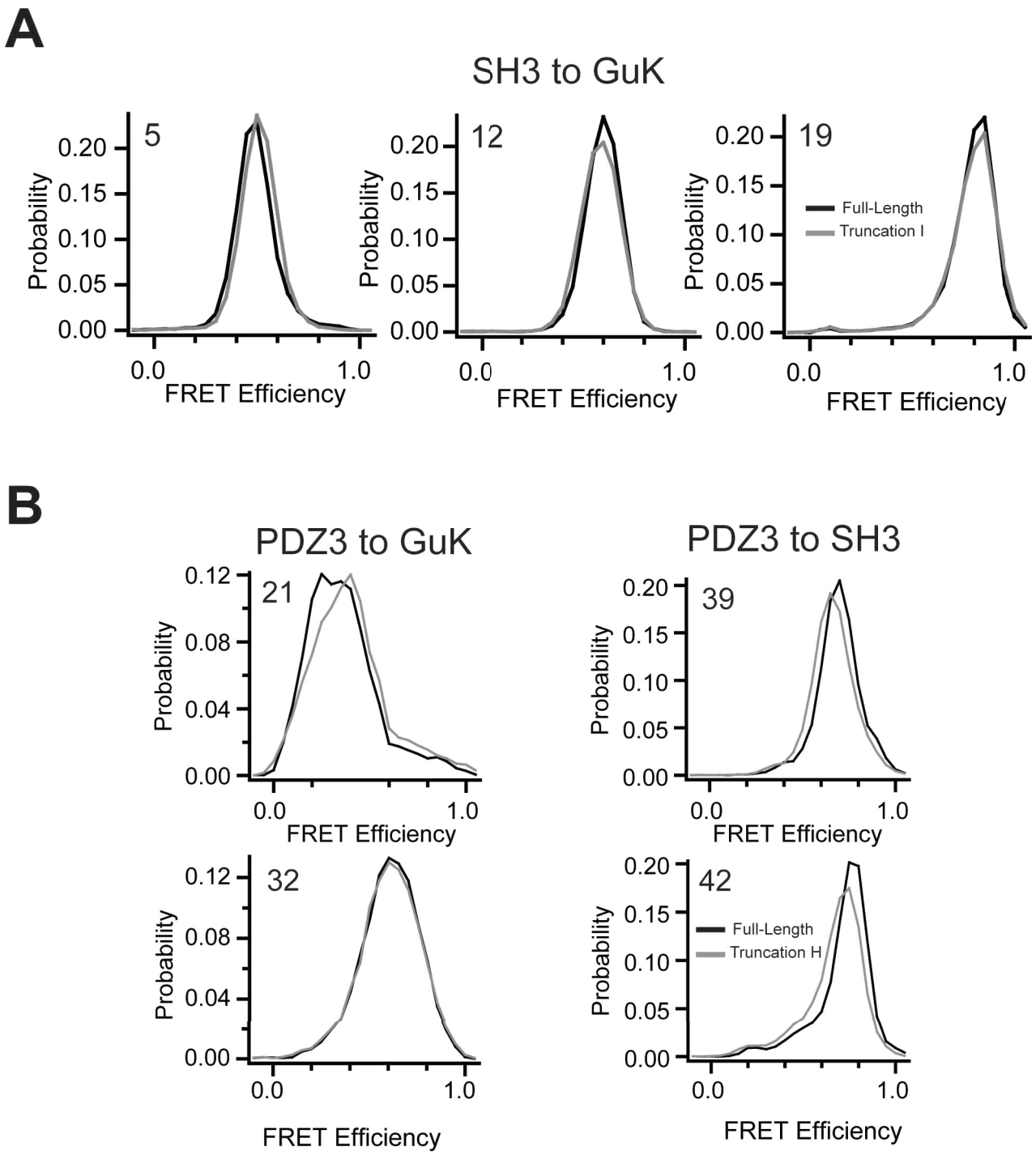

A
SH3 to GuK
5
12
19
Probability
FRET Efficiency
Full-Length
Truncation I
B
PDZ3 to GuK
PDZ3 to SH3
21
39
32
42
Full-Length
Truncation H

