



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

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

**Einzelmoleküluntersuchungen
zur Proteinkomplexbildung
an den Modellsystemen
ESAT-6/CFP-10 des *Mycobacterium tuberculosis*
und
NSP7/NSP8 des *Felinen Coronavirus***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Henning Seidel
geboren in Jena
am 10. September 1980

Lübeck 2013

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karsten Seeger

Tag der mündlichen Prüfung: Lübeck, 09. Januar 2014

Zum Druck genehmigt: Lübeck, 10. Januar 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Photophysik	5
2.1.1	Fluoreszenz	5
2.1.2	Fluoreszenzlöschung	8
2.1.3	FRET - Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	8
2.2	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie	12
2.2.1	Konfokales Prinzip	12
2.2.2	Signal-zu-Rausch-Verhältnis	14
2.2.3	Einzelmolekül-FRET	16
2.2.4	Korrelationsspektroskopie	18
2.3	Spezielle Methoden der Einzelmolekülspektroskopie	21
2.3.1	Korrelationsanalyse	21
2.3.2	FRET-Analyse	23
3	Molekulardynamische Simulation	29
3.1	Grundprinzip	29
3.1.1	Born-Oppenheimer-Näherung	29
3.1.2	Klassische Dynamik	30
3.1.3	Kraftfelder und Potentialfunktionen	31
3.2	Periodische Randbedingungen	33
3.3	Nicht-bindende Wechselwirkungen	33
3.4	Druck und Temperatur	34
4	Material und Methoden	35
4.1	Experimenteller Aufbau	35
4.1.1	Konfokales Mikroskop	35
4.1.2	Messkammer	37
4.1.3	Temperiereinheit	38
4.2	Experimentelle Durchführung	40
4.2.1	Probenpräparation	40
4.2.2	Allgemeine Messparameter	44
4.2.3	Auswerteschema	50
4.3	Molekulardynamische Simulationen	52
4.3.1	Simulation vorbereiten und starten	52
5	Charakterisierung des Messsystems	55
5.1	Laserleistung	55
5.2	Objektiveinstellung	58
5.3	Heizsystem	58

5.4	FRET-Referenzprobe - TetraSpeck-Beads	60
6	Komplexbildung - <i>ESAT-6/CFP-10</i> und <i>sagEsxA</i>	63
6.1	Einleitung	63
6.2	WXG-100-Familie - die Proteinkomplexe <i>ESAT-6/CFP-10</i> und <i>sagEsxA</i>	65
6.3	Zielstellung	66
6.4	Durchführung	68
6.4.1	Intermolekulare FRET-Messungen des Heterodimers <i>ESAT-6/CFP-10</i>	69
6.4.2	Intramolekulare FRET-Messungen des Monomers <i>ESAT-6</i> und des Heterodimers <i>ESAT-6/CFP-10</i>	70
6.4.3	Intermolekulare FRET-Messungen des WXG-100 Analogs - <i>sagEsxA</i>	70
6.5	Ergebnisse	71
6.5.1	Intermolekulare FRET-Messungen des Heterodimers <i>ESAT-6/CFP-10</i>	71
6.5.2	Intramolekulare FRET-Messungen des Monomers <i>ESAT-6</i> und des Heterodimers <i>ESAT-6/CFP-10</i>	85
6.5.3	Intermolekulare FRET-Messungen des WXG-100 Analogs - <i>sagEsxA</i>	92
6.6	Zusammenfassung und Diskussion	95
7	Komplexbildung - nsp7:nsp8	99
7.1	Einleitung	99
7.2	Der nsp7:nsp8 Komplex	101
7.3	Zielstellung	102
7.4	Durchführung	102
7.4.1	Isoliertes Protein - nsp8	103
7.4.2	Komplexbildung - nsp7:nsp8	104
7.5	Ergebnisse - Einzelmolekülmessungen - isoliertes nsp8	105
7.5.1	Isoliertes Protein - nsp8	105
7.5.2	Entfaltungsreihe	110
7.5.3	Dimerisation	112
7.5.4	Interaktion mit RNA	116
7.6	Ergebnisse - Einzelmolekülmessungen - nsp7:nsp8 Komplex	117
7.6.1	Komplexbildung	119
7.6.2	Struktur von nsp8 im Komplex	121
7.6.3	Komplexbildung - Dimer	123
7.6.4	Interaktion mit RNA	124
7.7	Ergebnisse - Röntgenstrukturuntersuchung des nsp7:nsp8 Komplexes	127
7.7.1	Vergleich der Strukturdaten mit den Einzelmolekülmessungen	129
7.8	Ergebnisse - molekulardynamische Simulationen	131
7.8.1	Isoliertes Protein - nsp8	132
7.8.2	Komplex - nsp7:nsp8	137
7.9	Zusammenfassung und Diskussion	150
8	Zusammenfassung	155
	Literaturverzeichnis	158

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

167

1 Einleitung

Die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer wichtigen Säule im Bereich strukturbioologischer Untersuchungen entwickelt. Etablierte Ensemblemethoden, wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie, bieten die Möglichkeit hochaufgelöste dreidimensionale Strukturen von Proteinen darzustellen. Zusammen mit weiteren Methoden, wie zum Beispiel CD-Spektroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung, ermöglichen diese, die Struktur und Funktion von Proteinen im Detail aufzuklären. Jedoch bauen alle diese Ensemblemethoden auf einem Prinzip auf: Die individuellen Eigenschaften der untersuchten Moleküle werden immer über das makroskopisch beobachtete Verhalten des Molekülensembles beschrieben. Informationen über statische oder dynamische Heterogenitäten des Systems gehen dabei verloren [1]. Die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, diese Heterogenitäten aufzulösen. So können zum Beispiel verschiedene statische Konformationen einzelner Proteine oder stöchiometrische Verhältnisse von Protein-Protein-Komplexen detektiert werden. Aber auch dynamische Prozesse, wie Faltungsreaktionen, Bindungsreaktionen mit Substraten oder der Prozess der Proteinkomplexierung, sind durch die Einzelmolekülspektroskopie zugänglich.

Die erste Beobachtung einzelner Moleküle erfolgte bereits 1976 durch Hirschfeld [2], die Detektion einzelner Farbstoffe schließlich 1990 durch Shera et al. [3]. Vor allem die Entwicklung des Lasers in Kombination mit der Konfokalmikroskopie, neue effiziente Detektoren und die Fortschritte in der Rechnertechnik brachten den entscheidenden technischen Durchbruch in der Entwicklung neuer Methoden. Im Bereich biologischer Systeme sind vor allem der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer und die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie von besonderer Relevanz, da diese die Möglichkeit bieten, die Systeme in Lösung und damit unter in-vivo-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen. Die Abbildung einzelner Moleküle wird hier durch die Kombination kleinster Detektionsvolumina und einer geringen Probenkonzentration erreicht [4].

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) erlaubt die Bestimmung von Abständen zwischen Fluorophoren im Bereich von 1 bis 10 nm, weshalb häufig auch die Bezeichnung spektroskopisches Lineal verwendet wird [5, 6]. Die Theorie zum strahlungslosen Energietransfer wurde bereits 1948 von Förster entwickelt [7]. Auf Einzelmolekülebene bietet FRET die Möglichkeit, zeitaufgelöst Abstände und Abstandsänderungen in Biomolekülen zu detektieren, und erlaubt damit einen detaillierten Einblick in den Mechanismus von Faltungsreaktionen [8] und die Detektion heterogener Konformationsverteilungen [9, 10]. Ebenso können Wechselwirkungsprozesse zwischen verschiedenen Bindungspartnern verfolgt werden. Beispiele sind hier DNA-Protein-Bindungsreaktionen oder die Untersuchung von Protein-Protein-Komplexen.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), die in den 70er Jahren von Elson und Magde entwickelt wurde [11, 12], bietet in Kombination mit einem konfokalen Mikroskop die Möglichkeit aus den Fluktuationen des Messsignals das Diffusions-

verhalten einzelner farbstoffmarkierter Moleküle zu untersuchen [13, 14].

Die Kombination von FRET und FCS erlaubt über die Analyse der Fluktuationen des Energietransfers die Untersuchung dynamische Prozesse innerhalb des Moleküls [15].

Essentiell für die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie ist die fluoreszente Markierung der untersuchten Moleküle mit einzelnen Farbstoffen. Durch FRET können zwar Abstände zwischen diesen beiden Farbstoffen bestimmt werden, die Auflösung detaillierter Strukturen ist jedoch nicht möglich. Für die Interpretation der Daten ist eine Kombination mit Strukturdaten der Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie meist unumgänglich. Da FRET zwar Daten zu Dynamik liefert, aber keine Informationen zu detaillierten atomaren Strukturen, ist es notwendig hier eine Verknüpfung zu schaffen.

Molekulardynamische Simulationen (MD) bieten einen Lösungsansatz. Ausgehend von bekannten Tertiär- oder Quartärstrukturen, lässt sich ein mögliches dynamisches Verhalten der Proteinstruktur vorhersagen [16] und bieten die Möglichkeit die dynamischen Abstandsinformationen der Einzelmolekülspektroskopie mit den statischen Ortskoordinaten der Proteinstruktur zu verknüpfen [17]. Simulationen sehr großer Proteine mit mehr als zehntausenden Atomen und Simulationszeiten bis in den Mikro- oder sogar Millisekundenbereich stellen aufgrund ausgereifter Simulationsprogramme [18] und ständig steigender Rechenleistung inzwischen kein Hindernis mehr dar [19]. MD-Simulationen werden aller Voraussicht nach experimentelle Untersuchungen nicht ersetzen, aber sie bieten ein riesiges Potential, bei widersprüchlichen Ergebnissen oder offenen Fragestellungen, Interpretationen und Lösungsansätze zu liefern.

Während Proteinkonformationen und deren Dynamik bereits mehrfach mit Einzelmolekülmethode untersucht wurden [20, 21], gibt es zur Komplexbildung von Proteinen bisher nur wenige Publikationen. Hier setzt die Arbeit an, um anhand zweier Modellsysteme die Methodik zur Untersuchung der Komplexbildung anzupassen beziehungsweise überhaupt zu etablieren.

Bei dem ersten Modellsystem handelt es sich um den bakteriellen Proteinkomplex *ESAT-6/CFP-10* des *Mycobacterium tuberculosis*. Die Proteine *ESAT-6/CFP-10* sind seit einem Jahrhundert Hauptbestandteil des sich immer noch in Benutzung befindlichen Tuberkulinhauttests. Sie bilden zusammen einen heterodimeren Komplex aus einem 4-helikalen Bündel und werden der WXG-100 Proteinfamilie zugeordnet [22]. Liegen beide Proteine ungebunden vor, besteht die Annahme, dass *CFP-10* vollkommen unstrukturiert ist, während *ESAT-6* bereits teilweise strukturiert ist und ein *Molten Globule* ausbildet. Neben der temperaturabhängigen Untersuchung des Komplexes, liegt ein Schwerpunkt auf der Charakterisierung der *Molten Globule* Struktur von *ESAT-6*. Zum Vergleich wird außerdem ein homologer Proteinkomplex der WXG-100 Proteinfamilie untersucht. Das Protein *sagEsxA* des Bakteriums *Streptococcus agalactiae* bildet ein Homodimer mit ähnlicher 4-helikaler Struktur wie *ESAT-6/CFP-10* [23]. Ziel ist es, ein universelles Verhalten für diese Proteinfamilie zu finden.

Bei dem zweiten Modellsystem handelt es sich um den viralen Proteinkomplex nsp7:nsp8 des *Felinen Coronavirus*. Der nsp7:nsp8 Komplex spielt im Replikations- und Transkriptionskomplex der Coronaviren eine wichtige Rolle [24]. Ausgehend von der Kristallstruktur des hexadekameren nsp7:nsp8 Komplexes des *SARS-CoV* [25]

wird der nsp7:nsp8 Komplex des *Felinen Coronavirus* untersucht. Es soll festgestellt werden, ob die komplizierte hexadekamere Struktur für weitere Coronaviren universell ist. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Untersuchung des Komplexbildungsprozesses und der Charakterisierung des ungebundenen nsp8 Proteins. Hierdurch soll ein besseres Verständnis der Rolle von nsp7 und nsp8 in Bezug zur RNA-Synthese erreicht werden.

Beide Proteinkomplexe werden aus Einzelproteinen geformt, bei denen nur wenige Informationen zur unkomplexierten Struktur in Lösung vorliegen. Vermutet wird für *ESAT-6* eine *Molten Globule* Struktur. *CFP-10* soll gänzlich unstrukturiert sein. Zur Struktur von nsp8 sind bisher ebenfalls keine Informationen bekannt. *nsp7* des *SARS-CoV* ist strukturiert und zeigt eine gute Übereinstimmung zur komplexierten Form [26].

Bisherige Annahmen gingen davon aus, dass ein Protein spezifisch strukturiert sein muss, um eine Funktion ausführen zu können [27]. Es existieren jedoch auch Strukturen, die, obwohl sie keine spezifische Struktur aufweisen, in der Lage sind eine Funktion auszuführen, oder erst bei Interaktion mit einem Bindungspartner oder Substrat ihren gefalteten Zustand einnehmen. Diese Proteine werden *Intrinsically Disordered Proteins* genannt. Damit ergibt sich ein völlig neues Struktur-Funktions-Paradigma [28]. Nach diesem Modell existieren Proteine nicht nur in einem geordneten oder komplett entfalteten Zustand (*random coil*), sondern es existiert ebenfalls eine dritte teilweise geordnete Struktur (*Molten Globule*) [28].

Die beiden Proteine *ESAT-6* und nsp8 zeigen im Hinblick auf eine mögliche *Molten Globule* Struktur vergleichbare Eigenschaften. So lassen sich beide Strukturen nicht getrennt kristallisieren. Dies ist ein erster Hinweis auf eine ungeordnete, flexible Struktur. Jedoch lässt sich für *ESAT-6* mittels CD-Spektroskopie eine bestehende Sekundärstruktur nachweisen [23]. Für *nsp8* wurde, obwohl das Protein nicht im Komplex gebunden war, eine RNA synthetisierende Aktivität nachgewiesen [29]. Neben der Untersuchung der Komplexstruktur stellt die Betrachtung möglicher *Molten Globule* Zustände der Einzelproteine einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Durch die Kombination von Strukturdaten aus der Röntgenkristallographie, Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie und molekulardynamischen Simulationen soll ein tieferer Einblick und ein besseres Verständnis zur Struktur und Funktion der Proteine und Proteinkomplexe erreicht werden.

Die Arbeit ist folgendermaßen gegliedert: In Kapitel 2 werden kurz die physikalischen und methodischen Grundlagen zur Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie vorgestellt. In Kapitel 3 erfolgt eine kurze Einführung in die MD-Simulation. In Kapitel 4 werden der experimentelle Aufbau vorgestellt und die Durchführung von Experiment und Simulation erläutert. Schließlich werden in Kapitel 6 die Ergebnisse zum *ESAT-6/CFP-10* und in Kapitel 7 zum nsp7:nsp8 Komplex vorgestellt. In Kapitel 8 werden die Ergebnisse kurz zusammengefasst.

2 Grundlagen

2.1 Photophysik

2.1.1 Fluoreszenz

Die Emission von Licht durch den Übergang eines Elektrons von einem angeregten elektronischen Zustand in den Grundzustand wird als Photolumineszenz bezeichnet. Es werden zwei Formen unterschieden, Fluoreszenz und Phosphoreszenz, die sich durch die Art des Anregungszustandes unterscheiden. Die Emission durch den Übergang eines Elektrons von einem angeregten Singulettzustand in den Grundzustand nennt man Fluoreszenz. Im Unterschied dazu erfolgt der Übergang bei der Phosphoreszenz von einem angeregten Triplettzustand in den Grundzustand. Übergänge dieser Art sind quantenmechanisch verboten und die Emissionsraten ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$) sind demzufolge wesentlich kleiner als bei der Fluoreszenz (10^8 s^{-1}). Die Übergänge und Raten zwischen den beteiligten Energieniveaus, die zwischen Absorption und Emission eines Photons stattfinden, lassen sich auf einfache Art in einem Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.1) darstellen [30].

Vor der Anregung befinden sich die Moleküle im Schwingungsgrundzustand ($\nu = 0$) des elektronischen Grundzustandes S_0 . Die Elektronen gelangen durch Absorption von Photonen in verschiedene Schwingungszustände des ersten angeregten Zustandes S_1 , abhängig von der Energie in höher angeregte Zustände S_2 etc. Es erfolgt keine Spinumkehr des Elektrons. Durch Schwingungsrelaxation relaxieren die Elektronen strahlungslos durch Wärmeabgabe an das umgebende Lösungsmittel in den Schwingungsgrundzustand von S_1 (Kashas Regel) [31]. Der folgende Übergang in den Grundzustand S_0 unter Aussendung eines Photons innerhalb von ca. 10^{-8} s wird Fluoreszenz genannt. Weitere Relaxationsprozesse, die jedoch strahlungslos erfolgen, sind Innere Konversion (*engl.: IC internal conversion*), der Energieübertrag auf benachbarte Moleküle (Quenchen) und chemische Reaktionen. Ein Beispiel hierfür ist das Auslösen von Isomerisierungsreaktionen durch den Energieeintrag der Absorption. Wenn das Elektron strahlungslos unter Spinumkehr in den elektronischen Triplettzustand T_1 übergeht, wird dies Interkombination (*engl.: ISC intersystem crossing*) genannt. Die Relaxation ausgehend vom Triplettzustand in den Grundzustand unter Aussendung eines Photons nennt man Phosphoreszenz. Strahlungslose Übergänge aus dem Triplettzustand sind ebenfalls möglich, und relativ zur Phosphoreszenz häufiger anzutreffen.

Ein wichtiger Effekt, der bei der Fluoreszenzspektroskopie ausgenutzt wird, ist, dass das Emissionsspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum rotverschoben ist (Stokes Verschiebung). Dieser Effekt wird durch zwei verschiedene Prozesse hervorgerufen. Einerseits erfolgt der Übergang vom Grundzustand S_0 meist nicht in den Vibrationsgrundzustand $\nu = 0$ des 1. angeregten Zustandes S_1 , hervorgerufen durch die im Verhältnis zur Kernbewegung (Kernschwingung 10^{-13} s) sehr schnellen elektronischen Übergänge (10^{15} s). Ein Übergang ist umso wahrscheinlicher, umso mehr

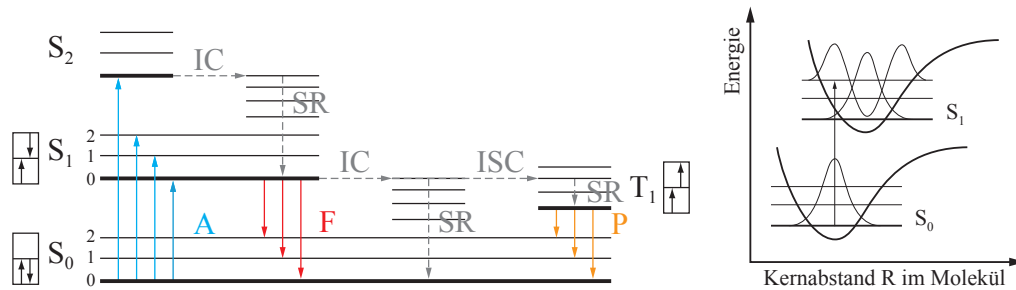


Abb. 2.1: Links: Jablonski-Diagramm. Dargestellt sind der elektronische Grundzustand S_0 , der erste angeregte Singulettzustand S_1 , der zweite angeregte Singulettzustand S_2 und der erste angeregte Triplettzustand T_1 mit den vibronischen Zuständen $\nu = 0, 1, 2, \dots$ und den jeweiligen Spinzuständen. Die Übergänge sind im Text erläutert. A: Absorption, F: Fluoreszenz, strahlungslose Übergänge: grau gestrichelt (IC: Innere Konversion, ISC: Interkombination, SR: Schwingungsrelaxation). Rechts: Franck-Condon-Prinzip. Anregung vom Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes in einen höheren Schwingungszustand des ersten angeregten elektronischen Zustands. Verschiebung der Potentiale und Überlapp der Wellenfunktionen aufgrund Kernschwingung.

sich die Vibrations-Wellenfunktionen des jeweiligen Übergangs überlappen (Franck-Condon-Prinzip, Abbildung 2.1). Die Wahrscheinlichkeiten der Übergänge werden durch die Franck-Condon-Faktoren angegeben. Die Relaxation in den Grundzustand erfolgt jedoch immer vom vibronischen Grundzustand des 1. angeregten Zustandes in ein Schwingungsniveau des Grundzustandes. Der Energieverlust aufgrund der Schwingungsrelaxation führt dann zur Rotverschiebung des Fluoreszenzsignals. Weiterhin spielt der Relaxationseffekt des meist polaren Lösungsmittels eine wichtige Rolle [32]. Die Umorientierung der polaren Lösungsmittelmoleküle nach der Anregung resultiert in der Verschiebung des 1. angeregten Zustandes zu niedrigeren Energien und führt zur Rotverschiebung des Emissionsspektrums. Dadurch lassen sich Absorptions- und Emissionslicht durch entsprechende Filter leicht voneinander trennen. Dies ist essentiell für die Fluoreszenzspektroskopie.

Fluorophore sind fluoreszierende Moleküle oder fluoreszierende Teile eines Moleküls. Bei Biomolekülen unterscheidet man intrinsische und extrinsische Fluorophore. Intrinsische Fluorophore sind in Biomolekülen natürlich vorkommende Fluorophore. Beispiele sind, neben den Basen der Nukleinsäuren, Proteine, die Aminosäuren mit aromatischen Resten wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin enthalten. Um Biomoleküle sichtbar zu machen, die keine Fluoreszenzeigenschaften besitzen, ist es notwendig, diese mit fluoreszierenden Molekülen zu markieren. Diese werden als extrinsische Fluorophore bezeichnet. Es ist wichtig, dass die ursprünglich zu untersuchenden Moleküle in ihrer Struktur und Funktion nicht beeinflusst werden und dass ebenfalls die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs nicht verändert werden. Entsprechend des Experiments und den damit geforderten Eigenschaften lässt sich aus einer Vielzahl von Fluorophoren auswählen.

Eine hohe Quantenausbeute und Photostabilität spielen bei der Auswahl der Farbstoffe eine wichtige Rolle.

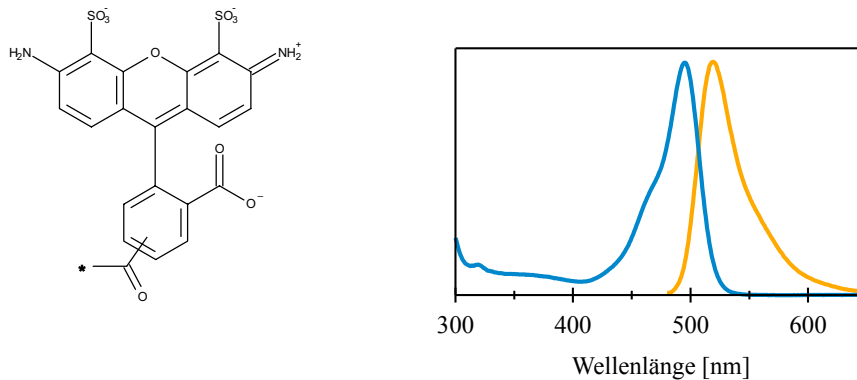


Abb. 2.2: Dargestellt sind die Struktur des Farbstoffs *AlexaFluor488* (links) mit dem entsprechenden Absorptionsspektrum (blau) und Emissionsspektrum (gelb) (rechts).

Unter der Quantenausbeute Q wird der Anteil des absorbierten Lichts verstanden, der als Fluoreszenzlicht emittiert wird:

$$Q = \frac{\text{Anzahl der emittierten Photonen}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}} . \quad (2.1)$$

Liegen idealerweise keine strahlungslosen Übergänge vor, beträgt die Quantenausbeute 100 %. Diese lässt sich nun durch die Raten der Übergänge ausdrücken, welche den ersten angeregten Zustand S_1 entvölkern:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} . \quad (2.2)$$

Die radiative Rate Γ ist die Rate der Übergänge der emittierten Photonen. Aus Gründen der Vereinfachung werden alle strahlungslosen Übergänge durch die Rate k_{nr} zusammengefasst. Hierzu gehören Innere Konversion, Interkombination, der Energieübertrag auf benachbarte Moleküle (Quenchen) und chemische Reaktionen. Eine weitere wichtige Eigenschaft zur Charakterisierung von Fluorophoren ist die Fluoreszenzlebenszeit τ . Unter der Fluoreszenzlebenszeit τ ist die mittlere Zeit zu verstehen, in der sich das Elektron im angeregten Zustand befindet. Typische Werte liegen im Bereich von 1 bis 10 ns. Die Fluoreszenzlebenszeit τ lässt sich ebenfalls durch die Raten der Übergänge beschreiben, die zur Entvölkerung des ersten angeregten Zustandes führen:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} . \quad (2.3)$$

Die Lebenszeit eines Fluorophores ohne den Einfluss strahlungsloser Prozesse wird intrinsische oder natürliche Fluoreszenzlebenszeit τ_n genannt und ergibt sich als Kehrwert der radiativen Rate Γ :

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} . \quad (2.4)$$

Experimentell lässt sich die natürliche Fluoreszenzlebenszeit durch die gemessene Fluoreszenzlebenszeit τ und die Quanteneffizienz Q bestimmen:

$$\tau_n = \frac{\tau}{Q} . \quad (2.5)$$

2.1.2 Fluoreszenzlöschung

Unter Fluoreszenzlöschung oder auch *Quenching (engl.)* versteht man alle Vorgänge, die aufgrund von Wechselwirkung der Fluorophore mit anderen Molekülen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität in der Probe führen [33]. Es wird hierbei zwischen statischem und dynamischem Quenchen unterschieden. Beim statischen Quenchen bildet der Quencher mit dem Fluorophor einen nicht-fluoreszierenden Komplex im energetischen Grundzustand S_0 . Der Fluorophor ist nicht mehr in der Lage, Licht zu absorbieren. Im Falle des dynamischen Quenchens wird die Energie des im ersten angeregten Zustand befindlichen Fluorophors aufgrund räumlicher Nähe oder direktem Kontakt auf ein Quencher-molekül übertragen [30]. Ein typisches Beispiel für den Energieübertrag aufgrund räumlicher Nähe ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), vorgestellt im folgenden Kapitel.

Nicht zu verwechseln ist der Vorgang der Fluoreszenzlöschung mit dem Photobleichen. Beim Bleichen wird der Farbstoff infolge irreversibler, photochemischer Prozesse zerstört. Bleichen stellt dahingehend ein Problem dar, dass Farbstoffe nur eine maximale Anzahl an Anregungszyklen durchlaufen können. Hohe Anregungsintensitäten führen zum schnelleren Bleichen der Farbstoffe und damit zur Abnahme der messbaren Intensität.

2.1.3 FRET - Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Unter Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer *FRET* versteht man den von Förster beschriebenen, strahlungslosen Energieübertrag von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül. Der Donor befindet sich im ersten angeregten Zustand S_1 und überträgt strahlungslos seine Energie auf das im Grundzustand S_0 befindliche Akzeptormolekül. Die beiden Moleküle werden hier als oszillierende Dipole und die Interaktion zwischen beiden als Dipol-Dipol-Wechselwirkung betrachtet. Ein Energieaustausch oder -übertrag findet statt, wenn beide Dipole eine ähnliche Resonanzfrequenz aufweisen. Die Rate des Energietransfers ist vom spektralen Überlapp des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors, der Quanteneffizienz Q_D des Donors, der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander und vor allem vom Abstand der beiden Moleküle abhängig [7].

Die gebräuchlichste Anwendung des Energietransfers liegt deshalb in der Abstandsmessung. Typischerweise werden hierfür entsprechende Moleküle mit einem Donor- und Akzeptorfarbstoff markiert. Die Messung der Transferrate erlaubt nun Aussagen zu statischen Abständen, zu Abstandsänderungen und damit Messung von Dynamik,

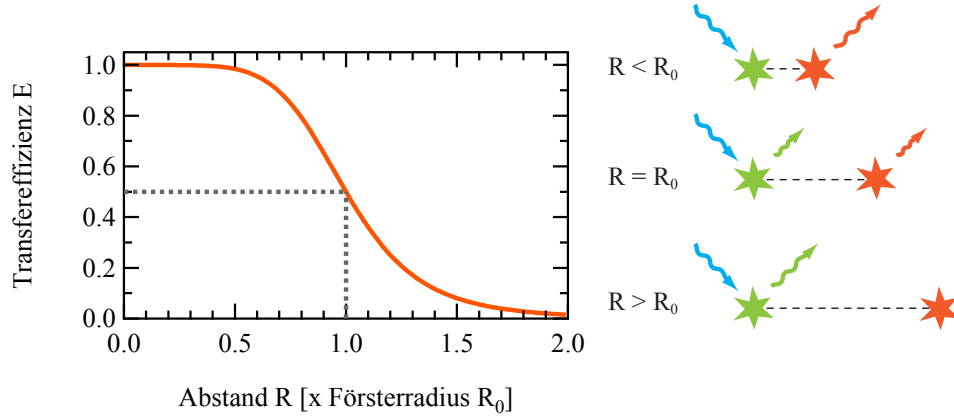


Abb. 2.3: Transfereffizienz E . Dargestellt ist die Transfereffizienz E in Abhängigkeit vom Abstand R . Entspricht der Abstand dem Försterradius R_0 ergibt sich die Transfereffizienz E zu 0,5. Ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer als der Försterradius ($R > R_0$) ist die Transfereffizienz E kleiner als 0,5 und minimal 0. Ist der Abstand kleiner ($R < R_0$) ist die Transfereffizienz E größer als 0,5 und maximal 1.

oder zur Bildung von Agglomeraten oder Komplexen. Die Anwendungsmöglichkeiten sind hierbei mannigfaltig, was durch die stetig steigende Zahl an Publikationen deutlich wird, die *FRET* zur Bestimmung von Struktur und Dynamik vor allem bei Biomolekülen nutzen.

Erstmalig wurde die Theorie von Förster durch Stryer und Haugland experimentell belegt. Durch ihre Abstandsmessungen an farbstoffmarkierten Polyprolinen prägten sie den Begriff des „spektroskopischen Lineals“ (*engl. spectroscopic ruler*) [5].

Eine charakteristische Größe ist der Försterradius R_0 . Er bezeichnet den Abstand, bei dem der Energieübertrag bei 50 % liegt. Typische Werte liegen zwischen 1..10 nm. Die Rate des Energietransfers $k_T(r)$ von einem Donor auf einen Akzeptor ist gegeben durch:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6. \quad (2.6)$$

τ_D bezeichnet die Fluoreszenzlebenszeit des Donors unter Abwesenheit des Akzeptors, R_0 den Försterradius und r den Donor-Akzeptor-Abstand. Besonders deutlich wird hier die starke Abstandsabhängigkeit der Transferrate. Kleinste Änderungen des Abstands in der Größenordnung des Försterradius, führen zu einer messbaren Änderung der Transferrate. Wird die Transfereffizienz E gegen den Abstand aufgetragen, ergibt sich der in Abbildung 2.3 dargestellte sigmoidale Verlauf. E bezeichnet das Verhältnis aus übertragenen Photonen zu absorbierten Photonen. Die absorbierten Photonen lassen sich auch als Summe aller Raten darstellen, die den angeregten Zustand entvölkern:

$$E = \frac{k_T}{k_T + \Gamma + k_{nr}}. \quad (2.7)$$

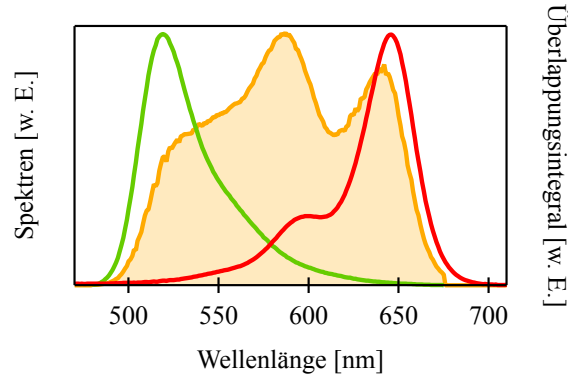


Abb. 2.4: Überlappungsintegral $J(\lambda)$. Dargestellt sind das Emissionsspektrum des Donors *AlexaFluor488* (grün), das Absorptionsspektrum des Akzeptors *Atto647N* (rot) und der sich nach Gleichung 2.11 ergebende spektrale Überlapp $F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda)$ (gelb).

Γ beschreibt die strahlende Rate und k_{nr} die nicht-strahlende Rate des Donors, wie bereits in Kapitel 2.1.1 vorgestellt. Unter Verwendung der Gl. 2.3 ergibt sich zunächst:

$$E = \frac{k_T}{\tau^{-1} + k_T} . \quad (2.8)$$

Mit Gleichung 2.6 ergibt sich die Transfereffizienz, und damit auch die Verteilung in Abbildung 2.3 zu:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} . \quad (2.9)$$

Die theoretische Betrachtung erlaubt es für ein Donor-Akzeptor-Paar, mittels klassischer und quantenmechanischer Rechnung, die Transferrate k_T und den entsprechenden Försterradius R_0 zu ermitteln [30]

$$k_T = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \cdot \left(\frac{9000 \ln 10}{128 \pi^5 N n^4} \right) \cdot J(\lambda) . \quad (2.10)$$

Bei Q_D handelt es sich um die Quantenausbeute und bei τ_D um die Fluoreszenzlebenszeit des Donors bei Abwesenheit eines Akzeptormoleküls. n ist der Brechungsindex des Mediums, N die Avogadro-Konstante und r der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der Term κ^2 beschreibt die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander, das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ den spektralen Überlapp des Donor-Emissionsspektrums und des Akzeptor-Absorptionsspektrums:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda . \quad (2.11)$$

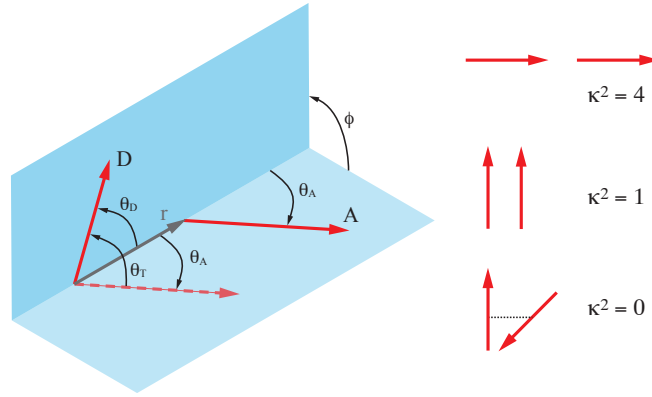


Abb. 2.5: Orientierungsfaktor κ^2 . Dargestellt ist die Abhängigkeit des Orientierungsfaktors κ^2 von der Richtung des Emissionsdipols des Donors D und des Absorptionsdipols des Akzeptors A .

$F_D(\lambda)$ ist die normierte Fluoreszenzintensität des Donors, $\epsilon_A(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors und λ die Wellenlänge.

Gebräuchlicher als die Transferrate k_T ist die Verwendung der Abstände. Mit Gleichung 2.6 ergibt sich der Försterradius zu:

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 N n^4} \cdot J(\lambda) . \quad (2.12)$$

Für κ^2 wird für zueinander frei bewegliche Farbstoffe typischerweise einen Mittelwert von $2/3$ angenommen. Voraussetzung ist, dass die Rotationskorrelationszeit τ_r des Farbstoffs deutlich kürzer als die Fluoreszenzlebenszeit τ ausfällt. Ist die Bewegung von Donor zu Akzeptor eingeschränkt, kann κ^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen [34].

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (2.13)$$

$$\kappa^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (2.14)$$

Die Bezeichnung der Winkel und mögliche Orientierungen der Dipole von Donor und Akzeptor sind in Abb. 2.5 dargestellt.

Experimentell ist die Transfereffizienz über die Messung der emittierten Intensitäten von Donor I_D und Akzeptor I_A zugänglich:

$$E = \frac{I_A}{I_A + I_D} . \quad (2.15)$$

2.2 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Methode der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie sehr stark entwickelt. Mit der Entwicklung des konfokalen Mikroskops [35] und des Lasers war es erstmals möglich einzelne Moleküle mittels Fluoreszenzspektroskopie zu detektieren [3]. Klassisch erfolgte die Beschreibung mikroskopischer Vorgänge ausschließlich aus dem makroskopisch beobachteten Verhalten des betrachteten Molekülensembles. Wurden homogene Verteilungen von Teilchen untersucht, spielte die individuelle Eigenschaft eines einzelnen Moleküls keine Rolle. Sollen jedoch heterogene Gruppen an Teilchen untersucht werden, deren Moleküle sich durch ihre individuellen Eigenschaften unterscheiden, so gehen diese innerhalb des Molekülensembles verloren [1]. Die Einzelmolekülspektroskopie bietet die Möglichkeit diese individuellen Eigenschaften zu erfassen. Methoden, wie FCS und FRET, bieten in Kombination mit einem konfokalen Mikroskop die Möglichkeit die Eigenschaften einzelner Moleküle in Lösung zu untersuchen [13, 9]. Typische Anwendungsbeispiele sind die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Biomoleküle, wie Proteine oder DNA. So können unterschiedliche Konformationen eines Proteins, Faltungsprozesse, Dynamik, Diffusionsverhalten, Wechselwirkung mit Bindungspartnern und vieles mehr untersucht werden.

Die methodischen und physikalischen Grundlagen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

2.2.1 Konfokales Prinzip

Bei der konventionellen Lichtmikroskopie wird das gesamte Objekt beleuchtet. Bei starker Vergrößerung stößt man damit schnell an Grenzen, da durch Streuung und Brechung des Lichts an optisch unterschiedlich dichten Strukturen das Auflösungsvermögen und der Kontrast verringert werden. Bei der konfokalen Mikroskopie hingegen wird nur ein Punkt beleuchtet. Die Detektion erfolgt genau aus diesem Punkt heraus, woraus sich der Begriff konfokal ableitet. Anregungs- und Detektionsvolumen sind somit identisch. Streulicht aus der Umgebung des beleuchteten Flecks wird durch die Verwendung einer Lochblende im Detektionsstrahlengang des Mikroskops (Abschnitt 4.1.1) ausgeblendet [14]. Soll nun ein komplettes Bild erstellt werden, muss das Objekt Punkt für Punkt abgerastert werden. Eine mathematische Beschreibung der Intensitätsverteilung von Anregungs- und Detektionsfokus ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

Anregungs- und Detektionscharakteristik

Bei der konfokalen Mikroskopie wird meist davon gesprochen, dass Detektion und Anregung aus einem Punkt heraus erfolgen. Eine genaue Definition, was unter diesem „Punkt“, dem Beobachtungsvolumen, zu verstehen ist, soll im folgenden Abschnitt kurz dargestellt werden. Die Form des Beobachtungsvolumens wird durch die Detektionsfunktion $MDE(\vec{r})$ (engl. *Molecular-detection-efficiency*) (Gleichung 2.25) charakterisiert. Sie ergibt sich aus der Anregungsintensität des Lasers $I_a(\vec{r})$ und der räumlichen Verteilung der Detektionseffizienz $CEF(\vec{r})$ (engl. *Collection-efficiency-function*). Das Profil der Anregungsintensität des Laserstrahls im Brennpunkt des Objektivs wird in radialer Richtung gaußförmig und in axialer Richtung

lorentzförmig angenommen [13].

$$I_a(\vec{r}) = I_0(z) e^{-\frac{\vec{r}^2}{\omega^2(z)}} \quad (2.16)$$

$$I_0(z) = \frac{\omega_0^2 I_0}{\omega^2(z)} \quad (2.17)$$

Dabei ist $\omega(z)$ der Laserradius im Fokus in Abhängigkeit von z .

$$\omega^2(z) = \omega_0^2 + \left(\frac{\lambda}{n \pi \omega_0} \right)^2 z^2 \quad (2.18)$$

$$\omega_0 = \frac{\lambda f}{n \pi l_0} = \frac{\lambda}{n \pi \tan \delta} \quad (2.19)$$

δ ist der Winkel, unter dem der eintretende Strahl fokussiert wird, λ die Wellenlänge des Laserlichts und n der Brechungsindex des Mediums hinter dem Objektiv. Der Winkel δ ist umso größer, je größer der Strahlradius l_0 vor Eintritt in das Objektiv ist. Es gilt $\tan \delta = l_0/f$. f ist die Brennweite des Objektivs. Der Detektionswinkel α ist durch die numerische Apertur NA und den Brechungsindex des Mediums n festgelegt:

$$\sin \alpha = \frac{NA}{n} . \quad (2.20)$$

Die $CEF(\vec{r})$ beschreibt die räumliche Detektionswahrscheinlichkeit der Fluoreszenz am Punkt $\vec{r}$. Sie ergibt sich streng mathematisch als Faltung aus der Transmissionsfunktion der Lochblende $T(\vec{r})$ mit der durch das Objektiv gegebenen Punktspreizfunktion $PSF(\vec{r})$ (engl. *Point-spread-function*). Ausgehend von einer punktförmigen Lichtquelle im Objektraum, beschreibt die $PSF(\vec{r})$ die Intensitätsverteilung in der Bildebene und damit auf der Detektoroberfläche [13].

Beide Funktionen können von einer Näherung ausgehend als Scheibchenfunktionen *circ* beschrieben werden [13].

$$circ\left(\frac{\vec{r}}{s_0}\right) = \begin{cases} 1 & \text{falls } |\vec{r}| \leq s_0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

$$T(\vec{r}) = circ\left(\frac{\vec{r}}{s_0}\right) \quad (2.21)$$

$$PSF(\vec{r}, \vec{r}', z) = \frac{circ\left(\frac{\vec{r}-\vec{r}'}{R^2(z)}\right)}{\pi R^2(z)} \quad (2.22)$$

$$R^2(z) = \sqrt{R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha} \quad (2.23)$$

$R(z)$ ist der Radius des Beugungsscheibchens, welcher sich analog dem in axialer Richtung lorentzförmigen Profil des Anregungslichtes ergibt, in Abhängigkeit des Abstandes z vom Brennpunkt. R_0 beschreibt das Auflösungsvermögen des Objektivs. s_0 ist der durch die Objektiv-Vergrößerung geteilte Lochblendenradius. Für die *CEF* folgt in semigeometrischer Näherung:

$$CEF(\vec{r}', z) = \frac{1}{\Delta} \int T(\vec{r}) PSF(\vec{r}, \vec{r}', z) d\vec{r}. \quad (2.24)$$

Δ ist ein Normierungsfaktor.

Das Produkt aus Anregungsintensität $I_a(\vec{r})$ und $CEF(\vec{r})$ ergibt die Detektionsfunktion $MDE(\vec{r})$. Die $MDE(\vec{r})$ bestimmt das effektive Messvolumen, da es die Intensitätsverteilung der detektierten Fluoreszenz angibt. Die Lösung lässt sich ausschließlich numerisch bestimmen und ergibt in Näherung in radialer und axialer Richtung eine Gaußverteilung.

$$MDE(\vec{r}) = I_0 e^{-2 \frac{x^2+y^2}{r_0^2}} e^{-2 \frac{z^2}{z_0^2}} \quad (2.25)$$

r_0 und z_0 sind die beiden Halbachsen des Gauß'schen Ellipsoiden, r_0 in der x-y-Ebene und z_0 in der z-Richtung. Die Näherung ist nur dann zulässig, wenn die Abbildungsoptik so gewählt ist, dass einerseits das Gaußprofil der Anregung in lateraler Richtung nicht zu stark modifiziert wird, andererseits aber die lorentzförmige z-Abhängigkeit unterdrückt wird. Erreicht wird dies durch die richtige Wahl des Lochblendenradius. Um das Lorentzprofil zu unterdrücken, sollte die Lochblende nicht zu groß gewählt werden. Die Erhaltung des Gaußprofils verlangt allerdings eine nicht zu kleine Lochblende. Erfüllt wird die Näherung für das in dieser Arbeit typischerweise verwendete Objektiv mit einer 60fachen Vergrößerungen bei Lochblenden zwischen $30 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$ [13].

2.2.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Eine wichtige Voraussetzung für erfolgreiche Einzelmolekülmessungen ist ein großes Signal-zu-Rausch-Verhältnis *SNR* (*engl. Signal-to-noise ratio*). Allgemein ist unter dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis das Verhältnis vom detektierten Nutzsignal zum Störsignal, dem Rauschen, zu verstehen [36].

Das typische Messsignal der Fluoreszenzmessung ist die Zahl der pro Zeiteinheit detektierten Photonen. Die Wahrscheinlichkeit $P(n)$ für die Detektion von n Photonen ist poissonverteilt:

$$P(n) = \frac{\langle N \rangle^n}{n!} e^{-\langle N \rangle}. \quad (2.26)$$

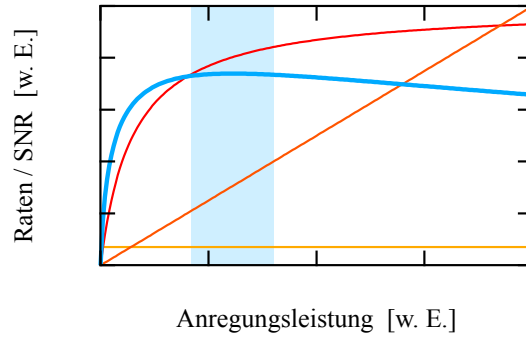


Abb. 2.6: Signal-zu-Rausch Verhältnis SNR in Abhängigkeit der Anregungsleistung (blau). Zusätzlich dargestellt sind die Emissionsrate R des Fluorophors (rot), das Streusignal des Lasers $C_b I$ (orange) und die Dunkelzählrate des Detektors N_d (gelb). Der theoretisch optimale Anregungsbereich ist blau hinterlegt [36].

Das poissonverteilte Rauschen der Zählrate um den Mittelwert der detektierten Photonen wird als Schrotrauschen (*engl. Shot-noise*) definiert [37]:

$$\Delta\langle N \rangle = \sqrt{\langle N \rangle} . \quad (2.27)$$

Die Gesamtzahl aller detektierten Photonen setzt sich aus dem eigentlichen Fluoreszenzsignal $\eta_{det} R$ und einem Hintergrundsignal zusammen. R entspricht der Emissionsrate des Fluorophors und η_{det} der Detektionseffizienz des Detektors. Die Stärke des Hintergrundsignals wird einerseits durch die anregungsunabhängige Dunkelzählrate N_d des Detektors und durch das Streusignal $C_b I$ des Anregungslasers bestimmt. Das Streusignal des Lasers entsteht aufgrund der Rayleigh- und Ramanstreuung des verwendeten Lösungsmittels und ist abhängig von der Anregungsintensität I . Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergibt sich somit zu [36]:

$$SNR = \frac{\eta_{det} R}{\sqrt{\eta_{det} R + C_b I + N_d}} \sqrt{T_{int}} . \quad (2.28)$$

T_{int} entspricht der Integrationszeit.

Intuitiv wird erwartet, dass es ausreicht, für ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit möglichst hoher Intensität anzuregen, um eine hohe Emissionsrate des Fluorophors zu erreichen. Jedoch unterliegt die Emissionsrate R einem Sättigungseffekt:

$$R = R_{max} \frac{1}{1 + \frac{I_{sat}}{I}} . \quad (2.29)$$

I_{sat} entspricht der Anregungsintensität, bei der die Hälfte der maximalen Emissionsrate R_{max} erreicht wird. Die maximale Emissionsrate R_{max} wird bestimmt durch die Fluoreszenzlebenszeit τ des Farbstoffs nach Gleichung 2.3, die Rate der nicht-strahlenden Übergänge in den Triplettzustand k_{ISC} und zurück k_{rISC} .

$$R_{max} = \frac{k_F}{1 + \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}}} = \frac{\tau^{-1}}{1 + \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}}} \quad (2.30)$$

Die im Vergleich zur Fluoreszenz relativ lange Aufenthaltsdauer im Triplettzustand $\tau_T = \frac{1}{k_{rISC}}$ führt zu einem zusätzlichen Sättigungseffekt.

$$\tau_T = \frac{1}{k_{rISC}} \quad (2.31)$$

In Abbildung 2.6 sind die Raten und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit der Anregungsleistung aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die theoretisch optimale Anregungsleistung nur für einen schmalen Bereich gilt. In der praktischen Anwendung wird die gewählte Anregungsleistung neben einem möglichst großem SNR auch durch das Bleichen des Farbstoffs bestimmt. Meist wird deshalb bei wesentlich niedrigerer Anregungsleistung gemessen, da Bleichen zur Abnahme der messbaren Intensität führt.

2.2.3 Einzelmolekül-FRET

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer Experimente auf Einzelmolekülniveau durchzuführen, bietet deutliche Vorteile gegenüber Ensemblemessungen. Werden Untersuchungen an Proben durchgeführt, bei denen ein Molekülensemble beobachtet wird, gehen individuelle Eigenschaften der Moleküle verloren [9]. Im Molekülensemble würde eine heterogene Verteilung der Transfereffizienz als ein einzelner, gemittelter Wert detektiert. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Die Einzelmolekülmessung ergibt eine breite Verteilung der Transfereffizienz mit zwei deutlichen Populationen. Die Ensemblemessung der gleichen Probe liefert hingegen ausschließlich einen mittleren Wert. Die individuellen Eigenschaften, zum Beispiel verschiedene Konformationen eines Proteins, gehen in der Mittelung unter.

Um FRET-Untersuchungen an einzelnen Molekülen durchzuführen, werden typischerweise zwei verschiedene Methoden genutzt. Entweder werden die zu untersuchenden Moleküle über eine spezielle Bindung an einem Objektträger immobilisiert, und die zeitabhängige Änderung der Transfereffizienz wird für jedes Molekül einzeln detektiert. Proteine werden in den meisten Fällen über einen Protein-Tag und entsprechend beschichtete Deckgläser immobilisiert. Oder die Messungen werden als Lösungsexperiment durchgeführt, das heißt die untersuchten Moleküle sind nicht immobilisiert, sondern können frei diffundieren. Ein deutlicher Vorteil dieser Methode ist, dass Wechselwirkungen mit dem Deckglas ausgeschlossen werden können. Der Nachteil ist hierbei, dass aufgrund der kurzen Aufenthaltsdauer im Fokus (μs bis ms) dynamische Prozesse außerhalb dieses Zeitfensters nicht detektiert werden können.

Um einzelne Moleküle im Lösungsexperiment beobachten zu können, wird einerseits das Beobachtungsvolumen sehr klein gehalten. Dies wird mit dem in Kapitel 2.2.1 vorgestellten konfokalen Mikroskop realisiert. Ein Fokusvolumen im Femtoliterbereich ist somit kein Problem. Andererseits muss die Konzentration der Moleküle angepasst werden, damit die Wahrscheinlichkeit, mehr als ein Molekül im Fokus zu detektieren, möglichst gering gehalten wird.

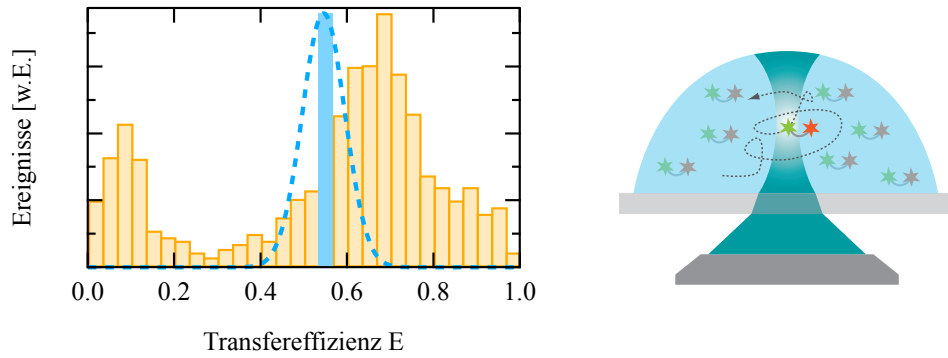


Abb. 2.7: Links: Dargestellt sind die Verteilung der Transfereffizienz einer Einzelmolekülmessung (gelb) und der Mittelwert der Ensembelmessung (blau). Zusätzlich ist die aufgrund von Schrotrauschen verbreiterte Verteilung der Ensembelmessung angedeutet (blau gestrichelt). Rechts: Schematische Darstellung einer Einzelmolekülmessung. Aufgrund geringer Probenkonzentration und einem kleinen Beobachtungsvolumen (Fokus) befindet sich im Mittel weniger als ein Molekül im Fokus.

Da die mittlere Teilchenzahl im Fokus Poisson-verteilt ist,

$$P(n) = \frac{\langle N \rangle^n}{n!} e^{-\langle N \rangle} \quad (2.32)$$

lassen sich für verschiedene, mittlere Teilchenzahlen die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten bestimmen, ein oder mehr Teilchen im Fokus zu detektieren. Wird ein Fokusbereich von 1 fl angenommen, ergeben sich Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Eine Übersicht möglicher Teilchenzahlen mit den entsprechenden Wahrscheinlichkeiten ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1: $\langle N \rangle$ entspricht der mittleren Teilchenzahl im Fokus, $P(n = 1)$ der Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Teilchens im Fokus, $P(n \geq 2)$ entsprechend zwei oder mehr Teilchen und c der Konzentration in Nanomolar.

$\langle N \rangle$	$P(n = 1)$	$P(n \geq 2)$	c [nM]
1	0,368	0,264	1,660
0,5	0,303	0,090	0,830
0,1	0,090	0,005	0,166
0,01	0,010	$5e^{-5}$	0,017

Eine Reduzierung der Teilchenzahl von im Mittel $N = 1$ auf $N = 0,1$ Teilchen im Fokus, reduziert die Wahrscheinlichkeit, ein weiteres Teilchen gleichzeitig im Fokus zu detektieren, um den Faktor 53.

Es wird deutlich, dass für Einzelmolekülmessungen starke Verdünnungen im subnanomolaren Bereich notwendig sind. Dies bringt häufig messtechnische Schwierigkeiten mit sich. Probleme bereiten hauptsächlich die sehr langen Messzeiten, verur-

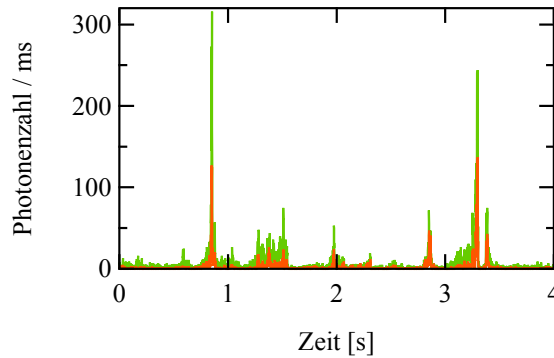


Abb. 2.8: Transiente Intensität einer Einzelmolekülprobe. Dargestellt ist das Signal einer FRET-Probe markiert mit zwei Farbstoffen, Donor (grün) und Akzeptor (orange).

sacht durch die starke Verdünnung und der damit reduzierten Ereignisdichte. Hierbei muss sichergestellt sein, dass das zu untersuchende System über einen langen Zeitraum und bei niedriger Konzentration stabil bleibt, und die Messbedingungen sich währenddessen nicht ändern. In der Regel wird versucht, Konzentrationen von $N = 0,1$ Teilchen im Fokus einzustellen. Dies stellt in den meisten Fällen den besten Kompromiss dar, zwischen ausreichender Verdünnung und Messzeit.

2.2.4 Korrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie *FCS* (engl. *Fluorescence-Correlation-Spectroscopy*) ist eine in den 70er Jahren entwickelte Methode zur Untersuchung kinetischer Eigenschaften molekularer Systeme im Gleichgewicht [38, 12, 11]. Hierbei ist nicht das absolute Fluoreszenzsignal der zu untersuchenden fluoreszierenden Moleküle von Bedeutung, sondern die momentane Fluktuation der Intensität um einen zeitlichen Mittelwert. Aus der Analyse dieser Fluktuationen mittels Autokorrelation lassen sich Größen wie die Diffusionskonstante, Molekülkonzentrationen, aber auch Triplettzerfallsraten oder chemische Bindungsraten bestimmen. Die FCS ist, obwohl sehr viele Moleküle untersucht werden, keine Ensemblemessung im herkömmlichen Sinne. Zeitlich wird über sehr viele Moleküle gemittelt, zeitgleich werden hier nur sehr wenige bis einzelne Moleküle untersucht. Erreicht wird dies, indem mit sehr niedrigen Konzentrationen (10^{-9} M) und einem sehr kleinen Detektionsvolumen (10^{-15} l) gearbeitet wird. Dies wird über einen konfokalen Aufbau der Messapparatur, dargestellt in Kapitel 4.1.1, realisiert.

Eine typische transiente Intensität einer *FCS*-Messung, auch als Intensitätszeitspur bezeichnet, ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Die Fluktuationen der Intensität werden durch die ständige Änderung der Konzentration im Beobachtungsvolumen verursacht. Ob das zu untersuchende Molekül, wie für FRET-Messungen notwendig, mit zwei Farbstoffen markiert ist, spielt dabei zunächst keine Rolle.

Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ beschreibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu unterschiedlichen Zeitpunkten t und $t + \tau$. Sie gibt somit die Wahrscheinlichkeit an, ein zum Zeitpunkt t detektiertes Molekül zum Zeitpunkt $t + \tau$ ebenfalls detektieren zu können. Für $t \rightarrow \infty$ wird $G(\tau)$ wie folgt definiert [30]

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} . \quad (2.33)$$

$I(t)$ entspricht der Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals. Im Folgenden wird der Ansatz zur Lösung von $G(\tau)$ gezeigt. Es wird nur der Fall der dreidimensionalen Diffusion betrachtet.

Die Intensität $I(t)$ hängt von der Geometrie des Beobachtungsvolumens ab, beschrieben durch die Detektionsfunktion $MDE(\vec{r})$ (Kapitel 2.2.1) und die Fluktuationen der Konzentration $C(\vec{r}, t)$ des Fluorophors:

$$I(t) = \int_R MDE(\vec{r}) C(\vec{r}, t) dV . \quad (2.34)$$

Die $MDE(\vec{r})$ gibt die Intensitätsverteilung im Fokus wieder und charakterisiert damit die Form des Beobachtungsvolumens. Bei konfokaler Detektion wird die $MDE(\vec{r})$ durch eine dreidimensionale Gaußverteilung angenähert [13]

$$MDE(\vec{r}) = I_0 e^{-2 \frac{x^2+y^2}{r_0^2}} e^{-2 \frac{z^2}{z_0^2}} . \quad (2.35)$$

r_0 und z_0 sind die beiden Halbachsen des Gauß'schen Ellipsoiden, r_0 in der x-y-Ebene und z_0 in der z-Richtung. Im Vorfaktor I_0 sind die Anregungsintensität durch den Laser, Verluste durch verwendete Filter und die Effizienz des Detektors enthalten. Das Fokusvolumen ergibt sich wie folgt:

$$V_{Fokus} = \frac{(\int MDE(\vec{r}) dV)^2}{\int MDE^2(\vec{r}) dV} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0 . \quad (2.36)$$

Auf die analytische Lösung der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ (Gleichung 2.33) wird nicht weiter eingegangen. Unter Verwendung von Gleichung (2.34) und (2.25) ergibt sich folgende Lösung [13]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{4 D \tau}{r_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4 D \tau}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}} . \quad (2.37)$$

$\langle N \rangle$ ist die mittlere Teilchenzahl, die sich im Fokus befindet, und wird im Folgenden nur noch mit N bezeichnet. Des Weiteren definiert man τ_D als die mittlere Aufenthaltszeit im Fokus mit

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4 D} \quad (2.38)$$

und führt den Strukturfaktor S ein. Der Strukturfaktor, der die Geometrie des Fokus beschreibt, ergibt sich aus dem Verhältnis der Halbachsen des Gauß'schen Ellipsoiden.

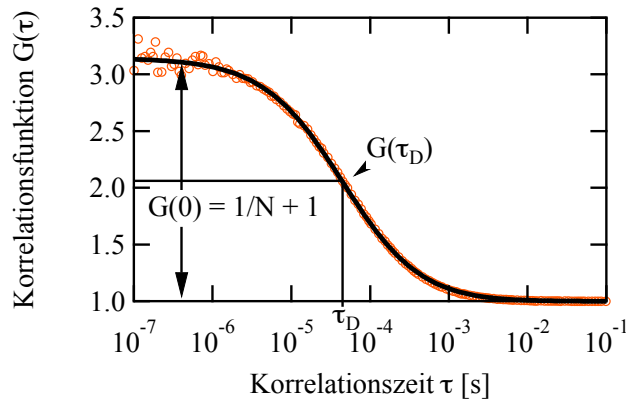


Abb. 2.9: Beispiel einer Autokorrelationsfunktion für den freien Farbstoff *AlexaFluor488*. N ..Teilchenzahl, τ_D ..Diffusionszeit. Rohdaten (orange), Kurvenanpassung (schwarz) mit Gleichung (2.40).

$$S = \frac{r_0}{z_0} \quad (2.39)$$

Für die Gleichung (2.37) ergibt sich damit folgender Ausdruck:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}}. \quad (2.40)$$

Mit dieser Gleichung lassen sich mit Hilfe einer geeigneten Kurvenanpassung an die gemessene Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$, wie sie in Abbildung 2.9 dargestellt ist, die gesuchten Parameter bestimmen. Aus $G(\tau = 0) = 1 + 1/N$ ergibt sich die mittlere Anzahl N der fluoreszenzaktiven Moleküle im Fokus. Über die Diffusionszeit τ_D lässt sich der Diffusionskoeffizient D bestimmen. Der Strukturfaktor S ist aus vorangehenden Justagemessungen bekannt.

Aus dem Diffusionskoeffizienten lässt sich der hydrodynamische Radius der zu untersuchenden Moleküle bestimmen. Unter Verwendung der Navier-Stokes-Gleichung für kugelförmige Teilchen

$$F = 6 \pi \eta R_S v \quad (2.41)$$

und der Einstein-Gleichung

$$F = \frac{k_B T}{D} v \quad (2.42)$$

lässt sich der Stokes-Radius R_S berechnen. F ist die, auf ein im Lösungsmittel mit der Geschwindigkeit v sich bewegendes Teilchen, wirkende Kraft, η die Viskosität des Lösungsmittels, k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur des Systems und

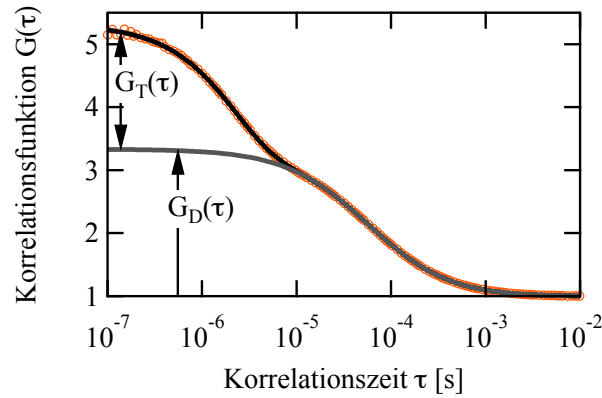


Abb. 2.10: Beispiel einer Autokorrelationsfunktion für den freien Farbstoff *AlexaFluor488*. Rohdaten (orange). Kurvenanpassung (schwarz) mit Gleichung (2.44). Die Anregungsleistung wurde ausreichend hoch gewählt, sodass die Moleküle häufig im Triplettzustand verweilen.

D die Diffusionskonstante des Teilchens. Der Stokes-Radius entspricht dem hydrodynamischen Radius der Moleküle. Bei hinreichend großen Kugeln ist dieser gleich dem geometrischen Radius.

$$R_S = \frac{k_B T}{6 \pi \eta D} \quad (2.43)$$

2.3 Spezielle Methoden der Einzelmolekülspektroskopie

2.3.1 Korrelationsanalyse

Die Grundlagen zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurden bereits in Kapitel 2.2.4 dargelegt. Neben der Größe und Konzentration des Moleküls ist es auch möglich, weitere Informationen mittels Korrelationsanalyse zu erhalten. So können verschiedene Spezies an Molekülen aufgrund ihrer unterschiedlichen Diffusionskonstanten voneinander getrennt werden. Aber nicht nur die Fluktuation des Fluoreszenzsignals aufgrund der Bewegung des Moleküls durch den Fokus trägt zum Korrelationssignal bei, sondern auch Intensitätsfluktuationen infolge von photophysikalischen Prozessen. Diese werden ebenfalls als zusätzliche Komponente in der Auftragung der Autokorrelation sichtbar.

Wie in Kapitel 2.1.1 kurz angeschnitten, kann aufgrund nicht-radiativer Übergänge Phosphoreszenz auftreten. Die Raten dieser Triplettübergänge liegen in einem Zeitbereich meist deutlich vom diffusiven Anteil getrennt. In diesem Fall lässt sich der Triplettbeitrag multiplikativ mit dem diffusiven Anteil verknüpfen [39]:

$$G(\tau) = G_D(\tau) G_T(\tau) . \quad (2.44)$$

$G_D(\tau)$ beschreibt die Diffusion (Gleichung (2.40)) und $G_T(\tau)$ den Triplettanteil:

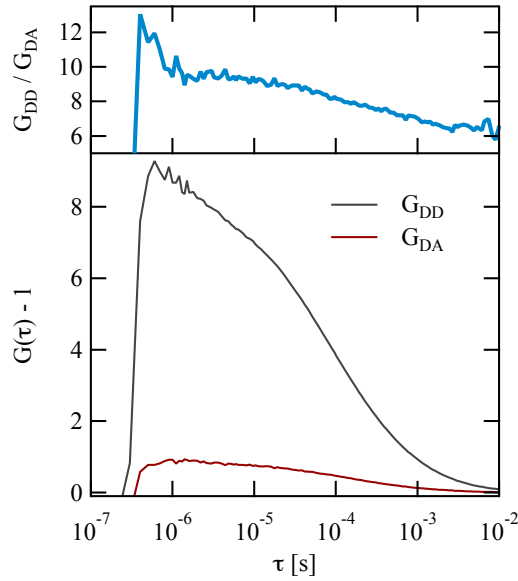


Abb. 2.11: Untersuchung eines mit Donor und Akzeptor markierten Proteins mit starker Fluktuation zwischen den Farbstoffen. Dargestellt sind Autokorrelation des Donors G_{DD} (schwarz), Kreuzkorrelation von Donor und Akzeptor G_{DA} (rot) und der Quotient G_{DD}/G_{DA} .

$$G_T(\tau) = 1 + \frac{T}{1-T} e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} . \quad (2.45)$$

T ist der Anteil der Moleküle, die sich im Triplettzustand befinden, und τ_T gibt die Triplettzeit an (Gleichung (2.31)). Ein Beispiel ist in Abbildung 2.10 dargestellt.

Ebenfalls ist es möglich, aus einer Korrelationsanalyse kombiniert mit FRET, Informationen über dynamische Konformationsänderungen zu erhalten. Voraussetzung hierfür ist ein System mit zwei sich quencheden Farbstoffen, wie dies bei FRET-Experimenten der Fall ist. Ist die Verteilung der Transfereffizienz sehr breit, ist es meist schwierig statische oder dynamische Systeme zu unterscheiden. Mehrere statisch eng beieinander liegende Konformationen führen gleichermaßen zu einer breiten Verteilung der Transfereffizienz wie ein dynamisches System. Handelt es sich nun um ein dynamisches System und liegt die Bewegung im Zeitbereich von Mikro- bis Millisekunden, ist aufgrund der begrenzten Zeitauflösung der FRET-Auswertung keine eindeutige Differenzierung möglich. Die Auswertung mittels Korrelation bietet die Möglichkeiten zu entscheiden, ob ein dynamisches System vorliegt, oder ob die breite Verteilung aufgrund mehrerer statischer Konformationen verursacht wird. Die Korrelation bietet hierfür eine ausreichende Zeitauflösung. Einziges Problem ist, dass der Zeitbereich in dem Dynamik auftritt, meist vom diffusiven Anteil überlagert wird. Beide Anteile lassen sich trennen, indem der Quotient aus Auto- und Kreuzkorrelation des Donor- und Akzeptorkanals gebildet wird [15, 40]. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.11 dargestellt. Der deutliche Abfall der Kurve, gebildet aus dem Quotienten G_{DD}/G_{DA} ist ein sicherer Hinweis für ein dynamisches System, das heißt einer starken Bewegung von Donor und Akzeptor zueinander.

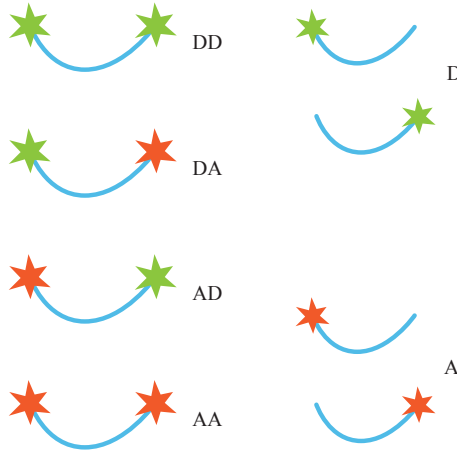


Abb. 2.12: Mögliche Verteilung der Farbstoffe (Donor - grün, Akzeptor - rot) bei statistischer Farbstoffmarkierung.

2.3.2 FRET-Analyse

Wie bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben, ist die Transfereffizienz über die Messung der emittierten Intensitäten von Donor und Akzeptor zugänglich (Gleichung (2.15)). Das Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe entsprechender Filter spektral in Donor- und Akzeptorsignal aufgetrennt. Im Idealfall sollte das zu untersuchende Molekül mit einem Donor und einem Akzeptor markiert sein. Tritt dieser Idealfall nicht ein, wird es schwierig, die Daten direkt über die ermittelten Intensitäten auszuwerten.

Im Folgenden werden kurz mögliche Szenarien aufgeführt und im Anschluss Lösungsansätze gezeigt.

Werden Proben statistisch markiert, sind neben den erwünschten Donor-Akzeptor-markierten Molekülen auch Varianten ohne Donor oder ohne Akzeptor möglich. Entsprechende Kombinationen sind in Abbildung 2.12 dargestellt. Um den Anteil an einfach markierten Proben gering zu halten, wird für die Bindungsreaktion meist mit einem hohen Überschuss an Farbstoff gearbeitet.

Auch bei multichromophoren Systemen, wie sie bei Aggregaten oder Komplexen entstehen können, ergeben sich Kombinationen, die nicht dem Idealfall entsprechen. So sind Varianten mit mehreren Donor- und Akzeptormolekülen möglich, abhängig vom Experiment in verschiedenen Verhältnissen, die wiederum wichtige Erkenntnisse über den Reaktionsverlauf der Aggregation und Komplexbildung liefern können.

Um hier eindeutige Aussagen treffen zu können, wird das stöchiometrische Verhältnis S eingeführt [41]. Dieses gibt das Verhältnis der detektierten Intensitäten der getrennt angeregten Donor- und Akzeptorfarbstoffe an. Werden ausschließlich Donorfarbstoffe detektiert, nimmt S den Wert 1 an; bei ausschließlich Akzeptorfarbstoffen ergibt sich $S = 0$. Werden ein Donor- und ein Akzeptorfarbstoff detektiert, ergibt sich ein Stöchiometriewert von $S = 0,5$.

$$S = \frac{I_{DA} + I_{DD}}{I_{DA} + I_{DD} + I_{AA} + I_{AD}} \quad (2.46)$$

Die Bezeichnung der Intensitäten I_{xy} erfolgt nach dem Schema, dass x die Anregung

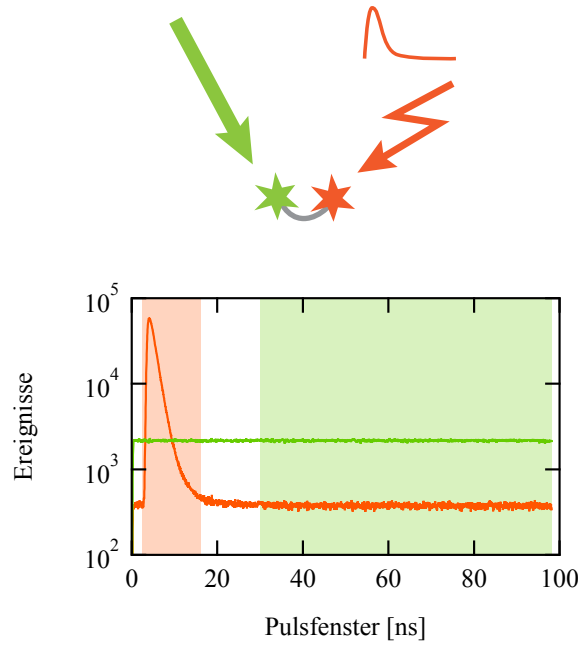


Abb. 2.13: POE - Anregungsschema. Oben: Anregung des Donors mit Dauerstrichlaser (grün) und Anregung des Akzeptors mit gepulstem Laser (rot). Unten: Pulsfenster mit aufsummierten Photonen relativ zum Puls, Bereich reine Donoranregung (grün hinterlegt) und überlagerte Akzeptoranregung (rot hinterlegt).

und y die Detektion von Donor D beziehungsweise Akzeptor A angeben. Eine genauere Erläuterung, vor allem des Anregungsschemas, erfolgt im nächsten Abschnitt.

Pulsed Overlaid Excitation

Um nun die abstandsabhängige Energietransfer-Effizienz und das stöchiometrische Verhältnis eines Farbstoff markierten Moleküls gleichzeitig messen zu können, wird ein spezielles Anregungsschema genutzt. Beim sogenannten POE-Schema (*engl. pulsed overlaid excitation*) wird einem Dauerstrichlaser, der zur reinen Donoranregung genutzt wird, ein gepulster Laser überlagert. Dieser Puls dient der direkten Akzeptoranregung. Das Pulsschema ist in Abbildung 2.13 dargestellt.

Neben der spektralen Trennung in einen Donor- und Akzeptorkanal und den damit detektierten Intensitäten I_D und I_A , bietet sich nun die Möglichkeit, eine zeitliche Selektion der detektierten Photonen vorzunehmen. Wie in Abbildung 2.13 dargestellt, wird für jedes detektierte Photon der zeitliche Abstand zum Puls des zur Akzeptoranregung genutzten Lasers aufgezeichnet. Somit ist durch die Photonenankunftszeit eindeutig festgelegt, ob das jeweils detektierte Photon des Akzeptorkanals direkt oder FRET-vermittelt angeregt wurde. Der Donor wird ausschließlich durch den Dauerstrichlaser angeregt und ist vom gepulsten Laser völlig unabhängig. Die sortierten Photonen werden folgenden Intensitäten zugeordnet:

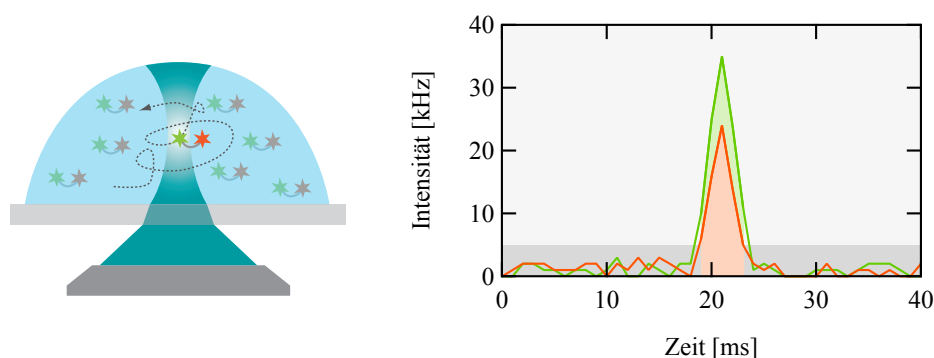


Abb. 2.14: Burstanalyse. Links: Schematische Darstellung frei durch den Fokus diffundierender Moleküle. Rechts: *Burst*, Donorintensität (grün) und Akzeptorintensität (rot), Summenschwelle (grau). Für die *FAMS*-Auswertung wird die Fläche unter dem *Burst* genutzt.

I_{DD}	Donoranregung	Detektion im Donorkanal
I_{DA}	Donoranregung	Detektion im Akzeptorkanal
I_{AA}	Akzeptoranregung	Detektion im Akzeptorkanal
I_{AD}	Akzeptoranregung	Detektion im Donorkanal

Vom Prinzip ähnelt POE den Anregungsschemen ALEX (*engl. Alternating laser excitation*) [41] oder PIE (*engl. Pulsed interleaved excitation*) [42], mit dem Unterschied, dass die Anregung des Donors nicht gepulst und damit klar getrennt vom Akzeptor erfolgt, sondern, dass der Donor permanent mit Hilfe des Dauerstrichlasers angeregt wird. Ein Nachteil ist hier die Überlagerung der Donor-induzierten Anregung mit der direkten Akzeptoranregung. Photophysikalisch bietet die nicht-gepulste Anregung aber klare Vorteile, da bei gepulster Anregung durch die hohen Photonenstromdichten Leiterprozesse auftreten können, die zu reversiblen oder irreversiblen photochemischen Veränderungen führen [43].

Burst Analyse

Wie bereits zu Beginn von Kapitel 2.2.3 diskutiert, werden die Experimente auf Einzelmolekülniveau durchgeführt. Alle Messungen erfolgen hierbei als Lösungsexperimente, das heißt die untersuchten Moleküle sind nicht immobilisiert, sondern können frei in der Lösung diffundieren. Diffundiert ein fluoreszierendes Molekül durch den Fokus, wird ein sogenannter *Burst* detektiert. Jeder *Burst* entspricht einem Schwall an Photonen. Die Selektion eines *Bursts* geschieht, wie in Abbildung 2.14 dargestellt, durch setzen eines Schwellwertes (Summenschwelle) und trennt damit das Signal eindeutig vom Hintergrund. Die Summe der Intensitäten von Donor und Akzeptor muss über dem gewählten Intensitätswert liegen, damit das Signal eindeutig als *Burst* identifiziert wird.

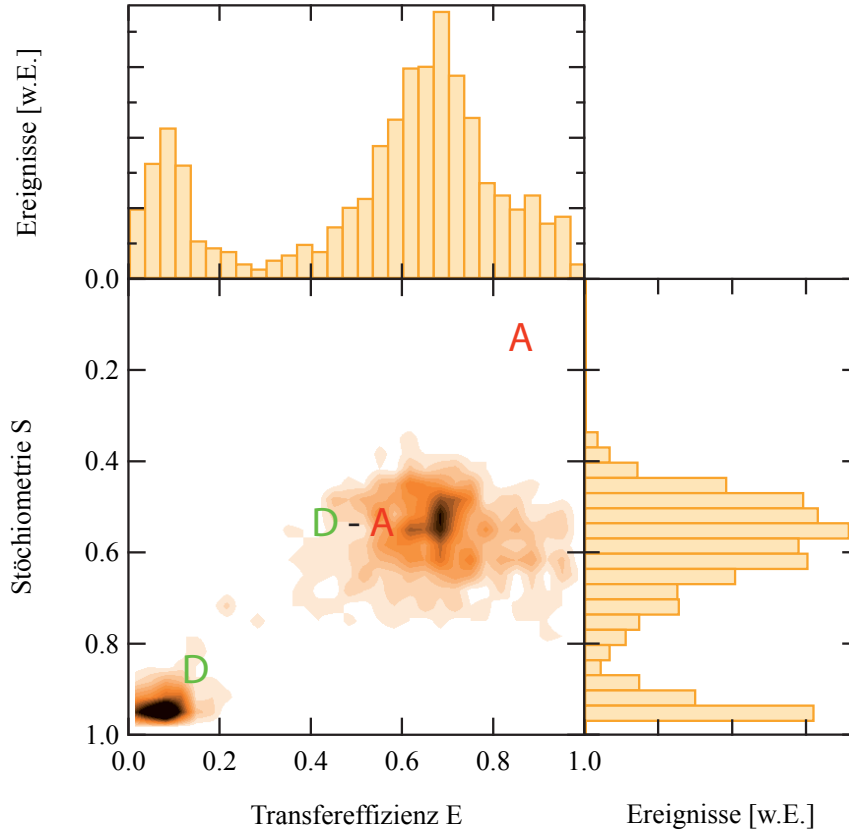


Abb. 2.15: Beispiel eines *FAMS*-Histogramms mit der Projektion der Transfereffizienz und Stöchiometrie ohne gesetzte Akzeptorschwelle. Eingezeichnet sind die Populationen ausschließlich Donor-markierter Moleküle (D), ausschließlich Akzeptor-markierter Moleküle (A) und Moleküle, die beide Farbstoffe tragen (D-A). Probe: *ESAT-6/CFP-10* Komplex.

FAMS-Histogramm

Zur Auswertung werden für jeden *Burst* und damit für jedes einzelne Teilchen eine Wert für die Transfereffizienz E und ein stöchiometrischer Faktor S berechnet. Für die Rechnung wird das Integral jedes *Bursts* bestimmt. Da jeder *Burst* in der Regel genau einem Teilchen entspricht, erhält man so genau einen Wert pro Teilchen.

$$E = \frac{I_{DA}}{I_{DD} + I_{DA}} \quad (2.47)$$

$$S = \frac{I_{DA} + I_{DD}}{I_{DA} + I_{DD} + I_{AA} + I_{AD}} \quad (2.48)$$

Die Einzelereignisse werden aufsummiert und als Histogramme dargestellt. Die zweidimensionale Darstellung der Transfereffizienz- und Stöchiometriewerte wird als *FAMS*-Histogramm (*engl. Fluorescence-aided molecule sorting*) bezeichnet. Dieses bietet die Möglichkeit Subpopulationen mit verschiedenen Farbstoffkombinationen darzustellen. In Abbildung 2.15 ist das Ergebnis einer Messung dargestellt, bei der

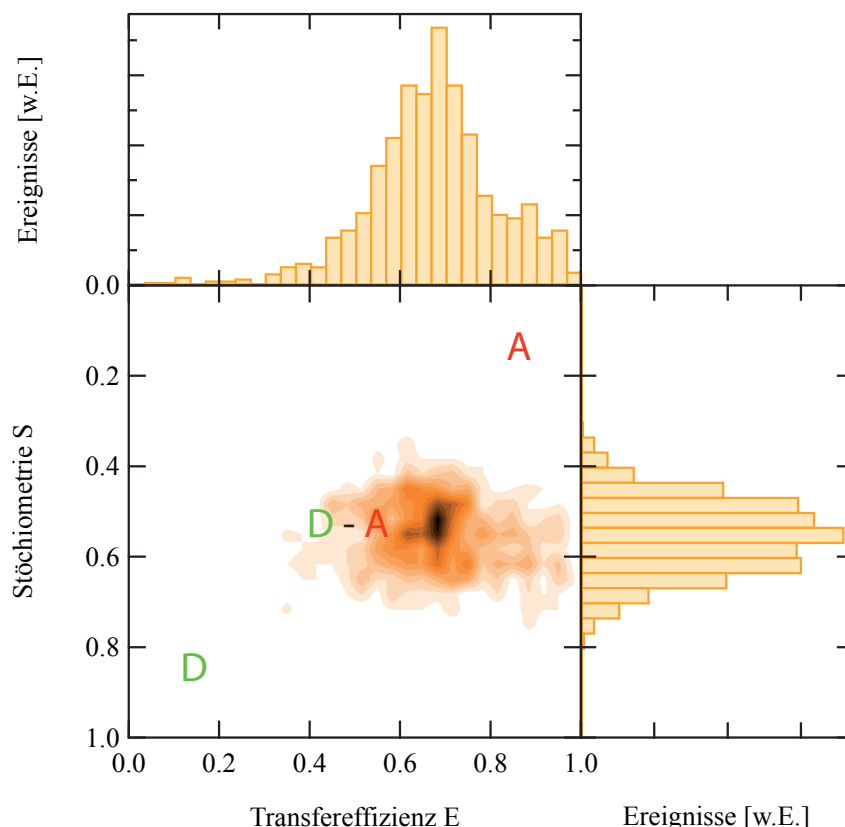


Abb. 2.16: Beispiel eines *FAMS*-Histogramms mit der Projektion der Transfereffizienz und Stöchiometrie mit gesetzter Akzeptorschwelle. Eingezeichnet sind die Populationen ausschließlich donormarkierter Moleküle (D), ausschließlich akzeptormarkierter Moleküle (A) und Moleküle, die beide Farbstoffe tragen (D-A). Probe: *ESAT-6/CFP-10* Komplex.

noch nicht nach den verschiedenen Farbstoffkombinationen sortiert ist. Moleküle, die ausschließlich Donor-markiert sind, liefern einen Stöchiometriewert von $S = 1$, da die direkte Akzeptoranregung ohne Akzeptor kein Signal liefert. Die Transfereffizienz liegt in diesem Fall nahe Null. Aufgrund von *Crosstalk* werden jedoch auch minimal größere Werte ermittelt, da der Donor spektral oft noch zu einem geringen Anteil im Akzeptorkanal beiträgt. Sind die Moleküle ausschließlich Akzeptor-markiert, ergibt sich ein Stöchiometriewert von $S = 0$, da die direkte Donoranregung kein Signal liefert. Im Histogramm taucht diese Population nicht auf, da aufgrund des Auswahlkriteriums ausschließlich Ereignisse in die Auswertung eingehen, die während der direkten Donoranregung ein Signal liefern, siehe Abbildung 2.13. Sind die Moleküle mit beiden Farbstoffen, Donor und Akzeptor, markiert, ergeben sich Stöchiometriewerte um $S = 0,5$.

Für die Auswertung der Transfereffizienz sind im Allgemeinen ausschließlich Moleküle von Interesse, welche mit Donor und Akzeptor markiert sind. Die Population ausschließlich Akzeptor-markierter Moleküle wird aufgrund des Auswerteschemas (POE) eliminiert und die Population der ausschließlich Donor-markierten Moleküle wird durch das Setzen einer Akzeptorschwelle aussortiert. Das heißt es gehen nur Ereignisse in die Auswertung ein, welche aufgrund der direkten Akzeptoranregung

2 Grundlagen

ein ausreichend hohes Signal im Akzeptorkanal liefern, als Nachweis, dass das Molekül mit Donor und Akzeptor markiert ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.16 dargestellt.

3 Molekulardynamische Simulation

Molekulardynamische (MD) Simulationen sind Computersimulationen zur Modellierung komplexer, molekularer, meist biologischer Systeme. Ziel der molekulardynamischen Simulationen ist es, die makroskopischen Größen des jeweiligen Systems berechnen zu können. Sie dienen dabei zur Interpretation oder Vorhersage von experimentellen Ergebnissen des untersuchten Systems. Die zugänglichen Messgrößen sind hierbei sowohl strukturelle als auch thermodynamische Größen. So lassen sich zum Beispiel Aussagen über Proteinstrukturen, Proteindynamik, Bindungsenergien und Protein-Faltungsreaktionen treffen.

Um die Wechselwirkung zwischen Atomen und Molekülen zu beschreiben, werden für die Modellierung Kraftfelder genutzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) verwendet [18]. GROMACS ist ein Softwarepaket für molekulardynamische Simulationen, das an der Universität Groningen in den Niederlanden entwickelt wurde. Der Vorteil von GROMACS gegenüber anderen Simulationsprogrammen liegt in seiner Schnelligkeit und Flexibilität. So bietet der in der Programmiersprache C geschriebene Algorithmus die Verwendung verschiedener bereits vorgegebener und für die Problemstellung optimierte Kraftfelder und dabei eine hohe Effizienz zur schnellen Berechnung der Trajektorien der einzelnen Atome des Systems [44].

Zur Ausgabe und Darstellung der Strukturen wird PyMOL verwendet [45].

3.1 Grundprinzip

Das Grundprinzip der MD Simulation beruht darauf, dass mittels statistischer Mechanik und Lösung der Newton'schen Bewegungsgleichungen auf atomarem Niveau, die Dynamik von komplexen, molekularen Systemen, wie zum Beispiel Proteinen, beschrieben wird. Am Ende sollen dabei Trajektorien für die einzelnen Atome und Energien des Systems über einen möglichst langen Zeitbereich hinweg berechnet werden. Die MD Simulation beruht im Wesentlichen auf den folgenden drei Näherungen [46].

3.1.1 Born-Oppenheimer-Näherung

Die Born-Oppenheimer-Näherung bietet die Möglichkeit, die Schrödinger-Gleichung für ein System aus mehreren Atomkernen und mindestens einem Elektron analytisch zu lösen. Das Ziel für die MD Simulation ist hierbei die Separation in eine zeitunabhängige elektronische Bewegung und eine zeitabhängige Kernbewegung. Nach Max Born und J. Robert Oppenheim ist eine Separation dann möglich, wenn die Beweglichkeit der Atomkerne klein ist im Vergleich zu den Elektronen. Diese Annahme ist aufgrund des Massenunterschiedes erfüllt [47].

Die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung beschreibt die zeitliche Entwicklung eines quantenmechanischen Systems:

$$\mathcal{H}\Psi = i\hbar \frac{\delta\Psi}{\delta t} . \quad (3.1)$$

Der Hamilton-Operator $\mathcal{H}$ beschreibt die Summe der potentiellen und kinetischen Energien. Die Wellenfunktion Ψ enthält die Informationen über alle Teilchen des Systems.

Unter den gegebenen Bedingungen kann ψ als das Produkt der zeitabhängigen Wellenfunktion der Atomkerne Ψ_n und der zeitunabhängigen Wellenfunktion der Elektronen Ψ_e geschrieben werden:

$$\Psi(\vec{R}, \vec{r}, t) = \Psi_n(\vec{R}, t) \Psi_e(\vec{r}, \vec{R}) . \quad (3.2)$$

$\vec{R} = (\vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_N)$ und $\vec{r} = (\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_K)$ sind die Koordinaten von N Atomkernen und K Elektronen.

Die Elektronen sind unabhängig von der Geschwindigkeit der Kernbewegung. Die Schrödinger-Gleichung für das elektronische System ergibt sich bei festem $\vec{R}$ zu:

$$\mathcal{H}_e(\vec{R}) \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) = E_e(\vec{R}) \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) . \quad (3.3)$$

Unter den gegebenen Annahmen ergibt sich die Schrödinger-Gleichung zur Beschreibung der Atomkerne zu:

$$(T_n + E_e(\vec{R})) \Psi_n(\vec{R}, t) = i\hbar \frac{\delta\Psi_n(\vec{R}, t)}{\delta t} . \quad (3.4)$$

T_n ist die kinetische Energie der Kerne. $E_e(\vec{R})$ sind die Energieeigenwerte der Elektronen. Zur Herleitung und für weitere Details sei auf entsprechende Literatur verwiesen [48, 49, 50].

Der limitierende Faktor für MD Simulationen ist die Anzahl der Atome und damit die Größe des Systems. Typische Simulationen an Proteinen beinhalten mehrere tausend Atome. Die Lösung der zeitabhängigen Schrödingergleichung wäre in diesen Fällen viel zu zeitaufwändig, weshalb dazu übergegangen wird quantenmechanische Systeme mit klassischer Physik zu beschreiben.

3.1.2 Klassische Dynamik

Nach dem Ehrenfest-Theorem lassen sich Atomkerne wie klassische Teilchen beschreiben. Die potentielle Energie der Teilchen $V(\vec{R})$ entspricht in diesem Fall den Energieeigenwerten des Grundzustandes $E_e^0(\vec{R})$ aus Gleichung 3.3 [51].

$$\vec{F}_i = - \frac{\delta V(\vec{R})}{\delta \vec{R}_i} \quad (3.5)$$

Für jedes Atom des Systems lassen sich nun mithilfe des 2. Newton'schen Axioms Bewegungsgleichungen aufstellen:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i \quad (3.6)$$

$$\vec{F}_i = m_i \frac{\delta^2 \vec{R}_i}{\delta^2 t} \quad (3.7)$$

und die Koordinaten und Geschwindigkeiten für den jeweiligen Zeitschritt berechnen:

$$\vec{R}_i(t + \Delta t) = \vec{R}_i(t) + \vec{v}_i(t) \Delta t \quad (3.8)$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i(t) + \vec{a}_i(t) \Delta t . \quad (3.9)$$

Die Vektoren $\vec{F}_i$, $\vec{R}_i$ und $\vec{v}_i$ entsprechen den kartesischen Koordinaten der Kraft, Position und Geschwindigkeit jedes einzelnen Atoms des Systems. Die typische Zeitauflösung für jeden Rechenschritt der Simulation Δt liegt bei 2 fs. Effektiv sind somit Millionen von Rechenschritten notwendig, um Simulationszeiten im Nano- oder sogar Mikrosekundenbereich zu erreichen.

Der zeitintensivste Teil der Rechnung ist die Lösung der Schrödinger-Gleichung des elektronischen Systems, der aber erforderlich ist, da für die MD Simulation die potentielle Energie $V(\vec{R})$ benötigt wird, um die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Atomen des Systems beschreiben zu können. Es werden deshalb empirische Potentiale genutzt, die dazu beitragen, die Rechenzeit auch für große Systeme zu reduzieren.

3.1.3 Kraftfelder und Potentialfunktionen

Das Kraftfeld $V(\vec{R})$ ist ein Synonym für die potentielle Energie eines molekularen Systems. So besteht die Möglichkeit, für die MD Simulation abhängig von der Problemstellung verschiedene optimierte Kraftfelder auszuwählen. Typischerweise werden ein bindender und ein nicht-bindender Energieterm unterschieden. Der bindende Term setzt sich aus folgenden Termen zusammen:

1. Variation der Bindungslänge - Wechselwirkung von jeweils zwei gebundenen Atomen, beschrieben durch V_{bond} (Abbildung 3.1).



Abb. 3.1: Variation der Bindungslänge.

2. Variation der Bindungswinkel - Wechselwirkung von jeweils drei aufeinanderfolgenden gebundenen Atomen, beschrieben durch V_{angle} (Abbildung 3.2).

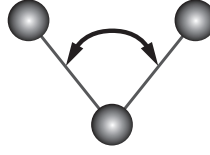


Abb. 3.2: Variation der Bindungswinkel.

3. Variation der Diederwinkel - festgelegt durch jeweils vier aufeinanderfolgende gebundene Atome, beschrieben durch $V_{torsion}$ (Abbildung 3.3).

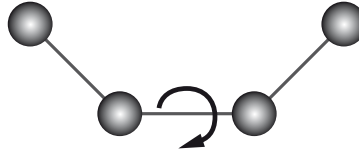


Abb. 3.3: Variation der Diederwinkel.

Wechselwirkungen, die über vier Atome hinausgehen, werden durch den nicht-bindenden Term beschrieben, der sich aus einem elektrostatischen Teil $V_{coulomb}$ und einem van-der-Waals Teil V_{vdW} zusammensetzt.

Werden alle Terme zusammengefasst, ergibt sich folgendes Potential:

$$V(\vec{R}) = V_{bond} + V_{angle} + V_{torsion} + V_{vdW} + V_{coulomb} \quad (3.10)$$

$$\begin{aligned} &= \sum_{bonds} \frac{k_b}{2} (l - l_{eq})^2 \\ &+ \sum_{angles} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_{eq})^2 \\ &+ \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n \Phi - \delta)) \\ &+ \sum_{pairs\ i,j} \left(4 \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4 \pi \varepsilon_0 R_{ij}} \right) . \end{aligned} \quad (3.11)$$

Für die Bindungen und Bindungswinkel werden harmonische Potentiale genutzt. l und θ entsprechen den aktuellen Bindungslängen und -winkeln, l_{eq} und θ_{eq} den beiden Gleichgewichtszuständen. Bei den Diederwinkeln ist Φ der Torsionswinkel und δ die Phase. Die Vorfaktoren k_b , k_θ und V_n variieren abhängig vom verwendeten Kraftfeld. So gibt es verschiedenste für bestimmte Anwendungen optimierte Kraftfelder.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das OPLS Kraftfeld (*engl.: Optimized potential for liquid simulations*) genutzt, welches Ende der 80er Jahre von William L. Jorgensen entwickelt wurde, mit dem Ziel, ein speziell für Simulationen an Proteinen passendes Kraftfeld zur Verfügung zu haben [52].

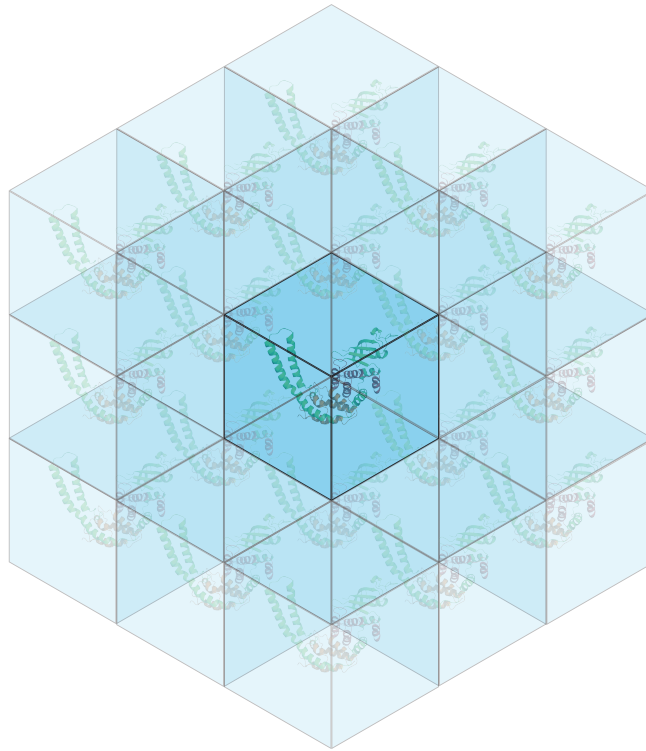


Abb. 3.4: Umsetzung der periodischen Randbedingungen. Simulationsbox (dunkelblau). Kopien (hellblau).

3.2 Periodische Randbedingungen

Die periodischen Randbedingungen (*engl.: Periodic boundary conditions*) werden genutzt, um bei großen Systemen den Rechenaufwand möglichst gering zu halten. Hierbei befindet sich das Protein in einer mit Wasser gefüllten Box. Sobald das Protein die Box auf einer Seite verlässt, taucht es auf der gegenüberliegenden Seite mit der gleichen Geschwindigkeit wieder auf. Der Vorteil ist, dass die Größe des simulierten Systems möglichst klein gehalten wird und trotzdem Randeffekte, die aufgrund der Wechselwirkung des Proteins mit der Wand auftreten können, vermieden werden [18]. Die Umsetzung ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die ursprüngliche Simulationsbox wird von 26 absolut identischen Kopien umgeben. Anzahl und Position der Atome sind in jeder Box gleich.

3.3 Nicht-bindende Wechselwirkungen

Die Berechnung der nicht-bindenden Wechselwirkungen hat einen großen Einfluss auf die Rechenzeit.

Um den Rechenaufwand für die elektrostatischen Wechselwirkungen zu reduzieren, wird der PME-Algorithmus (*engl.: Particle Mesh Ewald*) verwendet. Dazu wird das Coulombpotential $V_{coulomb}$ in einen kurzreichweitigen V_{sr} und einen langreichweitigen Term V_{lr} separiert. Mit V_{sr} wird im Realraum gerechnet, wohingegen bei V_{lr} versucht wird, durch schnelle Fouriertransformationen die Rechnung im reziproken

Raum schnell konvergieren zu lassen, und damit die Rechenzeit zu minimieren [53]. Für die Rechnung der van-der-Waals Wechselwirkung wird ausgenutzt, dass das Lennard-Jones-Potential mit zunehmendem Abstand stark abnimmt. Aufgrund dieser R^{-6} -Abhängigkeit wird bei Abständen zwischen 1,0 und 1,4 nm ein Schnittpunkt (*engl.: Cut-Off*) eingeführt, das heißt bei Atomen, die außerhalb dieser Grenze liegen, ist das Wechselwirkungspotential gleich Null.

3.4 Druck und Temperatur

Die Temperatur des Systems wird durch die kinetische Energie der Atome des Systems bestimmt. Diese unterliegt während der MD Simulation permanenten Schwankungen. Um das System im Gleichgewicht und damit bei konstanter Temperatur zu halten, nutzt man den Berendsen-Algorithmus. Hierbei wird das System an ein externes Temperaturbad mit konstanter Temperatur T_0 gekoppelt. Die Änderung der Temperatur T mit der Zeitkonstanten τ_T lässt sich folgendermaßen beschreiben [54]:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_T} (T_0 - T(t)) . \quad (3.12)$$

Analog zur Temperatur nutzt man den gleichen Algorithmus, um die Druckschwankungen im System auszugleichen. Auch hier wird das System an einen Referenzdruck P_0 mit der Zeitkonstanten τ_P gekoppelt:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_P} (P_0 - P(t)) . \quad (3.13)$$

4 Material und Methoden

4.1 Experimenteller Aufbau

4.1.1 Konfokales Mikroskop

Die Grundlagen zur konfokalen Mikroskopie und die prinzipielle Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops wurden bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Die experimentelle Umsetzung erfolgt mit einem in der Arbeitsgruppe konstruierten Mikroskop. Der grundlegende Aufbau ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Anregung

Abhängig vom Experiment und den damit verwendeten Farbstoffen werden für die Anregung verschiedene Laserlinien verwendet. Als Dauerstrichlaser sind ein frequenzverdoppelter Diodenlaser (Spectra Physics Cyan, Newport Corp., Irvine, USA) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$ und ein Helium-Neon-Laser (1677P, JDSU, Milpitas, USA) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 594 \text{ nm}$ im Einsatz. Bei den gepulsten Lasern handelt es sich um Diodenlaser mit den Wellenlängen $\lambda = 635 \text{ nm}$ (LDH-P-C-635, Picoquant, Berlin, Deutschland) und $\lambda = 670 \text{ nm}$ (LDH-P-670, Picoquant, Berlin, Deutschland). Die Laser werden mit den dichroitischen Strahlteilern 520DCXR, 600DCXR und 640DCXR (Chroma Technology, Bellows Falls, USA), die auf die Laserlinien abgestimmt sind, überlagert und in eine Einzelmodenfaser (SMC-460, Schäfter und Kirchhoff, Hamburg, Deutschland) eingekoppelt. Der Ausgang der Faser entspricht einer Punktlichtquelle. Zum Einstellen der Polarisation des Lichts werden in Kombination mit der Faser ein $\lambda/2$ - und ein $\lambda/4$ -Verzögerungsplättchen (Melles Griot, Bensheim, Deutschland) verwendet.

Um einen parallelen Strahlengang zu erzeugen, wird nach dem Faserausgang ein apochromatisches Objektiv (Uplan-Apo 4x 0,16, Olympus, Tokio, Japan) positioniert. Der Faserausgang als Punktlichtquelle steht exakt im Brennpunkt des Objektivs und erzeugt so einen perfekten parallelen Strahlengang, der sich mittels eines Interferometers (Shear-Plate, Melles Griot, Bensheim, Deutschland) justieren lässt. Der Strahldurchmesser wird anhand einer Lochblende eingestellt.

Der verwendete dichroitische Strahlteiler wird abhängig vom Experiment und den damit verwendeten Lasern ausgewählt. Zur Verfügung stehen ein Z-405-470-633 (AHF, Analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) und ein ZT-594-680RPC (Chroma Technology, Bellows Falls, USA). Die Spektren sind in Kapitel 4.2.2 dargestellt. In Anschluss an den Dichroiten befindet sich ein telezentrisches Linsensystem, bestehend aus zwei Tubuslinsen mit der Brennweite $f = 20 \text{ cm}$ (Nikon, Japan). In der Fokusebene zwischen den Linsen ist eine Lochblende (Thorlabs, Newton, NJ, USA) positioniert.

Als Objektiv dient ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer hohen Numerischen Apertur von $NA = 1,2$ (CFI Plan Apochromat 60x 1,2 WI, Nikon, Japan). Zusätzlich befinden sich direkt vor dem Objektiv ein Leistungsmessgerät (818-SL, Newport

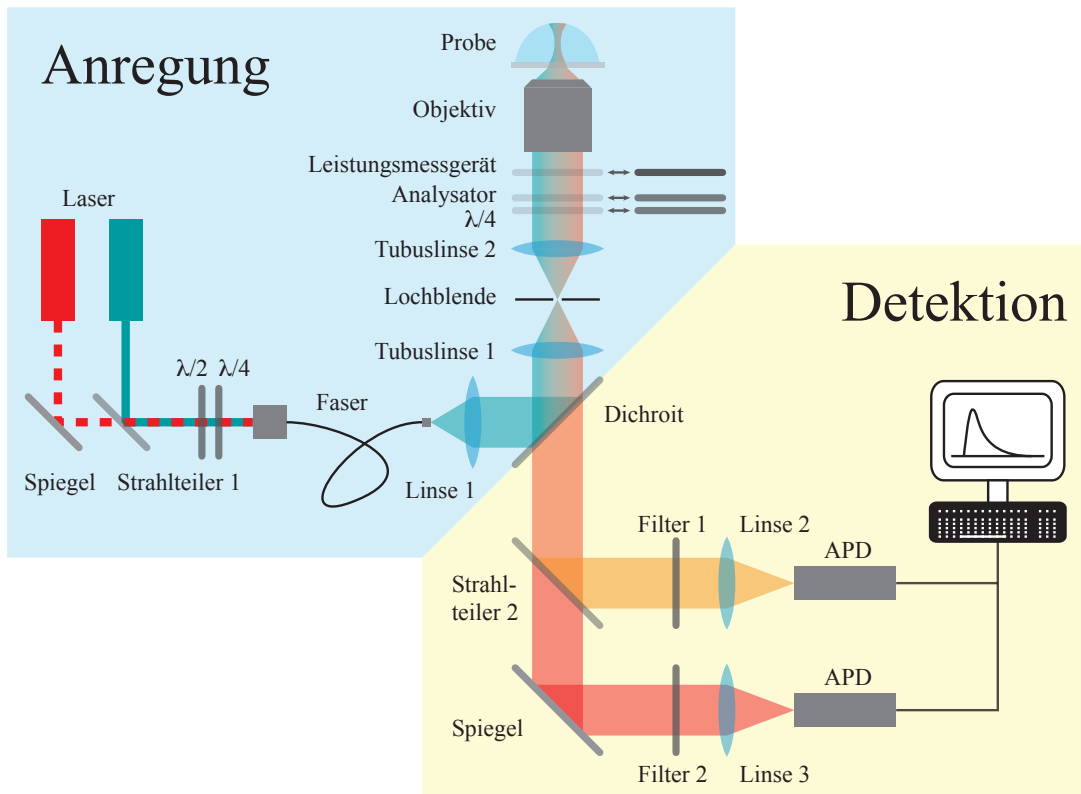


Abb. 4.1: Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Der Strahlengang der Anregung ist blau und der Detektion gelb hinterlegt. Die einzelnen Bauteile werden im Text erläutert.

Corp., Irvine, USA), ein $\lambda/4$ -Verzögerungsplättchen und ein Analysator (Melles Griot, Bensheim Deutschland), um die Leistung bzw. die Polarisation des Anregungslichtes zu bestimmen. Diese lassen sich bei Bedarf im Strahlengang positionieren und während der eigentlichen Messung wieder herausnehmen.

Detektion

Im Detektionsstrahlengang werden abhängig vom Experiment, verschiedene Filter genutzt, damit das Emissionslicht der Farbstoffe ihren Wellenlängen entsprechend aufgetrennt und detektiert werden kann. Donor- und Akzeptorsignal werden mittels Langpassfiltern, BS640DCXR und BS700DCXR (Chroma Technology, Bellows Falls, USA), aufgetrennt. Um Streulicht aus der Anregung, Reflektionen und Emissionslicht spektral benachbarter Farbstoffe einzuschränken, werden zusätzlich auf den jeweiligen Farbstoff abgestimmte Bandpassfilter, HQ525/50, HQ685/70 und HQ620/40, oder Langpassfilter HQ700LP (Chroma Technology, Bellows Falls, USA) eingesetzt.

Die entsprechenden Spektren in Kombination mit den verwendeten Farbstoffen sind ebenfalls in Kapitel 4.2.2 dargestellt.

Unter Verwendung achromatischer Linsen der Brennweite $f = 50\text{ cm}$ wird das Fluoreszenzlicht auf die Detektoren fokussiert. Die punktförmige Detektionsfläche der verwendeten Avalanche-Photodioden (APD) (SPCM-AQR 14, PerkinElmer Op-

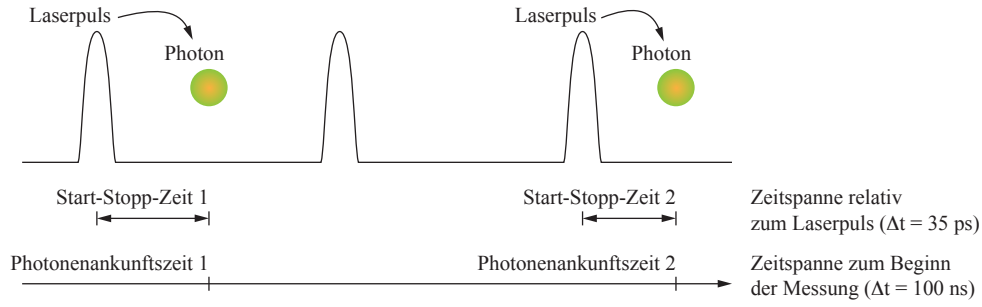


Abb. 4.2: Prinzip des tttr-Modus [55].

toelectronics, Wiesbaden, Deutschland) hat einen Durchmesser von $d = 175 \mu\text{m}$. Die Detektorfläche entspricht einer Lochblende von 3 bis 4 Airy und erfüllt ebenfalls die Funktion, Streulicht, das nicht aus der Fokusebene kommt, herauszufiltern. Essentielle Eigenschaften der genutzten APD sind eine hohe Quanteneffizienz $Q_{\text{max}} = 65 \%$, eine geringe Totzeit $t_{\text{tot}} = 50 \text{ ns}$ und eine niedrige Dunkelzählrate $r_{\text{dark}} = 100 \text{ Photonen/s}$.

Elektronik

Das Signal der APD wird von einer Zählkarte weiterverarbeitet. Die verwendete Elektronik Timeharp 200 (Picoquant GmbH, Berlin, Deutschland) schreibt die detektierten Photonen im tttr-Modus (*engl.: time-tagged-time-resolved*) kontinuierlich in eine Datei. Gespeichert werden hierbei die Kanalnummer des Detektors, die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Messung und der Detektion des Photons mit einer Zeitauflösung von $\Delta t = 100 \text{ ns}$ (*time-tagged*) und die Zeitspanne relativ zum Laserpuls mit einer Zeitauflösung von $\Delta t = 35 \text{ ps}$ (TCSPC). Das zum Laserpuls zeitlich korrelierte Detektieren einzelner Photonen (*TCSPC, engl.: time-correlated single photon counting*) bietet zum Beispiel die Möglichkeit, aufgrund der sehr hohen Zeitauflösung die Lebenszeit der Farbstoffe zu bestimmen.

Wesentlich bestimmender für diese Arbeit ist jedoch, dass sich die Photonen damit nach dem in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Schema sortieren lassen. Auf diese Weise lässt sich zu jedem einzelnen detektierten Molekül das Verhältnis von Donor- zu Akzeptorfarbstoffen bestimmen. Dies ist essentiell für die weitere FRET-Auswertung ist.

Probentisch

Direkt über dem Objektiv befindet sich der Probentisch, der die Möglichkeit bietet, das darauf fixierte Deckglas in alle Richtungen mit hoher räumlicher Auflösung Δx zu bewegen. In einem Bereich von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ ist es möglich, die Probe zu rastern oder statisch zu justieren. Die hohe Präzision und Auflösung wird durch die Verwendung von Piezoelementen erreicht, X-Y-Ebene (P-733.2CL, $\Delta x = 0,3 \text{ nm}$, Physik-Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) und optische Achse (Z-Achse) (PiFoc P-721.CLQ, $\Delta x = 0,7 \text{ nm}$, Physik-Instrumente, Karlsruhe, Deutschland).

4.1.2 Messkammer

Alle Messungen werden als Lösungsexperiment durchgeführt. Hierfür wird die im Puffer gelöste Probe als Tropfen ($5..10 \mu\text{l}$) auf ein Deckglas gegeben. Die Deckgläser

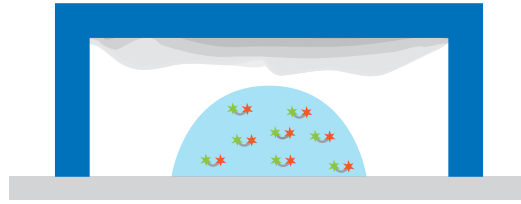


Abb. 4.3: Aufbau der Messkammer.

(22 x 22 μl , Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) werden zuvor für 2 h auf eine Temperatur von $T = 500^\circ\text{C}$ erhitzt, um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wird das Deckglas mit PMMA (Polymethylmethacrylat) beschichtet, um Wechselwirkung der Probe mit der geladenen Glasoberfläche zu verhindern. Zusätzlich wird ein Lack als Barrierefilm (Rotilab Liquid Barrier Marker, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen, um ein Breitlaufen des Tropfens zu verhindern.

Um bei langen Messungen ein Verdunsten der Probe zu verhindern, wird eine Feuchtkammer verwendet. Hierfür wird mit Hilfe eines mit Wasser getränkten Zellstofftuchs die Luftfeuchte in der Kammer über Stunden hinweg gesättigt und ermöglicht somit sehr lange Messungen, dargestellt in Abbildung 4.3.

Wenn bei hohen Salzkonzentrationen im Puffer oder bei hohen Temperaturen gemessen wird, wird eine spezielle und aufwendiger zu präparierende Probenkammer (25 μl , *GeneFrame* 1 x 1 cm, AB-0576, Thermo Scientific, MA, USA) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein selbstklebendes Silikonpad, das zusammen mit einem PMMA beschichteten Deckglas als Probenträger und einer PMMA-Folie als Abschluss eine Kammer bildet. Die Probe ist dabei vollständig gekapselt. Es wird dadurch osmotisches Anschwellen des Tropfens bei hohen Salzkonzentrationen oder schnelles Verdunsten des Tropfens aufgrund hoher Temperaturen verhindert. Zusätzlich muss für die temperaturabhängigen Messungen der Puffer entgast werden, um Blasenbildung beim Erhitzen zu vermeiden.

4.1.3 Temperiereinheit

Um temperaturabhängig Einzelmolekülmessungen realisieren zu können, wurde ein für den verwendeten Probenstisch passender Aufbau konstruiert. Die Probe und das

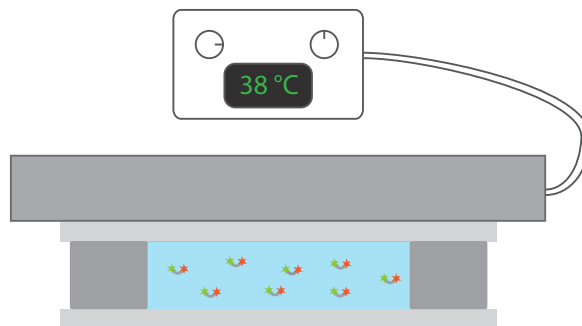


Abb. 4.4: Aufbau der Temperiereinheit mit gekapselter Probenkammer.

Heizelement müssen thermisch vom Tisch entkoppelt werden. Der Aufsatz wurde deshalb aus Polyetheretherketon (PEEK) gefertigt. Bei PEEK handelt es sich um einen gut zu bearbeitenden Kunststoff, dessen herausragenden Eigenschaften die niedrige Wärmeleitfähigkeit und die im Vergleich zu anderen Kunststoffen geringe Wärmeausdehnung sind.

Das eigentliche Heizelement besteht aus einer Aluminiumplatte mit integriertem Thermoelement (Temperaturfühler). Zum Heizen wird ein Widerstand verwendet, dessen Heizleistung über ein Steuergerät (Modell 5320, Drews Electronic GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland) eingestellt wird.

4.2 Experimentelle Durchführung

4.2.1 Probenpräparation

Die kompletten Messungen werden als Lösungsexperimente durchgeführt. Hierfür werden die Proben in den entsprechenden Puffern verdünnt. Die Messungen erfolgen in den in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Messkammern.

Probenpuffer 1:

- Natriumphosphat $c = 50 \text{ mM}$
- Natriumchlorid $c = 100 \text{ mM}$
- $pH = 7,0$

Probenpuffer 2:

- Natriumbicarbonat $c = 100 \text{ mM}$
- Natriumchlorid $c = 100 \text{ mM}$
- $pH = 8,0$

Zusätzlich zur Beschichtung der Deckgläser wird Tween20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Volumenanteil von 0,001 % zum Puffer hinzugegeben. Das Detergenz soll ebenfalls eine Wechselwirkung der Probe mit dem Deckglas unterbinden.

Für die Entfaltungsreihen wird das Denaturierungsmittel Guanidiniumchlorid (Gdm-Cl), BioUltra 8M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Die entsprechenden Konzentrationen von 0 bis 6 M werden durch Verdünnen mit dem Probenpuffer eingestellt.