Figure S5

Number	1st Site	2nd Site	Mean FRET	Peak Width	smFRET Gamma	N.O.M	Donor QY	Steady State Anisotropy
				SH3:GuK smFRET Measurements				
1	445	606	0.372	0.113	0.931	366	0.17	0.27
2	445	591	0.373	0.106	1.121	287	0.19	0.27
3	482	606	0.394	0.139	1.141	202	0.18	0.28
4	484	591	0.465	0.122	1.118	404	0.22	0.27
5	482	591	0.499	0.112	1.233	250	0.23	0.26
6	445	621	0.528	0.121	1.031	273	0.20	0.26
7	438	591	0.545	0.131	1.117	198	0.18	0.28
8	438	606	0.554	0.128	0.981	308	0.18	0.28
9	492	702	0.560	0.117	1.428	251	0.25	0.29
10	455	591	0.561	0.133	1.187	246	0.22	0.26
11	455	606	0.595	0.151	0.873	283	0.18	0.27
12	519	702	0.620	0.135	1.380	232	0.26	0.30
13	510	591	0.667	0.146	1.167	267	0.16	0.25
14	477	591	0.671	0.137	1.085	282	0.19	0.28
15	492	671	0.714	0.145	0.873	235	0.16	0.28
16	445	671	0.739	0.111	1.394	219	0.17	0.25
17	519	671	0.775	0.163	1.452	177	0.20	0.27
18	482	621	0.775	0.118	1.132	231	0.19	0.26
19	445	702	0.799	0.115	1.407	222	0.25	0.28
20	510	671	0.832	0.116	1.462	188	0.16	0.26
21	482	702	0.905	0.123	1.251	194	0.16	0.28
				PDZ3:GuK smFRET Measurements				
22	313	606	0.267	0.179	1.140	228	0.20	0.26
22 *	332	606	0.323	0.206	1.031	194	0.22	0.25
24 *	374	572	0.354	0.243	1.001	212	0.17	0.25
25 *	349	606	0.382	0.252	1.022	203	0.18	0.26
26	349	702	0.469	0.157	1.043	269	0.25	0.27
27	374	671	0.495	0.134	0.943	257	0.22	0.28
28	374	702	0.495	0.169	1.294	447	0.24	0.26
29	374	591	0.525	0.183	0.771	604	0.18	0.25
30 *	398	671	0.541	0.212	1.270	235	0.23	0.27
31 *	398	702	0.583	0.214	1.345	433	0.24	0.25
32	374	621	0.621	0.159	0.998	208	0.19	0.25
33 *	398	640	0.633	0.205	1.326	244	0.25	0.27
34	398	621	0.746	0.140	0.956	200	0.23	0.27
35	398	591	0.774	0.113	1.338	364	0.19	0.24
				PDZ3:SH3 smFRET Measurements				
36	398	482	0.513	0.137	0.728	243	0.17	0.24
37 *	313	445	0.556	0.210	1.022	299	0.20	0.26
38	313	492	0.576	0.157	1.182	271	0.18	0.28
39	374	445	0.596	0.170	1.029	303	0.16	0.28
40	374	482	0.632	0.111	1.111	241	0.23	0.27
41	374	492	0.694	0.180	1.066	255	0.20	0.27
42	398	445	0.710	0.126	1.064	301	0.20	0.29
43	313	482	0.779	0.110	1.102	661	0.20	0.24
44	398	492	0.782	0.147	1.429	213	0.17	0.25
				PDZ1:PDZ3 smFRET Measurements				
45	135	374	0.316	0.142	0.966	302	0.21	0.28
46	142	313	0.328	0.126	1.259	289	0.21	0.27
47	142	398	0.332	0.130	1.181	194	0.17	0.28
48	107	313	0.370	0.140	1.164	276	0.18	0.27
49	107	398	0.372	0.131	0.917	189	0.20	0.27
50	91	313	0.464	0.169	0.787	262	0.28	0.27
				PDZ2:PDZ3 smFRET Measurements				
51	236	374	0.379	0.143	0.749	592	0.22	0.28
52	230	374	0.405	0.164	0.968	222	0.18	0.27
53	236	398	0.451	0.138	1.023	248	0.19	0.27
54	182	398	0.540	0.184	0.928	267	0.20	0.29
55	202	398	0.557	0.107	0.986	220	0.17	0.28
				PDZ1:SH3 smFRET Measurements				
56	135	445	0.426	0.151	0.991	191	0.15	0.27
				PDZ2:SH3 smFRET Measurements				
57	236	445	0.464	0.148	0.897	187	0.16	0.26
				PDZ1:GuK smFRET Measurements				
58	135	671	0.330	0.183	0.821	288	0.22	0.28
59	135	702	0.383	0.169	0.983	205	0.18	0.26
60	135	591	0.387	0.140	0.986	200	0.19	0.25
61	135	621	0.438	0.151	0.877	315	0.22	0.25
				PDZ2:GuK smFRET Measurements				
62	230	702	0.439	0.150	1.024	221	0.18	0.27
63	230	591	0.482	0.187	0.971	181	0.20	0.26
64	230	621	0.532	0.164	0.892	319	0.18	0.26
				N-Terminus:PDZ3 smFRET Measurements				
65	5	374	0.293	0.151	0.901	223	0.16	0.24