Farbstoffmarkierung

Für alle Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, war es notwendig, die Proteinproben fluoreszent zu markieren. Die verwendeten Farbstoffe, im Folgenden kurz vorgestellt (Abbildung 4.5 bis 4.10), wurden entweder einzeln oder als FRET-Paar (Donor- und Akzeptorfarbstoff) in verschiedenen Kombinationen verwendet. Abhängig von der Anwendung können so, aufgrund der verschiedenen Försterradien, unterschiedliche Abstände untersucht werden. Die verwendeten *AlexaFluor*- (Molecular Probes, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und *Atto*-Farbstoffe (Atto-Tec, Siegen, Deutschland) zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie neben einer hohen Quantenausbeute und Photostabilität eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen und ihre Fluoreszenzeigenschaften zumeist vom pH-Wert unabhängig sind. Dies ist essentiell für die Arbeit mit biologischen Proben. Details zu Spektren, Försterradien, verwendeten Filtern, usw. werden im folgenden Kapitel 4.2.2 zusammengefasst. Im Anschluss werden kurz die beiden verwendeten Methoden zur Farbstoffmarkierung vorgestellt.

4.2 Experimentelle Durchführung

AlexaFluor488

Absorptionsmaximum λ_{abs}	494 nm
Emissionsmaximum λ_{em}	519 nm
Extinktionskoeffizient ϵ	$73\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
Quanteneffizienz Q	0,92

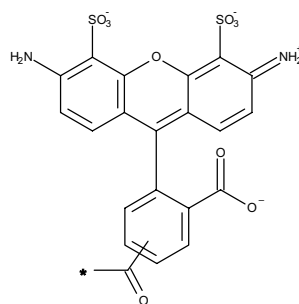


Abb. 4.5: Strukturformel von *AlexaFluor488*.

AlexaFluor594

Absorptionsmaximum λ_{abs}	590 nm
Emissionsmaximum λ_{em}	617 nm
Extinktionskoeffizient ϵ	$92\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
Quanteneffizienz Q	0,66

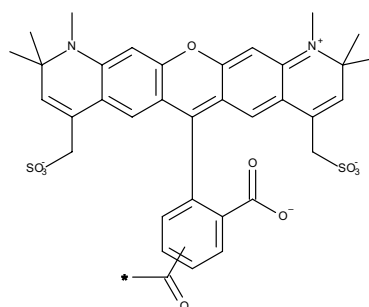


Abb. 4.6: Strukturformel von *AlexaFluor594*.

AlexaFluor633

Absorptionsmaximum λ_{abs}	622 nm
Emissionsmaximum λ_{em}	640 nm
Extinktionskoeffizient ϵ	$143\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
Quanteneffizienz Q	0,5

Abb. 4.7: Strukturformel nicht publiziert.

AlexaFluor647

Absorptionsmaximum λ_{abs}	651 nm
Emissionsmaximum λ_{em}	672 nm
Extinktionskoeffizient ϵ	$270\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
Quanteneffizienz Q	0,33

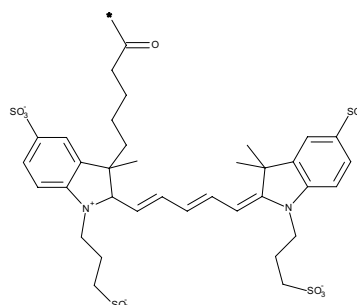


Abb. 4.8: Strukturformel von *AlexaFluor647*.

Atto647N

Absorptionsmaximum λ_{abs}	644 nm
Emissionsmaximum λ_{em}	669 nm
Extinktionskoeffizient ϵ	$150\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
Quanteneffizienz Q	0,65

Abb. 4.9: Strukturformel
nicht publiziert.

Atto680

Absorptionsmaximum λ_{abs}	680 nm
Emissionsmaximum λ_{em}	700 nm
Extinktionskoeffizient ϵ	$125\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
Quanteneffizienz Q	0,36

Abb. 4.10: Strukturformel
nicht publiziert.

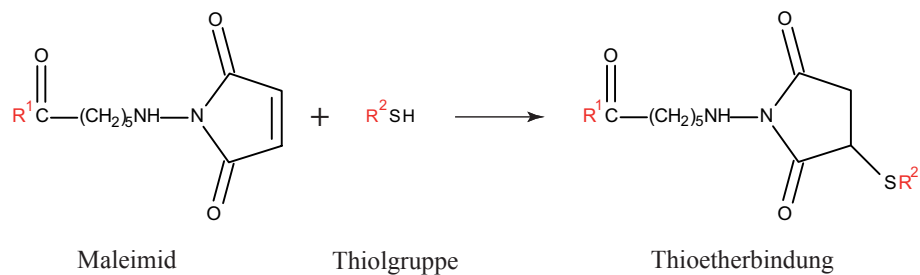


Abb. 4.11: Markierung über Thioetherbindung. Farbstoff R^1 mit dem Maleimid als Bindungspartner und Protein R^2 mit der Thiolgruppe des Cysteins als Bindungspartner. Die Bindung des Farbstoffs erfolgt unter Ausbildung einer Thioetherbindung.

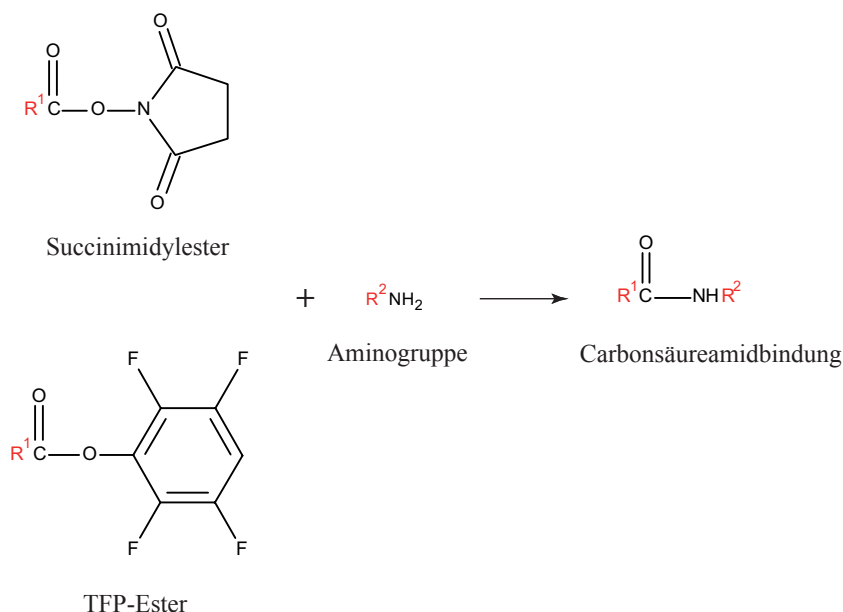


Abb. 4.12: Markierung über Amidbindung. Farbstoff R¹ mit den beiden Bindungspartnern, Succinimidyl- oder Tetrafluorophenylester und Protein R² mit der Aminogruppe. Die Bindung des Farbstoffs erfolgt unter Ausbildung einer Carbonsäureamidbindung.

Für die Farbstoffmarkierung der verwendeten Proteine wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die Farbstoffe spezifisch an das Protein zu binden.

Markierung über Thioetherbindung

Eine Möglichkeit besteht darin, den Farbstoff über eine Thioetherbindung an ein Cystein zu binden. Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, geht die Thiolgruppe des Cysteins dabei eine Bindung mit dem Maleimid des Farbstoffs ein. Der große Vorteil liegt hierbei darin, dass Proteine sich so für spezielle Anwendungen spezifisch an vorher gewählten Positionen fluoreszent markieren lassen. Einerseits lassen sich durch Mutationen einzelne Aminosäuren gegen ein Cystein austauschen, andererseits können günstig liegende, nativ vorkommende Cysteine für die Fluoreszenzmarkierung genutzt werden. Gegebenenfalls ist es erforderlich, Cysteine, die an ungeeigneten Positionen liegen, durch Mutationen zu entfernen.

Markierung über Amidbindung

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Farbstoff über eine Amidbindung an die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure zu binden. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, werden die Farbstoffe vom Hersteller mit zwei verschiedenen Bindungspartnern bereitgestellt, als Succinimidylester oder Tetrafluorophenylester (TFP-Ester). Beide bilden mit der Aminogruppe eine stabile Carbonsäureamidbindung. Der TFP-Ester bietet den Vorteil, dass er wesentlich resistenter gegenüber unspezifischer Hydrolyse ist, als der Succinimidylester. Bisher ist aber ausschließlich *AlexaFluor488* mit TFP-Ester lieferbar.

4.2.2 Allgemeine Messparameter

Für die Experimente werden unterschiedliche Farbstoffkombinationen verwendet. Verschiedene Kombinationen bieten aufgrund unterschiedlicher Försterradien die Möglichkeit, verschiedene Abstände zu untersuchen. Die verwendeten FRET-Paare werden nachstehend kurz vorgestellt, sowie die für die jeweiligen Experimente verwendeten Messparameter, wie Filter, Laser usw. Der Messaufbau entspricht im Wesentlichen dem in Kapitel 4.1.1 vorgestellten, konfokalen Mikroskop. Die Försterradien bestimmen sich nach Gleichung 2.12:

$$R_0 = 0,211 \left(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda) \right)^{\frac{1}{6}} \text{ (in \AA)}. \quad (4.1)$$

Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ (Gleichung 2.11) wird aus dem Überlappungsbereich des Emissionsspektrums des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors berechnet. Die Quanteneffizienz des Donors Q_D wird vom Hersteller vorgegeben, kann aber auch für die jeweiligen Messbedingungen experimentell bestimmt werden. Es werden die Werte aus Kapitel 4.2.1 verwendet. Da alle Experimente in Lösung durchgeführt werden, wird κ^2 für frei rotierende Farbstoffe mit $2/3$ angenommen [30]. Der Brechungsindex n beträgt für wässrige Lösungen 1,33.

Für die Auswertung der Daten müssen die detektierten Intensitäten noch korrigiert werden, da die verwendeten Filter und Detektoren das Fluoreszenzsignal der Farbstoffe nicht zu 100 % transmittieren bzw. detektieren. Für den jeweils verwendeten Donor- und Akzeptorfarbstoff lassen sich somit die Detektionseffizienzen k_D und k_A bestimmen. Die Quanteneffizienzen der einzelnen Farbstoffe werden ebenfalls berücksichtigt.

Die FRET-Effizienz und die Stöchiometrie ergeben sich zu:

$$E = \frac{I_{DA}/(k_A Q_A)}{I_{DD}/(k_D Q_D) + I_{DA}/(k_A Q_A)} \quad (4.2)$$

$$S = \frac{I_{DD}/(k_D Q_D) + I_{DA}/(k_A Q_A)}{I_{DD}/(k_D Q_D) + I_{DA}/(k_A Q_A) + I_{AA}/(k_A Q_A)} . \quad (4.3)$$

Im Folgenden sind die effektiv detektierten Spektren (schraffiert) und die Detektionseffizienzen k_D und k_A für die einzelnen Kanäle aufgeführt.

AlexaFluor488 und AlexaFluor633

Verwendete Laser:

- Donoranregung - Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ und der Leistung $P = 40 \mu\text{W}$
- Akzeptoranregung - gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 635 \text{ nm}$, einer Repetitionsrate von 10 MHz und der Leistung $P = 15 \mu\text{W}$

Verwendete Filter:

- Dichroit Z-405-470-633
- Strahlteiler BS640DCXR
- Bandpassfilter HQ525/50
- Bandpassfilter HQ685/70

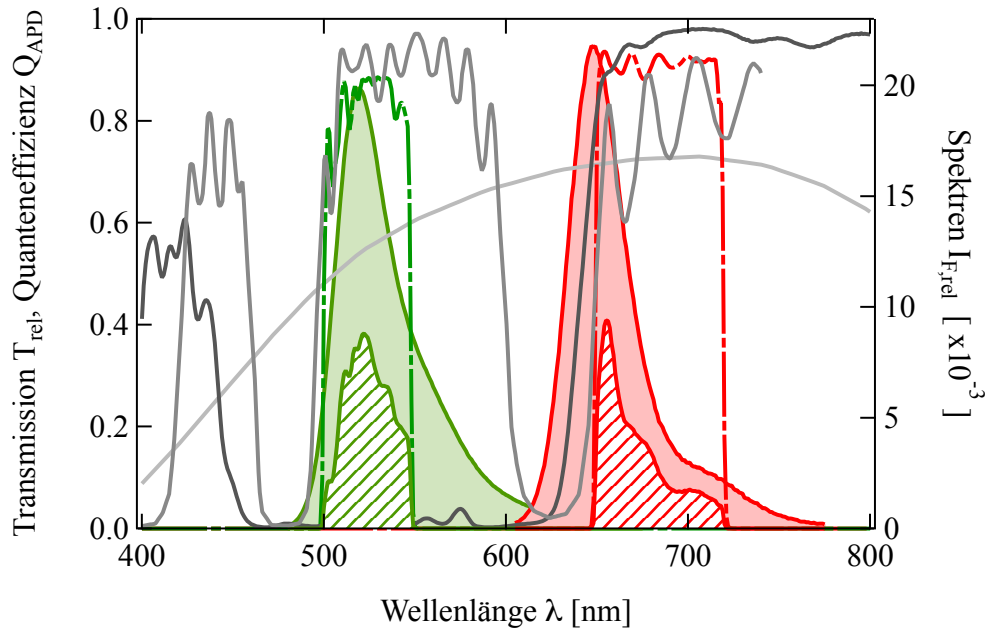


Abb. 4.13: **AlexaFluor488 und AlexaFluor633**. Dargestellt sind die Emissionsspektren des Donorfarbstoffs, *AlexaFluor488* (grün), und des Akzeptorfarbstoffs, *AlexaFluor633* (rot). Unter Berücksichtigung der verwendeten Filter und des Detektors erhält man die korrigierten Farbstoffspektren (schraffiert). Quanteneffizienz des Detektors (hellgrau), Dichroit Z-405-470-633 (grau), Strahlteiler BS640DCXR (dunkelgrau), Bandpassfilter HQ525/50 (grün schraffiert) und HQ685/70 (rot schraffiert).

Mit den verwendeten Filtern ergeben sich die Detektionseffizienzen für Donor und Akzeptor zu:

$$k_D = 0,28554 \quad k_A = 0,24856$$

Der Försterradius für das verwendete Farbstoffpaar ergibt sich unter Verwendung von Gleichung 4.1 zu:

$$R_0 = 52 \text{ Å}$$

AlexaFluor488 und *AlexaFluor647*

Verwendete Laser:

- Donoranregung - Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ und der Leistung $P = 40 \mu\text{W}$
- Akzeptoranregung - gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 635 \text{ nm}$, einer Repetitionsrate von 10 MHz und der Leistung $P = 15 \mu\text{W}$

Verwendete Filter:

- Dichroit Z-405-470-633
- Strahlteiler BS640DCXR
- Bandpassfilter HQ525/50
- Bandpassfilter HQ685/70

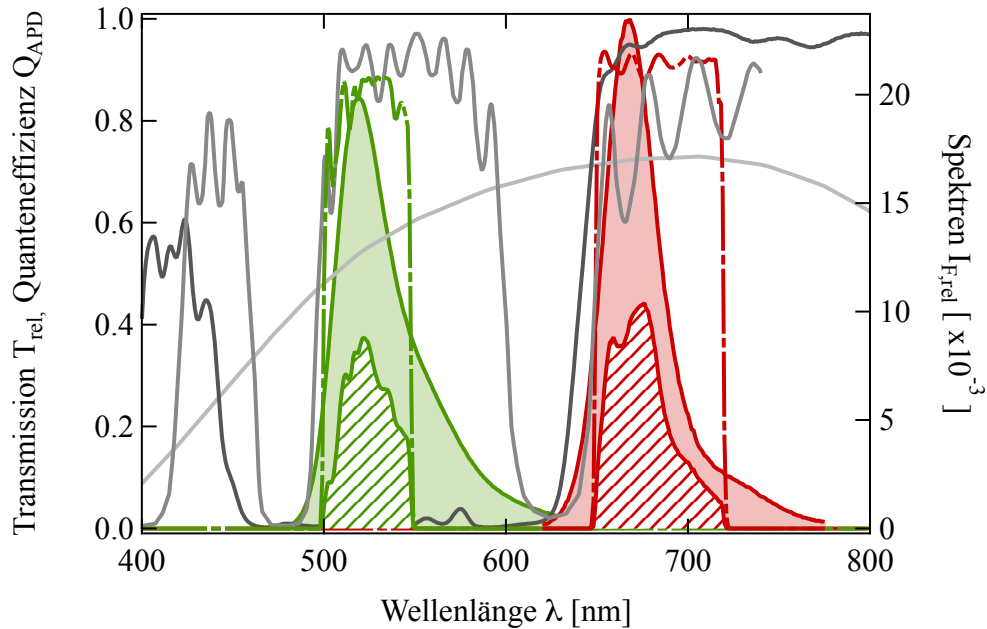


Abb. 4.14: *AlexaFluor488* und *AlexaFluor647*. Dargestellt sind die Emissionsspektren des Donorfarbstoffs, *AlexaFluor488* (grün), und des Akzeptorfarbstoffs, *AlexaFluor647* (rot). Unter Berücksichtigung der verwendeten Filter und des Detektors erhält man die korrigierten Farbstoffspektren (schraffiert). Quanteneffizienz des Detektors (hellgrau), Dichroit Z-405-470-633 (grau), Strahlteiler BS640DCXR (dunkelgrau), Bandpassfilter HQ525/50 (grün schraffiert) und HQ685/70 (rot schraffiert).

Mit den verwendeten Filtern ergeben sich die Detektionseffizienzen für Donor und Akzeptor zu:

$$k_D = 0,28554 \quad k_A = 0,39750$$

Der Försterradius für das verwendete Farbstoffpaar ergibt sich unter Verwendung von Gleichung 4.1 zu:

$$R_0 = 56 \text{ Å}$$

AlexaFluor488 und Atto647N

Verwendete Laser:

- Donoranregung - Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ und der Leistung $P = 40 \mu\text{W}$
- Akzeptoranregung - gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 635 \text{ nm}$, einer Repetitionsrate von 10 MHz und der Leistung $P = 15 \mu\text{W}$

Verwendete Filter:

- Dichroit Z-405-470-633
- Strahlteiler BS640DCXR
- Bandpassfilter HQ525/50
- Bandpassfilter HQ685/70

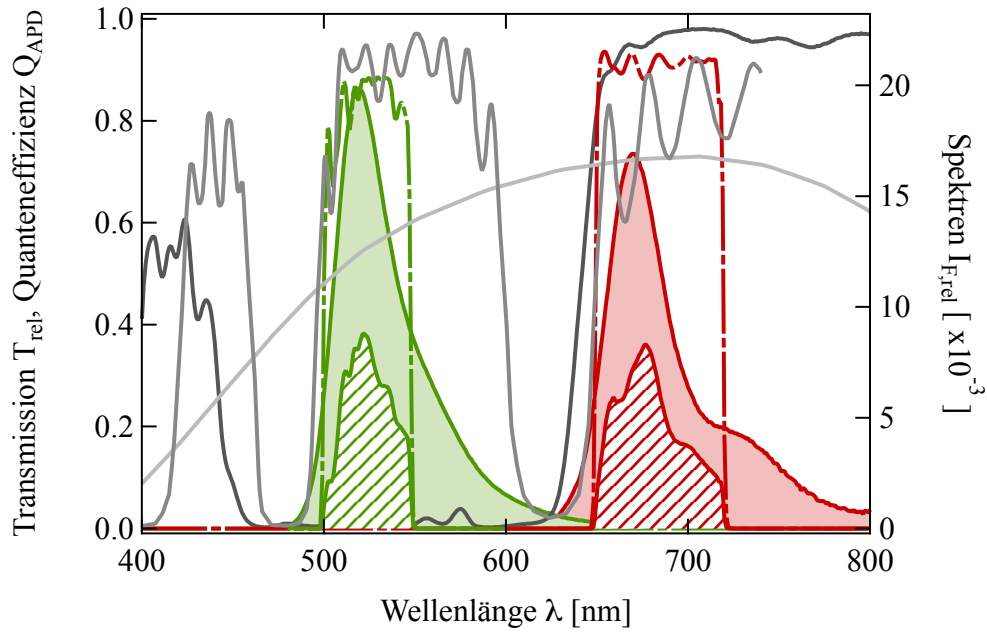


Abb. 4.15: **AlexaFluor488 und Atto647N**. Dargestellt sind die Emissionsspektren des Donorfarbstoffs, *AlexaFluor488* (grün), und des Akzeptorfarbstoffs, *Atto647N* (rot). Unter Berücksichtigung der verwendeten Filter und des Detektors erhält man die korrigierten Farbstoffspektren (schraffiert). Quanteneffizienz des Detektors (hellgrau), Dichroit Z-405-470-633 (grau), Strahlteiler BS640DCXR (dunkelgrau), Bandpassfilter HQ525/50 (grün schraffiert) und HQ685/70 (rot schraffiert).

Mit den verwendeten Filtern ergeben sich die Detektionseffizienzen für Donor und Akzeptor zu:

$$k_D = 0,28554 \quad k_A = 0,34602$$

Der Försterradius für das verwendete Farbstoffpaar ergibt sich unter Verwendung von Gleichung 4.1 zu:

$$R_0 = 52 \text{ Å}$$

AlexaFluor594* und *Atto680

Verwendete Laser:

- Donoranregung - Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 594 \text{ nm}$ und der Leistung $P = 30 \mu\text{W}$
- Akzeptoranregung - gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 670 \text{ nm}$, einer Repetitionsrate von 10 MHz und der Leistung $P = 20 \mu\text{W}$

Verwendete Filter:

- Dichroit ZT-594-680RPC
- Strahlteiler BS700DCXR
- Bandpassfilter HQ620/40
- Langpassfilter LP700

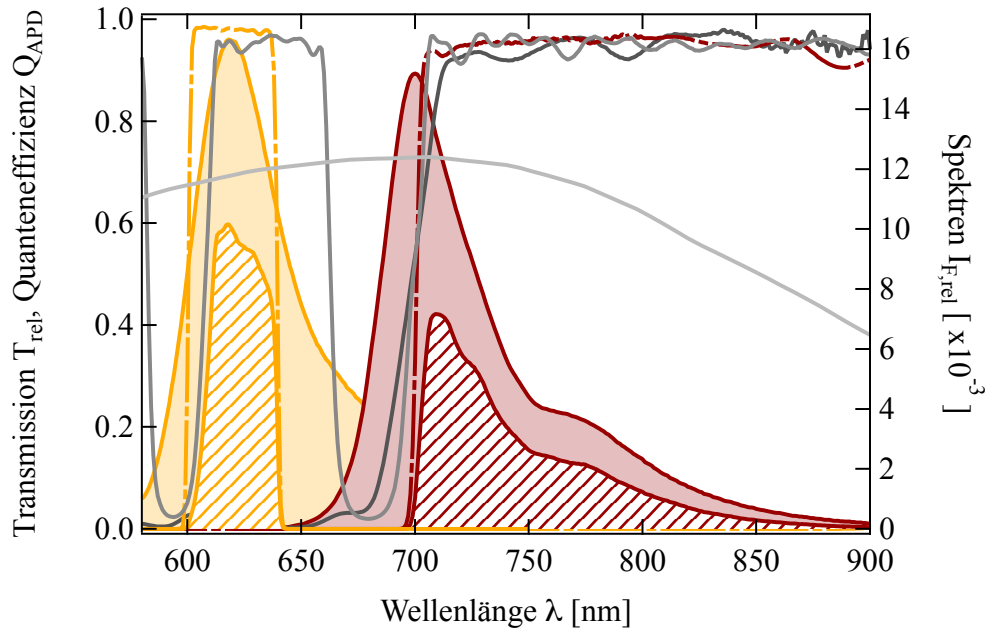


Abb. 4.16: ***AlexaFluor594* und *Atto680***. Dargestellt sind die Emissionsspektren des Donorfarbstoffs, *AlexaFluor594* (gelb), und des Akzeptorfarbstoffs, *Atto680* (rot). Unter Berücksichtigung der verwendeten Filter und des Detektors erhält man die korrigierten Farbstoffspektren (schraffiert). Quanteneffizienz des Detektors (hellgrau), Dichroit ZT-594-680RPC (grau), Strahlteiler BS700DCXR (dunkelgrau), Bandpassfilter HQ620/40 (gelb schraffiert) und Langpassfilter LP700 (rot schraffiert).

Mit den verwendeten Filtern ergeben sich die Detektionseffizienzen für Donor und Akzeptor zu:

$$k_D = 0,29071 \quad k_A = 0,38821$$

Der Försterradius für das verwendete Farbstoffpaar ergibt sich unter Verwendung von Gleichung 4.1 zu:

$$R_0 = 70 \text{ Å}$$

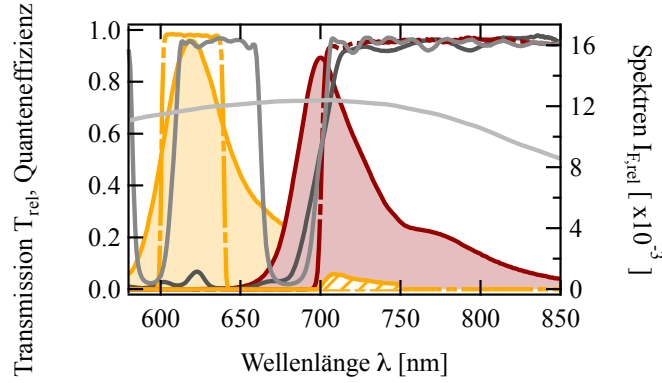


Abb. 4.17: Einfluss von *Crosstalk* bei Verwendung von *AlexaFluor594* und *Atto680*. Dargestellt sind die Emissionsspektren des Donorfarbstoffs, *AlexaFluor594* (gelb), und des Akzeptorfarbstoffs, *Atto680* (rot). Unter Berücksichtigung der Filter und des Detektors aus Abb. 4.16 ergibt sich der spektrale Überlapp des Donors (*Crosstalk*) im Akzeptorkanal (schraffiert).

Crosstalk und direkte Akzeptoranregung

Werden Farbstoffe verwendet, die spektral sehr dicht beieinander liegen, ergibt sich für die einzelnen Detektionskanäle ein spektraler Überlapp der Emissionsspektren, dargestellt in Abbildung 4.17. Typischerweise wird der Donor im Akzeptorkanal detektiert. Der umgekehrte Fall, dass der Akzeptor im Donorkanal detektiert wird, tritt meist nicht auf. Dieser Effekt wird als *Crosstalk* bezeichnet. Problematisch sind Farbstoffkombinationen mit großem Försterradius, wie bei *AlexaFluor594* und *Atto680*. In Abbildung 4.17 ist der Anteil des Donors im Akzeptorkanal dargestellt. Die Transfereffizienz wird dadurch verfälscht und zu größeren Werten verschoben. Um den *Crosstalk* zu korrigieren, wird eine Probe mit Donorfarbstoffen (*Donor only*) gemessen. Anschließend wird der Schwerpunkt der Gaußverteilung der Transfereffizienz anhand des Faktors *ct* auf Null korrigiert [56].

$$E = \frac{(I_{DA} - ctI_{DD})/(k_A Q_A)}{I_{DD}/(k_D Q_D) + (I_{DA} - ctI_{DD})/(k_A Q_A)} \quad (4.4)$$

Der Faktor wurde für *AlexaFluor594* mit $ct = 0,12$ ermittelt und für alle weiteren Auswertungen berücksichtigt. Für die anderen Farbstoffkombinationen kann der Effekt des *Crosstalks* vernachlässigt werden.

Ein weiteres Problem bei spektral sehr dicht beieinander liegenden Farbstoffen ist, wie in Abbildung 4.18 der Effekt der direkten Akzeptoranregung. Liegen die Anregungsspektren, wie bei *AlexaFluor594* und *Atto680*, sehr nah, wird der Akzeptor zusätzlich durch den Laser des Donors ($\lambda = 594 \text{ nm}$) gering angeregt. Teilweise wird der Akzeptor sogar in den S_2 -Zustand angeregt. Dies hat einen Einfluss auf die Verteilung der Transfereffizienz. Möglichst exakte Abstände lassen sich somit nicht bestimmen. Eine Korrektur ist problematisch, da die Anregung des Akzeptors über zwei Wege erfolgt, direkt und FRET-induziert. Inwieweit sich beide Wege gegenseitig beeinflussen, kann experimentell nicht geklärt werden. Die Verteilung der Transferef-

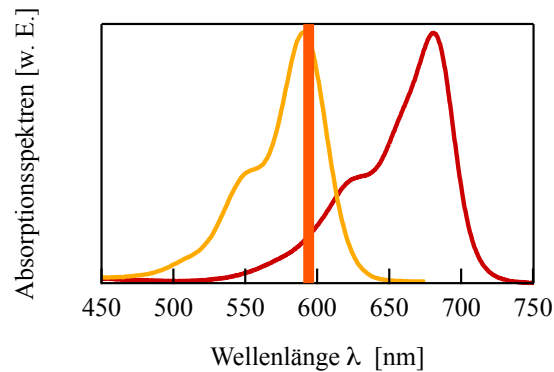


Abb. 4.18: Direkte Akzeptoranregung. Absorptionsspektren von *AlexaFluor594* (gelb) und *Atto680* (rot). Die Anregungswellenlänge des Lasers beträgt $\lambda = 594$ nm (orange).

fizienz von *AlexaFluor594* und *Atto680* sollte daher ausschließlich genutzt werden relative Änderungen im Abstand zu bestimmen und keine exakten Abstandswerte.

4.2.3 Auswerteschema

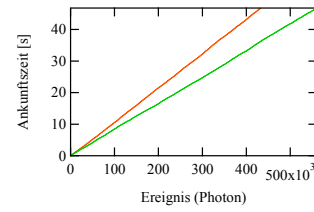
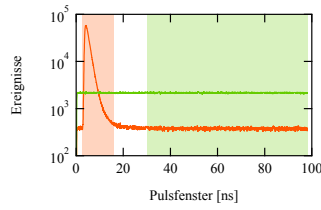
Zur Auswertung der FRET-Daten wird außer in Spezialfällen immer das gleiche Auswerteschema genutzt. Das Prinzip folgt der in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Theorie. Die typische Vorgehensweise wird kurz dargelegt:

1. Einlesen der im tttr-Format (Kapitel 4.1.1) gespeicherten Rohdaten.
2. Sortieren der Photonen nach dem in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Prinzip.
3. Gleichzeitiges Erzeugen der Zeitspuren I_{DD} , I_{DA} , I_{AA} und I_{AD} mit der Zeitauflösung von 1 ms.
4. Korrigieren der Intensitätszeitspuren für das jeweilige Farbstoffpaar nach Kapitel 4.2.2.
5. Setzen der Summenschwelle für die Burst-Auswertung nach Kapitel 2.3.2.
6. Berechnen von Stöchiometrie und Transfereffizienz. Erzeugen des FAMS-Histogramms (Kapitel 2.3.2).
7. Aussortieren der reinen Donorereignisse (*Donor-Only*) durch Setzen einer Akzeptorschwelle (Kapitel 2.3.2).

Im Normalfall werden, wenn nicht extra darauf hingewiesen wird, ausschließlich *Donor-Only* korrigierte Histogramme der Transfereffizienz dargestellt. Die FAMS-Histogramme mit den Stöchiometriewerten werden meist nicht gezeigt.

In Abbildung 4.19 ist das Schema der Auswertung graphisch dargestellt.

1. Einlesen der Photonendaten

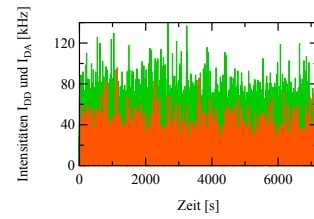
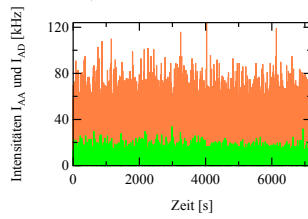


2. Sortieren der Photonen

Akzeptoranregung

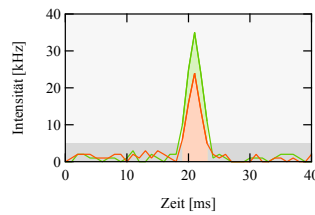
Donoranregung

3. Zeitspuren sortieren

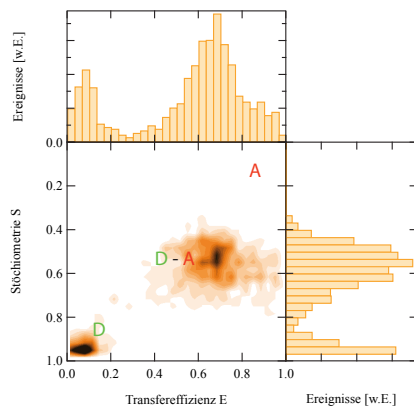


4. Korrigieren der Zeitspuren

5. Burst-Analyse



6. Stöchiometrie und Transfereffizienz berechnen - FAMS



7. Donor-Only aussortieren

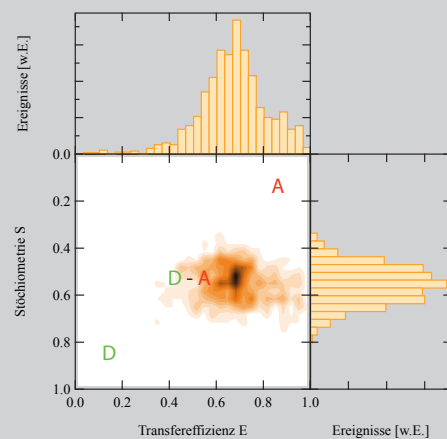


Abb. 4.19: Auswerteschema. Akzeptorsignal - rot. Donorsignal - grün.

4.3 Molekulardynamische Simulationen

Ausgangspunkt für alle molekulardynamischen Simulationen ist, dass zum Start eine Grundstruktur des Moleküls vorhanden sein muss. Typischerweise werden für Simulationen an Proteinen bekannte Strukturen aus der Proteindatenbank PDB genutzt. Abhängig von der Fragestellung wird die Simulation mit den entsprechenden Parametern vorbereitet.

Wichtige Fragestellungen, die Simulation betreffend, die vorweg geklärt werden müssen, sind zum Beispiel:

- Soll das Molekül im Vakuum oder in einem expliziten oder impliziten Lösungsmittel gerechnet werden?
- Da mit periodischen Randbedingungen gerechnet wird, ist die Entscheidung zu treffen, welche Form und Größe für die Simulationsbox gewählt wird.
- Die Wahl des Kraftfeldes ist entscheidend, da für verschiedene Szenarien, bereits verschieden optimierte Kraftfelder zur Verfügung stehen.
- Welcher Algorithmus soll gewählt werden, um den Rechenaufwand für die nicht-bindenden Wechselwirkungen zu reduzieren und bei welchem Abstand wird das Wechselwirkungspotential auf Null (*Cut-Off*) gesetzt?
- Bei welcher Temperatur und welchem Druck soll die Rechnung durchgeführt werden? Und sollen beide konstant gehalten werden?

Bei all diesen Parametern muss abgeschätzt werden, inwieweit die Simulation dem eigentlichen Experiment angenähert werden soll. Je größer das System wird, d.h. umso mehr Atome in die Rechnung eingehen, desto länger wird die Rechenzeit für die Simulation. Das gleiche gilt für die Anzahl der frei laufenden Parameter. Je realistischer die Simulation ausfallen soll, desto größer wird der Rechenaufwand.

Alle Simulationen wurden auf Rechnern des Instituts für Physik der Universität zu Lübeck durchgeführt. Die durchschnittliche Simulationszeit lag für das untersuchte System bei 1 bis 2 ns pro Tag.

4.3.1 Simulation vorbereiten und starten

Im Folgenden wird eine kurze Anleitung zum Starten einer MD-Simulation vorgestellt. Die Verwaltung und Steuerung der Simulation erfolgt bei GROMACS ausschließlich über die Konsole. Verwendet wird GROMACS 4.5.4. Für Details sei auf die Bedienungsanleitung von GROMACS verwiesen [18].

Die pdb-Datei wird in eine GROMACS Topologiedatei umgewandelt:

```
1 pdb2gmx -f name.pdb -o conf.gro -ignh
```

Wählen des Kraftfeldes - OPLS-AA/L (*Optimized potential for liquid simulations*) [57] und Wassermodeles - explizites Wasser - SPC (*Simple point charge*) [58]:

```
2 ; Forcefield: 14 OPLS-AA/L
3 ; Watermodel: 4 SPC
```

Festlegen der Boxgröße und füllen mit Wasser:

```
4 genbox -cp conf.gro -box 13 13 13 -cs spc216.gro -p topol.top
```

Eine weitere Topologiedatei erzeugen - topol.tpr:

```
5 grompp -f em1.mdp -c out.gro
```

Ausgleichen der Ladungen durch Hinzufügen von Ionen:

```
6 genion -s topol.tpr -nn 4 -nname CL -o conf.gro
7 ; group: SOL13
8 vi topol.top
9 ; replace SOL 72403 -> 72399
10 ; append CL 4
11 ; :wq
```

Eingabedatei für die Energieminimierung erzeugen. Energieminimierung starten:

```
12 grompp -f em1.mdp
13 nohup ./script &
```

Eingabedatei für die Simulation erzeugen. Simulation starten:

```
14 grompp -f md1.mdp
15 nohup ./script &
```

Simulationsparameter

Verwendete Parameterdatei für die Energieminimierung - em1.mdp:

```
1 ;      Input file
2 ;
3 integrator = steep
4 nsteps = 1000
```

Verwendete Parameterdatei für die Simulation - md1.mdp

```
1 ;      Input file
2 ;
3 constraints      = hbonds
4 lincs
5 lincs_iter       = 4
6 ;
7 integrator       = md
8 dt               = 0.002      ; ps !
9 tinit           = 0.0 ; ps !
10 nsteps          = 12500000; this job 25 ns, total 25 ns
11 ;
12 coulombtype      = PME
13 optimize_fft     = yes
14 fourierspacing   = 0.12
15 rcoulomb         = 1.00
16 rlist            = 1.00
17 rvdw             = 1.00
18 nstxout          = 1000
19 nstvout          = 1000
20 nstxtcout        = 200
```

4 Material und Methoden

```
21 xtc_grps          = Protein
22 ;
23 ;      Energy minimizing stuff
24 ;
25 ; Berendsen temperature coupling is on in two groups
26 Tcoupl            = berendsen
27 tc-grps           = Protein non-Protein
28 tau_t             = 0.1 0.1
29 ref_t             = 300 300
30 ; Energy monitoring
31 energygrps        = Protein non-Protein
32 ; Isotropic pressure coupling is now on
33 Pcoupl            = berendsen
34 Pcoupltype        = isotropic
35 tau_p             = 0.2
36 compressibility    = 4.5e-5
37 ref_p             = 1.0
```

Skriptdatei zum starten der Simulation - script:

```
1 mdrun -c conf.gro -cpi
```

5 Charakterisierung des Messsystems

5.1 Laserleistung

Um den Einfluss der Laserleistung auf die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe zu testen, wird im Folgenden exemplarisch für *AlexaFluor488* eine komplette Messreihe vorgestellt. Die Reihe wurde durchgängig mit der selben Probe mit einer Konzentration von $c = 50 \text{ pM}$ in Wasser gelöst gemessen. Die Leistung P wurde im Bereich von 10 bis $1500 \mu\text{W}$ variiert. Zusätzlich wurde die Messreihe einmal mit und einmal ohne Lochblende durchgeführt. Alle Messungen fanden als Lösungsexperimente statt. Der Lochblendenradius betrug $r = 50 \mu\text{m}$.

Zur Auswertung wurden die Autokorrelationen berechnet. Die Kurvenanpassung erfolgte mit den aus Kapiteln 2.2.4 und 2.3.1 bekannten Funktionen.

In den Abbildungen 5.1 und 5.2 sind die Autokorrelationen für die Messungen mit Lochblende (blau) und ohne Lochblende (grün) für steigende Anregungsleistung dargestellt. Auf den ersten Blick wird sofort deutlich, dass mit steigender Leistung die Amplitude der Korrelation abnimmt und ein zusätzlicher Anteil in der Korrelation auftaucht. Dieser zusätzlich zur diffusiven Komponente überlagerte Anteil wird durch Übergänge des Farbstoffs in den Triplettzustand verursacht. Der Verlauf beider Messreihen zeigt die gleiche Tendenz, jedoch mit Unterschieden im Detail. Auf die einzelnen Parameter wird im Folgenden eingegangen.

In Abbildung 5.3 sind der Verlauf der Fluoreszenzintensität mit Farbstoff und die Hintergrundintensität ohne Farbstoff in Abhängigkeit von der Laserleistung aufgetragen. Der Verlauf folgt der in Kapitel 2.2.2 vorgestellten Theorie. Die Fluoreszenzrate R und damit die detektierte Intensität sättigt für hohe Anregungsleistungen. Die Hintergrundintensität steigt linear mit der Anregungsleistung. Die Ursache für den stärkeren Intensitätsanstieg bei den Messungen ohne Lochblende liegt

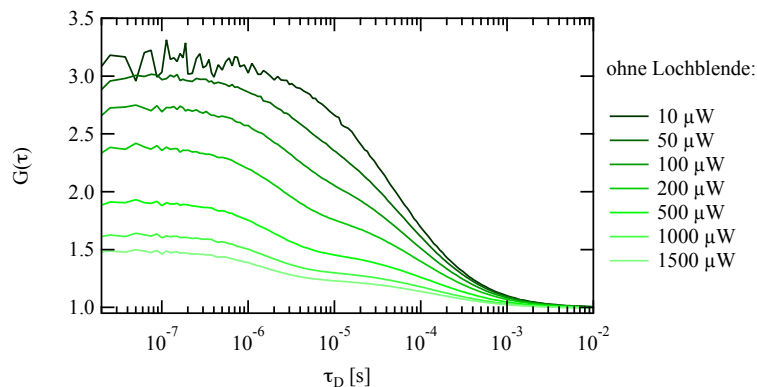


Abb. 5.1: Korrelationsfunktionen für *AlexaFluor488* bei verschiedenen Laserleistungen P . Ohne Lochblende.

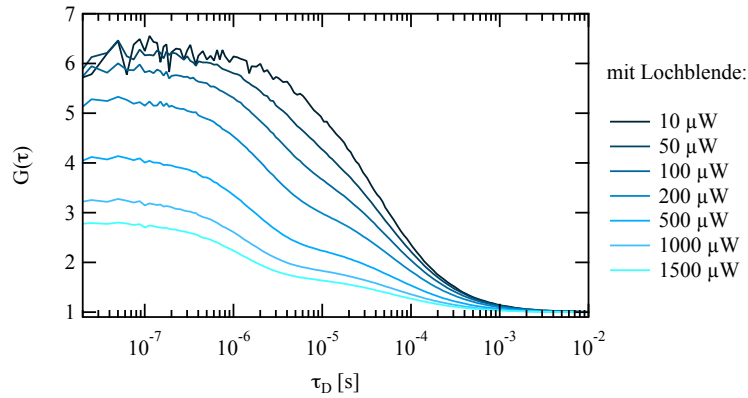


Abb. 5.2: Korrelationsfunktionen für *AlexaFluor488* bei verschiedenen Laserleistungen P . Mit Lochblende.

darin begründet, dass die Lochblende das effektive Fokusvolumen begrenzt. Durch die Lochblende wird die *CEF* (Gleichung 2.24) räumlich begrenzt. In Konsequenz wird gegenüber der Messung ohne Lochblende weniger Signal detektiert. Das Hintergrundsignal reduziert sich ebenfalls mit Nutzung der Lochblende, da hierdurch Streulicht stärker unterdrückt wird.

In Abbildung 5.4 sind der Verlauf der mittleren Teilchenzahl im Fokus N und die mittlere Diffusionszeit τ_D durch den Fokus in Abhängigkeit von der Laserleistung dargestellt. Für beide Messreihen, mit und ohne Lochblende, steigt die mittlere Teilchenzahl im Fokus an und sättigt für hohe Anregungsleistung. Ebenso die mittlere Diffusionszeit durch den Fokus, die mit steigender Anregungsleistung sättigt. Ursache hierfür ist die Zunahme des Fokusvolumens. Mit steigender Anregungsleistung nimmt die Intensität im Fokus, beschrieben durch die *MDE* (Gleichung 2.25), zu. Die Zunahme der *MDE* bedingt die Zunahme des Fokusvolumens (Gleichung 2.36) und damit bei gleichbleibender Farbstoffkonzentration die Zunahme der mittleren Teilchenzahl im Fokus. Dies gilt ebenso für die mittlere Diffusionszeit τ_D . Limitiert wird der Effekt durch die Lochblende, die durch die Begrenzung der *CEF*, zur Begrenzung des Fokusvolumens führt und damit zur Begrenzung der Diffusionszeit mit steigender Anregungsleistung. Bei der Messung ohne Lochblende, übernimmt

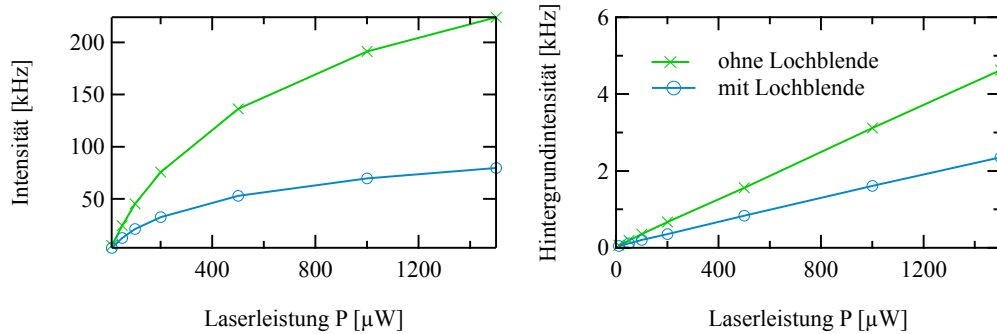


Abb. 5.3: Links: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Laserleistung P . Rechts: Hintergrundintensität in Abhängigkeit der Laserleistung P .

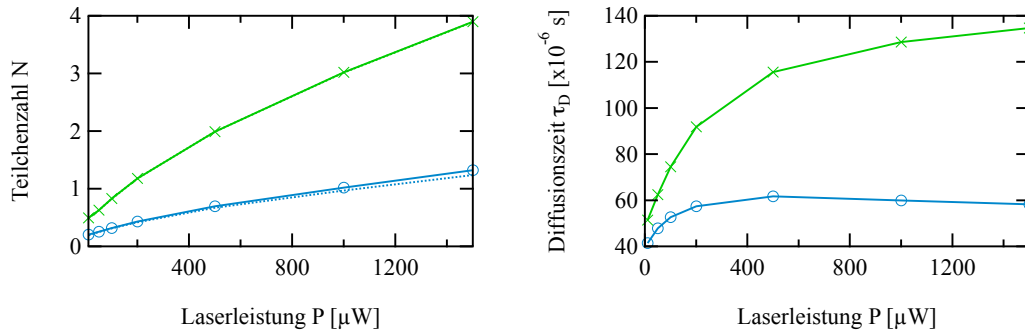


Abb. 5.4: Links: Mittlere Teilchenzahl im Fokus N in Abhängigkeit der Laserleistung P . Rechts: Mittlere Diffusionszeit durch den Fokus τ_D in Abhängigkeit der Laserleistung P .

die Fläche des Detektors, als „Quasilochblende“, die Begrenzung des Fokusvolumens (Radius $r = 87,5 \mu\text{m}$).

In Abbildung 5.5 sind der Verlauf des Triplettanteils T und der Triplettzeit τ_T in Abhängigkeit der Laserleistung aufgetragen. Der Triplettanteil nimmt mit steigender Anregungsleistung zu und sättigt, wie die Fluoreszenzintensität aus Abbildung 5.3, bei hohen Anregungsleistungen. Die Triplettzeit τ_T nimmt deutlich ab und konvergiert für hohe Anregungsleistungen. Um so höher die Anregungsleistung gewählt wird, desto öfter wird der Farbstoff angeregt. Befindet sich der Farbstoff häufiger im angeregten Zustand, nehmen ebenfalls die Übergänge in den Triplettzustand zu. Die Aufenthaltsdauer im Triplettzustand ist mit ca. 10^{-6} s wesentlich länger als im ersten angeregten Zustand mit 10^{-9} s. Ab einer gewissen Anregungsleistung setzt somit ein Sättigungseffekt ein, da der Farbstoff, während er im Triplettzustand verweilt, nicht erneut angeregt werden kann. Die Zeit zwischen zwei Triplettzuständen, hier als Triplettzeit τ_T bezeichnet, nimmt ebenfalls ab. Die Triplettzeit nähert sich mit steigender Anregungsleistung der mittleren Aufenthaltsdauer im Triplettzustand und sättigt.

Im Hinblick auf die folgenden Messungen sollen vor allem ein möglichst kleines Beobachtungsvolumen und ein geringer Triplettanteil erreicht werden. Ein sehr kleines Fokusvolumen erlaubt etwas höhere Konzentrationen für die Einzelmolekülmessungen.

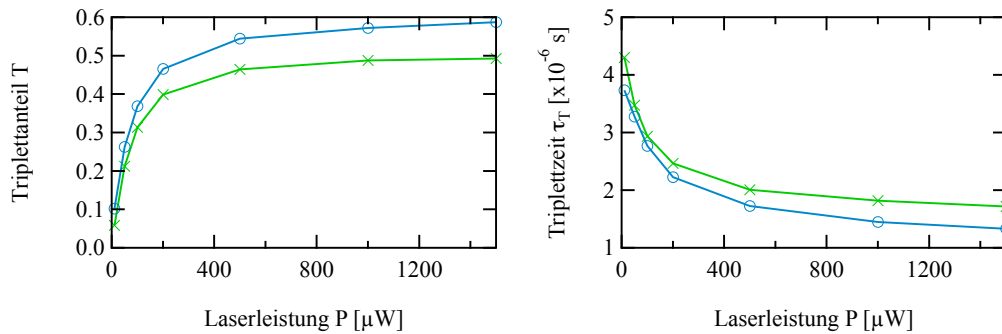


Abb. 5.5: Links: Triplettanteil T in Abhängigkeit der Laserleistung P . Rechts: Triplettzeit τ_T in Abhängigkeit der Laserleistung P .

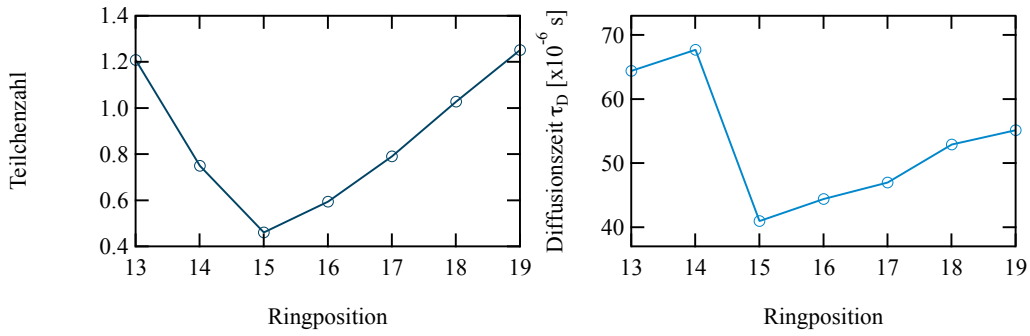


Abb. 5.6: Links: Mittlere Teilchenzahl im Fokus N in Abhängigkeit der Korrekturringposition des Wasserimmersionsobjektivs. Rechts: Mittlere Diffusionszeit im Fokus τ_D in Abhängigkeit der Korrekturringposition des Wasserimmersionsobjektivs.

Sollen Korrelationen ausgewertet werden, lassen sich Korrelationsfunktionen ohne Tripletanteil aufgrund geringerer Parameterzahl bei der Kurvenanpassung leichter auswerten. Die Anregungsleistung wird deshalb im Widerspruch zu Kapitel 2.2.2 mit $40 \mu\text{W}$ sehr gering gewählt.

5.2 Objektiveinstellung

Um einen möglichst perfekten Fokus zu erreichen, muss das verwendete Wasserimmersionsobjektiv von Nikon über einen Justagering korrigiert und damit für die verschiedenen Deckglasdicken angepasst werden. Die möglichen Korrekturringpositionen wurden anhand der zuvor verwendeten Farbstoffprobe (*AlexaFluor488*, 50 pM) vermessen. Alle Messungen dieser Arbeit wurden ausschließlich mit dem gleichen Deckglastype ($22 \times 22 \mu\text{l}$, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Zur Auswertung werden über die Autokorrelation die mittlere Teilchenzahl N und die Diffusionszeit τ_D bestimmt.

Aus Abbildung 5.6 ergibt sich eine optimale Ringposition von 15. Diese korreliert gut mit der ausgemessenen Deckglasdicke von $150 \mu\text{m}$. Teilchenzahl und Diffusionszeit sind hier am kleinsten und die Fokusform und -größe ist damit optimal. Die Dicken der einzelnen Deckgläser und Chargen unterscheiden sich nur geringfügig und sind reproduzierbar, sodass immer mit der gleichen Ringposition von 15 gemessen wird.

5.3 Heizsystem

Für die temperaturabhängigen Einzelmolekülmessungen wird die in Kapitel 4.1.3 vorgestellte Temperiereinheit genutzt. Da das Thermoelement ausschließlich die Temperatur in der Heizplatte misst, und aufgrund der Wärmeabgabe an den umgebenden Messaufbau eine abweichende Temperatur in der Probe erwartet wird, muss das gesamte System kalibriert werden. Für die Kalibrierung wird wiederum der bekannte Farbstoff *AlexaFluor488* genutzt. Nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2.43) ist die Diffusionskonstante temperaturabhängig. Anhand der Autokorrelation wird für Temperaturen von 25°C bis 70°C am Thermoelement die

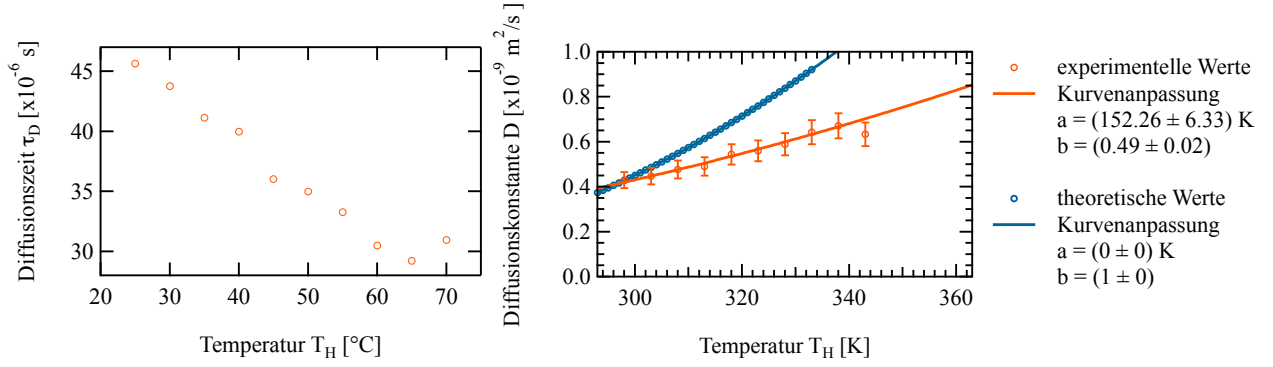


Abb. 5.7: Links: Diffusionszeiten für *AlexaFluor488* bei verschiedenen Heizertemperaturen T_H . Rechts: Theoretische (blau) und aus den experimentell (orange) ermittelten Diffusionszeiten berechnete Diffusionskonstanten für *AlexaFluor488* bei verschiedenen Heizertemperaturen T_H .

Änderung der Diffusionszeit und damit der Diffusionskonstante von *AlexaFluor488* in der Probe bestimmt. Über die experimentell ermittelte Diffusionskonstante lässt sich anschließend die tatsächlich in der Probe vorherrschende Temperatur bestimmen.

Die Diffusionskonstante von *AlexaFluor488* beträgt bei einer Temperatur von $T = 25$ °C $D = 4,3 \cdot 10^{-10}$ m² s⁻¹ [59]. Entsprechend Gleichung 5.1 lässt sich die Änderung der Diffusionskonstante $D(T)$ mit der Temperatur theoretisch berechnen [60].

$$D(T) = D(298,15 \text{ K}) \frac{T}{298,15 \text{ K}} \frac{8,9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa s}}{\eta(T)} \quad (5.1)$$

$D(298,15 \text{ K})$ entspricht dem Referenzwert der Diffusionskonstante bei 25 °C. Die Änderung der Viskosität $\eta(T)$ von Wasser in Abhängigkeit der Temperatur ergibt sich anhand folgender Gleichung:

$$\eta(T) = 2,414 \cdot 10^{-5} \text{ Pa s} \cdot 10^{\frac{247,8 \text{ K}}{T-140 \text{ K}}} \quad (5.2)$$

Optische Einflüsse aufgrund der Abnahme des Brechungsindex von Wasser werden vernachlässigt, da sich die Änderung im Promillebereich abspielt [61].

Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Wie erwartet, nimmt die mittlere Diffusionszeit τ_D mit steigender Temperatur ab. Anhand Gleichung 2.38 und der bekannten Diffusionskonstante bei 25 °C wird für jede Temperatur die entsprechende Diffusionskonstante berechnet. Folgt die Temperatur in der Probe exakt den am Heizer eingestellten Werten, ist der in blau dargestellte theoretische Verlauf nach Gleichung 5.1 zu erwarten. Die reale Zunahme der Diffusionskonstante ist deutlich flacher. Ursache ist die gegenüber dem Heizer T_H wesentlich geringere Temperatur in der Probe T_{real} .

Um die real in der Probe vorherrschende Temperatur T_{real} bestimmen zu können, werden die Gleichungen 5.1 und 5.2 für die Kurvenanpassung genutzt. Da der experimentelle Aufbau während der Messung nicht variiert wird, ist davon auszugehen,

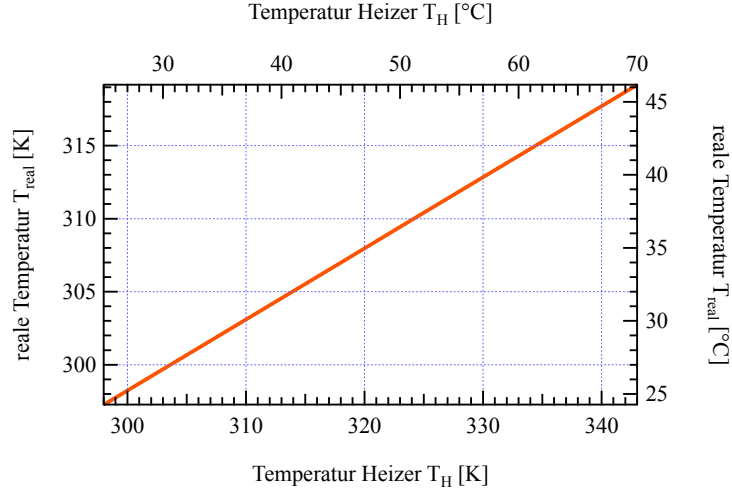


Abb. 5.8: Umrechnung der am Heizer eingestellten Temperatur T_H in die real in der Probe vorherrschende Temperatur T_{real} .

dass mit steigender Temperatur die Verlustleistung linear mit der Temperatur ansteigt. Die Abweichung der Temperatur in der Probe sollte somit ebenfalls einem linearen Zusammenhang folgen:

$$T_{real} = b \cdot T_H + a . \quad (5.3)$$

Anhand der Kurvenanpassung ergeben sich die folgenden Parameter:

$$a = (152,26 \pm 6,33) \text{ K}$$

$$b = (0,49 \pm 0,02)$$

Mit Gleichung 5.3 lässt sich nun für jede am Heizer eingestellte Temperatur T_H die real in der Probe vorherrschende Temperatur T_{real} vorhersagen, und umgekehrt. Ein graphischer Zusammenhang ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

5.4 FRET-Referenzprobe - TetraSpeck-Beads

Typischerweise werden für alle FRET-Messungen zwei verschiedene Konfigurationen des Messaufbaus genutzt. Abhängig von den verwendeten Farbstoffen (siehe Kapitel 4.2.2), wird bei Verwendung von *AlexaFluor488* als Donor Konfiguration 1 und bei Verwendung von *AlexaFluor594* als Donor Konfiguration 2 genutzt.

Um an verschiedenen Messtagen und nach Umbauten des Messaufbaus reproduzierbare Ergebnisse zu erreichen, wird vor jedem Messtag eine Kalibrierung mittels TetraSpeck-Beads (farbstoffmarkierte Latexkugeln, Invitrogen) durchgeführt. Diese lassen sich bei verschiedenen Wellenlängen anregen, zeigen Energietransfer und liefern entsprechend der verwendeten Anregungswellenlänge immer die gleiche Transfereffizienz.

Zur Auswertung wird die Verteilung der Transfereffizienz mit einer Gaußfunktion angepasst. Entscheidend für die Güte der Justage sind der Mittelwert und die Breite

der Gaußverteilung. Bei korrekter Justage müssen diese Werte reproduziert werden. Zur Auswertung wird Gleichung 2.47 verwendet. Die Intensitäten der beiden Detektionskanäle werden nicht korrigiert.

Konfiguration 1:

- Donoranregung - Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ und der Leistung $P = 300 \text{ nW}$
- Dichroit Z-405-470-633
- Strahlteiler BS640DCXR
- Bandpassfilter HQ525/50
- Bandpassfilter HQ685/70

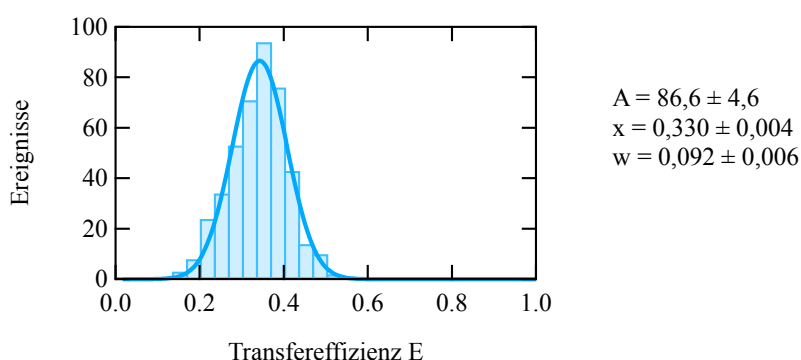


Abb. 5.9: Verteilung der Transfereffizienz der TetraSpeck-Beads bei Verwendung von Konfiguration 1. Parameter der Gaußverteilung: Amplitude A , Mittelwert x , Breite w .

Konfiguration 2:

- Donoranregung - Dauerstrichlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 594 \text{ nm}$ und der Leistung $P = 1 \mu\text{W}$
- Dichroit ZT-594-680RPC
- Strahlteiler BS700DCXR
- Bandpassfilter HQ620/40
- Langpassfilter LP700

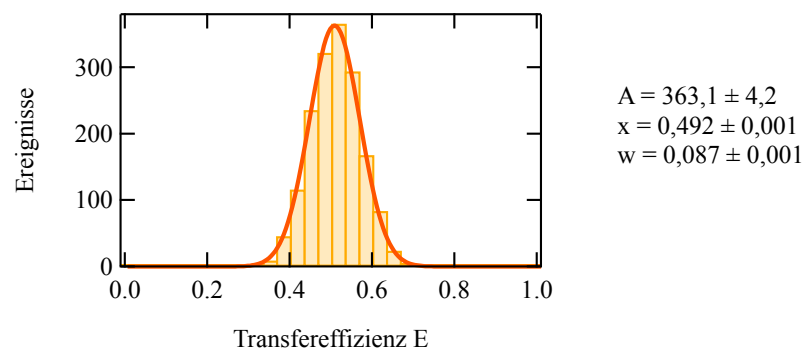


Abb. 5.10: Verteilung der Transfereffizienz der TetraSpeck-Beads bei Verwendung von Konfiguration 2. Parameter der Gaußverteilung: Amplitude A , Mittelwert x , Breite w .

6 Komplexbildung - *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA*

Dieses Kapitel widmet sich den beiden Proteinkomplexen *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA* der WXG-100 Proteinfamilie. Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Einzelmoleküluntersuchungen der beiden Proteinkomplexe. Neben der temperaturabhängigen Entfaltung des Komplexes werden ebenfalls Untersuchungen zur Struktur der Einzelproteine durchgeführt.

Der erste Teil zur temperaturabhängigen Entfaltung der Komplexe wurde von Sina Schultz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit im Institut für Physik behandelt. Die weiterführenden Untersuchungen zur Struktur des Einzelproteins *ESAT-6* im Komplex und als Monomer erfolgten im Rahmen der Bachelorarbeit von Magdalena Mecking, ebenfalls im Institut für Physik.

6.1 Einleitung

Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die durch Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) verursacht wird.

Die Übertragung von Tuberkulose erfolgt durch bakterienhaltige Aerosole (Tröpfcheninfektion). Ist eine Person im Stadium einer aktiven, offenen Tuberkuloseerkrankung, können die Keime durch Husten, Niesen oder Spucken in die Luft gelangen. Die Inhalation weniger Keime ist dann ausreichend, um sich zu infizieren. Typischerweise wird die Lunge infiziert.

Sobald die Bakterien die Lunge erreicht haben, werden sie durch alveolare Makrophagen oder dendritische Zellen registriert und phagozytiert. Es sind nun vier verschiedene Krankheitsverläufe möglich: (1) Das Bakterium wird in das Phagolysosom aufgenommen und zerstört. (2) Das Bakterium vermehrt sich und verursacht eine primäre Infektion. (3) Das Bakterium ruht und verweilt über Jahre hinweg im Wirt ohne Symptome zu zeigen. Diese latente Infektion wird auch als geschlossenen Tuberkulose bezeichnet. (4) Das Bakterium wird reaktiviert und führt zur Erkrankung [62]. Die verschiedenen Verläufe sind in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt.

Über ein Drittel der Weltbevölkerung sind latent (verborgen) mit Tuberkulose infiziert, das heißt es liegt eine Infektion vor, aber noch keine Erkrankung und damit auch keine Möglichkeit zur Übertragung bzw. Ansteckung. Das durchschnittliche Risiko nach einer Infektion an Tuberkulose zu erkranken, liegt bei 10%. Vor allem Personen mit geschwächtem Immunsystem, HIV infizierte, Unterernährte und Diabetiker gehören zur Risikogruppe. Auch Rauchen erhöht das Risiko zu erkranken [65].

Falls es zu einer Erkrankung kommt, sind die ersten typischen Symptome einer aktiven Tuberkulose Husten, Fieber, Schüttelfrost und Gewichtsverlust. Da der Verlauf zu Beginn über Monate hinweg relativ mild ausfällt, kann es zu einer Verzögerung

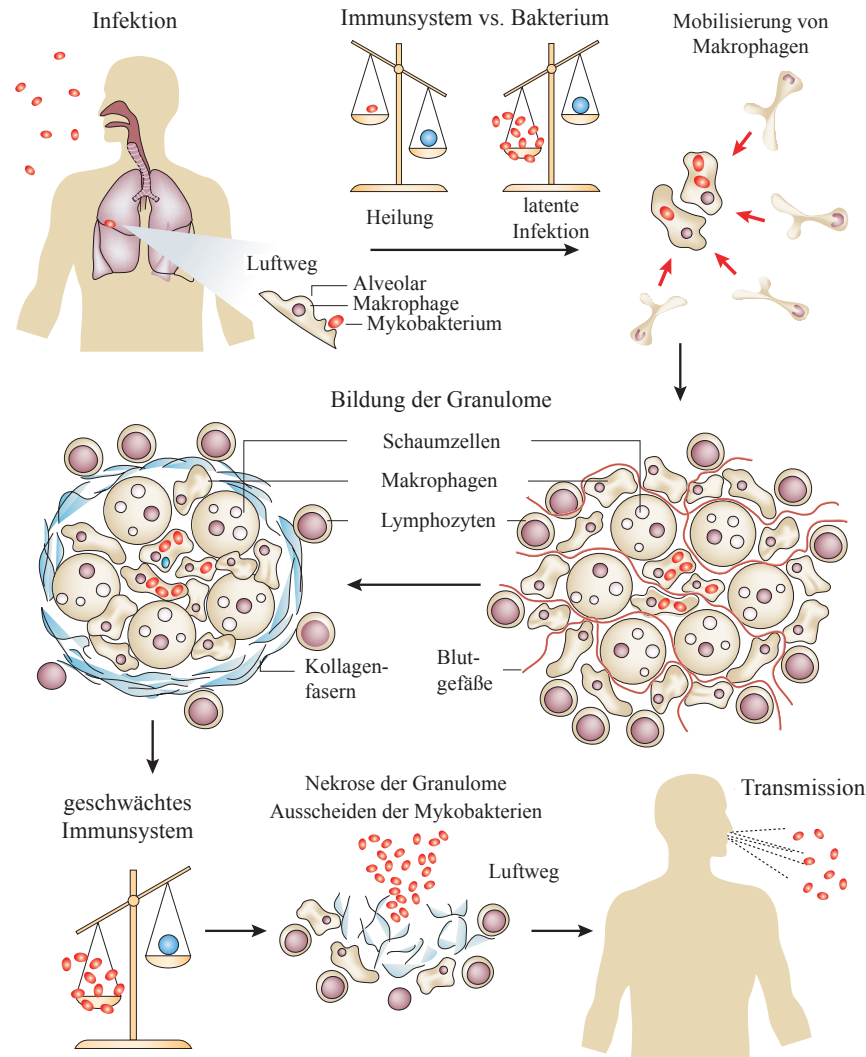


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Krankheitsverläufe der Tuberkulose entnommen aus [23, 63, 64].

bei der Behandlung kommen. Dies führt dazu, dass die betroffene Person das Bakterium bereits auf weitere Personen überträgt und diese ansteckt. Ohne Behandlung würden 2/3 der erkrankten Personen an der Tuberkulose versterben, da das Bakterium zur Zerstörung des Lungengewebes führt und in fortgeschrittenen Stadien sich die Bakterien durch hämatogene Streuung auf weitere Organe ausbreiten [65].

Tuberkulose ist behandelbar. Jedoch ist die derzeitige Standardbehandlungsmethode relativ aufwändig. Über ein halbes Jahr müssen entsprechend Medikamente eingenommen werden. Fehlt die ärztliche Aufsicht und Kontrolle, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Behandlung rapide. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich gegen das Medikament resistente Bakterienstämme ausbilden. Multiresistente Bakterienstämme, die sich mit den typischen Tuberkulosemedikamenten nicht mehr behandeln lassen, sind auf dem Vormarsch und nehmen stetig zu [65].

Dies ist ein ausschlaggebender Punkt, weshalb auf dem Gebiet der Tuberkulose

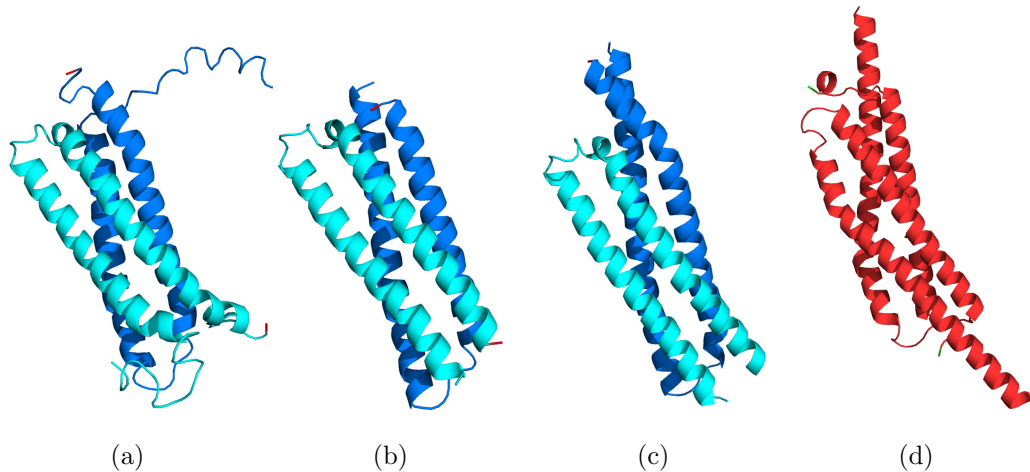


Abb. 6.2: Struktur von *ESAT-6/CFP-10* (hellblau/dunkelblau): (a) NMR-Struktur (pdb-Schlüssel: 1WA8), (b) Kristallstruktur (pdb-Schlüssel: 3FAV), (c) Kristallstruktur (pdb-Schlüssel: 3FAV). (d) Kristallstruktur von *sagEsxA* (pdb-Schlüssel: 3GVM).

intensiv geforscht werden muss, um weitere Details über Struktur und Funktion der verschiedenen Tuberkulosestämmen und somit bessere Angriffsmöglichkeiten im Kampf gegen Tuberkulose zu erhalten. Vor allem im Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine *ESAT-6/CFP-10* bilden seit einem Jahrhundert den Hauptbestandteil des Tuberkulinhauttests und sind Schwerpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten [66]. Vor allem strukturell sind bereits wesentliche Ergebnisse geliefert worden [67, 68], wohingegen zur molekularen Funktion der Proteine nur wenig bekannt ist [69].

6.2 WXG-100-Familie - die Proteinkomplexe *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA*

Die Proteine *ESAT-6* (*Early-secreted antigenic target 6 kDa*) und *CFP-10* (*Culture filtrated protein 10 kDa*) des *Mycobacterium tuberculosis* bilden zusammen einen heterodimeren Komplex aus einem 4-helikalen Bündel mit unstrukturierten N- und C-Termini. Die Proteine *ESAT-6/CFP-10* werden der Proteinfamilie WXG-100 zugeordnet. Hauptcharakteristikum ist die Folge der Aminosäuren Tryptophan-Xaa-Glycin (WXG) im Loop zwischen den beiden Alpha-helices. Beide Proteine enthalten etwa 100 Aminosäuren und bilden zusammen einen stabilen Komplex [22]. Ein weiteres Protein, das ebenfalls zur WXG-100 Proteinfamilie gehört, ist *sagEsxA*. *sagEsxA* stammt vom Bakterium *Streptococcus agalactiae* und bildet ein Homodimer mit einer ähnlichen Komplexstruktur wie *ESAT-6/CFP-10* [23].

Während *CFP-10* ungebunden vollkommen unstrukturiert vorliegt, ist *ESAT-6* bereits teilweise strukturiert und bildet ein *Molten Globule*, einen stabilen Zwischenzustand der Proteinfaltung. Erst bei Kontakt formen die Proteine die Komplexstruktur aus. In Abbildung 6.2 sind die bekannten Strukturen des heterodimeren Komplexes, bestehend aus *ESAT-6* und *CFP-10*, dargestellt. Die mittels NMR gelöste Struktur

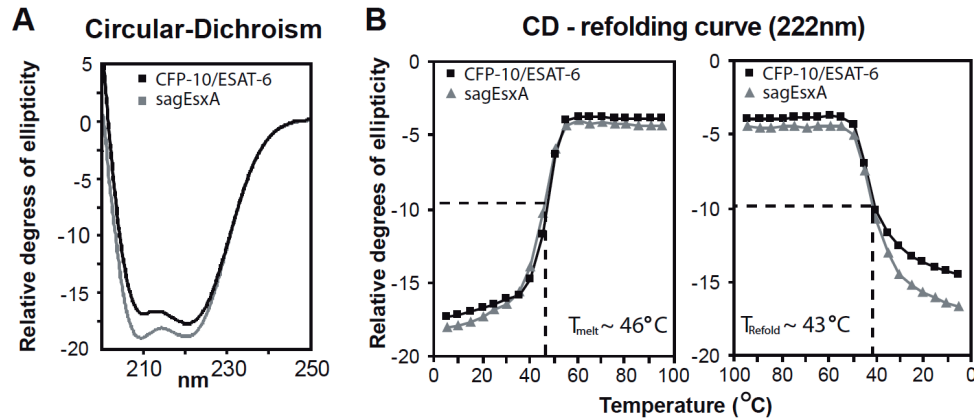


Abb. 6.3: CD-Spektren der Proteinkomplexe *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA*. (A) Die CD-Spektren zeigen deutlich die alphahelikale Struktur und hohe Ähnlichkeit der beiden Strukturen von *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA*. (B) *sagEsxA* zeigt einen ähnlichen Verlauf wie *ESAT-6/CFP-10* im Verlauf der thermischen Entfaltung. Temperaturerniedrigung führte zur Rückfaltung der alphahelicalen Struktur. Die Abbildung ist entnommen aus [23].

weist unstrukturierte N- und C-Termini auf [67]. Exemplarisch ist nur eine Konformation dargestellt. Die beiden mittels Röntgenkristallographie bestimmten Strukturen zeigen aufgrund der Packung im Kristall eine etwas verlängerte Helixstruktur. Die unstrukturierten flexiblen Termini werden aufgrund der undefinierten Elektrodichte nicht aufgelöst [23]. Beide bilden zusammen die asymmetrische Einheit im Kristall. Zusätzlich ist die Struktur des aus der Röntgenkristallographie bestimmten homodimeren Komplexes des Proteins *sagEsxA* dargestellt [23].

Synthetisiert und sekretiert werden die Proteine *ESAT-6/CFP-10* neben weiteren Mykobakterien vom *Mycobacterium tuberculosis*. Beide Proteine werden dem Gen-Cluster „*ESAT-6 secretion system*“ oder kurz *ESX-1* zugeordnet. Die für die Sekretion verantwortlichen Gene lokalisieren in der *ESX-1* Genregion. Die *ESX-1* Region entspricht der Genregion *RD1 - region of difference-1*, dessen Gene für ein neues Sekretionssystem (System VII) kodieren. Das selektive Ausschalten von Genen der *RD1* Region führt zu einer Störung der *ESAT-6/CFP-10* Sekretion und mindert die Virulenz des Mykobakteriums in Mäusen [70]. Dadurch sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, die proinflammatorische Immunantwort zu unterdrücken. Es wird vermutet, dass *ESAT-6* und *CFP-10* das Immunsystem des Wirts manipulieren können, auch wenn die molekulare Funktion noch nicht detailliert geklärt ist [23].

6.3 Zielstellung

Die Proteine *ESAT-6/CFP-10* stellen die sekretierten T-Zellantigene des *Mycobacterium tuberculosis* dar. Sie sind seit einem Jahrhundert Hauptbestandteil des sich immer noch in Benutzung befindlichen Tuberkulinhauttests. In Bezug auf die Struktur der komplexierten Proteine sind maßgebliche Fortschritte gemacht worden, wohingegen zur molekularen Funktion keine Erkenntnisse oder nur vage Vermutungen vorliegen.

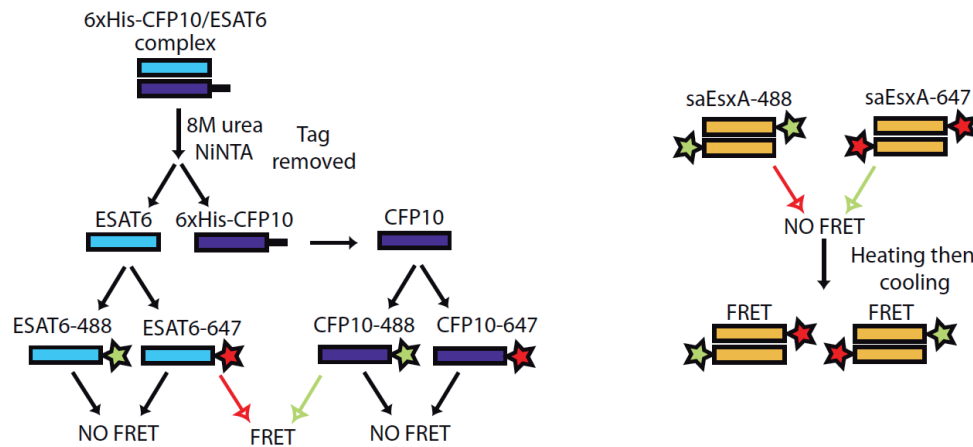


Abb. 6.4: Prinzip der Ensemble-FRET-Messung der heterodimeren *ESAT-6/CFP-10* (links) und homodimeren *sagEsxA* (rechts) Komplexbildung. Die Abbildung ist entnommen aus [23].

In der Dissertation von Christian Poulsen [23] wurden vielfältige Untersuchungen zur Struktur des Proteinkomplexes durchgeführt. Schwerpunkt lag hierbei auf röntgenkristallographischen Untersuchungen. Um weitere Informationen über den eigentlichen Prozess der Komplexbildung zu gewinnen, wurden Experimente in Lösung durchgeführt. Die Stabilität des Komplexes wurde temperaturabhängig mittels CD-Spektroskopie (Circulardichroismus) untersucht. Die Schmelzkurve ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Es wurden ebenso Experimente durchgeführt, die klären sollten, ob die Einzelproteine ebenfalls in der Lage sind, Homodimere zu bilden. In diesem Zusammenhang wurden FRET-Experimente durchgeführt. Die Einzelproteine wurden jeweils mit Donor oder Akzeptor farbstoffmarkiert und entsprechend gemischt. Das Prinzip ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Die Mischung der jeweiligen Populationen ergab eindeutig, dass die Einzelproteine *ESAT-6/CFP-10* nicht zu Homodimeren komplexieren.

Jedoch sind diese Ensemblemessungen nicht dazu geeignet, strukturelle Zwischenstufen, Oligomierzustände oder Konformationen der Proteine während der Komplexbildung zu untersuchen. Deutlich wird dies zum Beispiel bei der Auswertung der FRET-Daten, die Abstandsinformationen liefern, die nicht mit den Strukturdaten der Röntgenkristallographie korrelieren [23]. Hier spielt die Tatsache, dass während der Messung aufgrund der hohen Konzentration über ein großes Ensemble gemittelt wird, eine wesentliche Rolle.

Um einen genaueren Einblick in den Komplexbildungsprozess zu bekommen, werden die temperaturabhängigen Messungen mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen wiederholt. Außerdem soll die *Molten Globule* Struktur des monomeren *ESAT-6* Proteins untersucht werden. Neben strukturellen Eigenschaften stehen ebenfalls die Stabilität der Komplexe und der Austausch von einzelnen Proteinen zwischen verschiedenen Komplexen in Abhängigkeit der Temperatur im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Zum Vergleich wird ein homologer Proteinkomplex der WXG-100 Proteinfamilie untersucht. Das Protein *sagEsxA* des Bakteriums *Streptococcus agalactiae* bildet ein Homodimer mit ähnlicher Struktur wie *ESAT-6/CFP-10*, bestehend aus einem

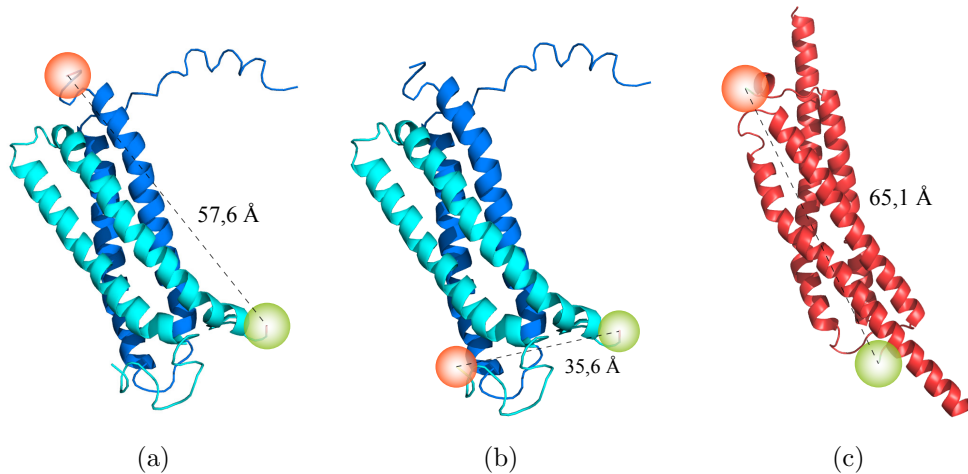


Abb. 6.5: Strukturen der beiden Komplexe *ESAT-6/CFP-10* (a) einzeln N-terminal markiert, (b) mit Donor-Akzeptor-markiertem *ESAT-6* und (c) *sagEsxA* mit den Farbstoffpositionen des Akzeptors (rot) und Donors (grün) für die FRET-Analyse. Die erwarteten Abstände, aus den pdb-Strukturen ermittelt, betragen für *ESAT-6/CFP-10* (1WA8) (a): $R_1 = 57,6 \text{ \AA}$, (b) $R_2 = 35,6 \text{ \AA}$ und (c) *sagEsxA* (3GVM) $R_3 = 65,1 \text{ \AA}$.

4-helikalen Bündel, dargestellt in Abbildung 6.2. Die analogen Ergebnisse zu CD-Spektroskopie und Ensemble-FRET-Messungen sind ebenfalls in den Abbildungen 6.3 und 6.4 dargestellt. Ziel ist es mit einem weiteren Protein der WXG-100 Familie eine mögliches universelles Verhalten für diese Proteinfamilie zu finden.

6.4 Durchführung

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Schemata zur Farbstoffmarkierung verwendet. Zuerst wurde für die intermolekularen FRET-Messungen jeweils ein Protein mit einem Farbstoff markiert. Die Farbstoffe *AlexaFluor488* und *AlexaFluor647* wurden dafür selektiv über eine Carbonsäureamidbindung, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, N-terminal an die Proteine gebunden. Außerdem wurde für die intramolekularen FRET-Messungen *ESAT-6* mit Donor (*AlexaFluor488*) und Akzeptor (*AlexaFluor647*) markiert. Hierfür wurde zusätzlich am C-terminalen Ende von *ESAT-6* ein Cystein angefügt. Der Akzeptor *AlexaFluor647* wurde über eine Thioetherbindung an das Cystein gebunden und der Donor *AlexaFluor488* über eine Amidbindung an das N-terminale Ende des Proteins. Die Farbstoffeigenschaften, wie zum Beispiel Spektren und Försterradius, und die verwendeten experimentellen Einstellungen für dieses Farbstoffpaar sind in Kapitel 4.2.2 zusammengefasst.

Exemplarisch sind die beiden Proteinkomplexe mit den jeweiligen Farbstoffpositionen, hier als farbige Kugeln, in Abbildung 6.5 dargestellt.

Die Messung der Proteine erfolgte in wässrigem Puffer (Probenpuffer 2, Kapitel 4.2.1). Um das Anlagern der Proteine am Deckglas zu verhindern, wurde 0.001 % TWEEN-20 als Detergenz zur Lösung hinzugegeben. Zusätzlich wurden die Deckgläser mit PMMA beschichtet. Zur Stabilisierung der Proteinkomplexe wurde durch Zugabe von BSA (*bovin serum albumin*) ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$) die Proteinkonzentration

in der Probe erhöht. Um aufgrund des Erhitzens der Probe entweichendes Gas und damit Blasenbildung zu verhindern, wurde der Puffer vor jeder Messung entgast.

Alle Messungen erfolgten mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Messaufbau mit Temperiereinheit. Die Farbstoffe wurden mit dem in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Pulsschema POE (*pulsed overlaid excitation*) angeregt und wie in Kapitel 4.2.3 vorgestellt ausgewertet.

6.4.1 Intermolekulare FRET-Messungen des Heterodimers *ESAT-6/CFP-10*

Konzentrationsabhängige Messung mit und ohne BSA

Für die Komplexmessung wurden das *AlexaFluor488* markierte *ESAT-6* und das *AlexaFluor647* markierte *CFP-10* in einem molekularen Verhältnis von 1 : 1 gemischt. Die Ausgangskonzentration betrug dabei 1 μ M. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Komplex auf zwei verschiedene Konzentrationen von 0,5 nM und 5,0 nM verdünnt und jeweils in Puffer, mit und ohne BSA, gemessen. Auf diese Weise soll der Einfluss von BSA (*Bovin Serum Albumin*) auf das FRET-Signal untersucht werden, da alle weiteren Messungen mit BSA durchgeführt werden sollen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur.

Temperaturabhängige Messung von *ESAT-6/CFP-10*

Für die temperaturabhängigen Komplexmessungen wurden wie zuvor *ESAT-6* und *CFP-10* im Verhältnis 1 : 1 gemischt und auf eine Konzentration von 0,5 nM verdünnt. Mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Messaufbau wurden Temperaturen im Bereich von 25 °C bis 46 °C eingestellt. Höhere Temperaturen waren aufgrund technischer Schwierigkeiten, wie verdunstendem Immersionswasser, nicht zu realisieren.

Messung zur Komplexstabilität von *ESAT-6/CFP-10*

Um einen möglichen Austausch der Proteine zwischen den Dimeren zu untersuchen, wurden zum Teil temperaturabhängige Experimente durchgeführt.

1. Als Erstes wurden das *AlexaFluor488* markierte *ESAT-6* und das *AlexaFluor647* markierte *CFP-10* bei einer Konzentration von 500 nM gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde eine Referenzprobe bei einer Konzentration von 0,5 nM gemessen. Der Stammlösung wurde *CFP-10* ohne Farbstoffmarkierung im 10000fachen Überschuss hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde wiederum bei einer Konzentration von 0,5 nM gemessen.

2. Als Zweites wurde eine Komplexprobe mit einer Konzentration von 500 nM vorbereitet, bei der beide Proteine *ESAT-6/CFP-10* mit Akzeptor (*AlexaFluor647*) markiert waren. Diese Probe wurde bei einer Konzentration von 0,5 nM gemessen. Anschließend wurde der hochkonzentrierten Probe Donor-markiertes *ESAT-6* (*AlexaFluor488*) im Überschuss von 2 : 1 zugegeben. Ein Teil der Probe wurde in einem externen Heizer (*Thermomixer*, *Eppendorf AG*, *Hamburg*, *Deutschland*) auf

60 °C erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einer Inkubationszeit von jeweils 1 h wurden die Kontrollprobe und die erhitzte Probe jeweils bei einer Konzentration von 0,5 nM gemessen.

3. Als Drittes wurden zwei Populationen an farbstoffmarkierten Komplexen hergestellt, die jeweils nur mit Donor oder nur Akzeptor markiert waren. Beide Populationen wurden durchmischt und nach einer Inkubationszeit von 1 h bei niedriger Konzentration von 0,5 nM gemessen. Die Stammlösung wurde wiederum extern erhitzt, diesmal auf 34 °C. Nach 1 h Abkühlen wurde wiederum bei einer Konzentration von 0,5 nM gemessen.

6.4.2 Intramolekulare FRET-Messungen des Monomers *ESAT-6* und des Heterodimers *ESAT-6/CFP-10*

Temperaturabhängige Messung von *ESAT-6*

Für die Untersuchung des monomeren *ESAT-6* wurde das doppelt mit Donor und Akzeptor markierte Protein bei einer Konzentration von 0,5 nM gemessen. Wiederum wurden mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Messaufbau Temperaturen im Bereich von 25 °C bis 45 °C eingestellt. Um die Ergebnisse der Temperaturentfaltung mit einer Referenz vergleichen zu können, wurde *ESAT-6* zusätzlich mit Guanidiniumchlorid der Konzentration 6 M entfaltet.

Temperaturabhängige Messung von *ESAT-6* im Komplex mit *CFP-10*

Für die Untersuchung des Komplexes wurde die Konzentration des farbstoffmarkierten *ESAT-6* Proteins auf 0,5 nM eingestellt. Das unmarkierte *CFP-10* wurde im 10000fachen Überschuss zugegeben. Die Messungen erfolgten wieder im Temperaturbereich von 25 °C bis 45 °C.

6.4.3 Intermolekulare FRET-Messungen des WXG-100 Analogs - *sagEsxA*

Zusätzlich wurden die temperaturabhängigen Messungen mit dem homologen Protein *sagEsxA* der WXG-Proteinfamilie wiederholt. Die jeweils mit Donor (*AlexaFluor488*) und Akzeptor (*AlexaFluor647*) markierten Proteine wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und anschließend, wie in Abbildung 6.4 dargestellt, auf 90 °C erhitzt, um die bereits bestehenden Komplexe zu lösen. Während des Abkühlens bilden sich erneut Homodimere aus, die nun gemischt Donor- und Akzeptorfarbstoffe tragen. Die Messung erfolgte analog zu *ESAT-6/CFP-10*.

6.5 Ergebnisse

6.5.1 Intermolekulare FRET-Messungen des Heterodimers *ESAT-6/CFP-10*

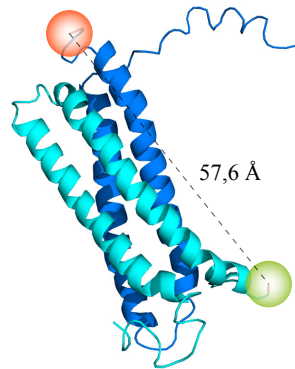


Abb. 6.6: Struktur von *ESAT-6/CFP-10* (hellblau/dunkelblau) einzeln N-terminal markiert mit den Farbstoffpositionen des Akzeptors (rot) und Donors (grün) für die FRET-Analyse. Der erwartete Abstand, aus der pdb-Struktur ermittelt, beträgt $R = 57,6 \text{ \AA}$.

Konzentrationsabhängige Messung mit und ohne BSA

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben, muss bei Einzelmolekülmessungen, die in Lösung durchgeführt werden, auf ausreichende Verdünnung der Probe geachtet werden. Um im Mittel die Wahrscheinlichkeit unter 1 % zu halten, dass sich gleichzeitig zwei Moleküle im Fokus befinden, sollte die mittlere Teilchenzahl im Fokus bei 0,1 liegen. Dies wird aufgrund des konfokalen Aufbaus des Mikroskops durch einen sehr kleinen Fokus im Femtoliterbereich umgesetzt und die Konzentration der Probe im Fokus wird über eine FCS-Messung kontrolliert und angepasst. Ein Beispiel ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Die verwendete Proteinkonzentration liegt bei 0,5 nM.

Die geringe Proteinkonzentration führt scheinbar dazu, dass der Komplex instabil wird und zerfällt. Erste Testmessungen zeigten über einen langen Zeitraum hinweg eine deutliche Abnahme des Signals. Um dem entgegenzuwirken, wird BSA (*Bovin Serum Albumin*) zum Messpuffer hinzugegeben. Die Erhöhung der Proteinkonzentration durch BSA führt zu einer deutlichen Stabilisierung des Komplexes, ohne dass die Konzentration der farbstoffmarkierten Proteine *ESAT-6/CFP-10* erhöht werden muss.

In Abbildung 6.8 sind die beiden Messungen mit und ohne BSA im Vergleich dargestellt. Im Bereich hoher Transfereffizienz zwischen 0,8 und 0,9 ist bei geringer Konzentration kein Unterschied in der Form des Histogramms zu erkennen. Lediglich die Population bei geringer Transfereffizienz zwischen 0,0 und 0,1 zeigt bei der Messung ohne BSA deutlich mehr Ereignisse im Vergleich zur Population hoher Transfereffizienzen. Ursachen sind hier einerseits ein hoher Anteil an freien Donormolekülen (*Donor only*), die trotz der Korrekturen (FAMS Auswerteschema, siehe Kapitel 2.3.2) im Histogramm auftauchen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Instabilität des Komplexes, da die freien Donor-markierten Proteine somit nicht mehr

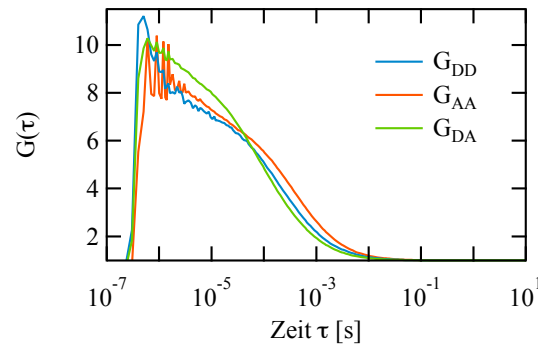


Abb. 6.7: Auto- und Kreuzkorrelationen der *ESAT-6/CFP-10*-Messung bei einer Temperatur von 25 °C. Autokorrelation des Donors (*ESAT-6-AlexaFluor488*) G_{DD} . Autokorrelation des Akzeptors (*CFP-10-AlexaFluor647*) G_{AA} . Kreuzkorrelation von Donor und Akzeptor G_{DA} .

im Komplex gebunden sind. Ein zusätzlicher Effekt könnte von der Ausbildung einer gestreckten Komplexkonformation herrühren, die sich aufgrund der Destabilisierung ausbildet und zu geringen Transfereffizienzen führt. Hinzu kommen die freien Farbstoffe, die trotz Aufreinigung noch zu einem geringen Anteil in der Probe vorhanden sind.

Bei den Messungen mit hoher Proteinkonzentration von 5,0 nM ist deutlich zu erkennen, dass keine separierten Populationen mehr zu erkennen sind. Aufgrund der zu hohen Teilchenanzahl im Fokus wird nicht das Signal eines einzelnen Moleküls detektiert, sondern die Mittelung über viele. Dies führt zu einer breiten Verteilung. Das Histogramm „verschmiert“.

Im weiteren Verlauf werden alle Einzelmolekülexperimente mit BSA durchgeführt. BSA erhöht deutlich die Langzeitstabilität des Komplexes. Dies ist vor allem in Hinblick auf die Temperaturmessungen erforderlich.

Raumtemperaturmessung von *ESAT-6/CFP-10*

In Abbildung 6.9 ist das FRET-Histogramm des Komplexes *ESAT-6/CFP-10* bei 25 °C dargestellt. Laut vorhergehender CD-Messungen [23], siehe Abbildung 6.3, ist davon auszugehen, dass hier ein stabiler Komplex vorliegt. Der erwartete Abstand im Proteinkomplex zwischen den beiden N-terminalen Aminosäuren wurde anhand der bekannten pdb-Struktur, dargestellt in Abbildung 6.5, ausgemessen und beträgt $R = 57,6 \text{ \AA}$. Die beiden Farbstoffe mit ihren Kopplungsgruppen sind an dieser Stelle noch nicht mit eingerechnet.

In Abbildung 6.9 sind deutlich zwei Bereiche zu erkennen. Die Population bei niedriger Transfereffizienz zwischen 0 und 0,2, die den freien Donormolekülen zugeordnet wird. Und eine Population bei hoher Transfereffizienz zwischen 0,6 und 1,0. Die niedrigen Transfereffizienzen werden mittels Gaußfunktion angepasst.

Die Population bei hohen Transfereffizienzen weist eine sehr breite asymmetrische Verteilung auf, die nicht ausschließlich durch Schrotrauschen bedingt ist. Die theoretische Verteilung der Transfereffizienz aufgrund von Schrotrauschen ergibt sich

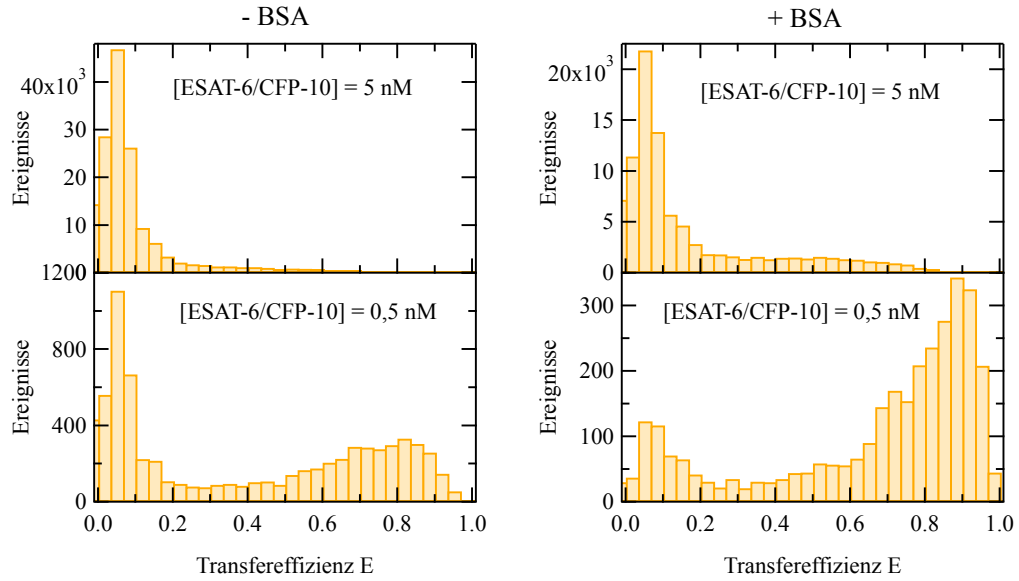


Abb. 6.8: Vergleich der Messung (links) ohne und (rechts) mit BSA. Zusätzlich ist der Einfluss der Konzentration von *ESAT-6/CFP-10* dargestellt. Hohe Konzentration 5,0 nM und Einzelmolekülkonzentration 0,5 nM. Summenschwelle: 200. Akzeptorschwelle: 80.

nach Gleichung 2.27. Der Mittelwert entspricht dem Maximum der experimentellen Verteilung der Transfereffizienz. Bleichen des Akzeptors kann ebenfalls als Ursache ausgeschlossen werden. Als Test wurden die Kreuzkorrelationen der Hin- und Rückkorrelation zwischen Donor- und Akzeptorsignal verglichen, und die FRET-Daten wurden Bin- und Burstweise ausgewertet. Hierauf wird im Folgenden nicht detailliert eingegangen. Mögliche Ursachen für die breite Verteilung sind verschiedene Konformationen des Komplexes und damit verschiedene Abstände zwischen den Farbstoffen oder eine starke Dynamik und Bewegung der Farbstoffe zueinander. Die Strukturuntersuchungen mittels NMR und Röntgenkristallographie bieten keine Hinweise auf verschiedene Konformationen des strukturierten Teils des Proteinkomplexes [67, 23], wohingegen die unstrukturierten und damit flexiblen Termini deutlich zu einer verbreiterten Abstandsverteilung führen können. Ist die Verteilung aufgrund der flexiblen Termini verbreitert, so ist der Zeitbereich der Bewegung deutlich größer als die Lebensdauer des angeregten Zustands [71]. Eine Kurvenanpassung mittels Gaußfunktion ist aufgrund der asymmetrischen Verteilung nicht sinnvoll. Da für den Komplex keine zwei verschiedenen Konformationen erwartet werden, ist die Linearkombination zweier Gaußfunktionen (Gauß) ebenfalls nicht zweckmäßig. Weist die Verteilung eine Asymmetrie auf, kann alternativ eine logarithmische Normalverteilung (logN) für die Kurvenanpassung genutzt werden [72]. Der Vergleich der Summe der Residuen von Gauß und logN mit 565 : 362 liefert für die logarithmische Normalverteilung die deutlich bessere Kurvenanpassung.

Anhand der mittleren Transfereffizienzen, ermittelt aus den Kurvenanpassungen, ergeben sich mit Gleichung 2.9 und dem Försterradius von $R_0 = 56,0 \text{ \AA}$ die in Tabelle 6.1 dargestellten mittleren Abstände.

Population 2 lässt sich eindeutig dem Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfarb-

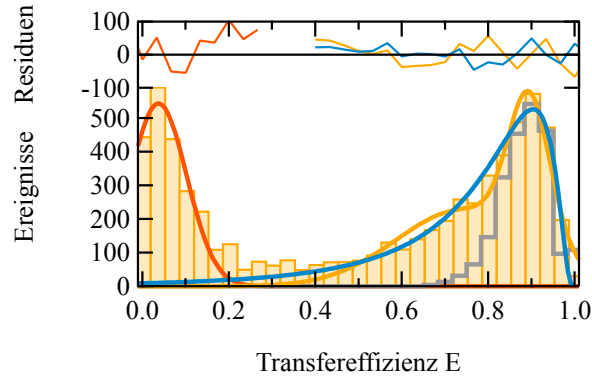


Abb. 6.9: FRET-Histogramm von *ESAT-6/CFP-10* bei einer Temperatur von 25 °C. Kurvenanpassung mittels Gaußfit (rot und orange) und Lognormalverteilung (blau). Verteilung der mittleren Transfereffizienz aufgrund von Schrottrauschen (grau). Summenschwelle: 100. Akzeptorschwelle: 80.

Tab. 6.1: Mittlere Transfereffizienzen E und die entsprechenden Abstände R für Population 1 und 2. Das Konfidenzintervall der Kurvenanpassung beträgt 95 %.

	E	R
Population 1	$0,037 \pm 0,008$	$(96,4 \pm 4,1) \text{ \AA}$
Population 2	$0,903 \pm 0,003$	$(38,6 \pm 0,2) \text{ \AA}$

stoff im Komplex, wie in Abbildung 6.5 dargestellt, zuordnen. Die Breite der Verteilung ist ein deutliches Indiz für die Flexibilität der unstrukturierten Termini. Diese Annahme wird durch die Korrelationsanalyse der Daten im folgenden Kapitel noch untermauert. Der Abstandsmittelwert ist mit $R = 38,6 \text{ \AA}$ deutlich geringer als der aus den Strukturdaten theoretisch ermittelte Wert von $R = 57,6 \text{ \AA}$. Da der Komplex kein starres Gebilde darstellt, wie dies durch Strukturabbildungen von Proteinen oft vermittelt wird, und die breite FRET-Verteilung bereits einen ersten Hinweis auf eine sehr dynamische und flexible Struktur gibt, ist eine Annäherung der Farbstoffe aufgrund der sich dynamisch im Raum beweglichen Termini durchaus plausibel.

Population 1 zeigt Ereignisse mit einem mittleren Abstand bei $R = 96,4 \text{ \AA}$. Diese Ereignisse passen nicht zur bekannten Komplexstruktur. Entweder werden die Ereignisse durch einen hohen Anteil an freien Donormolekülen verursacht, das heißt es befinden sich gleichzeitig mindestens ein Donor- und ein Akzeptormolekül im Fokus und führen so zur Detektion eines Signals bei einer Stöchiometrie von $S = 0,5$ oder der Komplex zeigt weitere Strukturen. Mögliche Theorien zum Entstehen dieser Population sind die Ausbildung von Polymeren oder die Existenz einer gestreckten Konformation des Komplexes. Ein Aneinanderlagern der Komplexe würde somit zum Energietransfer über einen großen Abstand hinweg führen, schematisch dargestellt in Abbildung 6.10.

Um diese möglichen, aber sehr unwahrscheinlichen Strukturen des Komplexes auszuschließen, wird im folgenden Kapitel der Einfluss freier Donormoleküle auf die Verteilung der Transfereffizienz untersucht. Außerdem wird in Kapitel 6.5.2 das Ex-

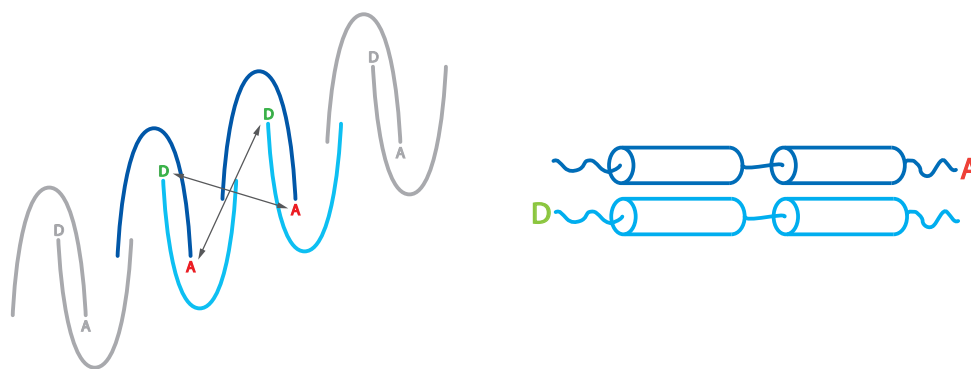


Abb. 6.10: Links: Schematische Darstellung einer möglichen Polymerstruktur von *ESAT-6/CFP-10*. Die Pfeile deuten möglichen intermolekularen Energietransfer zwischen einzelnen Komplexen an. Rechts: Schematische Darstellung einer möglichen gestreckten Konformation von *ESAT-6/CFP-10*. Angedeutet sind die erhaltenen alphahelikalen Strukturen.

periment mit dem Donor-Akzeptor-markierten *ESAT-6* Protein wiederholt. Eine gestreckte Konformation oder Polymerisation kann dadurch direkt dargestellt werden.

Einfluss der freien Donormoleküle auf die Verteilung der Transfereffizienz

Während der Analyse der Daten ist aufgefallen, dass abhängig von der eingestellten Summenschwelle der FRET-Auswertung, sich das Verhältnis zwischen Population 1 und 2 unterscheidet. Mit steigender Summenschwelle nimmt Population 1 deutlich ab. Dies lässt auf einen starken Einfluss der freien Donormoleküle schließen, trotz niedriger Konzentration. Eine durch FRET induzierte Population sollte im Verhältnis zu Population 2 nicht von der Summenschwelle abhängen. Ereignisse von freien Donormolekülen werden trotz Akzeptorschwelle mit $S = 0,5$ detektiert, wenn völlig unabhängig ein Donor- und ein Akzeptormolekül gleichzeitig durch den Fokus diffundieren. Mit steigender Summenschwelle reduzieren sich diese Ereignisse, da nur Ereignisse hoher Intensität gezählt werden. Dies ist der Fall, wenn Donor und Akzeptor möglichst gleichzeitig und dicht beieinander durch den Fokus diffundieren. Bei gekoppelten Molekülen, wie dem untersuchten Komplex, ist dies zutreffend. Eine hohe Summenschwelle lässt sich jedoch nur bei hoher Intensität der Einzelfarbstoffe umsetzen.

Im Folgenden wird eine Kontrollprobe gezeigt, bei der absolut unabhängig diffundierende Donor- und Akzeptorfarbstoffe untersucht werden. Es wird die gleiche Konzentration, wie für die Komplexmessung mit *ESAT-6/CFP-10*, eingestellt. Das Anregungsmuster der Farbstoffe und die Auswertung der Daten erfolgt nach dem identischen Schema aus Kapitel 4.2.3. In Abbildung 6.11 sind die beiden Histogramme mit und ohne Akzeptorschwelle dargestellt. Ohne Akzeptorschwelle werden alle freien Donormoleküle detektiert und im Histogramm dargestellt. Im FAMS-Histogramm ist deutlich zu erkennen, wie ebenfalls Ereignisse bei hohen Stöchiometriewerten detektiert werden. Bei gesetzter Akzeptorschwelle sollten eigentlich keine Ereignisse mehr in die Auswertung eingehen, da Donor und Akzeptor unabhängig voneinander

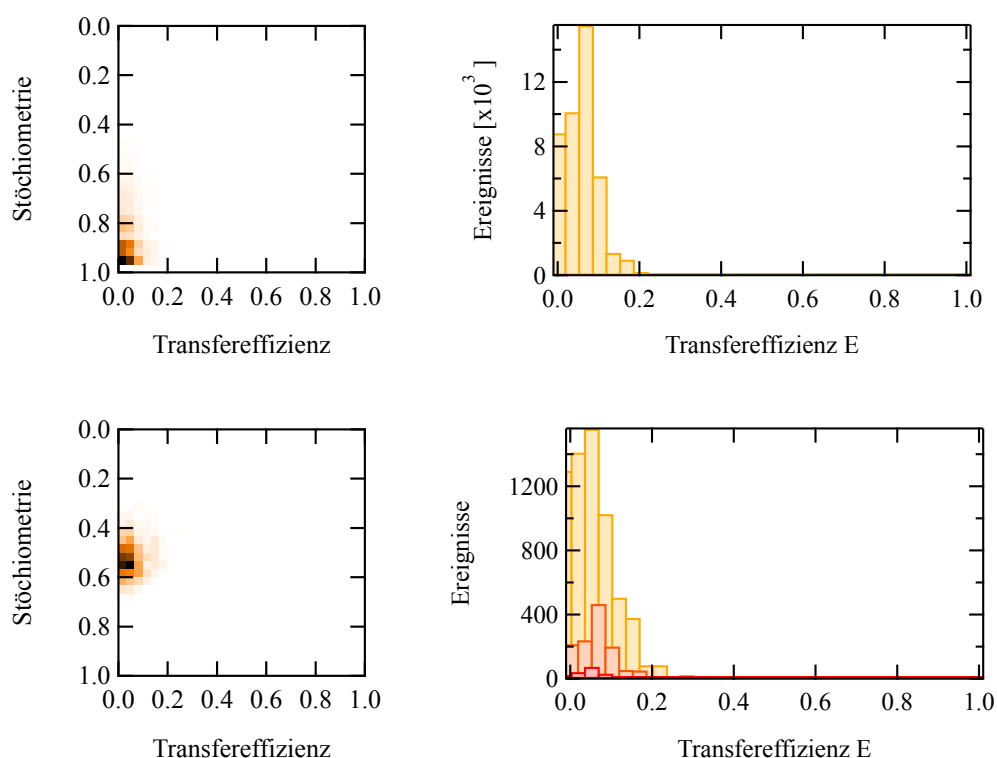


Abb. 6.11: Messung der freien Donor- und Akzeptorfarbstoffe. Vergleich der FAMS- und FRET-Histogramm bei verschiedenen Summen- und Akzeptorschwellen. Oben: keine Akzeptorschwelle. Summenschwelle: 150. Unten: gesetzte Akzeptorschwelle: 80 und verschiedene Summenschwellen, ansteigend von gelb nach rot: 100 bis 200.

diffundieren. Falls doch beide Farbstoffe gleichzeitig im Fokus auftauchen, werden auch bei gesetzter Akzeptorschwelle Ereignisse detektiert. Wird die Summenschwelle bei gleichbleibender Akzeptorschwelle erhöht, nehmen die Ereignisse, wie erwartet, ab. Es kann damit gezeigt werden, dass die detektierte Population 1 bei niedriger Transfereffizienz durch zufällige Koinzidenzereignisse von Donor- und Akzeptorfarbstoffe verursacht wird.

Wie sich im weiteren Verlauf zeigt, kann bei den temperaturabhängigen Messungen die Summenschwelle nicht beliebig erhöht werden, da die Signalintensität mit steigender Temperatur deutlich abnimmt. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wird jede Messreihe mit den gleichen Schwellwerten ausgewertet, weshalb Population 1 durchgehend präsent ist. Da keine Überlagerung mit dem eigentlichen Komplex stattfindet, kann diese Population ignoriert werden und hat keine weitere Bedeutung für die Auswertung.

Temperaturabhängige Messung von *ESAT-6/CFP-10*

In Abbildung 6.12 ist der Verlauf der Transfereffizienz in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Den Start bildet die Messung bei 25 °C. Population 2 wird mittels logarithmischer Normalverteilung angepasst. Insgesamt konnte die Temperatur

bis 46 °C erhöht werden.

Für die Messung der Temperaturreihe ergaben sich einige Schwierigkeiten. So konnten höhere Temperaturen aufgrund des Messaufbaus nicht realisiert werden. Die Heizleistung des Aufsatzes reicht nicht aus, um höhere Temperaturen in der Probenkammer einzustellen. Verdunsten des Immersionswassers führt zum Einbrechen des Fluoreszenzsignals. Je höher die Temperatur in der Probe ist, umso kürzer fällt demzufolge die Messzeit aus. Außerdem wurde für den Großteil der Messungen dieselbe Probenkammer verwendet. Bleichen der Farbstoffe und Anheften der Proteine an der Oberfläche der Kammer führen im Verlauf der Messreihe zur Abnahme an freien Proteinen mit intakten Farbstoffen. Die Reduktion der Messzeit und der detektierbaren Proteine in der Lösung führten insgesamt zu einer Abnahme der Ereignisse und damit schlechteren Statistik in der Auswertung. Deutlich Sprünge in der Anzahl an Ereignissen sind auf Probenwechsel und unterschiedliche Messzeiten zurückzuführen.

Dessen ungeachtet lässt sich eindeutig eine Änderung der Transfereffizienzen mit steigender Temperatur beobachten. Die Population hoher Transfereffizienz nimmt mit steigender Temperatur schnell ab und verschwindet im Bereich von 35 bis 38 °C. Die Kurvenanpassung der einzelnen Messungen zeigt keine Änderung des Schwerpunktes der einzelnen Populationen. Eine Verschiebung wäre ein eindeutiges Indiz für eine strukturelle Änderung im Komplex. Hier ist jedoch ausschließlich eine Abnahme der Ereignisse zu verzeichnen. Dies ist auf die Dissoziation der aus Abbildung 6.5 bekannten Struktur zurückzuführen und steht im Widerspruch zu den CD-spektroskopischen Daten, bei denen eine Schmelztemperatur von $T_{melt} = 46\text{ °C}$ ermittelt wurde [23]. Die CD-Daten geben jedoch ausschließlich die Sekundärstruktur der beiden Proteine *ESAT-6/CFP-10* wieder. Ein frühes Dissoziieren der ursprünglichen Komplexstruktur, ohne dass die Alphahelices ihre Struktur verlieren, ist durchaus möglich. Inwieweit sich die Sekundärstruktur der Proteine während der Temperaturzunahme ändert, lässt sich ebenfalls durch das Experiment mit dem Donor-Akzeptor-markierten *ESAT-6* Protein klären (siehe Kapitel 6.5.2).

Die Dynamikanalyse, die im nächsten Kapitel behandelt wird, liefert ebenfalls einen Nachweis für das Dissoziieren der bekannten Komplexstruktur ab 35 °C. Entfernen sich die Termini voneinander, sollte sich dies in den Korrelationsdaten widerspiegeln.