Free Alexa 555							0.10	0.22

Table S1

	1st Site	2nd Site	FRET Distance (Å)	Model Distance (Å)	Residual (Å)	σ due to Dye Motion (Å)	Mean Calculated κ^2	σ due to Instantaneous κ^2 and Dye Motions (Å)
1	445	606	59.9	66.4	6.5	9.5	0.611 ± 0.631	18.1
2	445	591	59.0	60.0	1.0	7.4	0.500 ± 0.536	17.0
3	482	606	60.5	63.0	2.5	7.2	0.672 ± 0.719	22.2
4	484	591	61.5	57.7	-3.8	7.9	0.813 ± 0.772	18.6
5	482	591	57.4	58.8	1.5	6.2	0.586 ± 0.673	18.7
6	445	621	55.3	56.4	1.1	4.5	0.607 ± 0.685	19.0
7	438	591	51.1	51.6	0.5	5.3	0.446 ± 0.443	14.4
8	438	606	52.5	49.3	-3.2	5.4	0.545 ± 0.659	14.6
9	492	702	55.1	52.5	-2.6	5.5	0.540 ± 0.621	14.5
10	455	591	54.5	53.8	-0.8	3.6	0.578 ± 0.489	13.7
11	455	606	50.6	53.6	3.0	4.2	0.519 ± 0.434	12.2
12	519	702	51.7	53.6	1.9	8.1	0.454 ± 0.508	14.6
13	510	591	48.0	46.0	-2.0	9.4	0.580 ± 0.581	16.0
14	477	591	49.7	47.0	-2.7	5.6	0.611 ± 0.636	14.9
15	492	671	46.0	47.3	1.3	6.7	0.563 ± 0.628	13.0
16	445	671	47.0	41.8	-5.2	10.1	0.680 ± 0.736	13.1
17	519	671	48.3	45.7	-2.6	8.9	0.830 ± 0.855	12.4
18	482	621	46.6	49.7	3.1	8.2	0.699 ± 0.729	16.8
19	445	702	47.6	41.8	-5.9	9.2	0.704 ± 0.751	12.7
20	510	671	42.5	42.9	0.4	8.5	0.695 ± 0.724	12.5
21	482	702	37.9	28.6	-9.3	7.8	0.670 ± 0.767	10.0
22	313	606	69.0	50.6	-18.3	3.6	0.744 ± 0.659	14.1
23	332	606	65.6	72.9	7.3	5.6	0.653 ± 0.663	15.1
24	374	572	61.5	71.3	9.9	6.7	0.658 ± 0.701	16.8
25	349	606	60.1	71.7	11.6	10.9	0.614 ± 0.668	18.5
26	349	702	61.2	68.4	7.2	10.7	0.705 ± 0.696	16.5
27	374	671	57.5	65.6	8.1	9.0	0.610 ± 0.784	16.2
28	374	702	57.2	67.3	10.1	6.5	0.543 ± 0.897	15.5
29	374	591	54.1	33.2	-20.9	5.5	0.582 ± 0.732	19.5
30	398	671	56.7	75.1	18.4	8.6	0.646 ± 0.709	11.8
31	398	702	56.8	55.4	-1.4	10.3	0.738 ± 0.834	16.6
32	374	621	54.5	41.5	-12.9	7.7	0.854 ± 0.678	15.3
33	398	640	54.0	43.8	-10.2	5.6	0.651 ± 0.732	13.9
34	398	621	48.7	44.7	-4.0	7.7	0.646 ± 0.709	13.1
35	398	591	47.6	61.4	13.9	7.2	0.792 ± 0.834	16.3
36	398	482	54.5	43.4	-11.2	7.9	0.618 ± 0.678	11.8
37	313	445	54.2	53.7	-0.5	5.7	0.601 ± 0.609	14.9
38	313	492	55.9	50.6	-5.3	3.8	0.872 ± 0.741	12.1
39	374	445	51.0	48.9	-2.1	9.2	0.614 ± 0.656	16.7
40	374	482	53.2	53.6	0.4	8.1	0.639 ± 0.656	17.8
41	374	492	50.6	37.0	-13.5	12.4	0.717 ± 0.766	14.6
42	398	445	49.8	43.6	-6.2	11.2	0.707 ± 0.743	18.6
43	313	482	44.9	48.6	3.7	9.7	0.547 ± 0.614	11.0
44	398	492	43.4	40.8	-2.6	5.8	0.536 ± 0.572	12.2

Table S2

		#34 (PDZ3-GuK)	#44 (PDZ3-SH3)	#53 (PDZ2-PDZ3)
$\tau_{D(0)}$		3.8 ns	3.8 ns	3.9 ns
Φ_{FD}		0.65	0.67	0.72
Φ_{FA}		0.63	0.56	0.53
Static F_D/F_A (R_0 = 52 Å)	c_0	-0.0687	-0.0626	-0.0546
	c_1	0.6923	0.6407	0.5769
	c_2	0.2594	-0.2744	0.2751
	c_3	-0.0457	-0.0462	-0.0418
Dynamic F_D/F_A (R_0 = 52 Å)	c_0	0.6	0.7	0.8
	c_1	3.1	3.2	3.4
	c_2	-1.8037	-1.7933	-2.0343
	c_3	1.5870	1.5646	1.6001
		#34 (PDZ3-GuK)	**#44 (PDZ3-SH3)**	**#53 (PDZ2-PDZ3)**
$r_{\infty,D}$ (Donor-only)		0.177	0.177	0.177
$r_{\infty,A(D)}$		0.088	0.083	0.104
$r_{\infty,A}$ (Acceptor-only with PIE)		0.2	0.2	0.18
Border values: worst cases	κ^2_{MIN}	0.3	0.3	0.32
	κ^2_{MAX}	2.35	2.34	2.34

Table S3