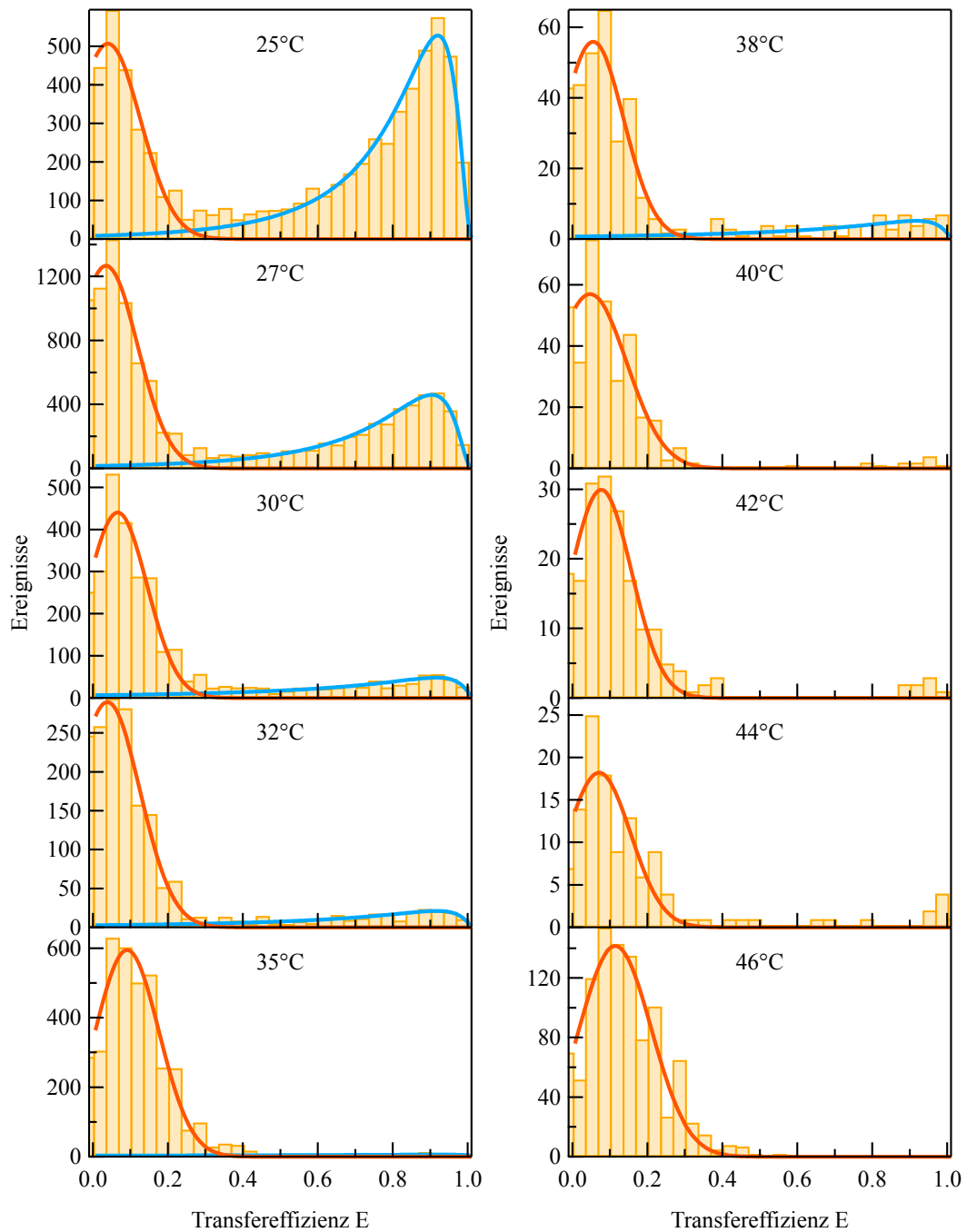


Abb. 6.12: Entwicklung der Transfereffizienz des Komplexes *ESAT-6/CFP-10* in Abhängigkeit der Temperatur von 25 °C bis 46 °C. Kurvenanpassung der Population 1 mittels Gaußfunktion (rot) und der Population 2 mittels logarithmischer Normalfunktion (blau). Summenschwelle: 100. Akzeptorschwelle: 80.

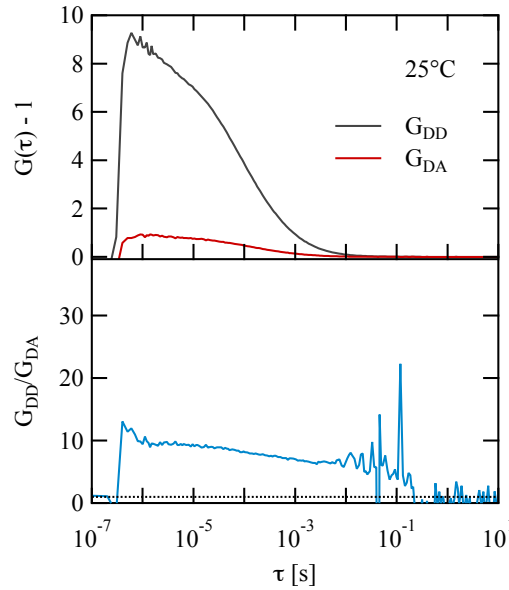


Abb. 6.13: Dynamikanalyse mittels Auto- und Kreuzkorrelation der Fluoreszenzdaten für die 25 °C - Messung. Dargestellt sind die Autokorrelation des Donors G_{DD} (schwarz), die Kreuzkorrelation von Donor und Akzeptor G_{DA} (rot) und der Quotient G_{DD}/G_{DA} (blau).

Dynamikanalyse der temperaturabhängigen Messung von *ESAT-6/CFP-10*

In Kapitel 2.3.1 wurde bereits erläutert, dass es aufgrund der begrenzten Zeitauflösung der FRET-Auswertung nur schwer möglich ist, bei breiten FRET-Verteilungen zu differenzieren, ob es sich um mehrere statisch eng beieinander liegende Konformationen handelt oder ob die breite Verteilung durch ein dynamisches System verursacht wird. Nach Torres und Levitus [15] ist es möglich, mittels Korrelationsanalyse interne Dynamik nachzuweisen. Fluktuationen der Intensitäten von Donor und Akzeptor aufgrund dynamischer Bewegung zueinander werden in der Korrelation sichtbar. Wird der Quotient aus Auto- und Kreuzkorrelation des Donor- und Akzeptorkanals gebildet, lässt sich der Dynamikbereich vom diffusiven Anteil der Korrelation trennen. Dies ist notwendig, da sich beide Bereiche zeitlich überlagern. Exemplarisch ist in Abbildung 6.13 das Ergebnis der Auto- und Kreuzkorrelation für die Messung des Komplexes bei 25 °C dargestellt. Der Quotient aus beiden Korrelationsfunktionen eliminiert den überlagernden diffusiven Anteil. Die Korrelationsanalyse der Daten soll verdeutlichen, dass die unstrukturierten Termini von *ESAT-6/CFP-10* aufgrund ihrer Dynamik und Flexibilität zur breiten Verteilung von Population 2 führen. Außerdem sollte der Übergang bei 35 °C in den Korrelationsdaten sichtbar werden, da sich hier die ursprüngliche, aus Abbildung 6.2 bekannte, Struktur löst und Population 2 verschwindet. Für die Korrelationsanalyse werden ausschließlich Photonen der reinen Donoranregung verwendet, siehe Abbildung 2.13.

Für den kompletten Temperaturbereich von 25 °C bis 44 °C sind die Quotienten aus den Auto- und Kreuzkorrelationen in Abbildung 6.14 zusammengefasst. Die Graphen für die jeweilige Temperaturmessung werden zur besseren Darstellung auf

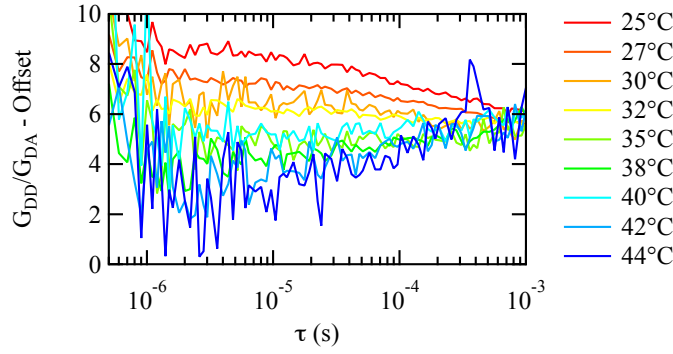


Abb. 6.14: Entwicklung des ESAT-6/CFP-10 Komplexes über einen Temperaturbereich von 25 °C bis 44 °C. Dynamikanalyse mit Nullpunktverschiebung (*Offset*).

einen festen Bezugspunkt verschoben, um die Änderung der Anstiege der verschiedenen Messungen zueinander zu veranschaulichen. Der deutliche Abfall der Kurve bei 25 °C ist eindeutig auf einen dynamischen Prozess zurückzuführen. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Flexibilität der unstrukturierten Termini. Die daraus resultierende starke Fluktuation des Abstands der beiden Farbstoffe führt folglich zur breiten Verteilung der Transfereffizienz in Abbildung 6.9. Im Verlauf steigender Temperatur werden die Anstiege der Kurven flacher, und ab 35 °C ist ein deutlicher Umschlag festzustellen, analog zum Verschwinden des Anteils hoher Transfereffizienz im FRET-Histogramm. Die Kurven sind nun stark verrauscht und zeigen einen flachen Verlauf mit leichtem Anstieg. Der Umschlag bei 35 °C ist ein weiterer Nachweis für das gegenüber den CD-spektroskopischen Daten frühzeitige Dissoziieren des Komplexes. Ob der flache Anstieg der Kurven über 35 °C durch die Messapparatur verursacht wird, lässt sich mit einer Referenzprobe verifizieren. Dissoziiert der Komplex, sollte theoretisch keine Korrelation zu detektieren sein. Der Anstieg wäre damit Null.

Als Referenz werden Tetraspeck-Beads verwendet. Tetraspeck-Beads sind feste Kunststoffkugeln, welche kein dynamisches Verhalten zeigen, da die Farbstoffe statische Abstände zueinander aufweisen, wie in Kapitel 5.4 vorgestellt. In Abbildung 6.15 ist das Ergebnis der Auto- und Kreuzkorrelation dargestellt. Der Quotient aus beiden Kurven eliminiert den diffusiven Anteil und sollte, da kein dynamischer Prozess erwartet wird, keinen Anstieg aufweisen. Die Kurve zeigt jedoch wie die Ergebnisse aus Abbildung 6.14, einen flachen Verlauf mit leichtem Anstieg. Nach dem Umbruch bei 35 °C ist somit kein dynamischer Prozess zu beobachten und der leichte Anstieg lässt sich ausschließlich auf den Einfluss der Messapparatur zurückführen.

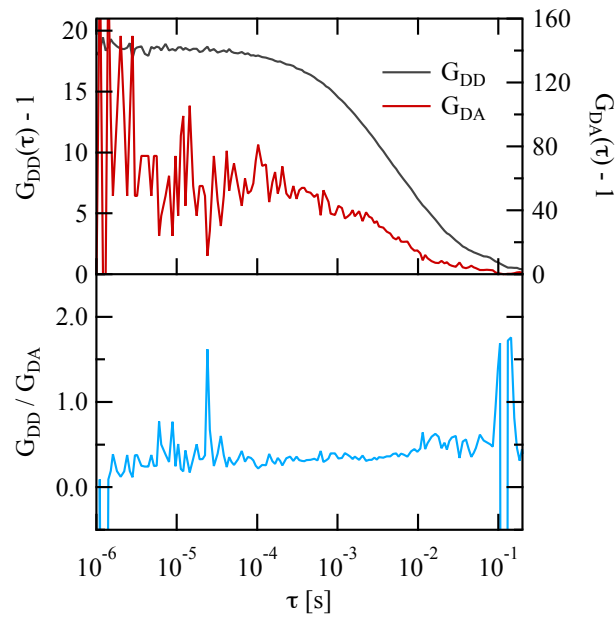


Abb. 6.15: Dynamikanalyse mittels Auto- und Kreuzkorrelation der Fluoreszenzdaten für Tetraspeck-Beads. Dargestellt sind die Autokorrelation des Donors G_{DD} (schwarz), die Kreuzkorrelation von Donor und Akzeptor G_{DA} (rot) und der Quotient G_{DD}/G_{DA} (blau).

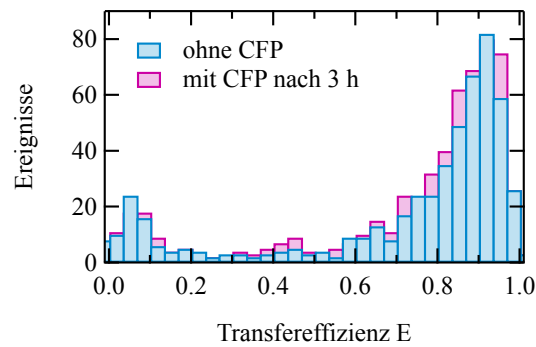


Abb. 6.16: Austauschexperiment 1. Transfereffizienz vor und nach Zugabe von *CFP-10* im Überschuss ohne Farbstoffmarkierung zu farbstoffmarkiertem Komplex *ESAT-6/CFP-10*. Summenschwelle: 150. Akzeptorschwelle: 80.

Untersuchung der Komplexstabilität von *ESAT-6/CFP-10*

Zum Test der Stabilität des Komplexes werden drei verschiedene Experimente durchgeführt:

1. Um die Stabilität des Komplexes bei Raumtemperatur zu testen, wird *CFP-10* im Überschuss zu den bereits komplexierten und farbstoffmarkierten Proteinen *ESAT-6/CFP-10* gegeben. Dissoziiert der Komplex und *ESAT-6* geht mit dem unmarkierten *CFP-10* eine neue Bindung ein, wird dieser Komplex nicht mehr als Ereignis im FRET-Histogramm dargestellt. Da das unmarkierte Protein *CFP-10* im 10000 fachen Überschuss vorliegt, würden mit hoher Wahrscheinlichkeit nur sehr wenige Komplexe mit beiden Farbstoffen auftreten. Eine signifikante Abnahme der Ereignisse wäre zu erwarten.

In Abbildung 6.16 ist jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Histogrammen vor und nach Zugabe von *CFP-10* zu erkennen. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass der Komplex bei Raumtemperatur stabil ist und kein Austausch zwischen bereits komplexierten Proteinen stattfindet. Die Dissoziation der Struktur findet erst mit Erhöhung der Temperatur statt.

2. Wird die Probe mit komplexierten Proteinen auf 60 °C erhitzt, sollte erwartungsgemäß die Komplexstruktur dissoziieren und nach anschließendem Abkühlen und Neuorganisation der Proteine wieder ausbilden. Hierfür wird zunächst ein komplett mit Akzeptor markierter Komplex gemessen. Wie in Abbildung 6.17 dargestellt, liefert die Probe kein signifikantes FRET-Signal, da kein Donor zur Verfügung steht. Nach Zugabe von Donor-markiertem *ESAT-6* im Überschuss ist ein deutliches Signal bei niedrigen Transfereffizienzen (Population 1) zu erkennen. Dies ist wieder auf eine hohe Konzentration freier Donormoleküle zurückzuführen. Außerdem sind einige Ereignisse bei hohen Transfereffizienzen (Population 2) zu detektieren. Da ebenfalls einige freie mit Akzeptor markierte *CFP-10* Proteine in der Probe vorhanden sind, komplexieren diese und liefern bereits einzelne Ereignisse bei hohen Transfereffizienzen. Wird die Probe auf 60 °C erhitzt, dissoziieren die Komplexe komplett [23]. Die Proteine durchmischen und während des Abkühlens kommt es zur erneuten Komplexbildung. Dies ist deutlich mit der Zunahme von Population 2 in Abbildung 6.17 zu erkennen. Der hohe Anteil der Population 1 ist wiederum auf die hohe Konzentration an freien Donormolekülen zurückzuführen.

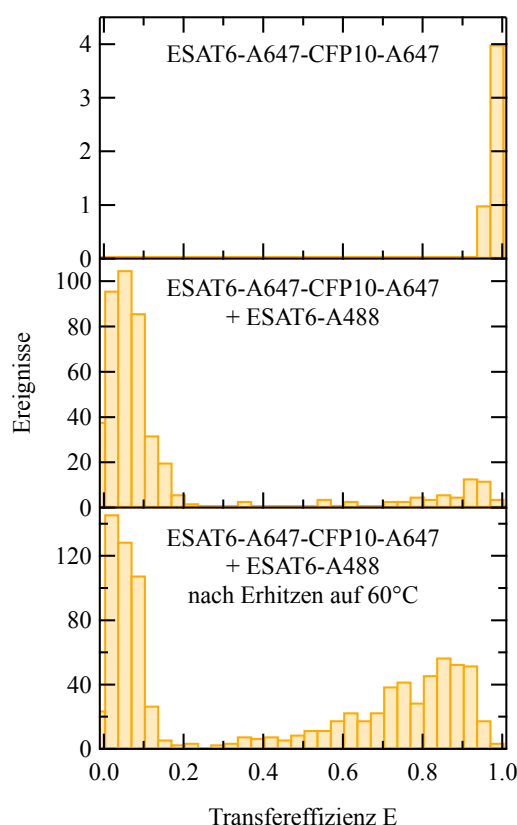


Abb. 6.17: Austauschexperiment 2. Transfereffizienz vor Zugabe von Donor-markiertem *ESAT-6* zum Akzeptor-markierten Komplex *ESAT-6/CFP-10* (oben), nach Zugabe von Donor-markiertem *ESAT-6* (Mitte) und nach Erhitzen auf 60 °C und anschließendem Abkühlen auf 25 °C (unten). Summenschwelle: 150. Akzeptorschwelle: 80.

Die Stabilität bei Raumtemperatur konnte erneut gezeigt werden und ebenso die Reversibilität der Komplexbildung nach Erhitzen der Probe auf mindestens 60 °C.

3. Wie bereits zuvor gezeigt, liefern die Einzelmoleküldaten einen anderen Verlauf der Dissoziation in Abhängigkeit von der Temperatur als die CD-Spektroskopiedaten. Der Verlauf der Transfereffizienzen zeigt, wie in Abbildung 6.12 dargestellt, bereits ab 35 °C einen deutlichen Umschlag, im Gegensatz zu den CD-Messungen, bei denen die Schmelztemperatur mit 46 °C ermittelt wurde. Um zu Überprüfen, ob der Komplex bereits bei 35 °C austauscht, werden zwei Komplexproben vorbereitet. Diese sind jeweils nur mit Donor oder nur mit Akzeptor markiert. In Abbildung 6.18 ist deutlich zu erkennen, dass bei Durchmischung der beiden Proben ohne vorheriges Erhitzen kein Austausch zu beobachten ist. Einzig wenige freie Proteine bilden vereinzelte Komplexe. Es ist aber keine signifikante Population bei hohen Transfereffizienzen zu erkennen. Nachdem die Probe mit einem externen Heizer auf 34 °C erhitzt wurde, ist nach anschließendem Abkühlen eine deutliche Zunahme der Ereignisse im Bereich hoher Transfereffizienz zu erkennen.

Dies ist ein eindeutiger Beweis für die Durchmischung der Probe. Während der Komplex bei Raumtemperatur nachweislich stabil ist, genügt bereits eine Temperaturzu-

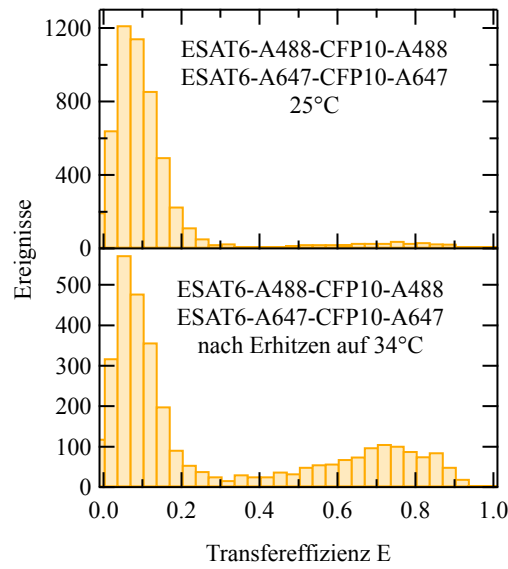


Abb. 6.18: Austauschexperiment 3. Transfereffizienz vor (oben) und nach Erhitzen der Probe auf 34 °C und anschließendem Abkühlen auf 25 °C (unten). Mischung zweier Komplexpopulationen, jeweils ausschließlich mit Donor oder Akzeptor markiert. Summenschwelle: 150. Akzeptorschwelle: 80.

nahme auf 34 °C, um die Bindung zwischen den Proteinen zu lösen. Anschließendes Abkühlen führt zur erneuten Komplexierung.

6.5.2 Intramolekulare FRET-Messungen des Monomers *ESAT-6* und des Heterodimers *ESAT-6/CFP-10*

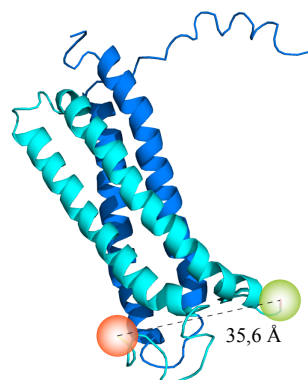


Abb. 6.19: Struktur von *ESAT-6/CFP-10* (hellblau/dunkelblau) mit Donor-Akzeptor-markiertem *ESAT-6* mit den Farbstoffpositionen des Akzeptors (rot) und Donors (grün) für die FRET-Analyse. Der erwartete Abstand, aus der pdb-Struktur ermittelt, beträgt $R = 35,6 \text{ \AA}$.

Raumtemperaturmessung von *ESAT-6* und seinem Komplex mit *CFP-10*

Bei den bisherigen Untersuchungen der jeweils nur mit einem Farbstoff markierten Proteine *ESAT-6/CFP-10* konnte im Unterschied zu den CD-spektroskopischen Daten bereits ein frühes Dissoziieren des Komplexes bei 35°C nachgewiesen werden. Die CD-Daten zeigten eine Schmelztemperatur von $T_{\text{melt}} = 46^\circ\text{C}$ [23]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die CD-Daten nur Informationen über die Sekundärstruktur der Proteine liefern. Dissoziiert der Komplex, ist es durchaus möglich, dass die Einzelproteine noch strukturiert sind, bevor sie bei höheren Temperaturen endgültig entfalten. Die Dissoziation des Komplexes bei konservierten Sekundärstrukturen von *ESAT-6* und *CFP-10* lässt sich mittels CD-Spektroskopie nicht nachweisen.

Sind beide Proteine isoliert in Lösung, sollen *CFP-10* gänzlich unstrukturiert und *ESAT-6* als *Molten Globule* vorliegen [67, 73]. Um weitere Informationen zur Struktur von *ESAT-6* im Komplex und als *Molten Globule* zu erhalten, wird *ESAT-6* N-terminal mit einem Donor (*AlexaFluor488*) und C-terminal mit einem Akzeptor (*AlexaFluor647*) markiert, dargestellt in Abbildung 6.5. *CFP-10* wird für die Untersuchungen zum Komplex unmarkiert und im 10000 fachen Überschuss zugegeben. Ziel ist hierbei, dass möglichst alle *ESAT-6* Proteine im Komplex gebunden vorliegen. Für das monomere und komplexierte *ESAT-6* liegt hier vor allem der Schwerpunkt auf den strukturellen Änderungen des Proteins in Abhängigkeit der Temperatur. Auch die Annahmen zur möglichen Polymerisation oder gestreckten Konformation der Komplexe aus Abbildung 6.10 sollen bestätigt oder widerlegt werden.

In Abbildung 6.20 ist der Vergleich der Messungen des monomeren mit dem komplexierten *ESAT-6* Protein dargestellt. In beiden Fällen, für das monomere und das

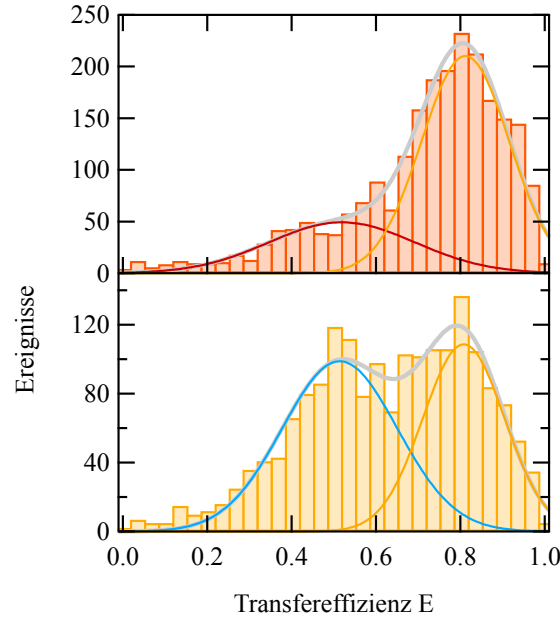


Abb. 6.20: Vergleich der Verteilung der Transfereffizienz des Donor-Akzeptormarkierten *ESAT-6* (oben) als Monomer und (unten) im Komplex mit *CFP-10* bei $T = 25^\circ\text{C}$. Kurvenanpassung mittels Gaußfunktion. Rot: komplexfähiges *ESAT-6*. Gelb: nicht komplexfähiges *ESAT-6*. Blau: komplexiertes *ESAT-6*. Summenschwelle: 200. Akzeptorschwelle: 100.

komplexierte *ESAT-6*, sind zwei Populationen zu erkennen, die sich jeweils durch eine Linearkombination zweier Gaußfunktionen anpassen lassen. Der Unterschied zwischen beiden Messungen liegt im Verhältnis der Ereignisse beider Populationen. Die Ergebnisse der Kurvenanpassung mit den mittleren Abständen und das Verhältnis der Flächen unter den Gaußverteilungen ist in Tabelle 6.2 zusammengefasst:

Tab. 6.2: Mittlere Transfereffizienzen E , die entsprechenden Abstände R und die Flächen A der Gaußfunktionen für Population 1 und 2. Das Konfidenzintervall der Kurvenanpassung beträgt 95%.

		E	R	A
Monomer	Population 1	$0,519 \pm 0,124$	$(55,3 \pm 13,2) \text{ \AA}$	3600
	Population 2	$0,811 \pm 0,013$	$(43,9 \pm 0,7) \text{ \AA}$	9100
Komplex	Population 1	$0,514 \pm 0,022$	$(55,5 \pm 2,4) \text{ \AA}$	5600
	Population 2	$0,808 \pm 0,015$	$(44,1 \pm 0,8) \text{ \AA}$	4400

Auffällig sind im Fall des monomeren *ESAT-6*, dass scheinbar zwei Konformationen des Proteins vorliegen. Dass die zweite Konformation durch Farbstoffe verursacht wird, deren Rotationsverhalten aufgrund von Wechselwirkung mit dem Protein eingeschränkt ist, kann ausgeschlossen werden. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Anisotropiemessungen [74] konnten die freie Rotation der Farbstoffe bestätigen. Die experimentellen Daten sind nicht aufgeführt. Beide Populatio-

nen liegen im Verhältnis 1 : 2,5 vor. Im Vergleich zum Komplex werden ebenfalls zwei Konformationen detektiert. Auffällig ist die Zunahme von Population 1. Diese wird dem eigentlichen Komplex zugeordnet. Dies kann im Verlauf der Temperaturentfaltung ebenfalls verifiziert werden. Population 2 ist identisch mit Population 2 des monomeren Proteins. Ein Teil der *ESAT-6* Proteine scheint keinen Komplex mit *CFP-10* einzugehen. Beide Populationen liegen im Verhältnis 1,3 : 1 vor. Auch nach Entfalten der Proteine durch Erhitzen und Rückfaltung durch Abkühlen ändert sich dieses Verhältnis aus komplexiertem und nicht-komplexiertem *ESAT-6* nicht. Hierfür wurden zwei Proben des Komplexes angesetzt. So wurde einerseits *CFP-10* zugegeben und nach ausreichender Wartezeit direkt die Messung gestartet und andererseits wurde die Probe nach Zugabe von *CFP-10* auf 60 °C erhitzt, damit beide Proteine zuvor entfalten und anschließend während des Abkühlens neu komplexieren. Da beide Experimente jeweils das gleiche Ergebnis lieferten, ist nur ein Histogramm der Komplexmessung in Abbildung 6.20 dargestellt.

Aufgrund der ermittelten kurzen Abstände können sowohl die Polymerisation mehrerer *ESAT-6/CFP-10* Komplexe als auch die vermutete, gestreckte Konformation des Komplexes ausgeschlossen werden. Die Population niedriger Transfereffizienz des vorherigen Kapitels ist eindeutig auf freie Donormoleküle zurückzuführen.

Ein zunächst widersprüchlicher Unterschied ist in der Verteilung der Abstände zwischen dem komplexierten und dem nicht-komplexierten *ESAT-6* festzustellen. Im Komplex wird ein sehr kleiner Abstand zwischen C- und N-terminalem Ende des Proteins erwartet. Der Abstand im nicht-komplexierten *ESAT-6* ist mit $R_2 = 44,1 \text{ \AA}$ jedoch nochmals kleiner als im Komplex mit $R_1 = 55,5 \text{ \AA}$. Bei einer teilweise unstrukturierten *Molten Globule* Struktur des *ESAT-6* Monomers ist zunächst ein größerer Abstand erwartet worden. Möglicherweise führt ein hydrophober Kollaps der beiden parallel angeordneten Alphahelices des *ESAT-6* zu einem noch kleineren Abstand zwischen den Enden. Und scheinbar ist diese Bindung so stark, dass das Protein nicht mit *CFP-10* wechselwirken kann und nicht für die Komplexbildung zur Verfügung steht. Im folgenden Experiment wird anhand der Temperaturentfaltung der Nachweis erbracht, dass Population 2 bereits einer Struktur und keinem entfalteten Zustand (*random coil*) zugeordnet werden kann. Der in Abbildung 6.19 dargestellte Abstand zwischen den beiden Termini im Komplex ist mit $R = 35,6 \text{ \AA}$ wesentlich kürzer als der experimentell ermittelte Abstand von $R_1 = 55,5 \text{ \AA}$. Zieht man in Betracht, dass die Kopplungsgruppen der beiden Farbstoffe zu einer zusätzlichen Abstandsvergrößerung von ca. $5 \text{ \AA}$ je Farbstoff führen [75], ist ein größerer Abstand durchaus plausibel. Außerdem muss beachtet werden, dass das verwendete System nicht auf absolute Abstandsbestimmung ausgelegt ist, da keine Abstandsreferenz, wie farbstoffmarkierte DNA, für das verwendete Farbstoffsystem und den Messaufbau zu Verfügung steht.

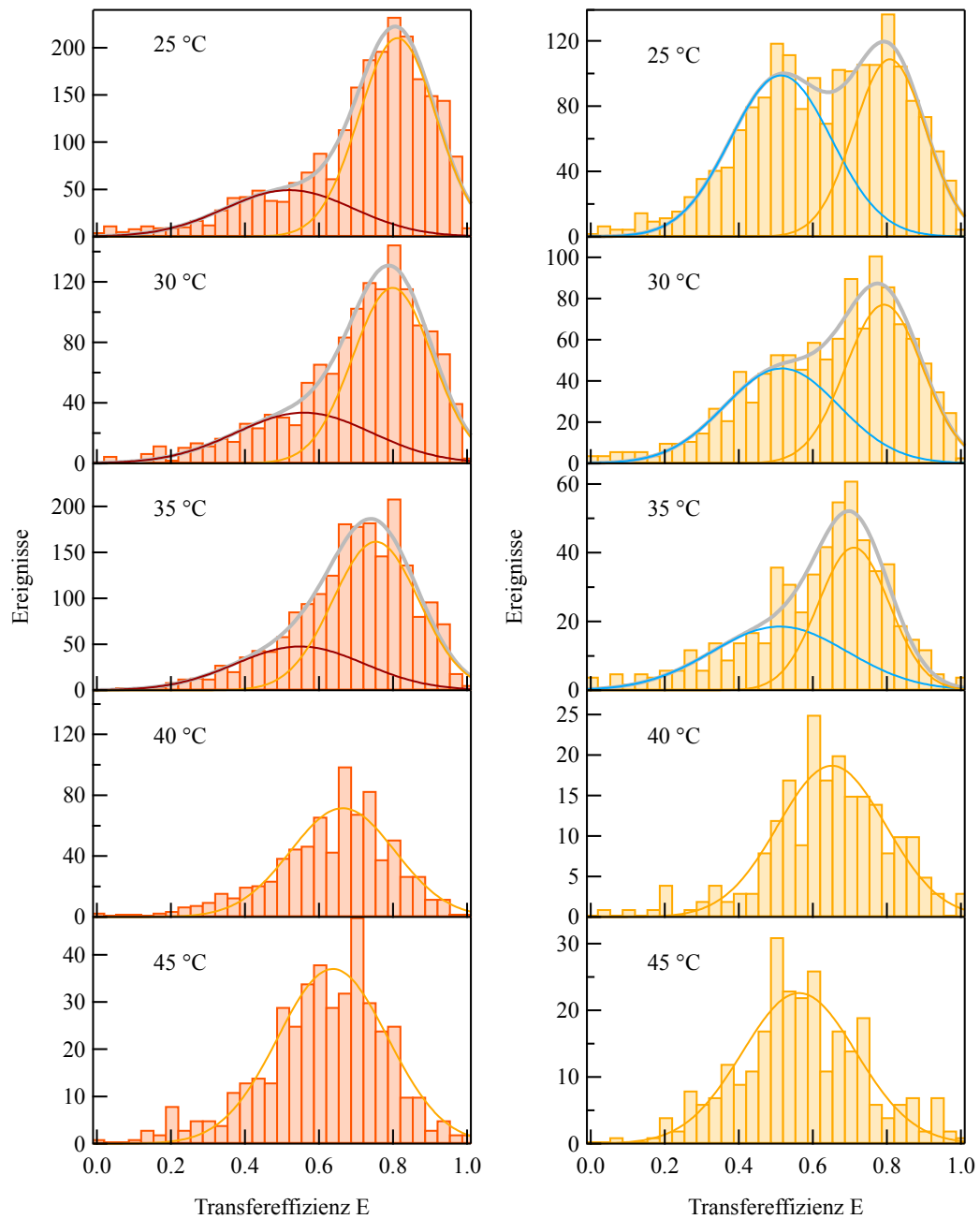


Abb. 6.21: Entwicklung der Verteilung der Transfereffizienz des Donor-Akzeptor-markierten *ESAT-6* (links) als Monomer und (rechts) im Komplex mit *CFP-10* in Abhängigkeit der Temperatur von 25 °C bis 45 °C. Kurvenanpassung mittels Gaußfunktion. Rot: komplexfähiges *ESAT-6*. Gelb: nicht komplexfähiges *ESAT-6*. Blau: komplexiertes *ESAT-6*. Summenschwelle: 100 bis 200. Akzeptorschwelle: 100.

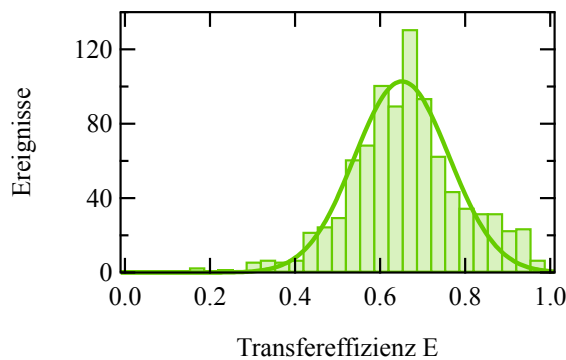


Abb. 6.22: Verteilung der Transfereffizienz des mit GdmCl entfalteten Donor- und Akzeptor-markierten *ESAT-6*. Summenschwelle: 200. Akzeptorschwelle: 100.

Temperaturabhängige Messung von *ESAT-6* und seinem Komplex mit *CFP-10*

Um die Hypothese der zwei möglichen *ESAT-6* Konformationen bestätigen zu können, werden im folgenden temperaturabhängige Entfaltungsmessungen des Komplexes und des monomeren *ESAT-6* durchgeführt. Zusätzlich wird zur Kontrolle eine Entfaltungsmessung mit hoher Guanidiniumchloridkonzentration von 6 M durchgeführt.

Der Verlauf der Transfereffizienz mit steigender Temperatur ist in Abbildung 6.21 dargestellt. Deutlich ist im Verlauf des Komplexes das Verschwinden von Population 1 bei 35 °C zu erkennen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den bereits gezeigten Ergebnissen zur Dissoziation des Komplexes. Im Vergleich mit dem monomeren *ESAT-6* zeigt Population 2, die der Struktur des nicht-komplexfähigen *ESAT-6* zugeordnet wird, in beiden Messungen den gleichen Verlauf. Diese Struktur kann somit in beiden Proben, mit und ohne *CFP-10*, bestätigt werden. Population 1 des monomeren *ESAT-6*, die der Struktur des komplexfähigen *ESAT-6* zugeordnet wird, scheint ebenfalls ab 35 °C zu verschwinden. Bei einer Temperatur von 45 °C ist *ESAT-6* in beiden Proben komplett entfaltet und zeigt die gleiche Verteilung der Transfereffizienz.

In Abbildung 6.22 ist das Ergebnis der Verteilung der Transfereffizienz des mittels Guanidiniumchlorid entfalteten *ESAT-6* dargestellt. Der Mittelwert der Verteilung liegt mit $E = (0,651 \pm 0,008)$ in einem ähnlichen Bereich wie das temperaturentfaltete *ESAT-6*. Der Verlauf der mittleren Transfereffizienz der beiden temperaturabhängigen Messungen des monomeren *ESAT-6* und des *ESAT-6/CFP-10* Komplexes ist in Abbildung 6.23 dargestellt. Zusätzlich ist das Ergebnis der GdmCl-Entfaltung eingezeichnet.

Die beiden Zustände von *ESAT-6* bei 45 °C können eindeutig dem entfalteten Zustand zugeordnet werden. Mit Zunahme der Temperatur ist der Übergang vom gefalteten zum entfalteten Zustand deutlich zu erkennen. Population 2 entspricht in beiden Messungen mit und ohne *CFP-10* der nicht-komplexfähigen Struktur und zeigt einen absolut identischen Verlauf mit einem deutlichen Übergang vom gefalteten zum entfalteten Zustand. Aufgrund des geringeren Abstands zwischen den Termini

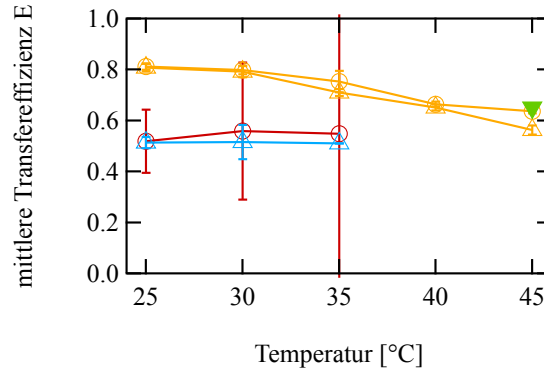


Abb. 6.23: Verlauf der mittleren Transfereffizienzen des Donor- und Akzeptormarkierten *ESAT-6* einzeln (Population 1 - Kreis rot, Population 2 - Kreis orange) und im Komplex mit *CFP-10* (Population 1 - Dreieck blau, Population 2 - Dreieck orange). Mittlere Transfereffizienz des mit GdmCl entfalteten *ESAT-6* (grün).

gegenüber dem komplexierten *ESAT-6* ist eine mögliche Struktur in Abbildung 6.24 dargestellt. Möglicherweise bildet *ESAT-6* eine kompakte Struktur aufgrund des hydrophoben Kollaps der beiden parallel angeordneten Alphahelices. Population 1 des monomeren *ESAT-6* entspricht der Struktur des Proteins, das bei Interaktion mit *CFP-10* komplexiert. Die ermittelte Transfereffizienz und der entsprechende Abstand zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten des komplexierten *ESAT-6*. Die Struktur scheint bereits eine ähnliche Konformation wie im Komplex einzunehmen. Im Unterschied zum Komplex ist in Abbildung 6.20 zu erkennen, dass das monomere *ESAT-6* eine deutlich breitere Verteilung der Transfereffizienz aufweist. Dies ist ein Hinweis auf eine stärkere Dynamik aufgrund der Flexibilität des Proteins, das noch nicht durch *CFP-10* im Komplex stabilisiert ist. Die Hypothese des *Molten Globule* kann somit bestätigt werden [67, 73].

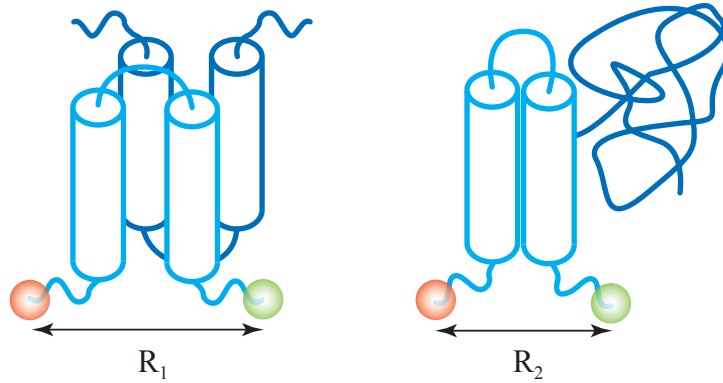


Abb. 6.24: *ESAT-6* (hellblau) und *CFP-10* (dunkelblau). Links: bekannte Komplexstruktur von *ESAT-6*/*CFP-10* mit dem 4-helikalen Bündel. Rechts: Struktur von *ESAT-6* nach hydrophobem Kollaps, *CFP-10* liegt aufgrund der ausgeschlossenen Bindung mit *ESAT-6* unstrukturiert vor (*random coil*). Zusätzlich sind die Abstände zwischen den beiden farbstoffmarkierten Termini mit $R_1 > R_2$ eingezeichnet.

Der Unterschied im Verhältnis der Populationen von monomerem und komplexiertem *ESAT-6* kann eventuell auf die hohe Konzentration von *CFP-10* zurückgeführt werden, das den Schwerpunkt der Verteilung von *ESAT-6* in Richtung komplexfähigem *ESAT-6* verschiebt.

6.5.3 Intermolekulare FRET-Messungen des WXG-100 Analogs - *sagEsxA*

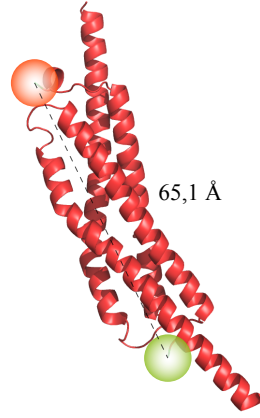


Abb. 6.25: Struktur des *sagEsxA* Komplexes mit den Farbstoffpositionen des Akzeptors (rot) und Donors (grün) für die FRET-Analyse. Der erwartete Abstand, aus der pdb-Struktur ermittelt, beträgt $R = 65,1 \text{ \AA}$.

Die Ergebnisse für den homodimeren Komplex *sagEsxA* zeigen Analogien zum Heterodimer *ESAT-6/CFP-10*. Die Verteilung der Transfereffizienz bei Raumtemperatur, dargestellt in Abbildung 6.26, weist ebenfalls zwei Populationen auf. Eine Population bei niedriger Transfereffizienz und eine Population bei hoher Transfereffizienz. Die Mittelwerte der Effizienzen und die daraus berechneten Abstände sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels zweier Gaußfunktionen. Population 1 ist wie bei *ESAT-6/CFP-10* ausschließlich auf freie Donormoleküle zurückzuführen. Population 2 entspricht der Komplexstruktur und ist gegenüber *ESAT-6/CFP-10* deutlich zu einem größeren Abstand verschoben. Neben dem abweichenden Abstand wird ebenfalls deutlich, dass die FRET-Verteilung nicht aufgrund flexibler Termini verbreitert ist. Die Breite der Verteilung ist ausschließlich durch die Photonenstatistik bedingt. Die Simulation der Verteilung um den Mittelwert der Transfereffizienz von 0,279 aufgrund von Schrotrauschen liefert die gleiche Verteilung wie die experimentell ermittelten Werte. Eine Verbreiterung der Verteilung aufgrund flexibler Termini ist somit auszuschließen und deckt sich mit den Strukturdaten aus Abbildung 6.2. Die C- und N-Termini von *sagEsxA* liegen strukturiert als Teile der Alphahelices vor und sind damit nicht frei beweglich.

Tab. 6.3: Mittlere Transfereffizienzen E und die entsprechenden Abstände R für Population 1 und 2. Das Konfidenzintervall der Kurvenanpassung beträgt 95 %.

	E	R
Population 1	$0,033 \pm 0,005$	$(98,3 \pm 2,8) \text{ \AA}$
Population 2	$0,279 \pm 0,005$	$(65,6 \pm 0,3) \text{ \AA}$

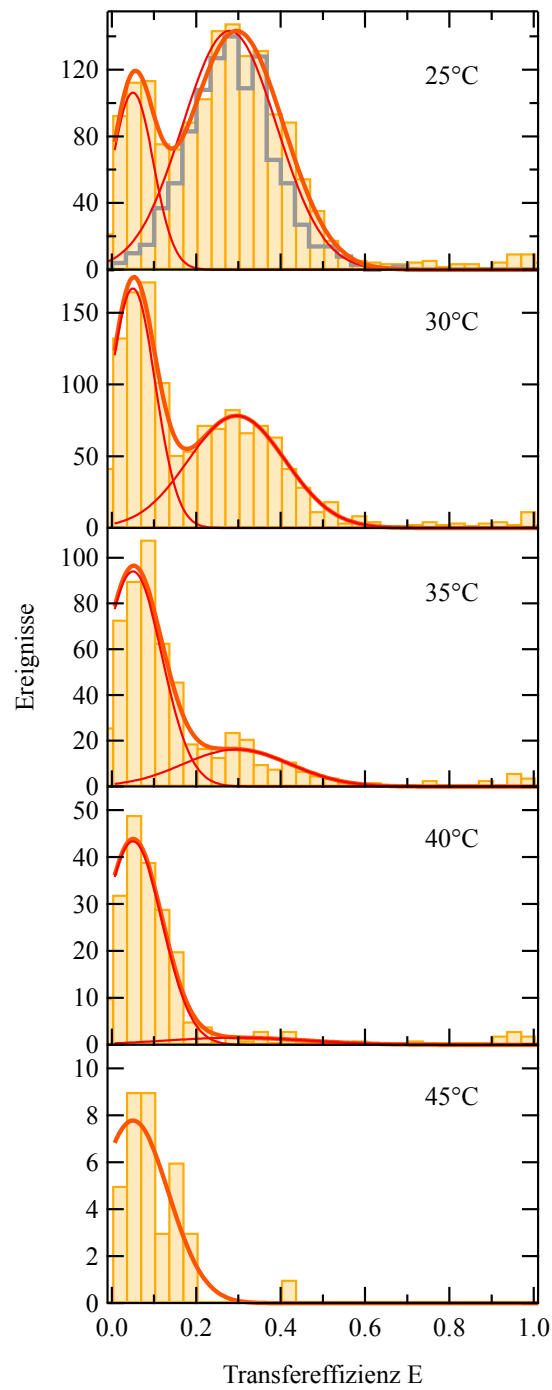


Abb. 6.26: Entwicklung der Transfereffizienz des *sagEsxA* Komplexes in Abhängigkeit der Temperatur von 25 °C bis 45 °C. Kurvenanpassung mittels zweier Gaußfunktionen (rot). Verteilung der mittleren Transfereffizienz aus Population 2 aufgrund von Schrotrauschen (grau).

Wird der Verlauf der Transfereffizienz mit steigender Temperatur betrachtet, so ist die Äquivalenz zu *ESAT-6/CFP-10* eindeutig. Bis zur Temperatur von 35 °C nimmt Population 2 stetig ab, bis sie schließlich verschwindet. Der berechnete Abstand von 65,6 Å ist in guter Übereinstimmung zum theoretisch ermittelten Wert aus der pdb-Struktur, dargestellt in Abbildung 6.5. Das Protein *sagEsxA* gehört, wie *ESAT-6/CFP-10*, zu WYG-100 Proteinfamilie. *sagEsxA* bildet ebenso die typische Komplexstruktur eines 4-helikalen Bündels. Mittels CD-Spektroskopie wurde bereits gezeigt, dass *sagEsxA* den gleichen Verlauf der thermischen Entfaltung zeigt. Die Einzelmoleküldaten sind mit dem Verschwinden von Population 2 ab 35 °C ebenso reproduzierbar.

Wie bei *ESAT-6/CFP-10* kann gezeigt werden, dass der Komplex bereits bei 35 °C dissoziiert. Dies steht wieder im Widerspruch zu den CD-spektroskopischen Daten, bei denen eine Schmelztemperatur von $T_{melt} = 46^{\circ}C$ ermittelt wurde. Da die CD-Daten jedoch ausschließlich die Sekundärstruktur von *sagEsxA* wiedergeben, kann wieder davon ausgegangen werden, dass der Komplex bereits bei 35 °C dissoziiert, das Protein aber erst bei höheren Temperaturen komplett entfaltet. Wie bei *ESAT-6* besteht die Möglichkeit, dass eine zweite stabile Konformation von *sagEsxA* existiert, die nicht in der Lage ist zu komplexieren. Mit steigender Temperatur entfaltet diese später als die komplexierte Form.

6.6 Zusammenfassung und Diskussion

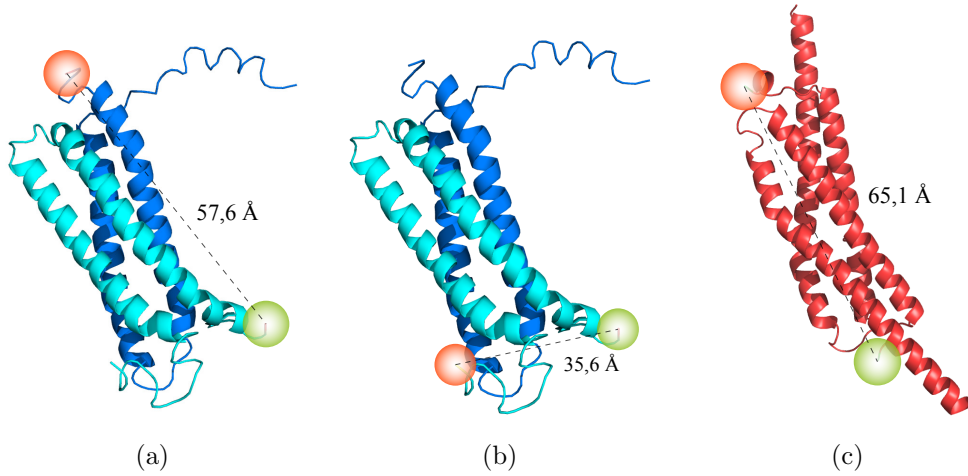


Abb. 6.27: Strukturen der beiden Komplexe *ESAT-6/CFP-10* (a) einzeln N-terminal markiert, (b) mit Donor-Akzeptor-markiertem *ESAT-6* und (c) *sagEsxA* mit den Farbstoffpositionen des Akzeptors (rot) und Donors (grün) für die FRET-Analyse. Die erwarteten Abstände, aus den pdb-Strukturen ermittelt, betragen für *ESAT-6/CFP-10* (a): $R_1 = 57,6 \text{ \AA}$, (b) $R_2 = 35,6 \text{ \AA}$ und (c) *sagEsxA* $R_3 = 65,1 \text{ \AA}$.

In der Dissertation von Christian Poulsen [23] wurden vielfältige Untersuchungen zur Struktur des Proteinkomplexes *ESAT-6/CFP-10* und dem WXG-Analog *sagEsxA* durchgeführt. Anhand röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden die Quartärstrukturen der beiden Proteinkomplexe aufgeklärt. Durch temperaturabhängige Stabilitätsuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie (Circulardichroismus) wurde für beide Komplexe eine Schmelztemperatur von $T_{melt} = 46^\circ\text{C}$ ermittelt. Außerdem wurde anhand von Ensemble-FRET-Messungen untersucht, ob die Einzelproteine *ESAT-6* und *CFP-10* in der Lage sind, Homodimere zu bilden. Dies konnte ausgeschlossen werden. Außerdem konnte festgestellt werden, dass ein Austausch zwischen der Donor- und Akzeptor-markierten Population des Homodimers *sagEsxA* nur nach Erhitzen erfolgte. Dies ist ein erster Beweis für die Stabilität der Komplexe, die ohne induzierte Dissoziation nicht in der Lage sind, untereinander auszutauschen.

Jedoch sind diese Ensemblemessungen nicht dazu geeignet strukturelle Zwischenstufen, Oligomerzustände oder Konformationen der Proteine während der Komplexbildung zu untersuchen, weshalb in dieser Arbeit die temperaturabhängigen Messungen mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen für *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA* wiederholt wurden. Außerdem sollte die *Molten Globule* Struktur des monomeren *ESAT-6* Proteins untersucht werden. Neben strukturellen Eigenschaften standen ebenfalls die Stabilität der Komplexe und der Austausch von einzelnen Proteinen zwischen verschiedenen Komplexen in Abhängigkeit von der Temperatur im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die Strukturen der Komplexe mit den verschiedenen Varianten der Farbstoffmarkierung sind nochmals in Abbildung 6.27 zusammengefasst.

Die Ergebnisse der Einzelmoleküldaten zeigten, dass der *ESAT-6/CFP-10* Komplex mit $R = (38,6 \pm 0,2 \text{ \AA})$ einen deutlich geringeren Abstand zwischen den N-terminalen

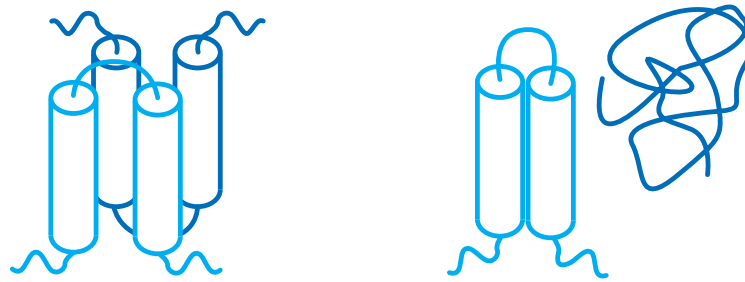


Abb. 6.28: *ESAT-6* (hellblau) und *CFP-10* (dunkelblau). Links: bekannte Komplexstruktur von *ESAT-6/CFP-10* mit dem 4-helikalen Bündel. Rechts: Struktur von *ESAT-6* nach hydrophobem Kollaps, *CFP-10* liegt aufgrund der ausgeschlossenen Bindung mit *ESAT-6* unstrukturiert vor (*random coil*).

Enden der beiden Proteine aufweist, als aus den Strukturdaten mit $R_1 = 57,6 \text{ \AA}$ ermittelt. Ursache sind hierfür die unstrukturierten flexiblen Termini, die zu einer effektiven Annäherung der beiden Farbstoffe führen. Ist der Zeitbereich der Bewegung wesentlich kürzer als die Lebensdauer des angeregten Zustands, werden hohe Transfereffizienzen bevorzugt detektiert (*Motional Narrowing*) [71]. Die starke Dynamik konnte anhand der Korrelationsanalyse bestätigt werden. Der Abstand, der sich für *sagEsxA* aus den Einzelmoleküluntersuchungen zu $R = (65,6 \pm 0,3 \text{ \AA})$ ergibt, stimmt mit den Strukturdaten gut überein. Da die Termini von *sagEsxA* strukturiert sind, ist hier keine hohe Flexibilität zu erwarten. Dies konnte experimentell über die Breite der Verteilung der Transfereffizienz bestätigt werden.

Die erste Vermutung, dass die Proteinkomplexe Polymere ausbilden oder dass zusätzlich eine weitere gestreckte Konformation der Komplexe vorliegt, konnte ausgeschlossen werden. Die Population niedriger Transfereffizienz wird eindeutig freien Donormolekülen zugeordnet. Im Nachhinein erweist sich der hohe Anteil an freien Donormolekülen auch als verständlich, da der Anteil an nicht komplexfähigem *ESAT-6* dazu führt, dass viele freie Einzelproteine in der Probe vorhanden sind.

Die temperaturabhängigen Messungen zeigten im Vergleich zu den CD-spektroskopischen Daten klare Unterschiede. So dissoziieren die beiden Komplexe bei einer wesentlich geringeren Temperatur als die Schmelztemperatur der CD-Messung mit $T_{melt} = 46^\circ\text{C}$ erwarten ließ. Beide Komplexe *ESAT-6/CFP-10* und *sagEsxA* zeigen einen identischen Verlauf bei steigender Temperatur mit der Dissoziation des Komplexes bei einer Temperatur von $T = 35^\circ\text{C}$. Die Dissoziation des Komplexes bedeutet aber nicht, dass die Sekundärstruktur sich löst, da die CD-Daten nur Informationen zur Sekundärstruktur des Proteins liefern. Um hier weitere Aussagen treffen zu können, wurde *ESAT-6* mit Akzeptor und Donor am C- und N-terminalen Ende des Proteins markiert und bietet damit die Möglichkeit, intramolekular Abstände zu ermitteln. Das Protein wurde als monomeres Protein, um die postulierte *Molten Globule* Struktur zu verifizieren, und im Komplex mit *CFP-10* untersucht. Bei Raumtemperatur werden jeweils zwei Zustände von *ESAT-6* detektiert. Struktur 1 komplexiert mit *CFP-10* zur bekannten Komplexstruktur aus Abbildung 6.27. Struktur 2 ist nicht in der Lage einen Komplex zu bilden. Mögliche Ursache ist hier ein hydrophober Kollaps der beiden Alpha-helices. Ein Hinweis hierfür wurde durch den geringeren Abstand zwischen den beiden Termini gegenüber der komplexierten

Struktur von *ESAT-6* geliefert. Liegt Struktur 1 als Monomer ohne Bindungspartner in Lösung vor, scheint die postulierte *Molten Globule* Struktur bereits sehr ähnlich zur finalen Komplexstruktur auszufallen, da für beide Messungen mit und ohne Bindungspartner *CFP-10* ähnliche Abstände zwischen den Termini ermittelt wurden. Für das ungebundene *ESAT-6* lässt sich aufgrund der breiteren Verteilung der Transfereffizienz eine größere Flexibilität nachweisen, da *ESAT-6* hier noch nicht durch *CFP-10* im Komplex stabilisiert wird. Beide Strukturen entfalten mit steigender Temperatur. Die komplette Entfaltung von *ESAT-6* bei 45 °C konnte durch eine Vergleichsmessung mit 6 M Guanidiniumchlorid verifiziert werden. Somit kann bestätigt werden, dass der Komplex zwar bei 35 °C dissoziiert, die Sekundärstruktur aber erst später vollständig aufgelöst wird.

Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Stabilität des *ESAT-6/CFP-10* Komplexes durchgeführt. Ist der Komplex bereits ausgebildet, lässt sich kein Austausch zwischen den Komplexen nachweisen. Auch wenn *CFP-10* als Bindungspartner im Überschuss zugegeben wird, bleiben die bereits ausgebildeten Komplexe konserviert und stabil. Entfalten die Proteine bei einer Temperaturerhöhung auf 60 °C und bilden während des Abkühlens erneut Komplexe aus, so ist erwartungsgemäß eine Durchmischung der einzelnen Populationen zu detektieren. Jedoch ist bereits eine Temperaturerhöhung auf 34 °C ausreichend, um einen Austausch zwischen verschiedenen Komplexen zu erreichen. Dies ist ein weiterer Nachweis für die frühe Dissoziation des Komplexes. Bei Raumtemperatur ist der Komplex jedoch außerordentlich stabil, da trotz hoher Konzentration des Bindungspartners kein Austausch induziert werden konnte.

Als Ausblick für weitere Einzelmoleküluntersuchungen ist vor allem die technische Optimierung des Temperatureaufbaus zu nennen, damit wesentlich höhere Temperaturbereiche abgedeckt werden können. Um weitere strukturelle Informationen zu gewinnen, ist es ebenfalls notwendig, die Struktur von *CFP-10* genauer zu untersuchen. Wird *CFP-10* Donor-Akzeptor-markiert, sollten Aussagen zu einer *Molten Globule* Struktur von *CFP-10* möglich sein. Bisherige Annahmen gehen von einer komplett entfalteten Form des monomeren *CFP-10* Proteins aus [67]. Außerdem sollten weitere Proteinkomplexe der WXG-100 Familie untersucht werden, um festzustellen, ob diese ein universelles Verhalten zeigen. Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf dem eigentlichen Komplexbildungsprozess liegen, um mögliche Strukturintermediate während der Komplexbildung zu charakterisieren. Eine Möglichkeit bietet hier die Einzelmoleküldetektion immobilisierter Proteine, um die Komplexbildung eines einzelnen Komplexes mit hoher Zeitauflösung im μs -Bereich zu verfolgen.

7 Komplexbildung - nsp7:nsp8

Dieses Kapitel widmet sich dem Proteinkomplex nsp7:nsp8 des Felinen Coronavirus (FCoV). Das Projekt wurde in Kooperation mit Yibei Xiao aus dem Institut für Biochemie (Leiter Prof. Rolf Hilgenfeld) bearbeitet. Dort wurden die Expression der Proteine und die Strukturuntersuchungen mittels Röntgenkristallographie von Yibei Xiao durchgeführt. Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Einzelmoleküluntersuchungen des nsp8 Proteins und seines Komplexes mit nsp7. Zusätzlich werden zur Interpretation der experimentellen Ergebnisse molekulardynamische Simulationen durchgeführt.

7.1 Einleitung

Coronaviren (CoV) sind umhüllte RNA-Viren. Typischerweise besteht die Virushülle aus einer Lipidmembran mit eingelagerten Hüllproteinen. Unter dieser Hülle befindet sich das sogenannte Kapsid. Das Kapsid, bestehend aus Proteinen, bildet eine meist ikosaedrische Form und dient zur Verpackung des Genoms. Coronaviren besitzen die längsten Genome aller bisher bekannten RNA-Viren, mit bis zu 31000 Nukleotiden [76].

Unter den RNA-Viren ist die Transkription der CoV-RNA einzigartig. Erstens erfordert die Größe des Genoms eine untypisch hohe enzymatische Aktivität und zweitens ist ein großer und komplizierter Replikations- und Transkriptionskomplex (RTK) notwendig [24].

Dieser Komplex wird aus bis zu 15 oder 18 nicht strukturbildenden Proteinen, sogenannte nsps (*engl. non-structural proteins*), gebildet. Die Synthese erfolgt als Teil der Polyproteine pp1a und pp1ab, welche Translationsprodukte des *open reading frame 1* (Orf1) darstellen [77].

Für die meisten der CoV-nsps ist die dreidimensionale Struktur bekannt. Ebenso ist für einige die Funktion innerhalb des RTK gut charakterisiert. Zum Beispiel fungiert nsp12 als RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRp) (*engl. RNA-dependent RNA-polymerase*), nsp13 als Helikase und nsp14 als Methyltransferase [78, 79, 80].

Einige Funktionen ergeben sich aus der Struktur. Ein Beispiel hierfür ist die Kristallstruktur von nsp7 und nsp8. Beide Proteine formen gemeinsam einen Komplex. Der nsp7:nsp8 Komplex des SARS-CoV (*SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome* - Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom) bildet eine zylindrische Hexadekamerstruktur, bestehend aus acht nsp7 und acht nsp8 Proteinen, dargestellt in Abbildung 7.1. Der Kanal innerhalb des Zylinders weist einen Durchmesser von 30 Å auf. Zusätzlich deutet die positive Ladung im Kanal darauf hin, dass der Komplex in der Lage ist, dsRNA zu binden [25]. Für SARS-nsp8 wurde eine Oligonukleotid synthetisierende Aktivität nachgewiesen [29]. Es besteht die Annahme, dass diese Oligonukleotide als Primer für die RdRp (nsp12) dienen [81].

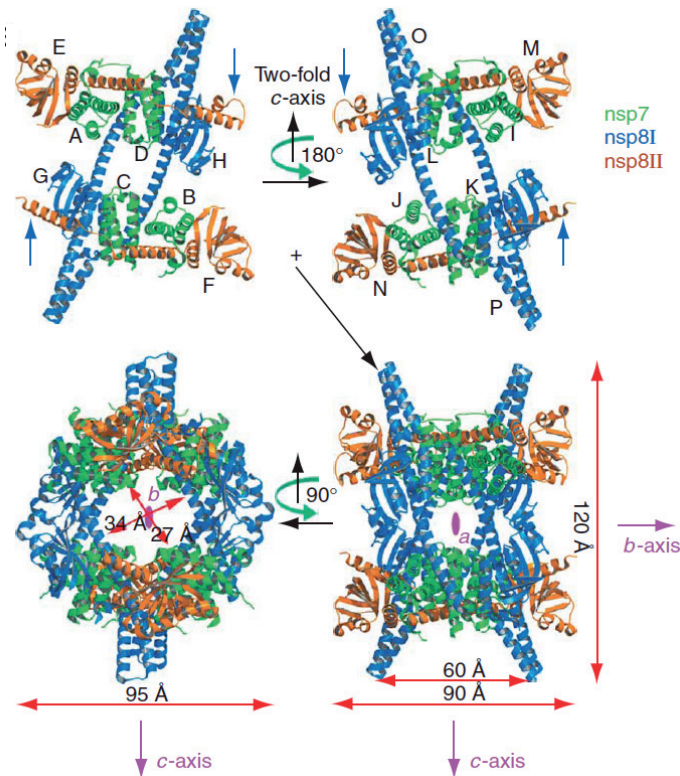


Abb. 7.1: Hexadekamere Komplexstruktur von nsp7:nsp8 des SARS-CoV. Grün: nsp7, blau: nsp8I und orange: nsp8II. Abbildung entnommen aus Zhai et al. [25].

Nichtsdestotrotz bleiben in Bezug auf die Rolle von nsp7 und nsp8 bei der RNA-Synthese der Coronaviren viele Fragen offen. Zur Funktion von nsp7 sind bisher kaum Informationen bekannt. Lediglich die stabilisierende Wirkung bei der Ausbildung der hexadekameren nsp7:nsp8 Komplexstruktur wurde beschrieben [25], ohne dass ein signifikanter Einfluss auf die Synthese des RNA Primers nachgewiesen wurde. Außerdem zeigte nsp8 allein und im Komplex die gleiche RNA synthetisierende Aktivität [29]. Ebenso ist die Stöchiometrie des Komplexes in-vivo völlig unbekannt, und es gibt bisher keine Idee zur Interaktion mit der RNA. Eine RNA-Bindungsstelle wurde nicht beschrieben. Die positive Ladung im Kanal gibt bisher nur einen Hinweis.

Deshalb ist es wichtig, weitere nsp7:nsp8 Komplexe verschiedener Coronaviren zu untersuchen, um einen weiteren Einblick in den molekularen Mechanismus der RNA-Synthese durch nsp8 und seinen Komplex mit nsp7 zu gewinnen. Außerdem muss der Frage nachgegangen werden, ob die komplizierte hexadekamere Struktur für weitere Coronaviren universell ist. Eine erste Motivation war der Nachweis mittels dynamischer Lichtstreuung, dass die Partikeldurchmesser des nsp8 Proteins von FCoV (*Feline Coronavirus*) und HCoV-229E (*Humaner Coronavirus*) nach Zugabe von nsp7 abnehmen [82]. Eine hexadekamere Struktur scheint hier unwahrscheinlich.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen entstand die Idee, den Komplexbildungsprozess und die Struktur von nsp8 und seinem Komplex mit nsp7 mittels Einzelmole-

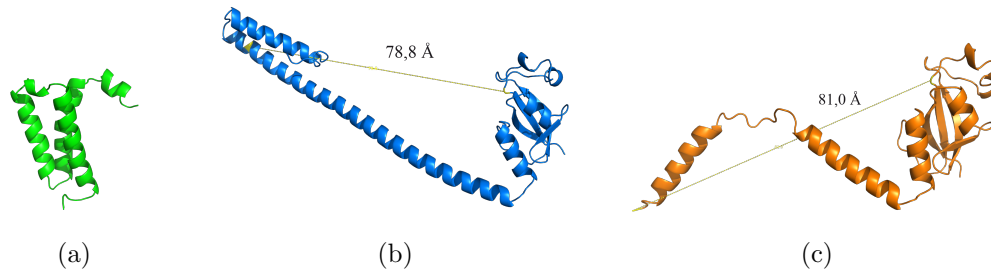


Abb. 7.2: SARS Kristallstruktur von nsp7 (a), nsp8I (b) und nsp8II (c) (pdb-Schlüssel: 2AHM) [25]. Die für FCoV erwarteten Abstände betragen für nsp8I $R = 78,8 \text{ \AA}$ und nsp8II $R = 81,0 \text{ \AA}$.

lekülspektroskopie zu untersuchen. Für die Untersuchungen wurde nsp8 des FCoV genutzt, da hier die einfache Möglichkeit bestand, das Protein spezifisch über zwei natürlich vorhandene Cysteine mit Farbstoffen zu markieren. Zum Startzeitpunkt der Untersuchung waren noch keine dreidimensionalen Strukturdaten bekannt.

Die Kristallstruktur wurde im Rahmen der Dissertation von Yibei Xiao veröffentlicht [83]. Diese Strukturdaten werden erst im späteren Verlauf des Kapitels vorgestellt, um die chronologische Reihenfolge der Ergebnisse einzuhalten.

Mit den Strukturdaten der Röntgenkristallographie wurden zusätzlich molekulardynamische Simulationen durchgeführt. Ziel war hierbei, ein mögliches Verhalten des Komplexes und des isolierten nsp8 Proteins in Lösung zu beschreiben und in Korrelation zu den Einzelmolekülmessungen zu setzen.

7.2 Der nsp7:nsp8 Komplex

Ausgangspunkt der Untersuchungen ist die nsp7:nsp8 Komplexstruktur des SARS-CoV [25]. Dieser hexadecamere Superkomplex ist in Abbildung 7.1 dargestellt.

Deutlich ist die bereits in Kapitel 7.1 beschriebene zylinderartige Ringstruktur zu erkennen. Diese wird aus zwei asymmetrischen Einheiten gebildet, welche jeweils aus vier nsp7 (Ketten A-D) und vier nsp8 (Ketten E-H) Proteinen bestehen. Für nsp8 existieren zwei verschiedene Konformationen. Die Strukturen von nsp7, nsp8I und nsp8II sind in Abbildung 7.2 dargestellt.

Die Einzelmolekülmessungen werden mit dem artverwandten Proteinkomplex nsp7:nsp8 des *Felinen Coronavirus* (FCoV) durchgeführt. Die Primärsequenzen der Proteine für SARS-CoV und FCoV zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Überlagerung der Sequenzen wird in Xiao et al. [83] vorgestellt. Der Vorteil von FCoV besteht darin, dass in dessen Struktur von nsp8 zwei natürliche Cysteine vorkommen. Diese liegen sehr günstig, um Abstände und Abstandsänderungen innerhalb des Proteins zu messen, und können deshalb zur spezifischen Farbstoffmarkierung genutzt werden. Die erwarteten Abstände zwischen C42 und C188 sind in die bisher bekannten Strukturen von SARS-CoV eingezeichnet (Abbildung 7.2) und betragen für nsp8I $R = 78,8 \text{ \AA}$ und nsp8II $R = 81,0 \text{ \AA}$.

Zum Ausgangszeitpunkt der Untersuchung ist noch keine Kristallstruktur des FCoV nsp7:nsp8 Komplexes bekannt. Über die eigentliche Struktur von nsp8 und seinem Komplex mit nsp7 konnte nur spekuliert werden. Für die Struktur von nsp8

(FCoV) wird aufgrund der großen Ähnlichkeit der Primärsequenz eine ähnliche Tertiärstruktur wie für nsp8 des SARS-CoV erwartet, muss aber durch die Strukturuntersuchung mittels Röntgenkristallisation noch verifiziert werden. Erste Untersuchungen lassen aber die Vermutung zu, dass nsp7 und nsp8 des FCoV keinen hexadekameren Superkomplex bilden [82].

7.3 Zielstellung

Im Wesentlichen sollen in diesem Kapitel die Struktur und Funktion des isolierten und komplexierten nsp8 Proteins mittels Einzelmolekülspektroskopie beleuchtet werden. So soll geklärt werden, ob das isolierte nsp8 Protein bereits vorstrukturiert ist und welche Konformationen nsp8 in Lösung einnimmt. Außerdem soll der Prozess der Komplexbildung mit nsp8 genauer beleuchtet werden. So soll untersucht werden, ob die hexadekamere Struktur des SARS-CoV universell ist, in welchem zeitlichen Rahmen und unter welchen konformellen Bedingungen sich die Komplexbildung mit nsp7 abspielt und welche Konformation nsp8 im Komplex einnimmt. Ein weiterer Punkt ist die Untersuchung der Wechselwirkung mit RNA. So sollen mögliche Konformationsänderungen bei der Interaktion der RNA mit nsp8 einzeln und im Komplex untersucht werden.

7.4 Durchführung

Die Proteine nsp7 und nsp8 (FCoV) wurden in der Arbeitsgruppe von Rolf Hilgenfeld der Universität zu Lübeck von Yibei Xiao exprimiert. Die Markierung mit den verschiedenen Farbstoffen erfolgte im Institut für Physik. Die verwendeten Farbstoffe wurden, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, über eine Thioetherbindung selektiv an die beiden Cysteine gebunden. Die Farbstoffeigenschaften, wie zum Beispiel Spektren und Försterradien, und die verwendeten experimentellen Einstellungen für diese Farbstoffpaare sind in Kapitel 4.2.2 zusammengefasst.

Zur Farbstoffmarkierung wurden unterschiedliche Farbstoffkombinationen verwendet, um durch unterschiedliche Försterradien einen größeren Abstandsbereich abzudecken.

Farbstoffpaare:

- *AlexaFluor488* - *AlexaFluor633* ($R_0 = 52 \text{ \AA}$)
- *AlexaFluor488* - *Atto647N* ($R_0 = 52 \text{ \AA}$)
- *AlexaFluor594* - *Atto680* ($R_0 = 70 \text{ \AA}$)

Erste Messungen wurden mit *AlexaFluor594* - *Atto680* durchgeführt, da aufgrund der bekannten gestreckten Konformation von nsp8 (SARS-CoV) große Abstände erwartet wurden, und der Försterradius hier $R_0 = 70 \text{ \AA}$ beträgt.

Exemplarisch ist nsp8 mit den beiden Farbstoffen, hier als farbige Kugeln, in Abbildung 7.3 dargestellt. Es ist zu beachten, dass Donor und Akzeptor nicht spezifisch an jeweils einer Position sitzen, sondern aufgrund der statistischen Farbstoffmarkierung Donor- und Akzeptorfarbstoffe auf beiden Markierungspositionen vorkommen können (Abbildung 2.12, Kapitel 2.3.2).

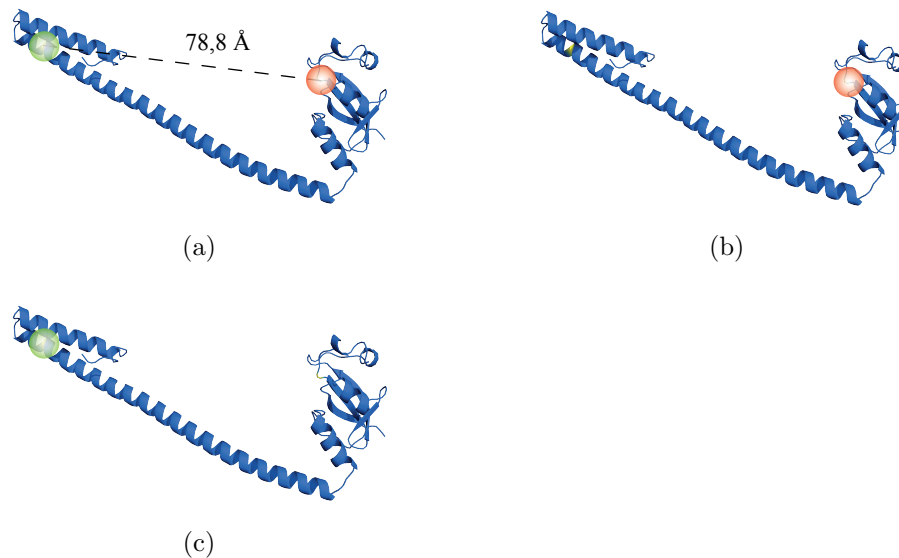


Abb. 7.3: Dargestellt sind die Strukturen von nsp8I mit den Farbstoffpositionen C42 und C188 (a), der Mutante C42S (b) und C188S (c).

Die Messung der Proteine erfolgte in wässrigem Puffer (Probenpuffer 1, Kapitel 4.2.1). Um das Anlagern der Proteine am Deckglas zu verhindern, wurde 0.001 % TWEEN-20 als Detergenz zur Lösung hinzugegeben. Zusätzlich wurden die Deckgläser mit PMMA beschichtet.

Alle Messungen erfolgten mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Messaufbau. Die Farbstoffe wurden mit dem in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Pulsschema POE (*Pulsed Overlaid Excitation*) angeregt und, wie in Kapitel 4.2.3 vorgestellt, ausgewertet.

7.4.1 Isoliertes Protein - nsp8

Zur Untersuchung des isolierten nsp8 Proteins wurden neben den mit zwei Farbstoffen markierten Proteinen zwei weitere Varianten des Proteins exprimiert. Bei diesen Mutationen wurde ein Cystein durch ein Serin getauscht. Die jeweilige Mutante lässt sich somit nur mit einem Farbstoff markieren. Ziel ist es, hierdurch Wechselwirkung und Bindung zwischen verschiedenen nsp8 Proteinen nachweisen zu können. Die Mutationen C42S und C188S mit den entsprechenden Markierungspositionen sind in Abbildung 7.3 dargestellt.

Folgende Schwerpunkte wurden in Bezug auf das isolierte nsp8 Protein untersucht:

1. Untersuchung des isolierten nsp8, mit und ohne Zugabe von unmarkiertem nsp8 im Überschuss.
2. Entfaltung des Proteins unter Zugabe von Guanidiniumchlorid (GdmCl).
3. Nachweis der Bildung von Dimeren mittels nsp8 Mutationen C42S und C188S.
4. Zugabe von RNA-Oligonukleotide zur Untersuchung der Interaktion mit RNA.

Für alle Messungen wurde die nsp8 Konzentration auf optimale Einzelmolekülkonzentration im pikomolaren Bereich eingestellt. Eine exakte Proteinkonzentration ist nicht bekannt. Die Kontrolle der optimalen Verdünnung erfolgte über Korrelationsmessungen. Für die Konzentration der FRET-Messungen wurde eine mittlere Teil-

chenzahl von $N = 0, 1$ im Fokus gewählt. Dies entspricht einer Konzentration von ca. $0, 1$ nM. Zur Untersuchung der RNA-Interaktion wurden RNA-Oligonukleotiden des *stem-loops* 1 der 3' UTR (*engl. untranslated region*, nicht-translatierte Region) des FCoV Strangs FIPV WSU-79/1146 (5'-GGCAACCCGAUGUCUAAAACUUGUCU-UUCCGAGGAAUACGGGUCAUCGCGCUGCCUACUCUUGUAC-3', 67 Nukleotide) mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ verwendet.

7.4.2 Komplexbildung - nsp7:nsp8

Zur Untersuchung der Komplexbildung und Struktur des Komplexes wurde zum farbstoffmarkierten nsp8 Protein das nsp7 Protein im Überschuss zugegeben. Hintergrund ist, dass möglichst alle nsp8 Proteine im Komplex gebunden werden, um eine Überlagerung des Signals mit freiem, nicht im Komplex gebundenen, nsp8 zu unterdrücken. Außerdem wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen zusätzliches unmarkiertes nsp8 zugegeben wurde. Falls mehrere nsp8 Proteine im Komplex gebunden sind (siehe Hexadekamer von SARS-CoV), lässt sich somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, nur ein markiertes Protein im Komplex zu detektieren. Eine Überlagerung mehrerer Signale von verschiedenen farbstoffmarkierten Proteinen soll somit ausgeschlossen werden. Dies erlaubt möglicherweise einen besseren Zugang zu verschiedenen Konformationen, die ansonsten überlagert wären.

Folgende Schwerpunkte wurden in Bezug auf den Komplex untersucht:

1. Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Komplexbildung anhand der Strukturänderungen von nsp8.
2. Untersuchung der Konformation von nsp8 im Komplex.
3. Untersuchung der Komplexbildung mit den Mutationen C42S und C188S.
4. Zugabe von RNA-Oligonukleotide zur Untersuchung der Interaktion des Komplexes mit RNA.

Für alle Messungen wurde die nsp8 Konzentration wiederum auf optimale Einzelmolekülkonzentration eingestellt. Die Konzentration von nsp7 wurde zwischen $0, 02$ mM und $0, 2$ mM gewählt, was einem Überschuss gegenüber nsp8 von ca. $1 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ entspricht. Zur Untersuchung der RNA-Interaktion wurden RNA-Oligonukleotiden des *stem-loops* 1 der 3' UTR (*engl. untranslated region*, nicht-translatierte Region) des FCoV Strangs FIPV WSU-79/1146 (5'-GGCAACCCGAUGUCUAAAACUUGUCU-UUCCGAGGAAUACGGGUCAUCGCGCUGCCUACUCUUGUAC-3', 67 Nukleotide) mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ verwendet.

7.5 Ergebnisse - Einzelmolekülmessungen - isoliertes nsp8

7.5.1 Isoliertes Protein - nsp8

Aufgrund der Fülle an Ergebnissen wird zum leichteren Überblick für die verschiedenen Farbstoffkombinationen den entsprechenden Kurven immer eine entsprechende Farbe zugeordnet:

1. *AlexaFluor594* - *Atto680* - gelb
2. *AlexaFluor488* - *Atto647N* - grün
3. *AlexaFluor488* - *AlexaFluor633* - blau

Die folgenden Ergebnisse zum isolierten nsp8 Protein stellen immer nur exemplarische Beispiele dar. Bei allen durchgeführten Messungen gestaltete es sich schwierig exakt reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Tendenzen sind jedoch immer festzustellen. Auf eine quantitative Analyse wird deshalb größtenteils verzichtet. Werden Abstände angegeben, so wurden diese aus den mittleren Transfereffizienzen der dargestellten Abbildungen ermittelt und sind als Größenordnung zu interpretieren. Lediglich die Experimente zur Entfaltung von nsp8 werden quantitativ ausgewertet.

AlexaFluor594 - *Atto680* - gelb

In Abbildung 7.4 ist das Ergebnis der Transfereffizienz für nsp8 unter Zugabe von unmarkiertem nsp8 dargestellt. Im Histogramm sollten aufgrund des hohen Überschusses an unmarkiertem nsp8 auch bei Ausbildung von Agglomeraten ausschließlich intramolekulare Transfereffizienzen eines nsp8 Proteins enthalten sein.

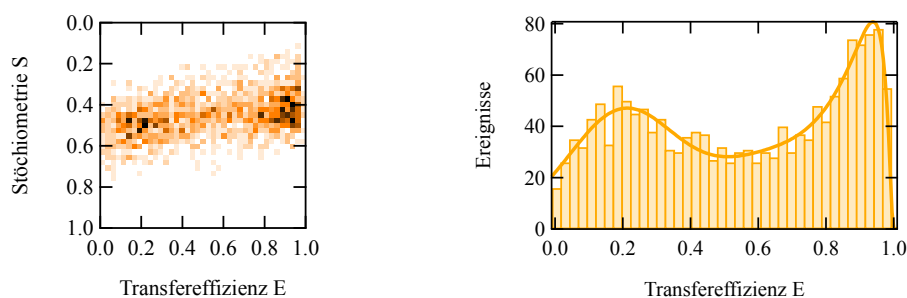


Abb. 7.4: FAMS-Histogramm und Transfereffizienz von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor594* - *Atto680*. Zusätzlich wurde nsp8 ohne Farbstoffmarkierung zugegeben.

Die Verteilung zeigt zwei stark ausgeprägte Populationen. Eine Population mit geringer Transfereffizienz, welche einem großen Abstand von ca. 88 Å entspricht, und eine Population mit hoher Transfereffizienz nahe 1 mit dem entsprechenden Abstand von 44 Å. Beide Populationen passen nicht zum bestehenden Modell von nsp8. Die Struktur von nsp8 isoliert entspricht scheinbar nicht der Golfschlägerstruktur aus dem Komplex von SARS-CoV. So können aus der Verteilung der Transfereffizienz zwei hypothetische Strukturen des isolierten nsp8 abgeleitet werden. Der große Abstand lässt auf die Ausbildung eines Dimers schließen, da ein größerer Abstand als

durch die gestreckte Golfschlägerstruktur intramolekular nicht zu erwarten ist. Die Ausbildung eines Dimers bietet die einzig mögliche Erklärung und damit die Detektion eines intermolekularen FRET-Signals, passend zu größeren Abständen. Über die Quartärstruktur dieses Dimers kann nur spekuliert werden, da bisher noch keine eindeutige Struktur des isolierten nsp8 Proteins vorliegt. Die Population zum kleinen Abstand zeigt, dass nsp8 eine wesentlich kompaktere Struktur aufweisen muss als bisher angenommen. Hinzu kommt die breite Verteilung über den gesamten Bereich der Transfereffizienz. Dies weist darauf hin, dass die Struktur des nsp8 Monomers eine große Flexibilität aufweist.

Um den kurzen Abstandsbereich besser untersuchen zu können, werden noch zwei weitere Farbstoffkombinationen mit kleinerem Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ verwendet.

AlexaFluor488 - Atto647N - grün

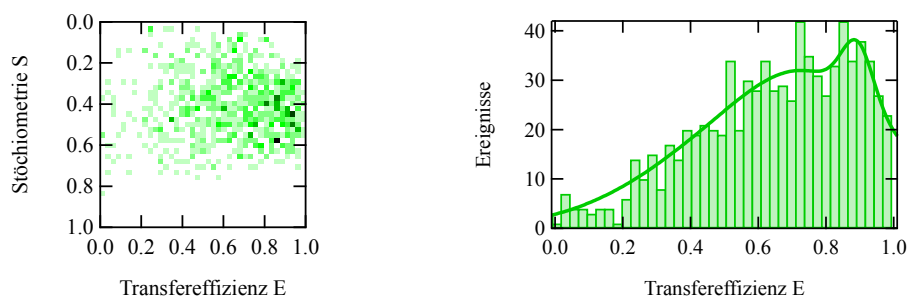


Abb. 7.5: FAMS-Histogramm und Transfereffizienz von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488 - Atto647N*.

In Abbildung 7.5 ist das Ergebnis der Transfereffizienz für nsp8 ohne Zugabe und in Abbildung 7.6 mit Zugabe von unmarkiertem nsp8 dargestellt. Die beiden Verteilungen sind sehr ähnlich. So zeigt die starke Population bei hoher Transfereffizienz für beide Messungen mittlere Abstände zwischen 37 und 54 Å. Die Population niedriger Transfereffizienz, zu großen Abständen passend, ist sehr schwach ausgeprägt und nur in Abbildung 7.6 zu beobachten. Die Hypothese dass nsp8 eine wesentlich kompaktere Struktur aufweist als die bisher angenommene Golfschlägerstruktur, konnte damit erhärtet werden.

Zusätzlich fällt auf, dass in Abbildung 7.5 die Stöchiometrie sehr breit verteilt ist. Ursache hierfür sind Moleküle, die neben einem Donor und einem Akzeptor zusätzliche Akzeptorfarbstoffe tragen. Dies führt zu geringeren Stöchiometriewerten und damit zur breiten Verteilung im FAMS-Histogramm. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass nsp8 Dimere ausbildet.

AlexaFluor488 - AlexaFluor633 - blau

In Abbildung 7.7 ist das Ergebnis der Transfereffizienz ohne Zugabe von unmarkiertem nsp8 dargestellt. Die Verteilung entspricht im wesentlichen den zuvor dargestellten Ergebnissen. Eine schwache Population bei niedriger Transfereffizienz liefert den Hinweis auf eine Dimerisation des nsp8 Proteins. Zusätzlich ist die breite Verteilung

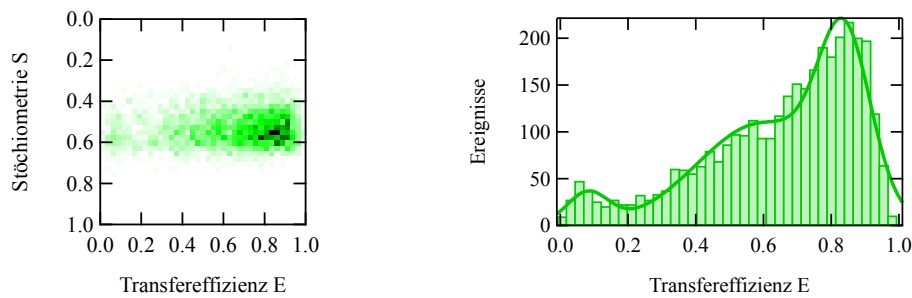


Abb. 7.6: FAMS-Histogramm und Transfereffizienz von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488 - Atto647N*. Zusätzlich wurde nsp8 ohne Farbstoffmarkierung zugegeben.

der Stöchiometrie zu beobachten. Eine starke Population mit großer Transfereffizienz entspricht wiederum kleineren Abständen, als bei der golfschlägerartigen Struktur zu erwarten wäre.

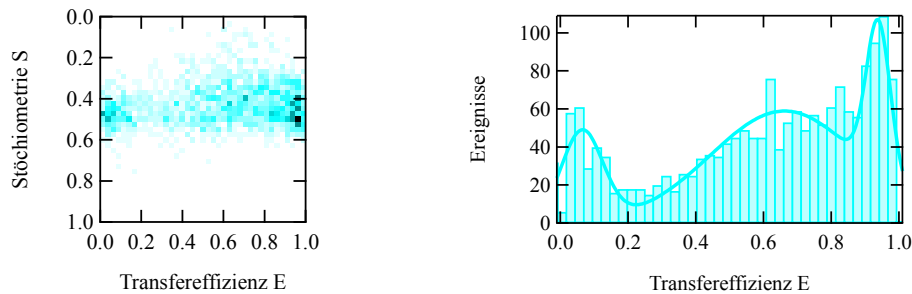


Abb. 7.7: FAMS-Histogramm und Transfereffizienz von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488 - AlexaFluor633*.

Zusammenfassung und Diskussion

Es lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse zwar nicht absolut reproduzierbar, jedoch im Verlauf der Untersuchungen eindeutige Tendenzen zu erkennen sind. Zur besseren Übersicht sind alle Histogramme noch einmal zusammengefasst in Abbildung 7.8 dargestellt. Zusätzlich sind die erwarteten Abstände in Abhängigkeit von der Transfereffizienz aufgetragen. Diese dienen zum groben Abschätzen der Abstände, da Aussagen zu absoluten Abstandswerten schwer zu treffen sind.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilungen der Transfereffizienzen, so können für alle Bedingungen stets mindestens zwei Verteilungen beobachtet werden: Eine bei hoher und eine bei niedriger Transfereffizienz. Die Population bei niedriger Transfereffizienz lässt aufgrund der großen Abstände darauf schließen, dass nsp8 isoliert in Lösung in der Lage ist, Dimere zu bilden. Ein weiteres Indiz für diese Annahme liefert die breite Verteilung der Stöchiometrie. Zur Kontrolle werden im Folgenden Experimente mit den beiden Mutationen C42S und C188S durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Experimente mit den beiden Mutationen C42S und C188S durchgeführt. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt dargestellt. Die zweite Population bei

hoher Transfereffizienz zeigt Abstände, welche nicht zu den aus dem Komplex erwarteten Golfschlägerstrukturen von nsp8 passen [25]. Die erwarteten Abstände sind 78,8 Å für nsp8I und 81,0 Å für nsp8II. Die experimentellen Ergebnisse liegen jedoch im Bereich von ca. 37 Å bis 54 Å. Die postulierte Struktur aus dem Komplex von SARS-CoV kann für das freie nsp8 somit nicht bestätigt werden. Inwieweit nsp8 vorstrukturiert ist, wird im Folgenden anhand einer Entfaltungsreihe untersucht. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine sehr flexible aber auch wesentlich kompaktere Struktur hin. Die breite Verteilung der Transfereffizienz kann jedoch auch ein Hinweis auf verschiedene Konformationen von nsp8 sein. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Messreihen lassen ebenfalls vermuten, dass bereits minimal verschiedene Messbedingungen zu unterschiedlichen Heterogenitäten führen. Ein möglicher Ansatz zur Interpretation der Messergebnisse wird in Kapitel 7.8 zur MD-Simulation gegeben.

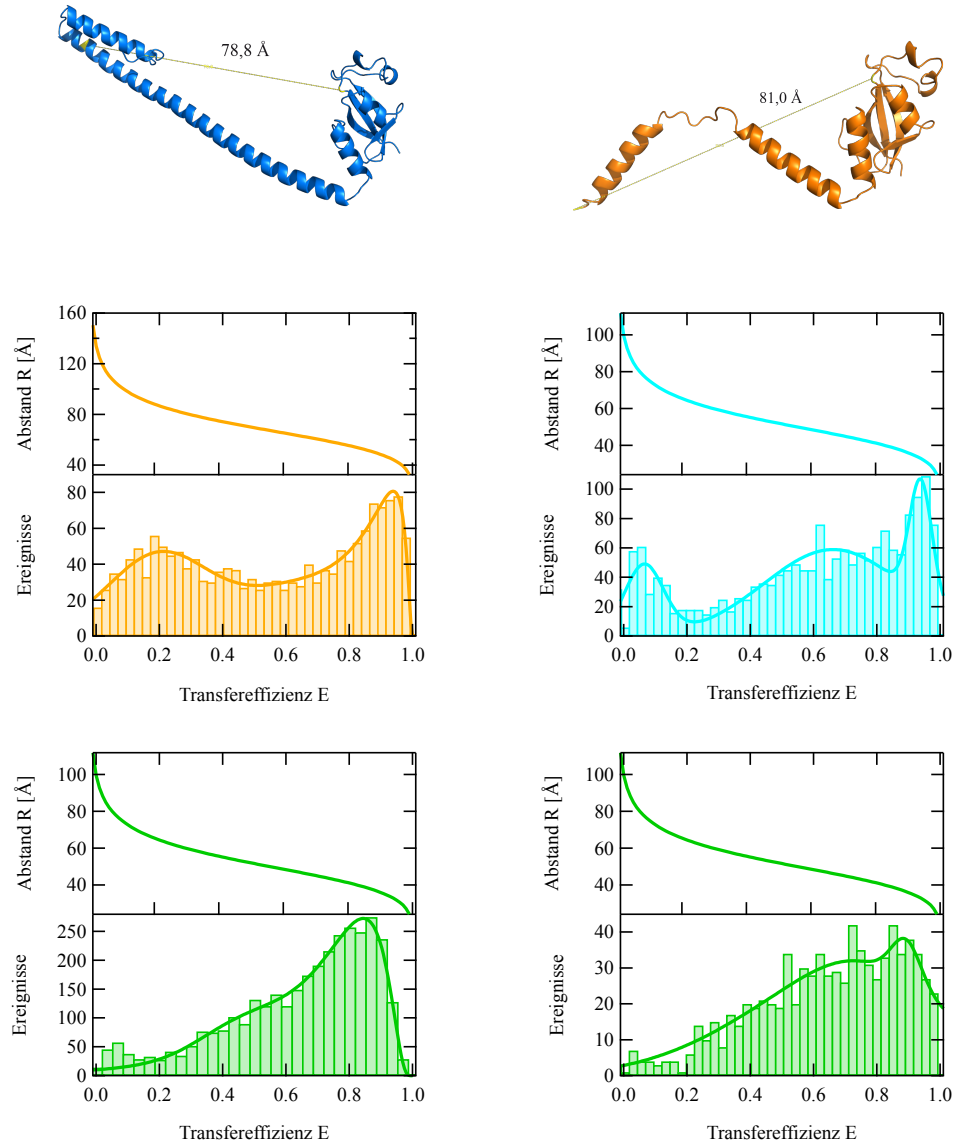


Abb. 7.8: Zusammenfassung der Ergebnisse mit Darstellung der Abstandsverteilung in Abhängigkeit der Transfereffizienz. Die Försterradien betragen $R_0 = 70 \text{ Å}$ (gelb) und $R_0 = 52 \text{ Å}$. Zusätzlich sind die beiden Strukturen nsp8I (links) und nsp8II (rechts) aufgetragen (oben).

7.5.2 Entfaltungsreihe

AlexaFluor488 - Atto647N

Um zu überprüfen, inwieweit nsp8 ohne Verbund im Komplex bereits strukturiert ist, wird das Protein mittels Guanidiniumchlorid (GdmCl) entfaltet. Die Änderung der Struktur vom nativen in den entfalteten Zustand wird anhand der Abstandsänderung zwischen den beiden Farbstoffpositionen C42 und C188 ermittelt. Die Änderung der Transfereffizienz mit steigender Konzentration des Denaturierungsmittels ist in Abbildung 7.9 dargestellt.

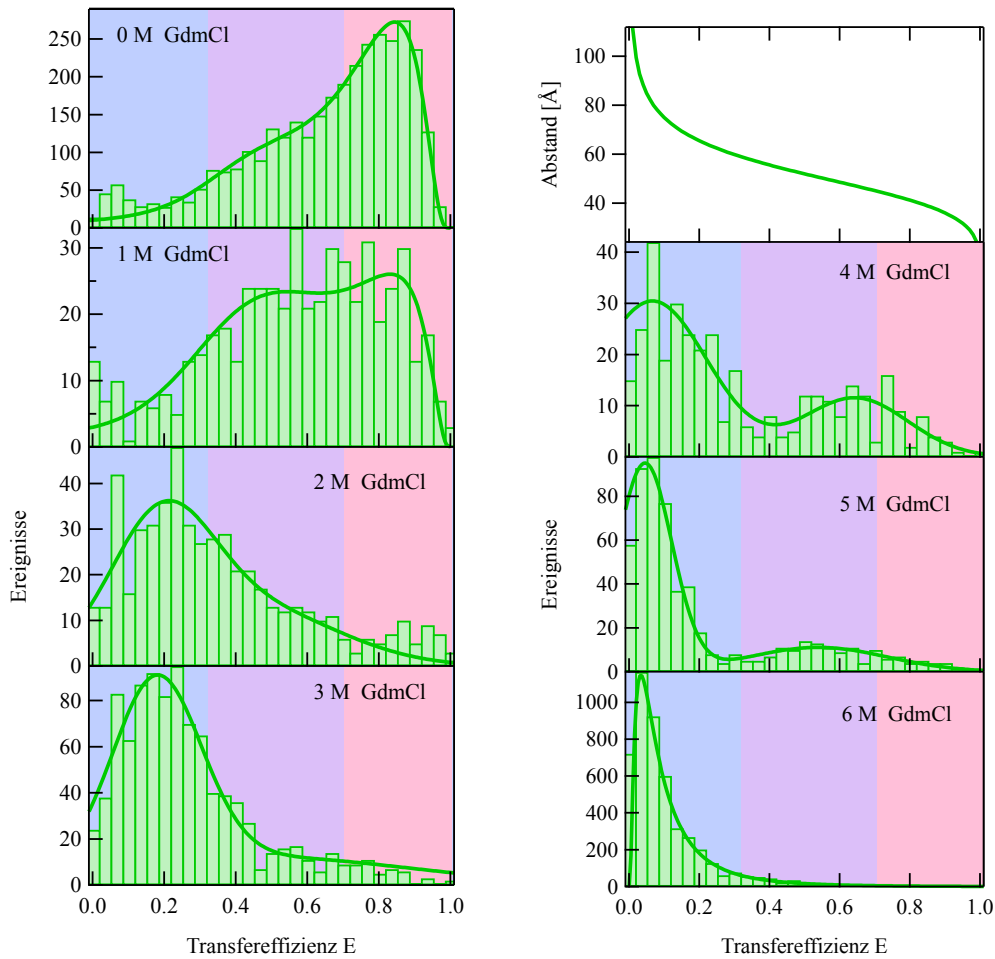


Abb. 7.9: Entfaltungsreihe von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488 - Atto647N*. Verlauf der Transfereffizienz von nsp8 bei steigender GdmCl-Konzentration. Zusätzlich ist die Abstandsverteilung in Abhängigkeit der Transfereffizienz dargestellt. Die einzelnen Populationen sind farblich hinterlegt mit Population 1 - blau, Population 2 - violett und Population 3 - rot.

Insgesamt sind drei mögliche Populationen zu erkennen. Für die Kurvenanpassung werden drei Gaußfunktionen genutzt. Ob die drei Gaußfunktionen wirklich drei verschiedenen Konformationen entsprechen, ist fraglich, da die breite Verteilung wahr-

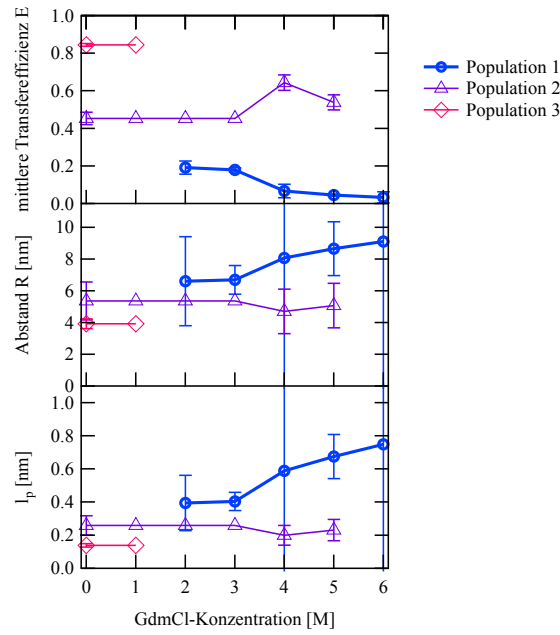


Abb. 7.10: Entfaltungsreihe von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *At-to647*. Verlauf der mittleren Transfereffizienzen aus den Kurvenanpassungen, die dazugehörigen Abstände R und die apparente Persistenzlänge l_p von nsp8 bei zunehmender GdmCl-Konzentration. Der entfaltete Zustand ist fett markiert (dunkelblau).

scheinlich durch den flexiblen oder unstrukturierten Arm verursacht wird. Entscheidend ist aber die Darstellung und Detektion von relativen Änderungen in der Transfereffizienz. Mit Zunahme der Konzentration von GdmCl ist eine deutliche Änderung der Abstände und damit der Struktur zu erkennen. Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass nsp8 als isoliertes Protein strukturiert oder zumindest vorstrukturiert ist.

Die Auswertung der Kurvenanpassung ist in Abbildung 7.10 dargestellt. Die mittleren Transfereffizienzen E ergeben sich aus den Kurvenanpassungen. Mittels Gleichung 2.9 errechnet sich mit dem Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ der mittlere Abstand zwischen den beiden farbstoffmarkierten Aminosäuren C42 und C188. Entfaltet das Protein, so bildet sich ein Zufallsknäuel (*random coil*). Unter der Annahme des *Worm-Like-Chain*-Modells (WLC) lässt sich über die apparente Persistenzlänge l_p feststellen, ob das untersuchte Protein als entfaltetes Zufallsknäuel vorliegt [84]. Die Werte liegen hierbei zwischen ca. $3 \text{ \AA}$ und $9 \text{ \AA}$, abhängig davon, ob das Protein unter nativen Bedingungen ohne Salzeinfluss oder aufgrund einer hohen Salzkonzentration entfaltet ist [85]. Da GdmCl die attraktiven elektrostatischen Kräfte innerhalb des Zufallsknäuels abschirmt, führt dies mit steigender Salzkonzentration zu einer Zunahme der apparenten Persistenzlänge [84]. Erwartet wird, sobald eine entfaltete Population des Proteins vorliegt, eine Zunahme der apparenten Persistenzlänge mit zunehmender Salzkonzentration. Die Werte von l_p sollten zwischen $3 \text{ \AA}$ und $9 \text{ \AA}$ liegen. Liegt ein entfalteter Zustand vor, so sollte dieser den typischen Anstieg der apparenten Persistenzlänge mit steigender Salzkonzentration zeigen [84].

Der mittlere Abstand R ist nach dem WLC-Modell mit der Persistenzlänge l_p über folgenden Zusammenhang verknüpft:

$$\langle R^2 \rangle = 2 l_p l_c . \quad (7.1)$$

Die Konturlänge l_c ergibt sich als Produkt der Anzahl der Aminosäuren, hier zwischen C42 und C188 mit $n = 146$, und dem mittleren Abstand zwischen zwei Aminosäuren $l = 3,8 \text{ \AA}$ [84].

Die Auswertung der Entfaltungsreihe zeigt ab einer GdmCl-Konzentration von 2 M einen deutlichen Umschlag. Zusätzlich zu den Populationen 2 und 3 (hohe Transfereffizienzen) ist mit Population 1 (dunkelblau) der entfaltete Zustand zu erkennen. Aus den Abständen R lässt sich über Gleichung 7.1 die apparente Persistenzlänge l_p berechnen. Die Werte für l_p liegen für Population 1 im Bereich von 4 bis 8 Å. Diese zeigen außerdem den typischen Verlauf, wie er für einen entfalteten Zustand bei steigender GdmCl-Konzentration erwartet wird, und korreliert gut mit den aus der Literatur beschriebenen Werten [84].

Zusammenfassung und Diskussion

Die Annahme, dass nsp8 als isoliertes Protein bereits strukturiert oder zumindest vorstrukturiert sein muss, kann bestätigt werden. Die Entfaltung mittels Guanidiniumchlorid zeigt den Übergang vom gefalteten zum entfalteten Zustand des Proteins. Bisherige Strukturuntersuchungen lieferten ausschließlich Ergebnisse für das komplexierte Protein. Aufgrund der Tatsache, dass nsp8 ohne nsp7 bereits RNA synthetisierende Aktivität zeigt [29], kann davon ausgegangen werden, dass nsp8 bereits vorstrukturiert ist. Der direkte Nachweis wurde bisher jedoch nicht erbracht.

Die Interpretation der Daten in Hinblick auf die Struktur von nsp8 in Lösung erweist sich hingegen als schwierig. Wie bereits zu Beginn des Kapitels gezeigt wurde, kann die gestreckte Golfschlägerstruktur nicht verifiziert werden. Der hierfür erwartete Abstand von rund 80 Å wird durch die Messungen nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse lassen eher auf eine kompakte Struktur von nsp8 schließen. Einige Szenarien zur Interpretation der Struktur werden im Kapitel 7.8 zur MD-Simulation fortgeführt.

7.5.3 Dimerisation

Die ersten Messungen lieferten den Hinweis, dass nsp8 als isoliertes Protein nicht ausschließlich als Monomer vorliegt. Die breite Verteilung der Stöchiometrie und die Population der Transfereffizienz bei niedrigen Werten lassen den Schluss zu, dass nsp8 wahrscheinlich dimerisiert. Um die Bildung von Dimeren und ebenfalls den Austausch zwischen verschiedenen nsp8 Dimeren untersuchen zu können, wurden die Mutationen C42S und C188S verwendet. Wie zu Beginn des Kapitels vorgestellt, sind die Mutationen jeweils nur mit einem Farbstoff markiert (siehe Abbildung 7.3). Kommen sich zwei Proteine nah genug und binden, so lässt sich über den stattfindenden Energietransfer und die auftretenden Koinzidenzereignisse eine Wechselwirkung nachweisen. Die verschiedenen realisierten Kombinationen sind im Folgenden aufgeführt. Um die langreichweitige Wechselwirkung besser untersuchen zu können, wurden die Farbstoffe *AlexaFluor594* und *Atto680* verwendet. Der

Försterradius beträgt hier $R_0 = 70 \text{ \AA}$. Es wurden ebenfalls Untersuchungen mit der Farbstoffkombination *AlexaFluor488* - *Atto647N* durchgeführt. Die Ergebnisse waren reproduzierbar, werden hier aber nicht mit dargestellt, da aufgrund des geringeren Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ die erwartete Transfereffizienz nahe Null schwer auszuwerten ist.

	Donor markiert	Akzeptor markiert
Kombination 1	C42S	C42S
Kombination 2	C42S	C188S
Kombination 3	C188S	C42S
Kombination 4	C188S	C188S

In den Abbildungen 7.11 bis 7.14 sind die Ergebnisse des Austauschprozesses und der damit verbundenen Dimerisation dargestellt. Ausgangspunkt war die Mischung der beiden jeweils mit Donor oder Akzeptor markierten nsp8 Proteine. Sollten die nsp8 Proteine hier bereits als Dimer vorliegen, so sind diese nicht zu detektieren, da sie entweder nur Donor- oder Akzeptorfarbstoffe tragen. Nach dem Mischen der beiden Proben beginnt der Austausch der beiden Populationen. Jedes Ereignis, das detektiert wird, entspricht einem neu gebildeten Dimer (Koinzidenzereignis). Bei allen Kombinationen ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten: Zunahme der Ereignisse bei ähnlichem Zeitregime und Sättigung der Ereignisse zu langen Zeiten. Lediglich Kombination 4 zeigt eine leichte Abnahme der Ereignisse, was auf die Aggregation der Proteine am Deckglas zurückzuführen ist. Ursache ist in diesem Fall ein vermutlich ungenügend präpariertes Deckglas. Die Verteilung der Transfereffizienz der vier Kombinationen in Abbildung 7.11 bis 7.14 ergibt sich aus der Summe aller detektierten Koinzidenzereignisse. Die mittlere Transfereffizienz, welche sich aus einer einfachen Kurvenanpassung mittels Gaußfunktion ergibt, liefert für alle vier Kombinationen innerhalb der Fehlergrenzen das gleiche Abstandsergebnis von im Mittel $R = 96,7 \text{ \AA}$.

Tab. 7.1: Mittlere Transfereffizienzen E und die entsprechenden Abstände R für Mix 1 bis Mix 4. Das Konfidenzintervall der Kurvenanpassung beträgt 95 %.

	E	R
Kombination 1	$0,124 \pm 0,020$	$(97,0 \pm 3,2) \text{ \AA}$
Kombination 2	$0,133 \pm 0,011$	$(95,7 \pm 1,4) \text{ \AA}$
Kombination 3	$0,120 \pm 0,010$	$(97,6 \pm 1,6) \text{ \AA}$
Kombination 4	$0,127 \pm 0,008$	$(96,5 \pm 1,2) \text{ \AA}$

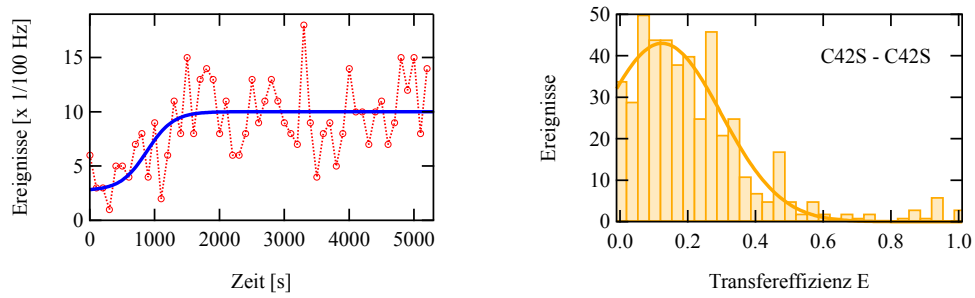


Abb. 7.11: Mix 1 - C42S-C42S. Zeitlicher Verlauf der Dimerisation von nsp8:nsp8 (links) und die aufsummierte Transfereffizienz aller Koinzidenzereignisse (rechts).

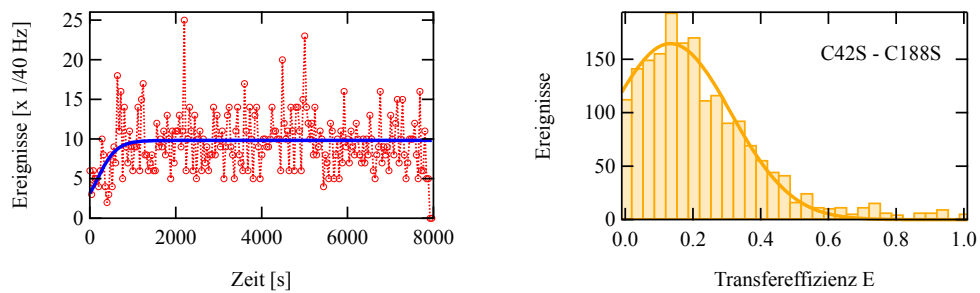


Abb. 7.12: Mix 2 - C42S-C188S. Zeitlicher Verlauf der Dimerisation von nsp8:nsp8 (links) und die aufsummierte Transfereffizienz aller Koinzidenzereignisse (rechts).

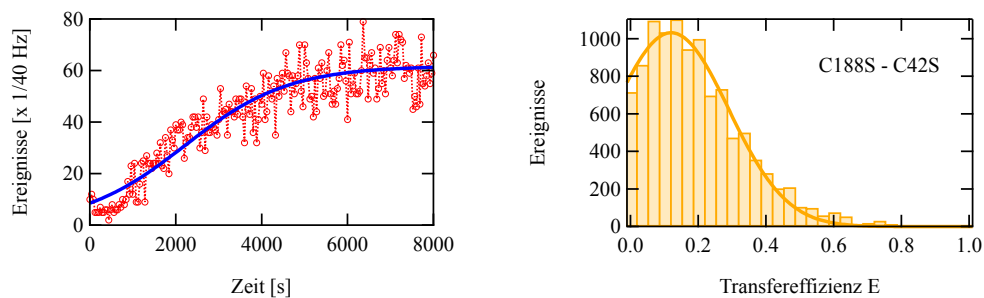


Abb. 7.13: Mix 3 - C188S-C42S. Zeitlicher Verlauf der Dimerisation von nsp8:nsp8 (links) und die aufsummierte Transfereffizienz aller Koinzidenzereignisse (rechts).

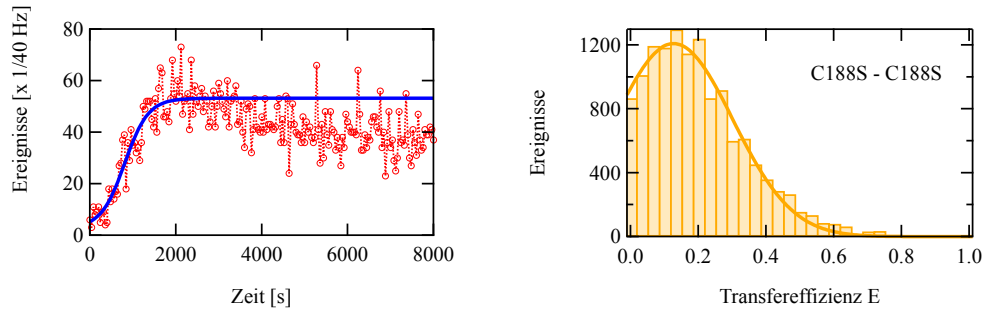


Abb. 7.14: Mix 4 - C188S-C188S. Zeitlicher Verlauf der Dimerisation von nsp8:nsp8 (links) und die aufsummierte Transfereffizienz aller Koinzidenzereignisse (rechts).

Zusammenfassung und Diskussion

Zu Beginn der Untersuchung des isolierten nsp8 Proteins wurde die Vermutung angestellt, dass nsp8 in der Lage ist Dimere auszubilden. Einerseits deutete bereits die breite Verteilung der Transfereffizienz darauf hin und andererseits passte der detektierte große Abstand nicht zur postulierten Struktur von nsp8. Die verwendeten Mutationen C42S und C188S liefern den eindeutigen Beweis für die Dimerisation von nsp8. Intramolekularer Energietransfer kann hier ausgeschlossen werden. Jedes detektierte Ereignis kann eindeutig einem Dimer zugeordnet werden. Die Interpretation der Struktur ist wiederum schwierig, da alle vier Kombinationen den gleichen Abstand liefern. Es spielt keine Rolle, ob die Farbstoffe im Bereich der Alphahelices oder an der Kopfgruppe sitzen. Eine Möglichkeit ist die kreuzweise Orientierung der beiden Proteine zueinander. Ein direktes Aneinanderlagern der Alphahelices kann ausgeschlossen werden, da sonst Transfereffizienzen zu kleineren Abständen detektiert worden wären. Ein passendes Modell zu entwerfen, ist leider nicht möglich, da bisher nicht geklärt ist, wie die eigentliche Struktur des nsp8 Proteins ausfällt.

Dass die Populationen der Donor- und Akzeptor-markierten nsp8 Proteine überhaupt austauschen, ist ein Hinweis auf die schwache Bindung innerhalb des Dimers. Inwieweit die Kinetik des Austauschs von der Konzentration des Proteins abhängt, konnte nicht quantitativ geklärt werden. Die unterschiedlichen Zeitverläufe der verschiedenen Kombinationen sind wahrscheinlich auf Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Proben zurückzuführen.

7.5.4 Interaktion mit RNA

Dass nsp8 am RNA-Syntheseprozess beteiligt ist, konnte für SARS-CoV bereits gezeigt werden. Sowohl nsp8 als isoliertes Protein als auch der Komplex, bestehend aus nsp7 und nsp8, zeigen RNA synthetisierende Aktivität [29]. Um zu prüfen, inwieweit nsp8 strukturell auf Kontakt und Interaktion mit RNA reagiert, wurden hierzu Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Die Zugabe von RNA erfolgte zum Start der Messung, um eventuelle Änderungen der Konformation von nsp8 direkt beobachten zu können. Für die Messung wurden RNA-Oligonukleotide des FCoV Strangs FIPV WSU-79/1146 verwendet.

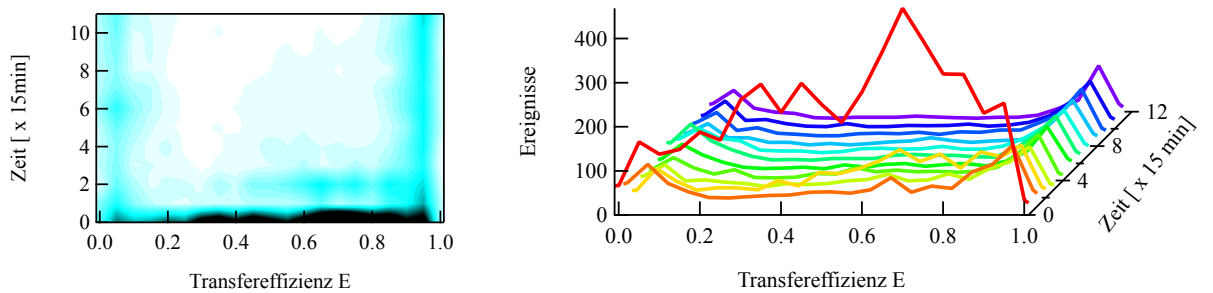


Abb. 7.15: Zeitlicher Verlauf der Transfereffizienz von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *AlexaFluor633*, nach Zugabe der RNA-Nukleotide. Darstellung als 2D (links) und 3D Histogramm (rechts).

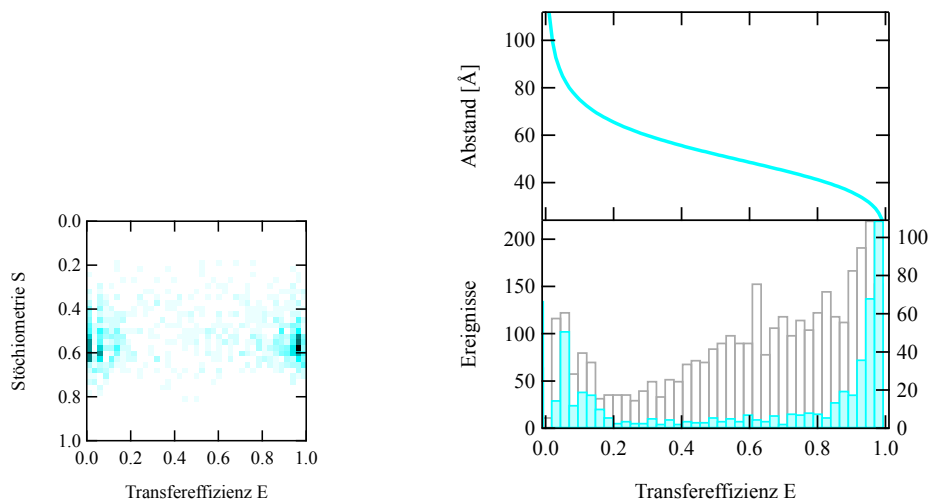


Abb. 7.16: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) von nsp8, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *AlexaFluor633*, 3 Stunden nach Zugabe der RNA-Nukleotide. Zum Vergleich ist die Verteilung der Transfereffizienz ohne RNA-Zugabe eingezeichnet (grau). Zusätzlich ist die Abstandsverteilung in Abhängigkeit der Transfereffizienz dargestellt.

Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Farbstoffkombinationen durchgeführt. Exemplarisch ist die Messung für *AlexaFluor488* und *AlexaFluor633* gezeigt. In Abbildung 7.15 ist die zeitliche Entwicklung der Transfereffizienz für Zeitintervalle von

15 Minuten dargestellt. In Abbildung 7.16 ist die Verteilung der Transfereffizienz von nsp8 drei Stunden nach Zugabe von RNA und zum Vergleich ohne Zugabe von RNA dargestellt. Auffällig ist die starke Änderung der Transfereffizienz direkt zu Beginn der Messung innerhalb der ersten 15 Minuten. Dies lässt auf eine deutliche strukturelle Änderungen schließen. Im weiteren Verlauf ähnelt die Verteilung der Transfereffizienz zunächst wieder der Ausgangsverteilung, nimmt dann aber bis ca. 2 Stunden nach RNA-Zugabe im Bereich mittlerer Transfereffizienz ab. Der Vergleich der Histogramme nach und vor Zugabe von RNA in Abbildung 7.16 zeigt, dass nach der Zugabe von RNA der Mittelteil der Transfereffizienz fehlt. Neben den weiterhin vorhandenen Dimeren ist lediglich eine Population vorhanden, die aufgrund der großen Transfereffizienz nahe 1 auf eine sehr kompakte Struktur mit einem mittleren Abstand kleiner 40 Å schließen lässt.

Zusammenfassung und Diskussion

Die Interaktion der Nukleotide mit nsp8 führt zu einer deutlichen strukturellen Änderung von nsp8. So stellt sich zum Ende der Messung eine wesentlich kompaktere Struktur ein, als bereits vor RNA-Zugabe bestand. Dies lässt auf einen Kollaps der Struktur schließen. Inwieweit dies im Zusammenhang mit der bisher unbekannten Ausgangsstruktur des isolierten nsp8 steht, wird im Kapitel zur MD Simulation diskutiert.

7.6 Ergebnisse - Einzelmolekülmessungen - nsp7:nsp8 Komplex

Bisher ist noch keine Kristallstruktur des nsp7:nsp8 Komplexes von FCoV bekannt. Existiert ein universelles Muster, sollte die Struktur ähnlich zur Komplexstruktur von SARS-CoV ausfallen. Erste Untersuchungen mittels Lichtstreuung lassen aber die Vermutung zu, dass nsp7 und nsp8 aufgrund der Größe des detektierten Komplexes keinen hexadekameren Superkomplex bilden [82].

Um die Komplexbildung und die Komplexstruktur zu untersuchen, wurde unmarkiertes nsp7 zu farbstoffmarkiertem nsp8 gegeben. Nsp7 wurde hierbei im Überschuss verwendet, um sicherzustellen, dass möglichst jedes nsp8 Protein in einem Komplex gebunden ist. Darüber hinaus wurden Untersuchungen mit zusätzlichem unmarkierten nsp8 durchgeführt. Hier war das Ziel, möglichst nur ein farbstoffmarkiertes nsp8 Protein pro Komplex einzubauen und dessen strukturelle Änderungen zu verfolgen. Die Überlagerung mehrerer Signale verschiedener nsp8 Proteine, wie doppelt markierter Dimere oder Monomeren mit eventuell unterschiedlichen Strukturen, wird so vermieden.

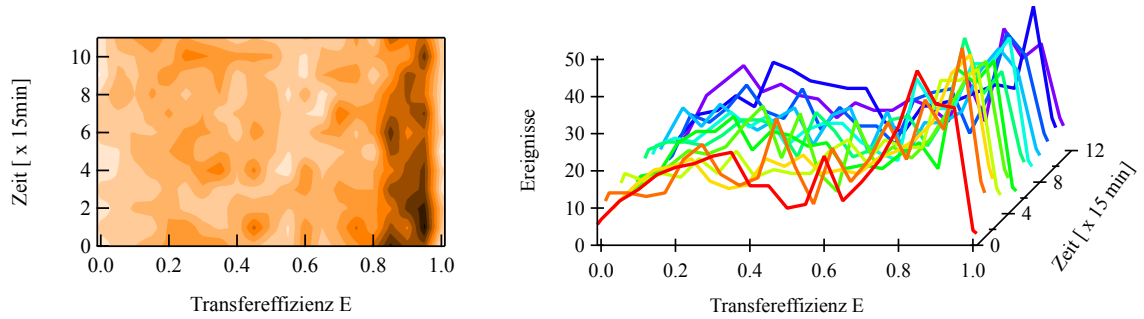


Abb. 7.17: Zeitliche Entwicklung der Transfereffizienz der Komplexbildung als 2D- (links) und 3D-Darstellung (rechts), farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor594* - *Atto680*.

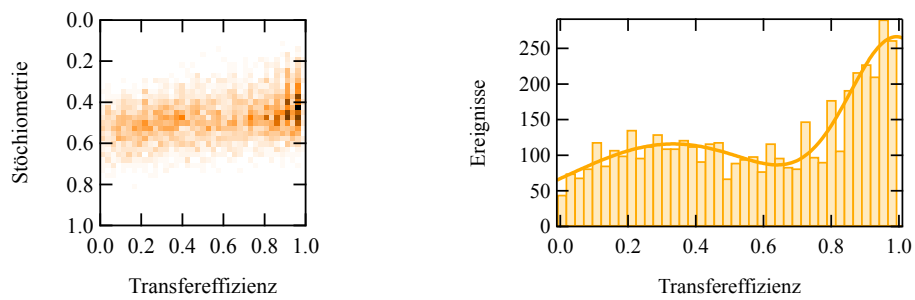


Abb. 7.18: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) des nsp8:nsp7 Komplexes, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor594* - *Atto680*.

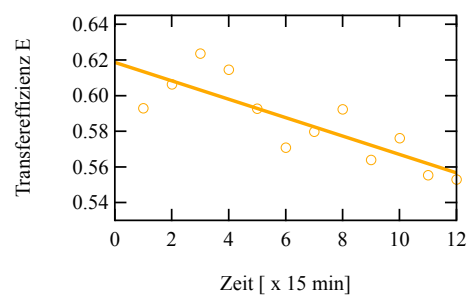


Abb. 7.19: Zeitlicher Verlauf der mittleren Transfereffizienz der Komplexbildung, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor594* - *Atto680*.

7.6.1 Komplexbildung

Der erste Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung der Komplexbildung. Das heißt nach Zugabe von nsp7 wird die Messung direkt gestartet, um die strukturellen Änderungen von nsp8 während der Komplexierung beobachten zu können. Zusätzlich werden Kontrollen nach abgeschlossener Messung durchgeführt und dargestellt. Die Untersuchungen zur direkten Messung der Komplexbildung wurden unter Zugabe von unmarkiertem nsp8 durchgeführt. Die Ergebnisse für die beiden Farbstoffkombinationen *AlexaFluor594* - *Atto680* und *AlexaFluor488* - *Atto647N* sind in den Abbildungen 7.17 bis 7.21 dargestellt.

Für beide Messungen ist in den Abbildungen 7.17 und 7.20 zu jedem Zeitschritt von 15 Minuten die Verteilung der Transfereffizienz dargestellt und als Kontur- und Wasserfalldarstellung (2D- und 3D-Darstellung) zusammengefasst. In den Abbildungen 7.18 und 7.21 ist die Verteilung der Transfereffizienz der Kontrollmessung nach der Komplexierung dargestellt.

Es wird deutlich, dass das Ergebnis für den Komplex kaum Unterschiede zum isolierten nsp8 aufweist. Weiterhin ist die starke Population hoher Transfereffizienz und damit geringem Abstand vorhanden. Es ist kein Übergang von der kompakten Struktur des isolierten nsp8 zur gestreckten Golfschlägerstruktur im Komplex zu beobachten. Die Verteilung ist sehr breit, was ebenfalls auf einer hohen Flexibilität der Struktur von nsp8 schließen lässt. Der lange alpha-helikale Arm scheint nicht fest im Komplex eingebunden zu sein und behält damit seine Flexibilität bei. Insgesamt ist über den kompletten Zeitverlauf von 3 Stunden und der möglichen Zeitauflösung von 15 Minuten keine merkliche Änderung der Transfereffizienz zu beobachten. Es ist lediglich eine starke Änderung zu Beginn der Messung mit *AlexaFluor488* - *Atto647N* zu beobachten, welche im Anschluss aber einen ähnlichen Verlauf wie die Messung mit *AlexaFluor594* - *Atto680* zeigt. Die einzelnen starken Abweichungen sind vermutlich auf Messartefakte zurückzuführen. In den Abbildungen 7.19 und 7.22 ist der zeitliche Verlauf der mittleren Transfereffizienz der Komplexierung aufgetragen. Das heißt zu jedem Zeitschritt ist die mittlere Transfereffizienz des kompletten Histogramms berechnet. Bei beiden Messungen ist eine leichte Tendenz zu niedrigerer Transfereffizienz zu beobachten. Vor allem die Werte der zweiten Messungen aus Abbildung 7.22 streuen sehr stark. Eine Interpretation ist deshalb schwierig und kann höchstens als Hinweis für eine minimale Strukturänderung gelten.

Insgesamt ist festzustellen, dass keine deutliche Strukturänderung von nsp8 während der Komplexierung zu beobachten ist. Die gestreckte Golfschlägerstruktur des SARS-CoV kann bisher nicht bestätigt werden. Da bei diesen Messungen noch ein Anteil an freiem, unkomplexiertem nsp8 Protein in der Probe vorhanden ist, überlagern sich beide Signale. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des Komplexes vorgestellt, nachdem freies nsp8 mittels Größenausschlusschromatographie entfernt wurde.

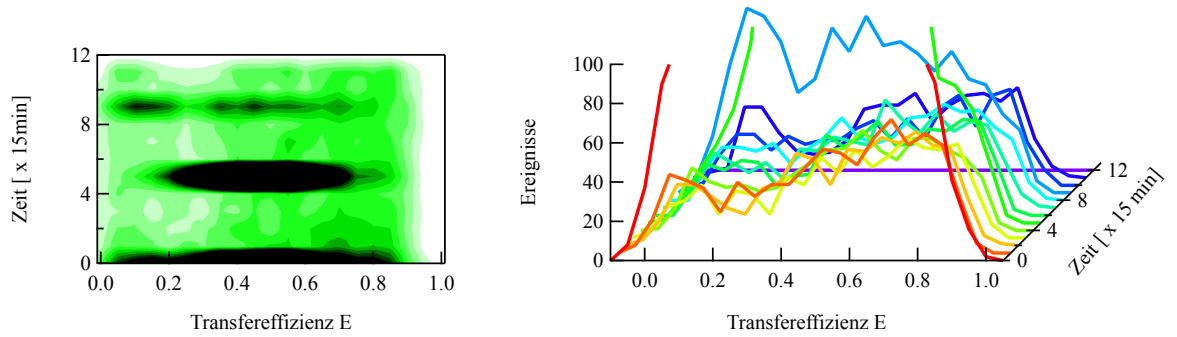


Abb. 7.20: Zeitliche Entwicklung der Transfereffizienz als 2D- (links) und 3D-Darstellung (rechts), farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *Atto647N*.

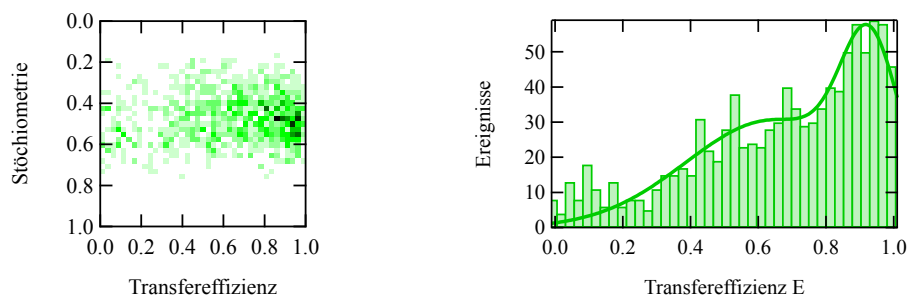


Abb. 7.21: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) vom nsp8:nsp7 Komplex, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *Atto647N*.

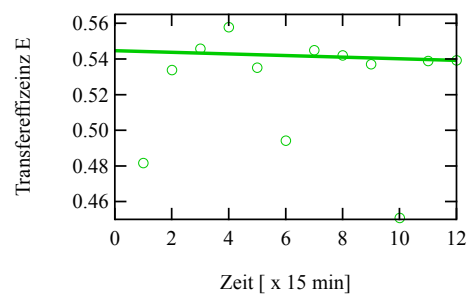


Abb. 7.22: Zeitlicher Verlauf der mittleren Transfereffizienz der Komplexbildung, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *Atto647N*.

7.6.2 Struktur von nsp8 im Komplex

Das Problem der vorhergehenden Messung ist der wahrscheinlich große Anteil an freiem farbstoffmarkiertem nsp8, welches nicht im Komplex gebunden ist. Um dieses Problem zu lösen, wurden Proben des farbstoffmarkierten Komplexes hergestellt. Anschließend wurden mittels Größenausschlusschromatographie die freien nsp8 Proteine herausgefiltert, um deren Anteil an der Messung zu reduzieren. Die ermittelten Transfereffizienzen sollten somit ausschließlich nsp8 Proteine, welche im Komplex gebunden sind, widerspiegeln. Die Komplektierung erfolgte hier ausschließlich mit farbstoffmarkiertem nsp8.

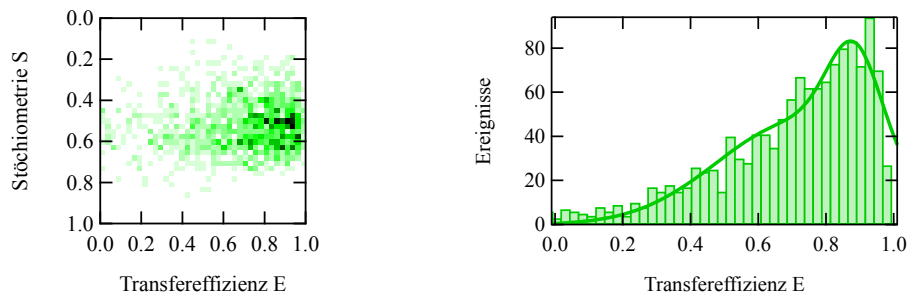


Abb. 7.23: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) des nsp8:nsp7 Komplexes, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *Atto647N*, vor der Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

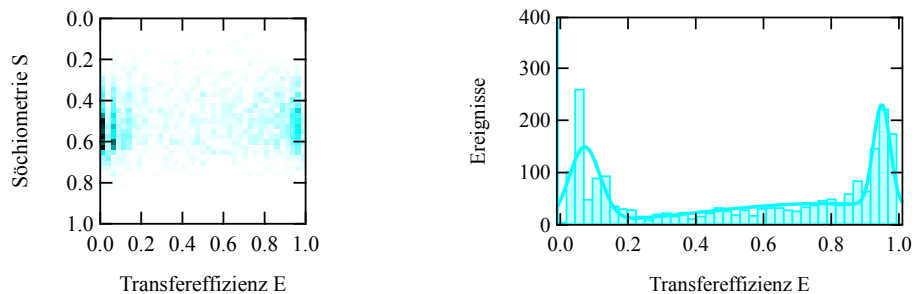


Abb. 7.24: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) vom nsp8:nsp7 Komplex, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488* - *AlexaFluor633*, vor der Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

In den Abbildungen 7.23 und 7.24 sind die Verteilungen der Transfereffizienz vor der Aufreinigung für die Farbstoffkombinationen *AlexaFluor488* - *Atto647N* und *AlexaFluor488* - *AlexaFluor633* dargestellt. Abbildung 7.25 und 7.26 zeigen die Ergebnisse nach der Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Verteilung der Transfereffizienz nicht signifikant ändert. Es ist zwar ein leichter Rückgang der Ergebnisse bei sehr hohen Transfereffizienzen zu beobachten, jedoch bleibt die ursprüngliche Verteilung erhalten. Nsp8 in freier oder komplexierter Form scheint kaum wesentliche strukturelle Unterschiede aufzuweisen. Die breite Verteilung der Transfereffizienz lässt darauf schließen, dass nsp8 im Komplex weiterhin eine sehr flexible Struktur aufweist. Die

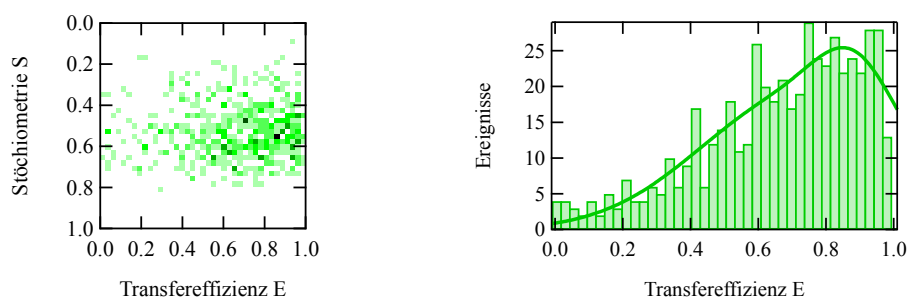


Abb. 7.25: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) vom nsp8:nsp7 Komplex, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488 - Atto647N*, nach der Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

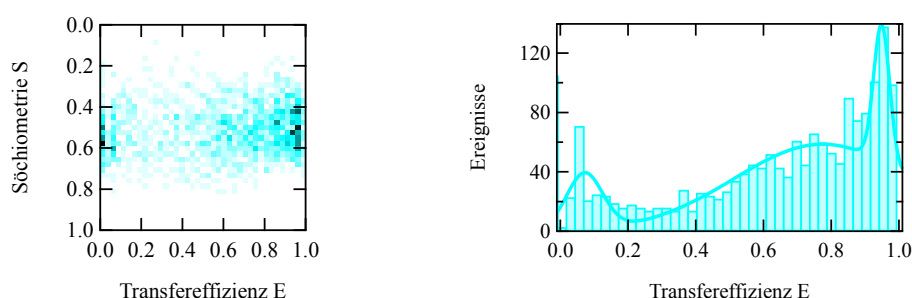


Abb. 7.26: FAMS-Histogramm (links) und Transfereffizienz (rechts) vom nsp8:nsp7 Komplex, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor488 - AlexaFluor633*, nach der Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

mittleren Abstände bewegen sich im Bereich zwischen ca. 33 und 54 Å. Die gestreckte Golfschlägerstruktur kann auch hier nicht identifiziert werden.

Auch die Ausbildung eines Komplexes mit acht nsp8 Proteinen kann nicht nachgewiesen werden. Die Stöchiometrie weist zwar eine recht breite Verteilung auf. Ein Unterschied zum isolierten nsp8 kann jedoch nicht festgestellt werden. Eher lässt die in Abbildung 7.26 auftretende niedrige Transfereffizienz, wie beim isolierten nsp8, vermuten, dass nsp8 weiterhin als Dimer vorliegt. Inwieweit und wieviel nsp7 Proteine bei der Ausbildung des Komplexes beteiligt sind, kann nicht geklärt werden.

Zusammenfassung und Diskussion

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das unkomplexierte nsp8 strukturiert ist. Die Struktur im Komplex scheint sich im Wesentlichen nicht vom freien Protein zu unterscheiden. Die lang gestreckte Golfschlägerstruktur, wie sie mittels Röntgenkristallographie für SARS-CoV gezeigt wurde [25], kann jedoch nicht bestätigt werden. Die detektierte Struktur von FCoV nsp8 im Komplex ist wesentlich kompakter und weist eine hohe Flexibilität auf. Eine mögliche Interpretation ist, dass bei bestehender alpha-helikaler Struktur des Arms keine gestreckte Konformation vorliegt. Dieser ist aufgrund der hohen Flexibilität wahrscheinlich nicht in einem großen aus vielen Proteinen zusammengesetzten Komplex eingebaut, sondern kann sich frei bewegen. In Bezug auf die Funktion von nsp8 ist ein flexibler Arm, der in der Lage ist, RNA-

Fragmente zu binden nicht unwahrscheinlich (siehe Kapitel 7.8.2). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Struktur des Komplexes wesentlich einfacher ausfällt als in der Kristallstruktur. Dieser besteht möglicherweise nur aus ein oder zwei nsp8 Proteinen (Dimer). In welcher Form und wie viele nsp7 Proteine eingebaut werden, kann an dieser Stelle nur vermutet werden und bleibt gegenstand weiterer Untersuchungen. Bisherige Ergebnisse beschreiben nur die stabilisierende Funktion von nsp7 [25]. Falls die Anlagerung von nsp7 zu intermediären Strukturänderungen von nsp8 führt, kann dies mit der möglichen Zeitauflösung von 15 Minuten nicht detektiert werden.

7.6.3 Komplexbildung - Dimer

Die Auswertung der vorhergehenden Experimente lieferte den Hinweis, dass nsp8 im Komplex mit nsp7 ebenfalls als Dimer vorliegen könnte. Unter Dimer ist hier ein Komplex zu verstehen, der zwei nsp8 Proteine enthält. Die Anzahl der beteiligten nsp7 Proteine kann nicht bestimmt werden, da diese nicht farbstoffmarkiert sind. Zum Nachweis werden die nsp8 Mutationen C42S mit dem Farbstoffpaar *AlexaFluor488* - *Atto647N* verwendet. Zum Start der Messung wurden die beiden nsp8 Populationen mit Donor und Akzeptor gemischt. Das Ergebnis ist in Abbildung 7.27 dargestellt und entspricht den in Kapitel 7.5.3 gezeigten Daten, mit dem Unterschied, dass hier mit dem verwendeten Farbstoffpaar der kleinere Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ gilt. Das Signal des Dimers liegt somit aufgrund des großen Abstands von $97 \text{ \AA}$ bei sehr niedriger Transfereffizienz nahe Null.

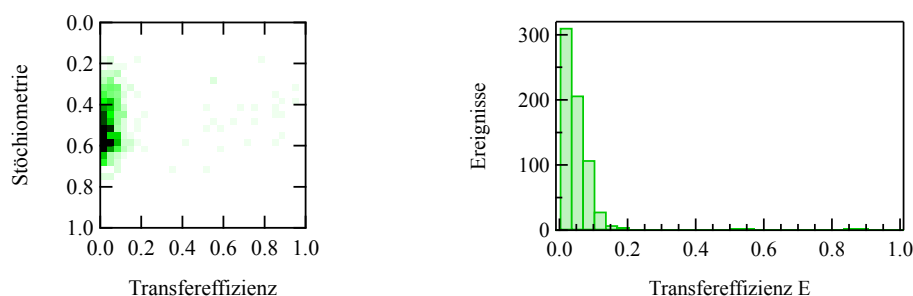


Abb. 7.27: FAMS-Histogramm (links) und aufsummierte Verteilung der Transfereffizienz (rechts) des isolierten nsp8 Proteins. Dimer gebildet aus der Mutante C42S.

Nach den Erfahrungen aus Kapitel 7.5.3 wurde nsp7 erst nach ausreichender Zeit von 2 Stunden hinzugegeben, damit sich zuvor ein Gleichgewicht zwischen den beiden nsp8 Populationen einstellen konnte. In den Abbildungen 7.28 und 7.29 sind der zeitliche Verlauf und die Verteilung der Transfereffizienz über die komplette Messzeit der Komplexbildung dargestellt.

In Abbildung 7.27 kann für die dimerisierten nsp8 Proteine vor der Zugabe von nsp7 keine Population bei hoher Transfereffizienz detektiert werden. Die Population hoher Transfereffizienz in Abbildung 7.29 ist eindeutig auf die Komplexbildung mit nsp7 zurückzuführen. Im Vergleich zur Population niedriger Transfereffizienz zeigt diese eine wesentlich geringere Intensität. Die Population ist direkt zum Start der Messung mit Zugabe von nsp7 präsent und wird zum Ende der Messung nach 3

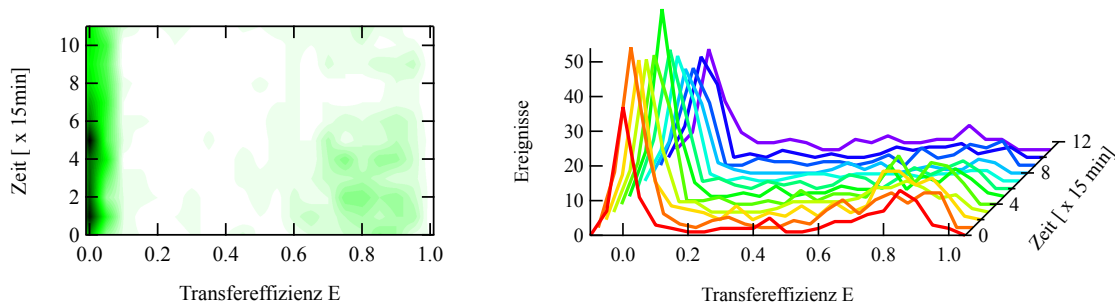


Abb. 7.28: Verlauf der Komplexbildung. nsp7:nsp8 Komplex mit Mutante C42S. Darstellung als 2D- (links) und 3D-Histogramm (rechts).

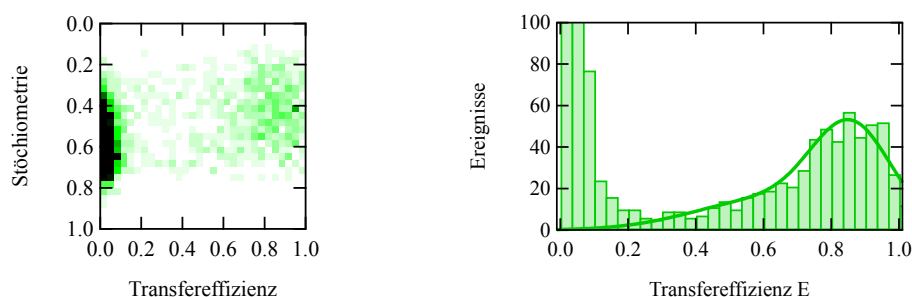


Abb. 7.29: FAMS-Histogramm (links) und aufsummierte Verteilung der Transfereffizienz (rechts) der Komplexbildung. nsp7:nsp8 Komplex mit Mutante C42S.

Stunden schwächer.

Zusammenfassung und Diskussion

Die Untersuchung der Komplexbildung mit den Mutationen C42S liefert ausschließlich Ereignisse, welche durch intermolekularen Energietransfer verursacht werden. Die Population bei hoher Transfereffizienz stammt im Vergleich zur Dimerisation des isolierten nsp8 eindeutig vom Komplex mit nsp7. Der Anteil des Komplex mit mindestens zwei nsp8 Proteinen nimmt im Verlauf der Messung jedoch ab. Eine mögliche Erklärung ist, dass nsp7 die Struktur von nsp8 im Komplex stabilisiert, wie dies bereits von Zhai et al. [25] postuliert wurde. Sobald nsp8 mit nsp7 komplexiert, scheint die stabilisierende Wirkung des nsp8 Dimers nicht mehr notwendig zu sein, und dieser dissoziiert. Welche Struktur der dimerisierte Komplex einnimmt, ist schwer zu interpretieren. Die hohe Transfereffizienz lässt auf kurze Abstände im Bereich kleiner 50 Å schließen.

7.6.4 Interaktion mit RNA

Sowohl für nsp8 als isoliertes Protein als auch im Komplex konnte RNA synthetisierende Aktivität nachgewiesen werden [29]. Die Interaktion von nsp8 mit RNA auf Einzelmolekülniveau und die daraus resultierenden strukturellen Änderungen wurden bereits in Kapitel 7.5.4 gezeigt. Um die strukturellen Änderung von nsp8

im Komplex bei Interaktion mit RNA zu untersuchen, wurde zunächst eine Probe mit nsp7:nsp8 Komplexen vorbereitet. Die Zugabe von RNA erfolgte wieder zum Start der Messung, um eventuelle Änderungen der Konformation von nsp8 direkt beobachten zu können. Für die Messung wurden RNA-Oligonukleotide des FCoV Strangs FIPV WSU-79/1146 verwendet.

In Abbildung 7.30 ist die zeitliche Entwicklung der Transfereffizienz für Zeitintervalle von 15 min dargestellt. In Abbildung 7.31 ist die Verteilung der Transfereffizienz des komplexierten nsp8 direkt und zum Vergleich 1, 5 h nach Zugabe von RNA dargestellt. Zusätzlich ist die Verteilung der Transfereffizienz des nsp7:nsp8 Komplexes ohne RNA-Zugabe aus Kapitel 7.6.1 dargestellt.

Es ist eine deutliche Änderung der Transfereffizienz zum Start direkt nach RNA-Zugabe im Vergleich zur Messung ohne RNA festzustellen. Wie bereits für das isolierte nsp8 erfolgt die strukturelle Änderung sehr schnell. Im weiteren Verlauf der Messung, während die Nukleotide langsam abgebaut werden, ändert sich die Verteilung der Transfereffizienz wieder in Richtung der Ausgangskonformation vor RNA-Zugabe.

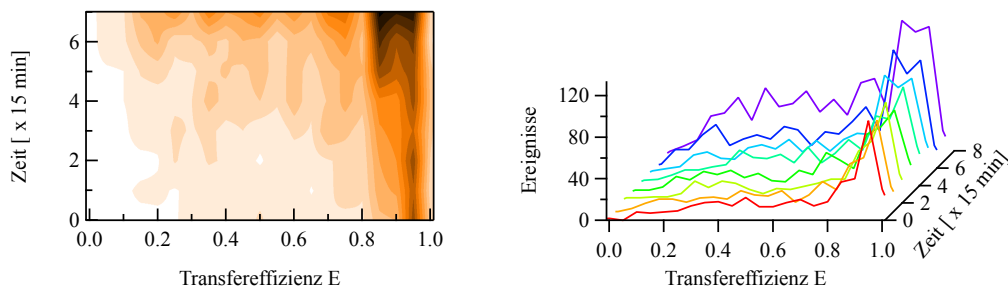


Abb. 7.30: Zeitlicher Verlauf der Transfereffizienz des nsp7:nsp8 Komplexes, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor594 - Atto680*, nach Zugabe von RNA Nukleotiden. Darstellung als 2D- (links) und 3D-Histogramm (rechts).

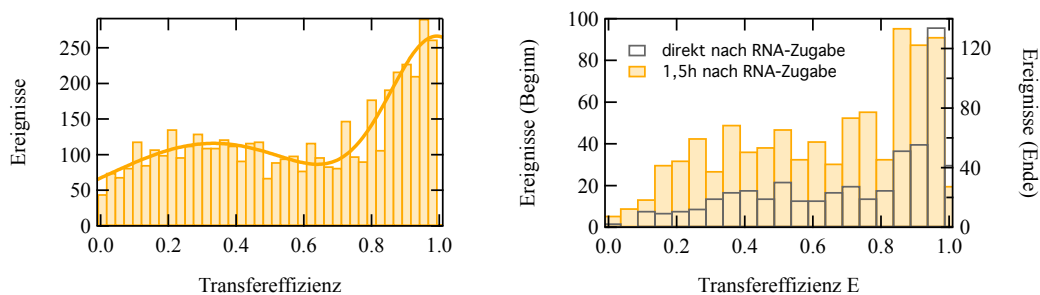


Abb. 7.31: Transfereffizienz des nsp7:nsp8 Komplexes, farbstoffmarkiert mit *AlexaFluor594 - Atto680*. Links: nsp7:nsp8 Komplex ohne RNA-Zugabe. Rechts: Vergleich der Histogramme direkt (hellgrau) und 1, 5 h nach RNA-Zugabe (gelb).

Zusammenfassung und Diskussion

Wieder wird eine deutliche Änderung der Transfereffizienz bei Interaktion mit den Nukleotiden festgestellt. Im Unterschied zum isolierten nsp8 scheint der Komplex eine stabile Konformation einzunehmen. Direkt bei Zugabe von RNA erfolgt eine Änderung der Transfereffizienz zu hohen Werten. Eine wesentlich kompaktere Struktur wird eingenommen, die sich im Verlauf der weiteren Messung wieder zur Ausgangskonformation zurückbildet, während beim isolierten nsp8 die Struktur scheinbar kollabiert und zum Ende eine sehr kompakte Konformation einnimmt.

Neben der deutlichen Strukturänderung von nsp8 bei RNA-Zugabe, kann die stabilisierende Wirkung von nsp7 demzufolge bestätigt werden.

7.7 Ergebnisse - Röntgenstrukturuntersuchung des nsp7:nsp8 Komplexes

Parallel zu den Einzelmolekülmessungen wurde durch Yibei Xiao an der Strukturaufklärung der FCoV nsp7 und nsp8 Proteine mittels Röntgenkristallographie gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Xiao et al. [83] zusammengefasst. Kristallisation und damit detaillierte Strukturdaten sind nur mit den komplexierten Proteinen möglich. Strukturdaten der isolierten nsp7 und nsp8 Proteine sind nicht verfügbar.

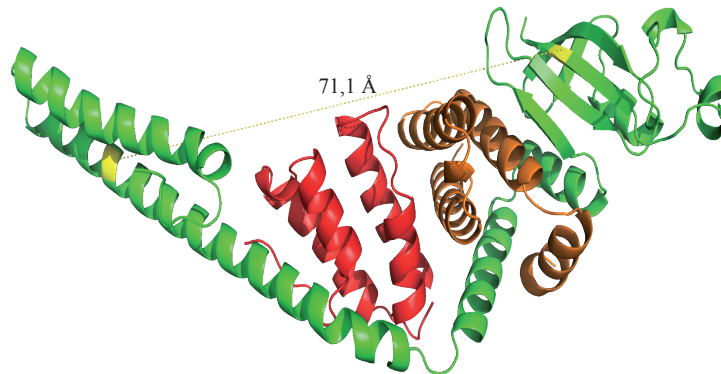


Abb. 7.32: Kristallstruktur des nsp7:nsp8 Komplexes von FCoV (pdb-Schlüssel: 3UB0). nsp7I (orange), nsp7II (rot) und nsp8 (grün). Eingezeichnet ist der Abstand $R = 71,1 \text{ \AA}$ zwischen den Cysteinen C42 und C188, welche für die Farbstoffmarkierung genutzt wurden.

Im Unterschied zu SARS-CoV bildet der Komplex von FCoV keine hexadekamere Struktur aus. In Abbildung 7.32 ist die Kristallstruktur mit einer Auflösung von $2,6 \text{ \AA}$ dargestellt. Der Komplex des FCoV besteht aus zwei nsp7 Proteinen und einem nsp8 Protein. Dieser Heterotrimer ist wesentlich einfacher als der Komplex des SARS-CoV. Die Packung im Kristall ist so organisiert, dass zwei dieser Heterotrimer die asymmetrische Einheit im Kristall bilden (Abbildung 7.33). Die Interaktion findet hierbei zwischen den beiden nsp8 Molekülen statt. In Lösung lässt sich die heterohexamere Struktur nicht nachweisen [83].

Werden die Strukturen der Einzelproteine des FCoV mit SARS-CoV verglichen, so

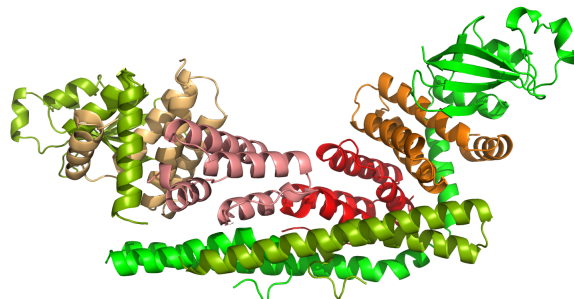


Abb. 7.33: Packung des FCoV nsp7:nsp8 Komplexes im Kristall. Die asymmetrische Einheit wird durch die Zusammenlagerung zweier Heterotrimer zu einem Heterohexamer gebildet.

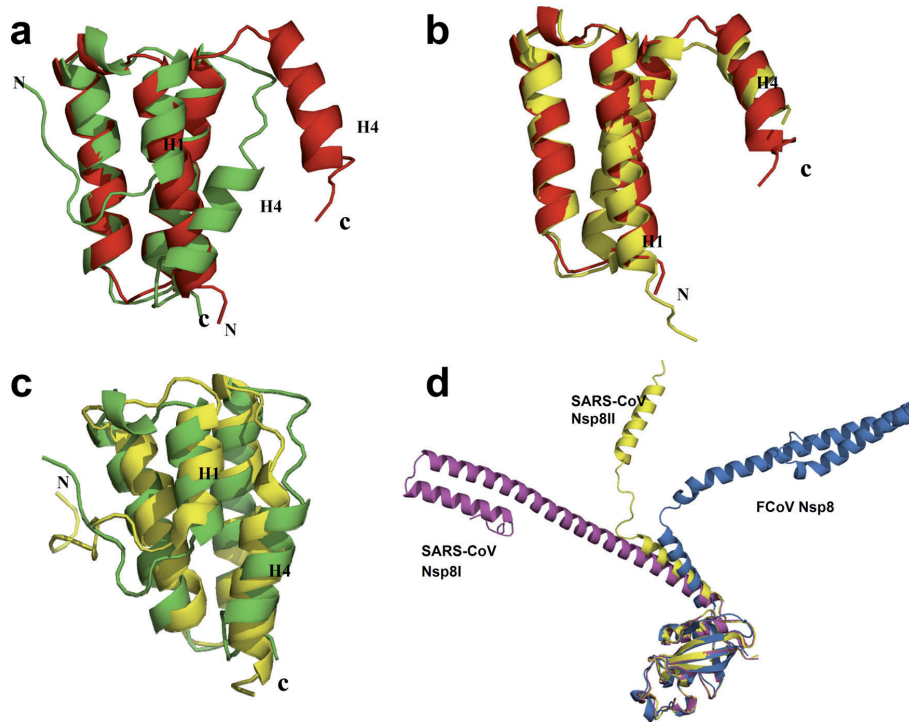


Abb. 7.34: Vergleich der Strukturdaten von FCoV und SARS-CoV. (a) Überlagerung der Strukturen nsp7I (rot) und nsp7II (grün) von FCoV. (b) Überlagerung der Strukturdaten von FCoV nsp7I (rot) und SARS-CoV nsp7 (gelb). (c) Überlagerung der Strukturdaten von FCoV nsp7II (grün) und SARS-CoV nsp7 (isoliert) (gelb). (d) Überlagerung der C-terminalen Domäne (Kopfgruppe) von FCoV nsp8 (blau) mit SARS-CoV nsp8I (magenta) und nsp8II (gelb). Die Abbildung ist entnommen aus Xiao et al. [83].

ist trotz der stark unterschiedlichen Komplexstrukturen eine gute Übereinstimmung zu erkennen. Im Komplex des SARS-CoV bildet nsp8 zwei verschiedene Konformationen. Für FCoV existiert im Komplex nur eine nsp8 Struktur. Die Überlagerung der Strukturen für beide Coronaviren ist in Abbildung 7.34 dargestellt.

Nsp8 bildet eine Konformation, welche der Form einer Pistole ähnelt. Die N-terminale Domäne als Lauf (AS 5-112) und die C-terminale Domäne als Griff (AS 113-191). Die Überlagerung der Strukturen in Abbildung 7.34 zeigt, dass die Griffdomäne für SARS-CoV und FCoV gut konserviert ist. Während die Laufdomäne starke Abweichungen und völlig verschiedene Orientierungen gegenüber SARS-CoV zeigt [83].

Nsp7 bildet im Gegensatz zu SARS-CoV im Komplex zwei verschiedene Konformationen aus. Werden die Strukturdaten miteinander verglichen, so zeigen nsp7I des FCoV und nsp7 des SARS-CoV eine im Prinzip identische Struktur [26, 86, 25]. Für nsp7 des SARS-CoV wurde ebenfalls eine isolierte, unkomplexierte Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgelöst. Diese zeigt eine gute Übereinstimmung mit der nsp7II Struktur des FCoV [26]. Die Überlagerung der verschiedenen Strukturen ist ebenfalls in Abbildung 7.34 dargestellt.

Um weitere Informationen zur Struktur in Lösung zu erhalten, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Anhand chemischem Cross-Linking wurde nachgewiesen, dass die beiden isolierten Proteine nsp7 und nsp8 nicht ausschließlich als Monomer vorliegen, sondern auch dimere Strukturen ausbilden. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie (*Size exclusion column*) zeigten ebenfalls, dass nsp7 und nsp8 als Dimere vorliegen [83]. Komplexieren beide Proteine, konnte nur die heterotrimere Struktur nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS - *Small-angle X-ray scattering*) bestätigten ebenfalls, dass der nsp7:nsp8 Komplex ausschließlich als Heterotrimer und das isolierte nsp7 Protein als Dimer vorliegen. Das Heterohexamer ist somit nur auf die Packung im Kristall zurückzuführen. In Lösung bilden nsp7 und nsp8 ein Heterotrimer.

Um die Rolle des nsp8 Proteins und des nsp7:nsp8 Komplexes während der RNA-Transkription besser zu verstehen, wurden außerdem Experimente zur RNA-Synthese-Aktivität durchgeführt. Es konnte in Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen zu SARS-CoV gezeigt werden, dass isoliertes nsp8 bereits kurze RNA-Stränge synthetisiert [29, 83]. Dies stützt die Annahme, dass nsp8 als Primase für nsp12 (RdRp) fungiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der nsp7:nsp8 Komplex in der Lage ist, eine RNA kompletter *template*-Länge (67 Nukleotide) zu synthetisieren. Dies ist ein klarer Hinweis auf die wichtige Rolle im Replikations- und Transkriptionskomplex. Der Komplex scheint, anders als für SARS-CoV berichtet, nicht ausschließlich als Primase, sondern bereits als Primase-unabhängige Polymerase zu funktionieren [29, 83].

7.7.1 Vergleich der Strukturdaten mit den Einzelmolekülmessungen

Die bereits erfolgten Einzelmolekülmessungen bestätigen zum Teil die in Xiao et al. [83] gezeigten Ergebnisse. Wesentliche Punkte konnten gezeigt werden:

Zum Einen konnte die Ausbildung von Dimeren des isolierten nsp8 Proteins nachgewiesen werden.

Es konnte bestätigt werden, dass die Komplexstruktur des FCoV deutlich einfacher ausfällt, als die hexadekamere Komplexstruktur des SARS-CoV.

Schließlich konnte die Interaktion der RNA mit dem isolierten und komplexierten nsp8 Protein belegt werden.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nsp8 isoliert bereits vorstrukturiert ist. Vor allem in Hinblick auf die RNA synthetisierende Aktivität des Proteins ist dies eine wesentliche Information. Das Protein scheint bereits so weit gefaltet zu sein, dass eine Funktion ausgeführt werden kann (*Molten Globule*).

Schwierigkeiten bereitet die Auswertung der Abstandsinformationen. Die Abstände des isolierten nsp8 und des komplexierten nsp8 liegen in einem ähnlichen Bereich und lassen sich schlecht separieren. Außerdem passen die gemessenen Abstände nicht zum erwarteten Abstand von $R = 71,1 \text{ \AA}$, der aus der Kristallstruktur des FCoV ermittelt wurde. Obwohl dieser etwas kleiner ausfällt als die Abstände von nsp8I und nsp8II des SARS-CoV mit $R_I = 78,8 \text{ \AA}$ und $R_{II} = 81,0 \text{ \AA}$. Die mit FRET

gemessenen Abstände lassen eher auf eine kompakte Struktur des nsp8 Proteins schließen. Eine Interpretation der Daten in Hinblick auf mögliche Strukturen ist somit schwer möglich.

Um hier Aussagen treffen zu können, werden molekulardynamische Simulationen am isolierten nsp8 und am nsp7:nsp8 Komplex des FCoV durchgeführt. Mögliche Konformationen oder dynamische Prozesse des nsp8 Proteins werden dann im Vergleich mit den Einzelmoleküldaten ausgewertet.

7.8 Ergebnisse - molekulardynamische Simulationen

Für die molekulardynamischen Simulationen wird die Struktur aus Abbildung 7.35 des FCoV (pdb Schlüssel: 3UB0) verwendet, um mit den Ergebnissen mögliche Interpretationsansätze für die Einzelmoleküldaten zu erhalten. Es werden zwei verschiedene Ansätze vorgestellt. Als erstes wird das isolierte nsp8 Protein untersucht. Hierfür wird als Startstruktur die Kristallstruktur des Komplexes ohne die beiden nsp7 Proteine verwendet. Als zweites wird die komplette Komplexstruktur, bestehend aus den beiden nsp7 Proteinen (nsp7I und nsp7II) und einem nsp8 Protein, für die Simulation verwendet.

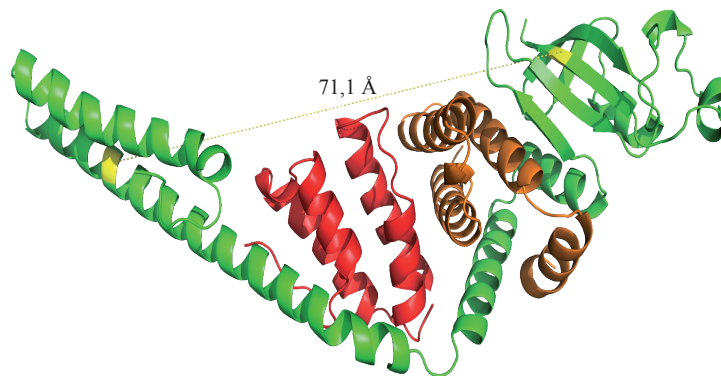


Abb. 7.35: Kristallstruktur des nsp7:nsp8 Komplexes von FCoV (pdb-Schlüssel: 3UB0). nsp7I (orange), nsp7II (rot) und nsp8 (grün). Eingezeichnet ist der Abstand $R = 71,1 \text{ \AA}$ zwischen den Cysteinen C42 und C188, welche für die Farbstoffmarkierung genutzt wurden.

Der Ausgangspunkt ist für beide Fälle identisch. Die Simulationen werden nach dem in Kapitel 4.3 vorgegebenen Schema vorbereitet. Zur Auswertung werden mit den von GROMACS verfügbaren Werkzeugen verschiedene Parameter untersucht. So werden zum Beispiel Abstände zwischen den beiden zur Farbstoffmarkierung benutzten Aminosäuren, C42 und C188, ausgelesen. Diese Werte werden in Transfereffizienzen umgerechnet und als Histogramme dargestellt, um damit eine Vergleichbarkeit zu den experimentellen FRET-Daten zu erhalten. Um abzuschätzen, wie stark die simulierten Strukturen von der Ausgangsstruktur abweichen, werden die RMSD-Werte (*engl. Root-Mean-Square-Deviation* - mittlere quadratische Abweichung) bestimmt [87]. Außerdem werden verschiedene Winkel im Protein untersucht, um Änderungen in der Struktur anschaulicher darzustellen. Die Darstellung der Strukturen erfolgte mit PYMOL [45].

7.8.1 Isoliertes Protein - nsp8

Ausgangspunkt für die Simulation ist die aus dem nsp7:nsp8 Komplex bekannte Struktur des nsp8 Proteins aus Abbildung 7.35. Die Simualtionszeit betrug 100 ns. Beim ersten Durchgang hat sich gezeigt, dass die Struktur recht schnell in einer Art Sackgasse landet. Strukturelle Änderungen waren in diesem Fall nicht mehr zu erwarten. Um sicherzugehen, ob nicht auch andere Verläufe möglich sind, werden deshalb fünf Simulationen bei absolut identischen Ausgangsbedingungen mit gleicher Startstruktur durchgeführt. Die Startstruktur von nsp8 und die Ergebnisse der fünf Simulationen nach 100 ns Simulationszeit sind in Abbildung 7.36 zusammengefasst.

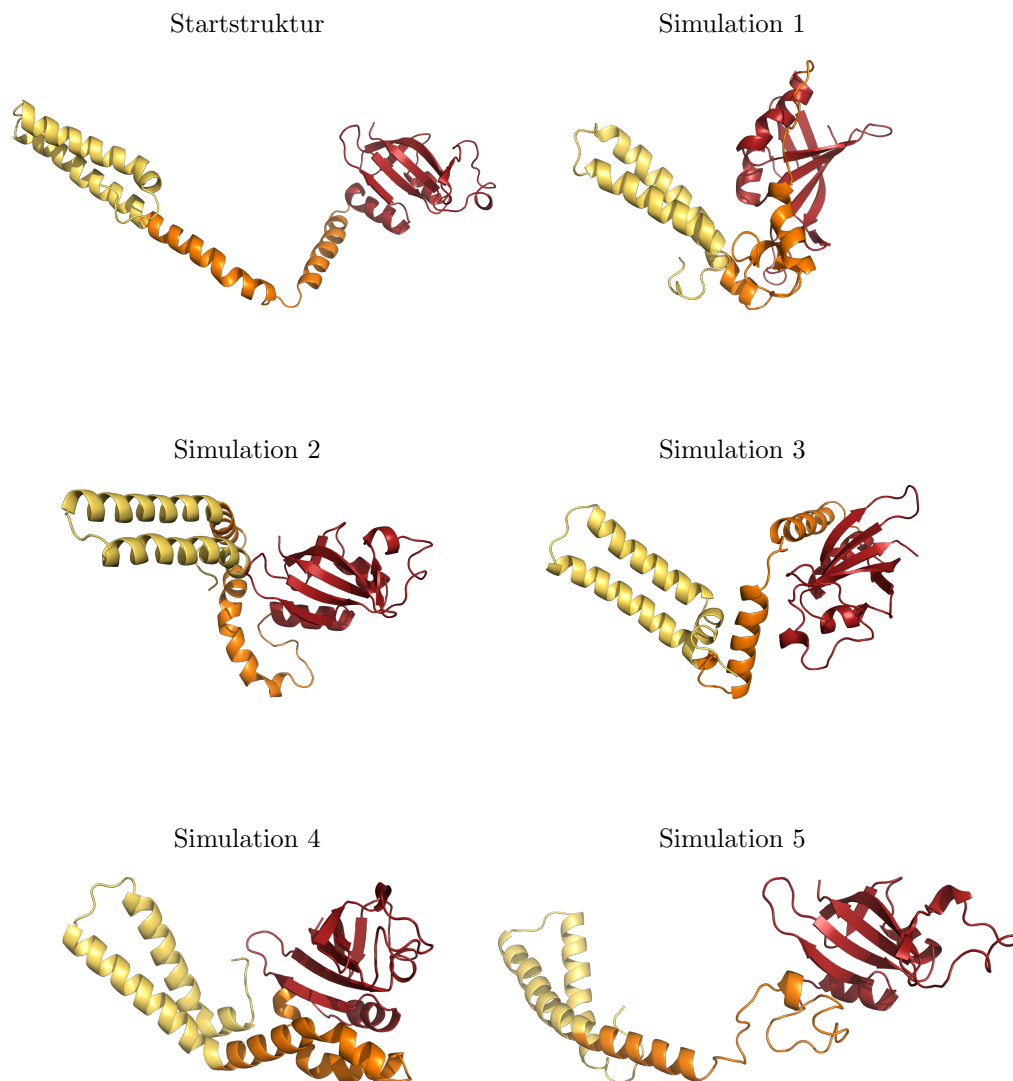


Abb. 7.36: Links oben: Startstruktur von nsp8, isoliert aus der Kristallstruktur des Komplexes. Alle weiteren Strukturen entsprechen den finalen Strukturen fünf unabhängiger Simulationen nach 100 ns. Farbkodierung: gelb - Alpha-helices (Prolin 2 .. Serin 54), orange - Mittelteil (Valin 55 .. Methionin 100), rot - Kopfgruppe (Serin 101 .. Threonin 191).

Ausgehend von den Simulationsergebnissen, lassen sich drei Bereiche in der Struk-

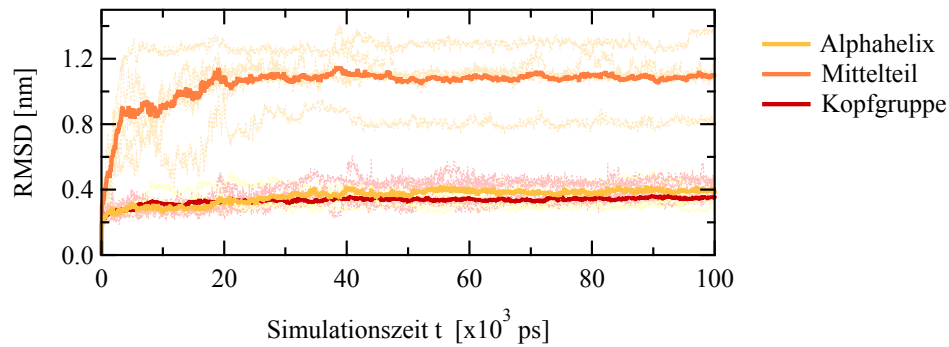


Abb. 7.37: Mittlere quadratische Verschiebung (RMSD). Referenzstruktur zum Startpunkt der Simulation $t = 0$ s. Der mittlere Verlauf aller fünf Simulationen ist für den jeweiligen Teil (Alphahelix - gelb, Mittelteil - orange, kopfteil - rot) dick markiert. Die einzelnen Simulationen sind gestrichelt dargestellt.

tur von nsp8 festlegen: Armbereich α (Alphahelices), Mittelteil m und Kopfgruppe k . Zwei Bereiche bleiben konserviert: der Armbereich (gelb) mit den doppelt übereinander liegenden Alphahelices, die sich gegenseitig stabilisieren (Aminosäuren 2..54) und der Kopfbereich (rot), bestehend aus Betafaltblättern, Loops und Alphahelix (Aminosäuren 101..191). Der Mittelteil, der hier orange gekennzeichnet ist, bleibt hingegen nicht konserviert. Die fehlenden nsp7 Proteine führen zur Destabilisierung der Alphahelix. Dies hat in allen fünf Fällen den Kollaps des Mittelteils zur Folge. Der Kollaps führt bei allen Simulationen trotz unterschiedlichem Verlauf zu einer Verdichtung und damit kompakteren Struktur. Der Abstand zwischen Alphahelices und Kopfteil nimmt ab und damit auch der Abstand zwischen den beiden Cysteinen C42 und C188.

Um den Verlauf der strukturellen Änderung für nsp8 über die Simulationszeit hinweg darzustellen, werden in Abbildung 7.37 die RMSD-Werte für die drei Teile (Alphahelix, Mittelteil, Kopfteil) aufgetragen [87]. Hierbei wird die Struktur von nsp8 zu jedem Simulationsschritt mit der Startstruktur verglichen. Die RMSD-Werte

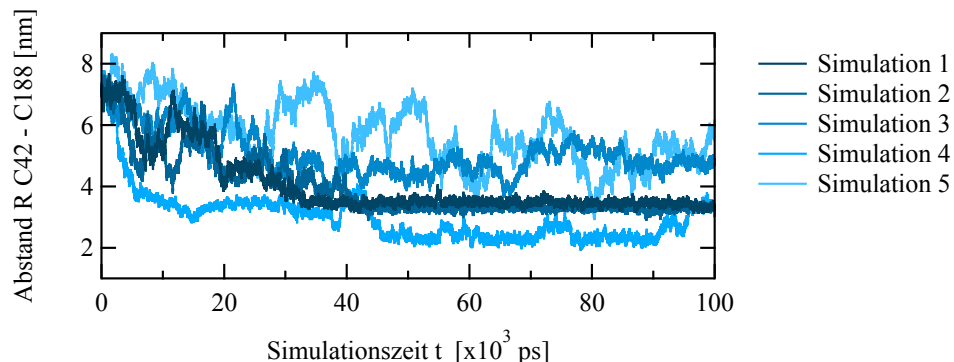


Abb. 7.38: Abstand der farbstoffmarkierten Cysteine C42 und C188, aufgetragen für fünf verschiedene Simulationen, mit jeweils identischer Startstruktur und gleicher Simulationszeit von 100 ns.

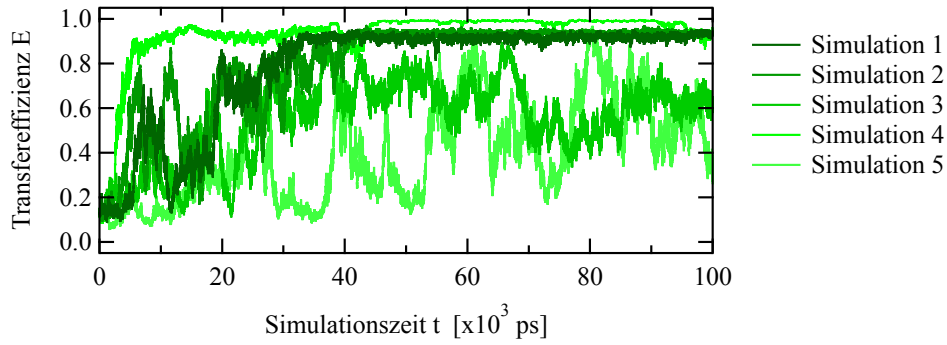


Abb. 7.39: Transfereffizienz E in Abhängigkeit der Simulationszeit für einen Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$, berechnet für die Abstände aus Abb. 7.38.

für die Alphahelices und den Kopfteil sättigen und liegen zum Ende der Simulation (95 bis 100 ns) im Mittel bei $\text{RMSD}_\alpha = (3,922 \pm 0,001) \text{ \AA}$ und $\text{RMSD}_k = (3,494 \pm 0,001) \text{ \AA}$. Abweichungen von größer Null sind unumgänglich, da die Strukturen während der Simulation relaxieren und Fluktuationen aufgrund der inneren thermischen Energie des Systems aufweisen. Zudem wird deutlich, auch wenn man sich die Strukturen in Abbildung 7.36 anschaut, dass beide Bereiche gut konserviert sind. Im Gegensatz dazu sind im Mittelteil deutliche Abweichungen zur Startstruktur zu erkennen. Der mittlere RMSD liegt hier zum Schluss bei $\text{RMSD}_m = (10,891 \pm 0,001) \text{ \AA}$.

Zum Vergleich der Daten mit den Einzelmolekülmessungen wird der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren C42 und C188 ermittelt. Der Verlauf über die Simulationszeit ist für die fünf verschiedenen Simulationen in Abbildung 7.38 aufgetragen. Insgesamt ist eine Abnahme des Abstands zu beobachten. Zwei der Simulationen gehen bereits nach kurzer Simulationszeit von 40 ns in Sättigung und zeigen keine weitere Änderung im Abstand. Die weiteren drei Simulationen zeigen bis zum Schluss der Simulation noch starke Fluktuationen. Trotzdem ist bereits eine kompaktere Struktur mit verringertem Abstand zu beobachten.

Die Abstandswerte werden anhand Gleichung 2.9 mit $R_0 = 52 \text{ \AA}$ und $R_0 = 70 \text{ \AA}$ in Transfereffizienzen umgerechnet. Die Ergebnisse sind für die Farbstoffpaare *Alexa-*

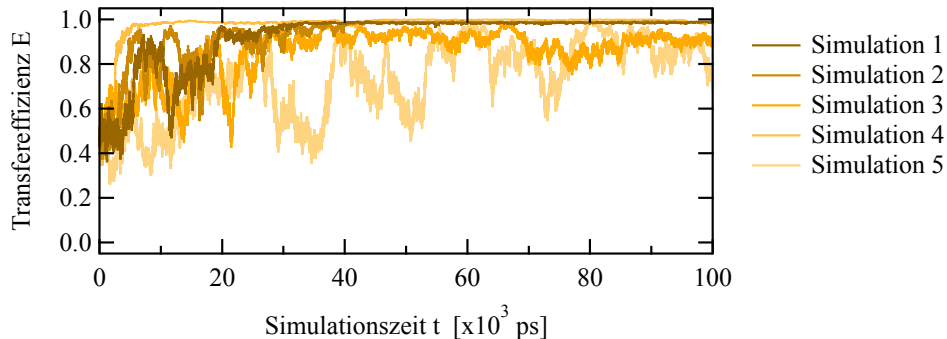


Abb. 7.40: Transfereffizienz E in Abhängigkeit der Simulationszeit für einen Försterradius von $R_0 = 70 \text{ \AA}$, berechnet für die Abstände aus Abb. 7.38.

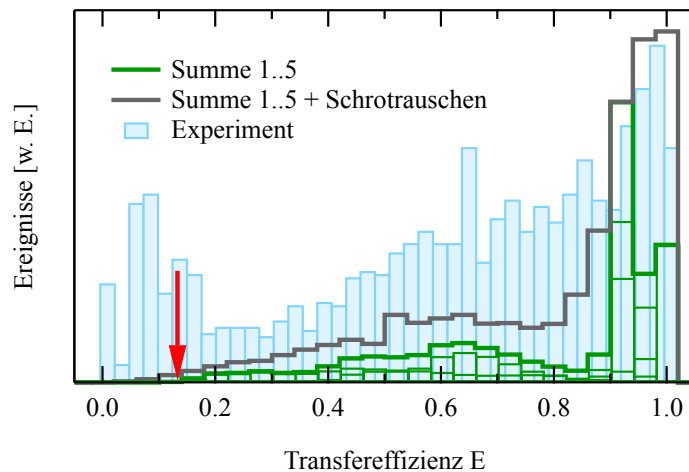


Abb. 7.41: Aufsummierte Transfereffizienzen (grün) für den Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ aus Abb. 7.39. Verbreiterte Verteilung aufgrund der Photonenstatistik (Schrotrauschen) (dunkelgrau). Experimentelle Werte (hellblau). Mit rotem Pfeil ist die erwartete Transfereffizienz für den Abstand $R = 71,1 \text{ \AA}$ aus der Kristallstruktur eingezeichnet.

Fluor488 - AlexaFluor633 und *AlexaFluor488 - Atto647N* mit einem Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ in Abbildung 7.39 dargestellt. Die Transfereffizienz für *AlexaFluor594 - Atto680* mit einem Försterradius von $R_0 = 70 \text{ \AA}$ wird in Abbildung 7.40 dargestellt. Die Transfereffizienzen der einzelnen Simulationen werden histogrammiert und aufsummiert. Das Ergebnis ist für $R_0 = 52 \text{ \AA}$ in Abbildung 7.41 und für $R_0 = 70 \text{ \AA}$ in Abbildung 7.42 dargestellt. Für beide Verteilungen wird zusätzlich für die Vergleichbarkeit mit den experimentellen Werten die Photonenstatistik beachtet. Dies führt zu einer Verbreiterung der Verteilung. In beiden Abbildungen sind jeweils zum Vergleich die experimentellen Ergebnisse aus Kapitel 7.4.1 dargestellt.

Der Unterschied in der Verteilung der Transfereffizienz aufgrund der verschiedenen Försterradien ist deutlich zu erkennen. So führt der größere Försterradius in Abbildung 7.42 zu einer Verschiebung der Transfereffizienz zu großen Werten nahe 1. Die aus der Simulation erwarteten Abstände sind experimentell mit dem großen Försterradius nur schwer zugänglich. Der Vergleich mit den experimentellen Daten zeigt, dass für die Werte hoher Transfereffizienz eine Übereinstimmung zu erkennen ist. Hinzu kommt jedoch die Überlagerung mit den dimeren Strukturen, die in der Simulation nicht beachtet werden. Der Vergleich zeigt, dass das Farbstoffpaar *AlexaFluor594 - Atto680* bei den erwarteten Abständen eher ungeeignet ist, da kleine Abstände hier nur schlecht erfasst werden können. Der Vergleich der experimentellen und simulierten Daten des kleineren Försterradius zeigt für die Farbstoffpaare *AlexaFluor488 - Atto647N* und *AlexaFluor488 - AlexaFluor633* hingegen eine wesentlich bessere Übereinstimmung und bestätigt die simulierten Strukturen.

Zusammenfassung und Diskussion

Im Experiment und der Simulation kann die gestreckte Konformation von nsp8 nicht bestätigt werden. Die Einzelmoleküldaten lieferten bereits den Hinweis, dass nsp8

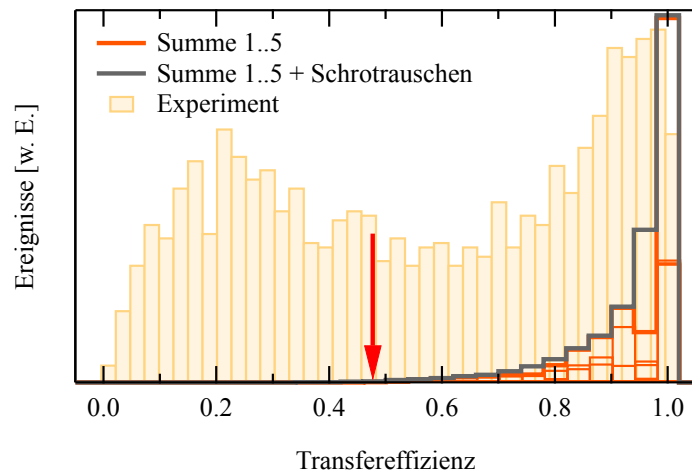


Abb. 7.42: Aufsummierte Transfereffizienzen (rot) für den Försterradius $R_0 = 70 \text{ \AA}$ aus Abb. 7.40. Verbreiterte Verteilung aufgrund der Photonenstatistik (Schrotrauschen) (dunkelgrau). Experimentelle Werte (gelb). Mit rotem Pfeil ist die erwartete Transfereffizienz für den Abstand $R = 71,1 \text{ \AA}$ aus der Kristallstruktur eingezeichnet.

eine wesentlich kompaktere Struktur einnimmt. Mögliche Szenarien sind durch die Simulationen gezeigt worden. Aufgrund des Fehlens der nsp7 Proteine, fehlt nsp8 der stabilisierende Faktor für den Mittelteil der Struktur. Dies führt als Konsequenz zu einer Annäherung von Alphahelices und Kopfgruppe, und resultiert in kurzen Abständen und den hohen detektierten Transfereffizienzen.

Um zu prüfen, ob weitere Strukturen möglich sind, müssen zusätzliche und zeitlich ausgedehntere Simulationen durchgeführt werden. Der erste Ansatz zeigt aber eine eindeutige Tendenz.

7.8.2 Komplex - nsp7:nsp8

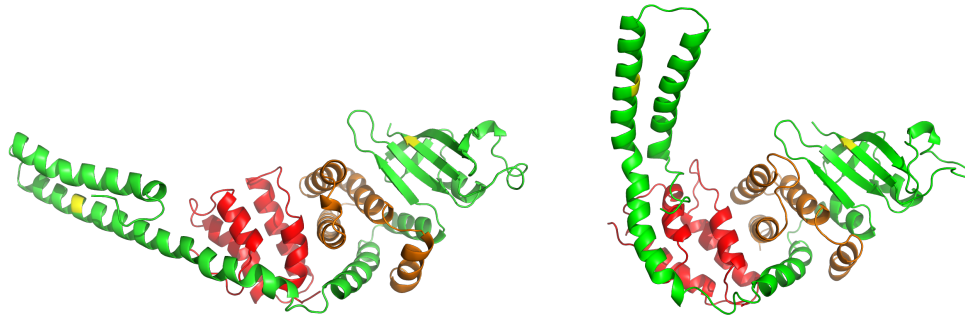


Abb. 7.43: Links: Startstruktur des Komplexes, bestehend aus einem nsp8 (grün) und zwei nsp7 Proteinen, nsp7I (orange) und nsp7II (rot). Rechts: Struktur des Komplexes nach 250 ns Simulationszeit.

Ausgangspunkt für die Simulation ist wiederum die aus Abbildung 7.35 bekannte Kristallstruktur des nsp7:nsp8 Komplex des FCoV. Die erreichte Simulationszeit beträgt 250 ns. Das Ergebnis im Vergleich mit der Startstruktur ist in Abbildung 7.43 dargestellt. Die kompaktere Struktur aufgrund des Eindrehens und Umklappens des Arms mit den beiden Alphahelices ist deutlich zu erkennen. Die jeweiligen Grundstrukturen der einzelnen Teile von nsp8 bleiben aber erhalten. Der Vergleich der RMSD-Werte von Alphahelix, Mittelteil und Kopfgruppe in Abbildung 7.44 zeigt eine leichte Änderung zu Beginn der Simulation aufgrund des Umklappens des Arms. Der Prozess des Umklappens erfolgt innerhalb der ersten 80 ns der Simulation. Innerhalb dieses Zeitbereichs sind erwartungsgemäß die größten Änderungen der RMSD-Werte erfolgt. Nach dem Umklappen des Arms bleiben diese relativ konstant. Zum Ende der Simulation liegen die Werte bei $\text{RMSD}_\alpha = (3,639 \pm 0,001) \text{ \AA}$, $\text{RMSD}_m = (5,11 \pm 0,001) \text{ nm}$ und $\text{RMSD}_k = (3,037 \pm 0,001) \text{ nm}$.

Die beiden nsp7 Proteine, nsp7I und nsp7II verhalten sich sehr ähnlich und zeigen nur eine geringe Änderung in der Struktur. Die Grundstruktur bleibt erhalten und die RMSD-Werte zum Ende der Simulation liegen bei $\text{RMSD}_I = (4,548 \pm 0,001) \text{ \AA}$ und $\text{RMSD}_{II} = (3,629 \pm 0,001) \text{ \AA}$. Der zeitliche Verlauf der RMSD Werte von nsp7 ist in Abbildung 7.45 dargestellt.

Die Ergebnisse der RMSD Auswertung können ebenfalls durch die direkte Darstellung der Struktur anschaulich gemacht werden. In den Abbildungen 7.46 und 7.47 wird die Änderung der Struktur von nsp7 und nsp8 mit zunehmender Simulationszeit von gelb nach rot dargestellt. Für nsp8 ist ein deutliches Umklappen des Arms der Alphahelices innerhalb der ersten 80 ns zu beobachten. Nach dem Umklappen bleibt der Arm in dieser Position. Die hohe Flexibilität und Rotation des Arms sind deutlich zu erkennen. Ein Zurückklappen findet jedoch nicht statt. Um festzustellen, ob der Arm sich frei bewegen kann oder ob bevorzugte Konformationen eingenommen werden, wird im folgenden Kapitel eine gesonderte Auswertung durchgeführt. Für nsp7 sind, wie erwartet, nur leichte Fluktuationen zu erkennen.

Insgesamt ist festzustellen, dass die beiden nsp7 Proteine eine stabilisierende Funktion einnehmen. Der Mittelteil bleibt, im Gegensatz zum isolierten nsp8, im Komplex konserviert. Als einzige strukturelle Änderung ist das Einklappen des Arms zu beobachten. Der Komplex nimmt dadurch eine kompaktere Struktur ein, und der Abstand

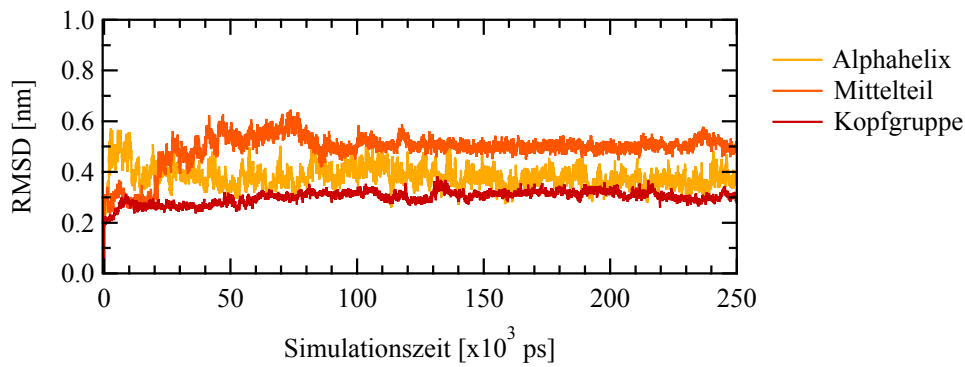


Abb. 7.44: Mittlere quadratische Verschiebung (RMSD) von nsp8 gebunden im Komplex. Referenzstruktur zum Startzeitpunkt der Simulation $t = 0$ s.

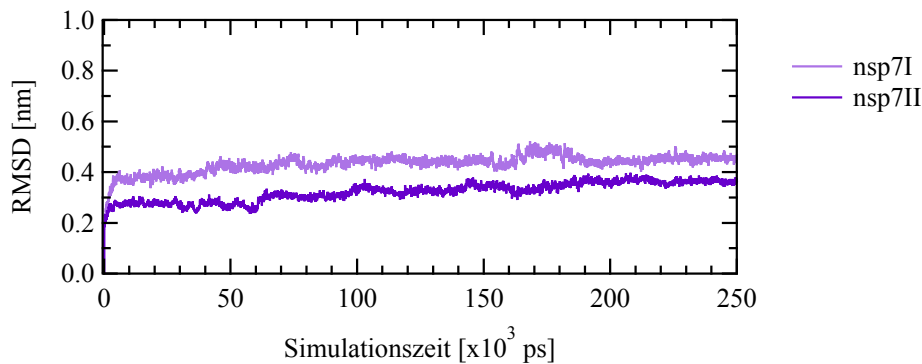


Abb. 7.45: Mittlere quadratische Verschiebung (RMSD) der beiden nsp7 Proteine gebunden im Komplex. Referenzstrukturen zum Startzeitpunkt der Simulation $t = 0$ s.

zwischen den beiden farbstoffmarkierten Aminosäuren C42 und C188 ist wesentlich geringer. Dies wird in der folgenden FRET-Auswertung ebenfalls deutlich.

Zuordnung einzelner Domänen mittels DynDom - Server

Das online zur Verfügung stehende Programm DynDom bietet die Möglichkeit, bei verschiedenen Strukturen eines Proteins, ähnliche Domänen zu erkennen (*Protein Domain Motion Analysis*) [88]. Außerdem werden die „Scharniere“, welche die Domänen verbinden, mit den dazugehörigen Aminosäuren bestimmt. Wird das Programm auf die nsp8 Struktur bei $t = 0$ ns und $t = 250$ ns angewendet, ergeben sich zwei Domänen, dargestellt in Abbildung 7.48. Wie erwartet, werden die beiden Alphahelices des Arms als eine Domäne erkannt. Die Analyse ergibt die gleiche Zuordnung der Aminosäuren 2..54, wie bereits in Abbildung 7.36 zur Auswertung des isolierten nsp8 Proteins gezeigt wurde. Kopf- und Mittelteil mit den Aminosäuren 55..191 werden im Komplex als eine weitere Domäne erkannt. Kopf- und Mittelteil sind aufgrund der stabilisierenden Wirkung der nsp7 fest zueinander organisiert und zeigen während der Simulation keine wesentliche Änderung.

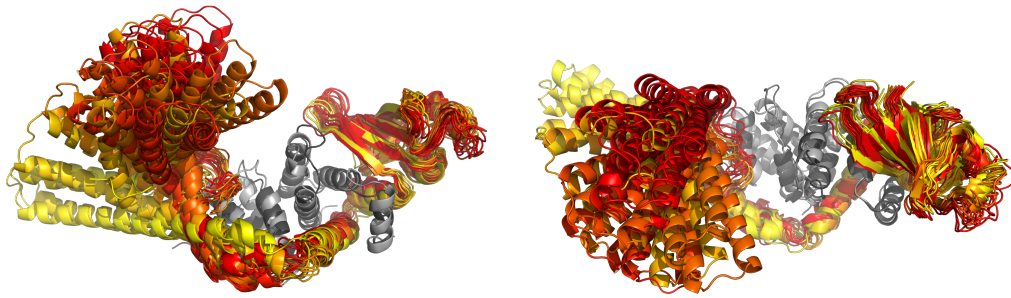


Abb. 7.46: Beispielstrukturen für die zeitliche Entwicklung der nsp8 Proteinstrukturen von 0 ns bis 100 ns in 5 ns-Schritten (von gelb nach rot). Ab 100 ns bis 250 ns in 50 ns-Schritten (rot). Zusätzlich sind die Startstrukturen der beiden nsp7 Proteine bei $t = 0$ ns (hellgrau) und die Strukturen nach $t = 250$ ns (dunkelgrau) dargestellt. Links: Sicht von vorn. Rechts: Aufsicht von oben.

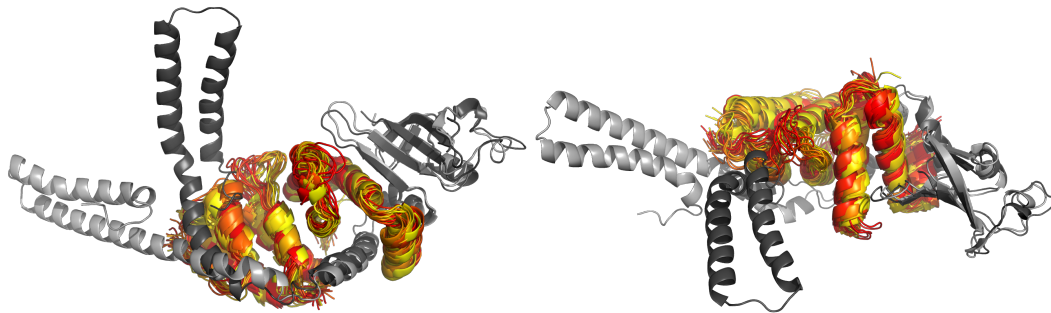


Abb. 7.47: Beispielstrukturen für die zeitliche Entwicklung der beiden nsp7 Proteinstrukturen von 0 ns bis 100 ns in 5 ns-Schritten (von gelb nach rot). Ab 100 ns bis 250 ns in 50 ns-Schritten (rot). Zusätzlich sind die Startstruktur von nsp8 bei $t = 0$ ns (hellgrau) und die Struktur von nsp8 nach $t = 250$ ns (dunkelgrau) dargestellt. Links: Sicht von vorn. Rechts: Aufsicht von oben.



Abb. 7.48: DynDom-Analyse der Struktur von nsp8 zum Start der Simulation bei $t = 0$ ns (links) und zum Ende der Simulation bei $t = 250$ ns. Gelb: Aminosäuren 2..54. Rot: Aminosäuren 55..191. Die beiden nsp7 Proteine sind nicht dargestellt.

FRET - Auswertung

Um die Strukturdaten aus der Simulation mit den Einzelmoleküldaten zu vergleichen, wird wieder der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren C42 und C188 ausgelesen. Die Entwicklung des Abstands in Abhängigkeit der Simulationszeit ist in Abbildung 7.49 aufgetragen. Mit zunehmender Simulationszeit fällt die deutliche Abnahme des Abstands auf. Mit Umklappen des Arms ist ein deutlicher Sprung im Abstand zu beobachten. Aus den Abstandsdaten wird mit Gleichung 2.9 für die beiden Försterradien $R_0 = 52 \text{ \AA}$ und $R_0 = 70 \text{ \AA}$ der Verlauf der Transfereffizienz bestimmt und in Abbildung 7.50 graphisch dargestellt.

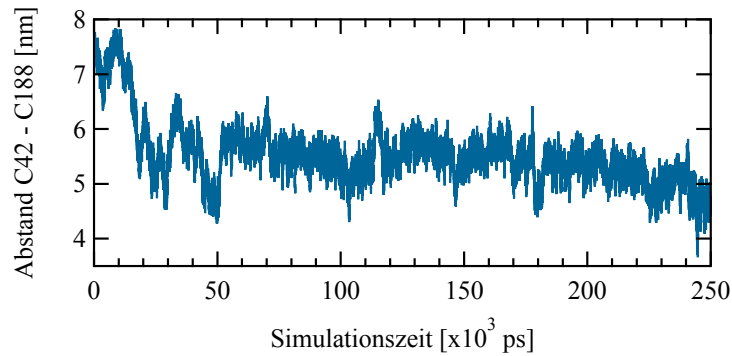


Abb. 7.49: Abstand der farbstoffmarkierten Cysteine C42 und C188 im Komplex.

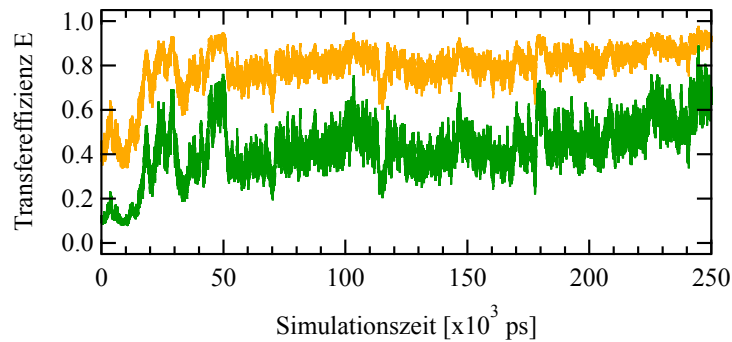


Abb. 7.50: Transfereffizienz in Abhängigkeit der Simulationszeit für die beiden Försterradien $R_0 = 52 \text{ \AA}$ (grün) und $R_0 = 70 \text{ \AA}$ (rot).

Die Transfereffizienzen der einzelnen Simulationen werden histogrammiert und aufsummiert. Das Ergebnis ist für $R_0 = 52 \text{ \AA}$ in Abbildung 7.51 und für $R_0 = 70 \text{ \AA}$ in Abbildung 7.52 gezeigt. Für beide Verteilungen wird zusätzlich für die Vergleichbarkeit mit den experimentellen Daten die Photonstatistik beachtet. Dies führt zu einer Verbreiterung der Verteilung.

Die simulierte Verteilung der Transfereffizienz in Abbildung 7.51 zeigt auf den ersten Blick keine direkte Übereinstimmung mit den experimentellen Daten für den Försterradius von $R_0 = 52 \text{ \AA}$. Das Experiment zeigt eine Verteilung mit deutlichem Schwerpunkt zu größeren Transfereffizienzen. Die von Xiao et al. [83] gezeigte getreckte Konformation kann damit nicht bestätigt werden, da hier die erwartete

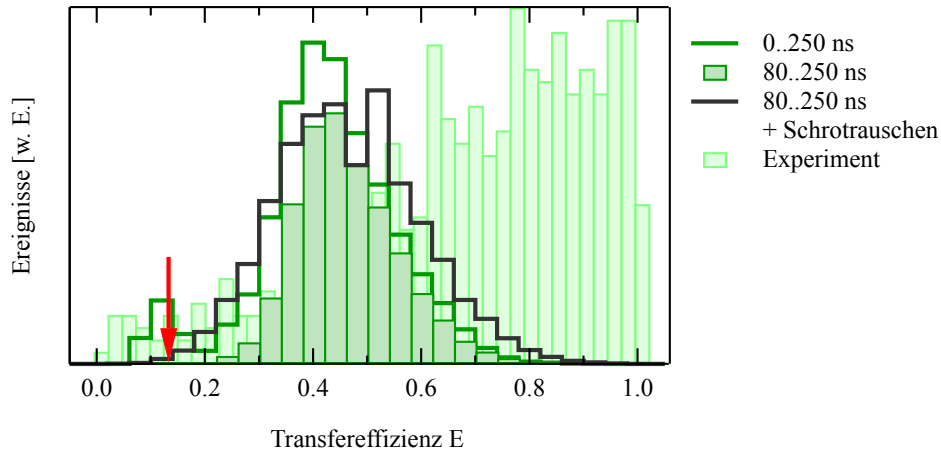


Abb. 7.51: Histogrammierte Transfereffizienzen (grün) für den Försterradius $R_0 = 52 \text{ \AA}$ aus Abb. 7.50. Verbreiterte Verteilung aufgrund der Photonenstatistik (Schrotrauschen) (dunkelgrau). Experimentelle Werte (hellgrau). Mit rotem Pfeil ist die erwartete Transfereffizienz für den Abstand $R = 71,1 \text{ \AA}$ eingezeichnet.

Transfereffizienz deutlich neben den simulierten und experimentellen Werten liegt. Falls die Konformation mit umgeklapptem Arm ebenfalls im Experiment vorliegt, ist eine mögliche Ursache für die abweichende Transfereffizienz die hohe Flexibilität des Arms. Kommen sich die beiden Farbstoffe nur kurzzeitig sehr nah, so hat dies aufgrund von *motional narrowing* zur Folge, dass die dazugehörigen hohen Transfereffizienzen bevorzugt detektiert werden, da der Zeitbereich der Bewegung wesentlich kürzer ist als die Lebensdauer des angeregten Zustands [71]. Freies nsp8 spielt bei den dargestellten experimentellen Werten von $R_0 = 52 \text{ \AA}$ eine untergeordnete Rolle, da hier die über die Säule aufgereinigte Probe dargestellt ist.

Das Ergebnis für den Försterradius von $72 \text{ \AA}$ in Abbildung 7.52 ist sehr ähnlich zu den zuvor gezeigten Daten. Die experimentelle Verteilung der Transfereffizienz zeigt ebenfalls eine deutliche Tendenz zu größeren Werten. Der Effekt des *motional narrowing* ist hier ebenfalls zu beachten. Die zusätzliche starke Population bei niedrigen Transfereffizienzen ist, wie bereits in Kapitel 7.5.3 diskutiert, wahrscheinlich durch das Dimer des freien nsp8 Proteins verursacht. Die Überlagerung dieser Effekte wird in der Simulation nicht berücksichtigt.

Darstellung der Proteinoberfläche

Die Darstellung der Oberfläche des nsp7:nsp8 Komplexes in Abbildung 7.53 soll einen möglichen Interpretationsansatz für den Wechselwirkungsbereich des Komplexes mit RNA liefern. Der Komplex des SARS-CoV bildet eine hexadekamere Ringstruktur mit einem Kanaldurchmesser von $30 \text{ \AA}$. Der innere Bereich des Kanals ist positiv geladen und somit ein möglicher Bindungsbereich für RNA [25]. Im Unterschied dazu bildet FCoV ein Art Greifer. Dieser flexibler Greifarm, dessen Innenseite positiv geladen ist, bietet durchaus einen passenden Bindungsbereich für RNA. Möglichwerweise erklärt dies auch die sehr kompakte Struktur des Komplexes während der Einzelmolekülmessung mit RNA. Ist RNA gebunden, klappt der

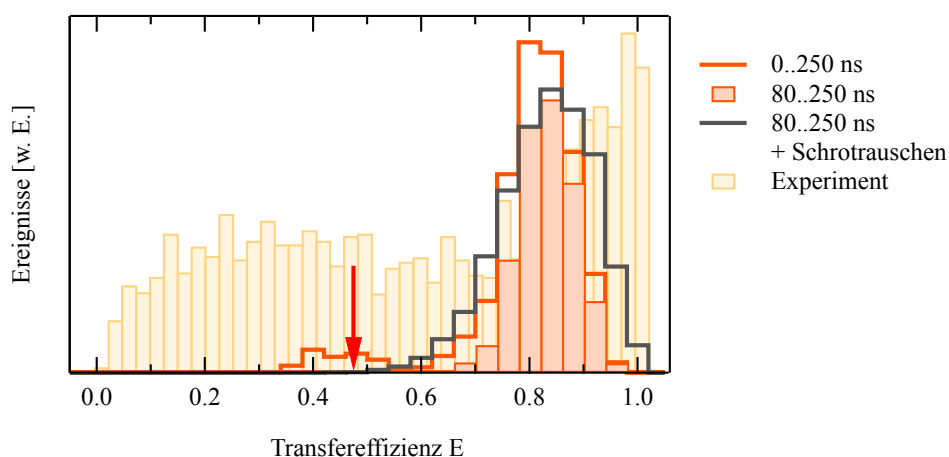


Abb. 7.52: Histogrammierte Transfereffizienzen (rot) für den Försterradius $R_0 = 70 \text{ \AA}$ aus Abb. 7.50. Verbreiterte Verteilung aufgrund der Photonenstatistik (Schrotrauschen) (dunkelgrau). Experimentelle Werte (hellgrau). Mit rotem Pfeil ist die erwartete Transfereffizienz für den Abstand $R = 71,1 \text{ \AA}$ eingezeichnet.

Arm deutlich in Richtung Kopfgruppe. Sobald die kompletten Nukleotide umgesetzt sind, nimmt der Komplex wieder seine Ausgangskonformation ein. Beim freien nsp8 führte der Klappmechanismus zum endgültigen Kollaps des Mittelteils und damit zur experimentell detektierten kompakten Struktur.

Simulationen zur Bindung mit RNA konnten bisher nicht durchgeführt werden und sind als zukünftiges Projekt geplant.

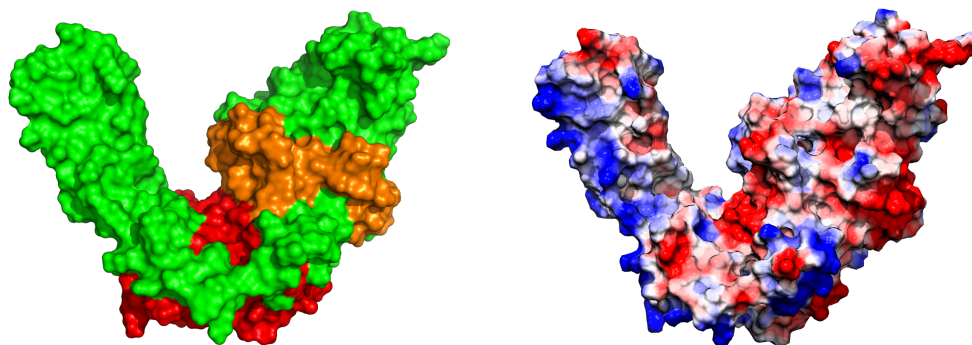


Abb. 7.53: Links: Oberflächendarstellung der Komplexstruktur bei $t = 250 \text{ ns}$. nsp8 (grün), nsp7 (rot und orange). Rechts: Ladungsverteilung auf der Oberfläche von -5 V (rot) bis 5 V (blau).

Vergleich der Simulationstruktur mit den Ergebnissen der Röntgenkleinwinkelstreuung

In Xiao et al. [83] konnte anhand der Analyse mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) bereits gezeigt werden, dass der nsp7:nsp8 Komplex ausschließlich als Heterotrimer vorliegt. Hierfür wurde die ursprüngliche, gestreckte Komplexstruktur aus der Röntgenkristallographie an die SAXS-Daten angepasst. Eine erneute Analyse der Daten mit den Strukturen aus der Simulation zeigt für die eingeklappte Struktur eine geringfügig bessere Anpassung an die SAXS-Daten als die gestreckte Konformation. Die Struktur, welche die beste Übereinstimmung erbrachte, ist im Vergleich mit der Startstruktur $t = 0$ s und der Struktur zum Ende der Simulation bei $t = 250$ ns in Abbildung 7.54 dargestellt. Die Startstruktur entspricht der Kristallstruktur aus Abbildung 7.32. Beim Vergleich ist zu beachten, dass große Strukturen durch die Röntgenkleinwinkelstreuung bevorzugt dargestellt werden und erklärt die mögliche Abweichung von der kompakteren Struktur bei $t = 250$ ns [89, 90].

Die Experimente zur Röntgenkleinwinkelstreuung und die Anpassung an die Simulationsdaten erfolgten durch Dr. Dmitri Svergun am EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, Hamburg).

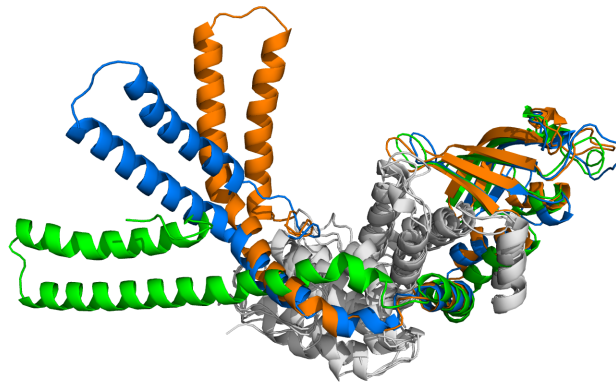


Abb. 7.54: Überlagerung der Strukturen bei $t = 0$ ns (grün), $t = 250$ ns (orange) und die Struktur mit der besten Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Röntgenkleinwinkelstreuung (blau). Die nsp7 Proteine sind jeweils grau dargestellt.

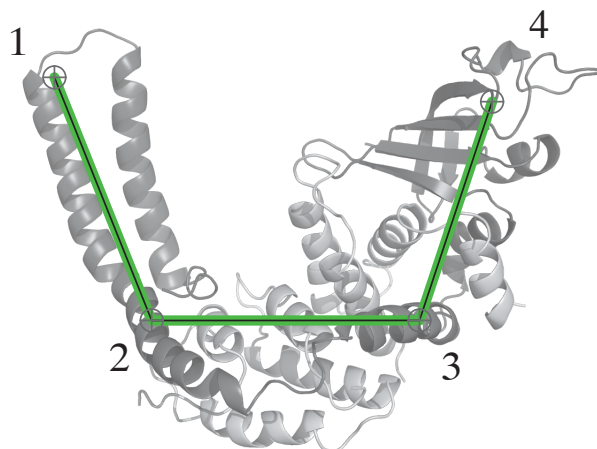
Winkelauswertung

Abb. 7.55: Projektion der Fixpunkte für die Winkelauswertung der Struktur des FCoV-Komplex.

Wie zuvor geschildert, scheint der Arm mit den beiden Alphahelices nach dem Einklappen in einem gewissen Rahmen frei zu fluktuieren. Diese Bewegung ist nach Abbildung 7.46 in einer Art Trichter eingeschränkt. Die Frage ist nun, ob diese Bewegung völlig frei und stochastisch verteilt stattfindet und der Arm dabei um ein lokales Minimum rotiert oder ob verschiedene Konformationen existieren, die bevorzugt eingenommen werden. Möglicherweise existieren offene oder geschlossene Zustände, die einem Nukleotid bindenden oder nicht bindenden Zustand entsprechen. Ein ähnliches Verhalten wurde zum Beispiel für Enzyme beschrieben, die substratbindende oder nichtbindende Zustände annehmen [91]. Um zu erkennen, ob der Arm bestimmte Konformationen bevorzugt, werden ortsbezogene Parameter ausgewertet und gegeneinander dargestellt.

Das Prinzip ist in den Abbildungen 7.55 und 7.56 dargestellt. Es werden vier Punkte im nsp8 Protein definiert, um mit den zwischen den Punkten aufgespannten Vektoren verschiedene Winkel zu definieren. Der Vektor zwischen 1 - 2 entspricht dem Arm mit den beiden Alphahelices, der Vektor zwischen 2 - 3 dem Mittelteil und der Vektor zwischen 3 - 4 der Kopfgruppe. Die Abstände zwischen den Punkten werden ebenfalls ausgewertet. Das Hauptscharnier liegt an Position 2 und entspricht dem Übergang zwischen Domäne 1 und 2 aus der Auswertung des DynDom-Server.

Die definierten Winkel sind der Öffnungswinkel α und der Neigungswinkel δ zwischen Alphahelices und Kopfgruppe. Der Drehwinkel θ (Twist) wird zwischen beiden Alphahelices und dem restlichem Protein definiert.

Die Entwicklung der Abstände zwischen den einzelnen Punkten ist in Abbildung 7.57 dargestellt. Hier wird deutlich, dass die einzelnen Teile, wie Alphahelices, Mittelteil und Kopfteil, stabil ihre Struktur behalten. Dies konnte bereits mittels RMSD gezeigt werden. Der Abstand zwischen Punkt 1 und 4 zeigt, den gleichen Verlauf der Abstandsänderung wie zwischen den farbstoffmarkierten Aminosäuren C42 und C188. Diese sitzen nicht so weit an den äußeren Bereichen des Proteins und zeigen deshalb einen etwas geringeren Abstand.

Die Entwicklung der Winkel ist in Abbildung 7.58 dargestellt. Interessant wird nun

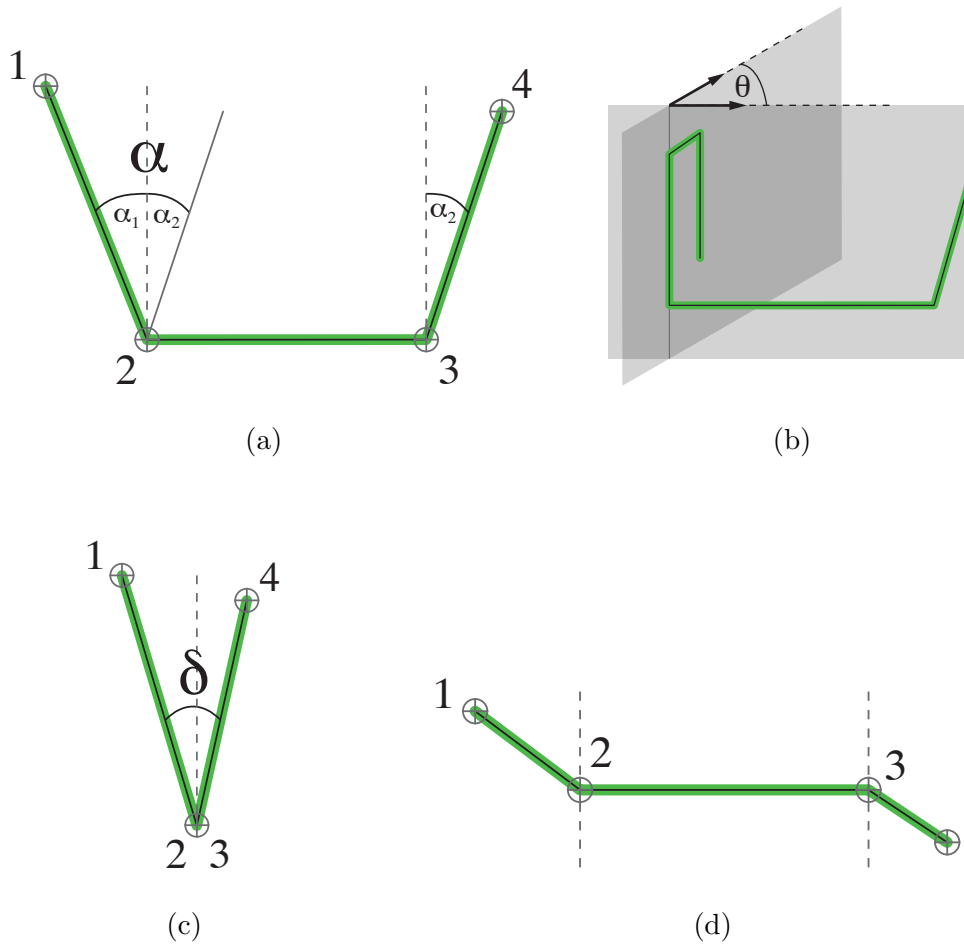


Abb. 7.56: Prinzip der Winkelauswertung. (a) Winkel α - Öffnungswinkel zwischen Alphahelices und Kopfgruppe. (b) Twist θ - Verdrehen der beiden Alphahelices gegenüber der restlichen Struktur. (c) Winkel δ - Neigungswinkel zwischen Alphahelices und Kopfgruppe. (d) Aufsicht von oben.

die Auftragung der Winkel gegeneinander, um festzustellen, ob bestimmte Positionen des Arms (Alphahelices) im Bezug zum restlichen Protein bevorzugt werden. Die Auftragung der verschiedenen Parameter gegeneinander ist in den Abbildungen 7.59 und 7.60 dargestellt. Die Farbskala kodiert die Häufigkeit der Ereignisse. Jedes Ereignis entspricht einer Position des Arms. Hierfür wurde alle 4 ps eine Struktur des Komplexes ausgelesen. Da ausschließlich die Fluktuationen im eingeklappten Zustand untersucht werden sollen, sind nur die Ereignisse ab 80 ns Simulationszeit dargestellt. Einzige Ausnahme bildet Abbildung 7.59 (d) mit der kompletten Simulationszeit von 0 bis 250 ns.

Im Vergleich zeigen alle Kombinationen jeweils nur ein Maximum. Es existiert somit nur eine privilegierte Struktur. Die Bewegungen des Arms sind völlig frei und stochastisch um dieses Maximum verteilt. Ein hin- und herschalten zwischen verschiedenen Konformationen ist nicht zu beobachten. Im Detail ist, wie erwartet, der lineare Zusammenhang zwischen Abstand 1 - 4 und dem Winkel α zu beobachten, da beide Parameter das Öffnen und Schließen von Alphahelices und Kopfteil beschreiben. Zudem ist die scharfe Begrenzung in der Abhängigkeit von α und δ auffällig. Die

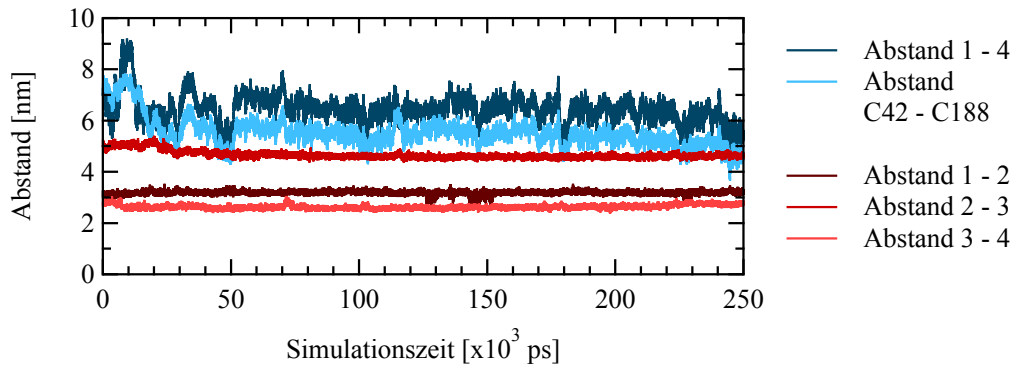


Abb. 7.57: Abstände zwischen den Punkten 1 bis 4 im Vergleich zum FRET-Abstand C42-C188 in Abhängigkeit der Simulationszeit.

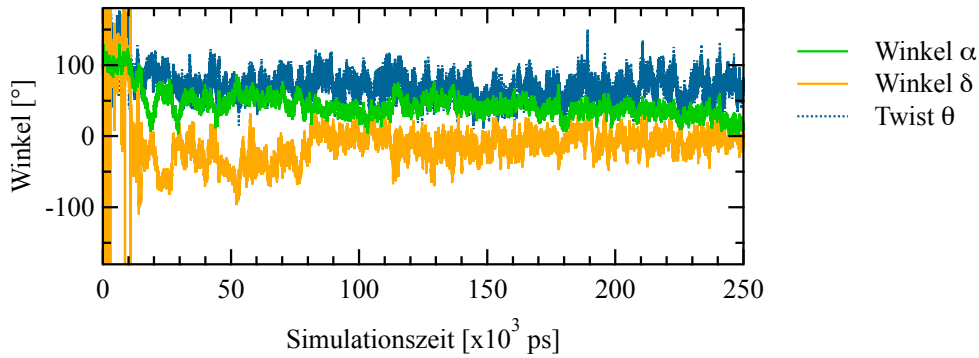


Abb. 7.58: Winkel α , δ und θ in Abhängigkeit der Simulationszeit.

Annäherung der Alphahelices an die Kopfgruppe ist durch scharfe Grenzen limitiert. Die Darstellung über die komplette Simulationszeit in Abbildung 7.59 (d) zeigt den Vorgang des Umlappens, von der gestreckten zur eingeklappten, kompakten Struktur. Die gestreckte Konformation ist als blasser Population am rechten unteren Rand zu erkennen. Es ist kein kontinuierlicher Übergang von der gestreckten zur eingeklappten Struktur zu erkennen. Zwischenstufen werden nur sehr schwach detektiert. Der Übergang erfolgt innerhalb der betrachteten Zeitskala sehr schnell.

Die Verdrehung θ (Twist) zeigt ebenfalls keine Korrelation mit den anderen Parametern. Der Arm mit den beiden Alphahelices bewegt sich absolut frei und wird nur durch die Nähe zum restlichen Protein in seiner Bewegung eingeschränkt.

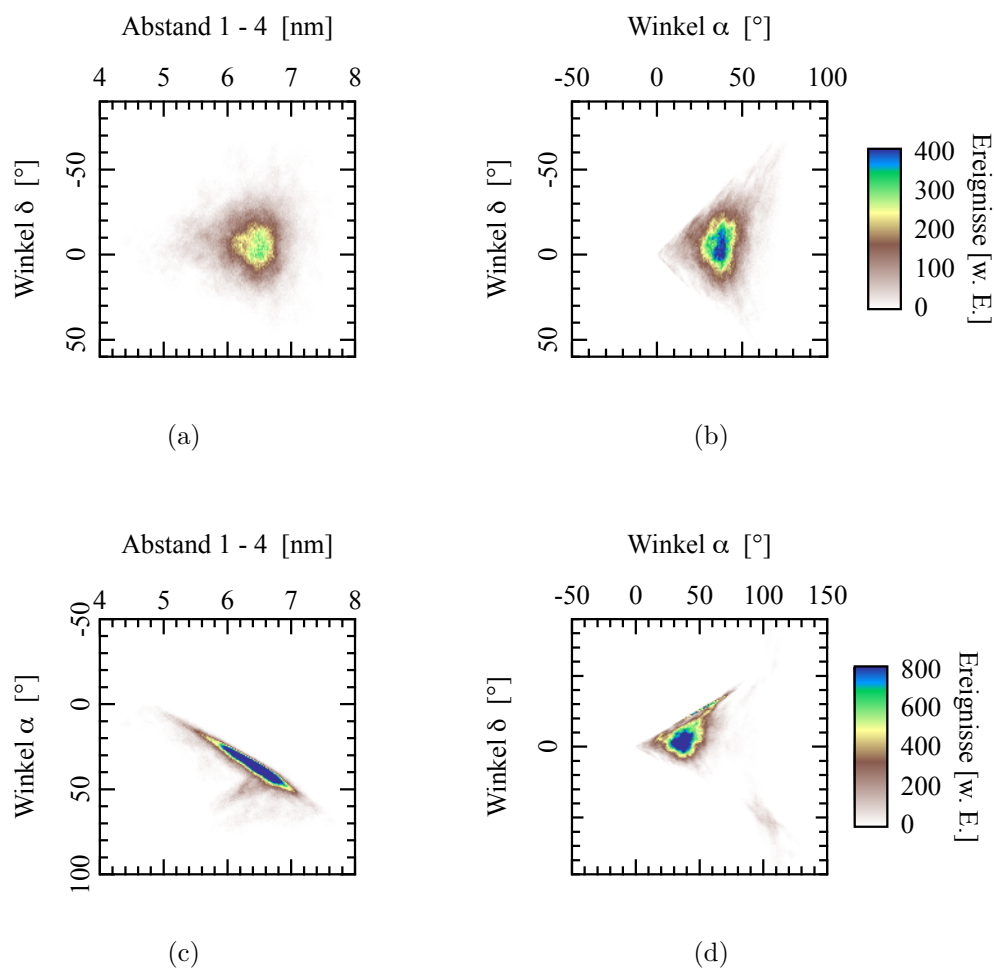


Abb. 7.59: Zweidimensionale Auftragung der Parameter: (a) Winkel δ gegen Abstand 1 - 4, (b) Winkel δ gegen Winkel α und (c) Winkel α gegen Abstand 1 - 4 für die Simulationszeit von 80 bis 250 ns. (d) Winkel δ gegen Winkel α für die komplette Simulationszeit von 0 bis 250 ns.

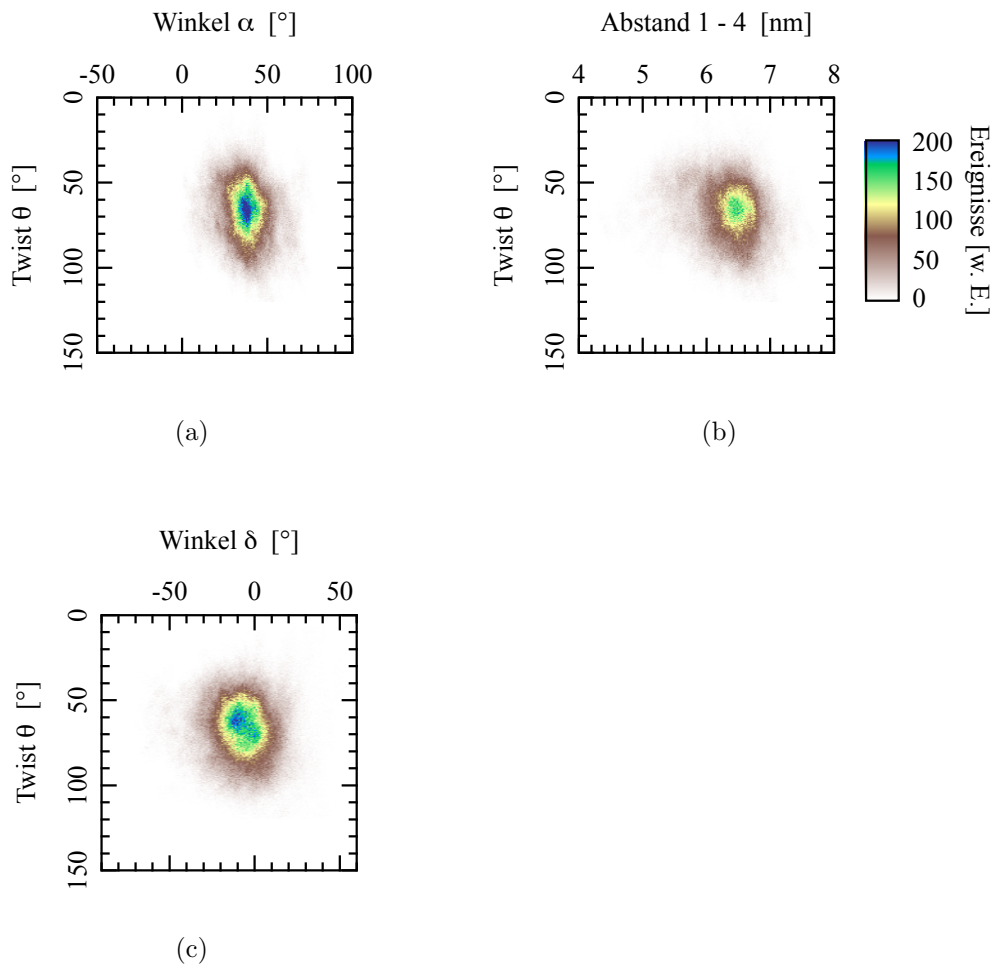


Abb. 7.60: Zweidimensionale Auftragung der Parameter: (a) Winkel θ gegen Winkel α , (b) Winkel θ gegen Abstand 1 - 4 und (c) Winkel θ gegen Winkel δ für die Simulationszeit von 80 bis 250 ns.

Zusammenfassung und Diskussion

Für die Komplexstruktur ist festzustellen, dass die beiden nsp7 Proteine eine stabilisierende Funktion einnehmen. Der Mittelteil bleibt, im Gegensatz zum isolierten nsp8, im Komplex konserviert. Als einzige strukturelle Änderung ist das Einklappen des Arms zu beobachten. Der Komplex nimmt dadurch eine kompaktere Struktur ein und der Abstand zwischen den beiden farbstoffmarkierten Aminosäuren C42 und C188 ist wesentlich geringer. Dies führt zu deutlich größeren Transfereffizienzen, wie sie ebenfalls bereits experimentell bestimmt wurden. Die Auswertung mit Hilfe der Domänenanalyse liefert, wie erwartet, zwei Bereiche: Einerseits den flexiblen Arm mit den beiden Alphahelices und andererseits den restlichen Teil, bestehend aus Mittelteil und Kopfgruppe, welcher durch die beiden nsp7 Proteine stabilisiert wird. Bei der Untersuchung der Raumwinkel in Hinblick auf die Beweglichkeit des Arms konnten innerhalb der betrachteten Zeitskala keine bevorzugten Konformationen festgestellt werden. So bewegt sich der Arm nach dem Einklappen innerhalb eines Trichters völlig frei verteilt um ein Maximum. Die Bewegung wird lediglich durch die Nähe zur Kopfgruppe eingeschränkt. Hier existieren scharfe Grenzen. Ein Zurückklappen zur gestreckten Konformation wird innerhalb der Simulationszeit nicht beobachtet.

7.9 Zusammenfassung und Diskussion

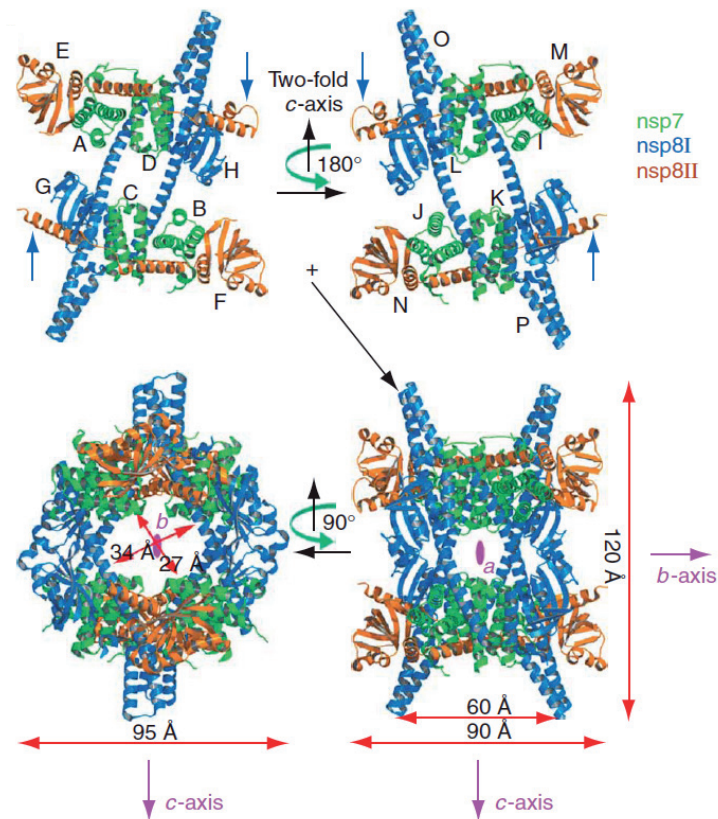


Abb. 7.61: Hexadekamere Komplexstruktur von nsp7:nsp8 des SARS Virus. Grün: nsp7, blau: nsp8I und orange: nsp8II. Abbildung entnommen aus Zhai et al. [25].

Den Ausgangspunkt für die Arbeit bildete der zylindrische hexadekamere nsp7:nsp8 Komplex des SARS-CoV [25]. Dieser besteht aus acht nsp7 und acht nsp8 Proteinen, die ringförmig zueinander angeordnet sind. Die Struktur ist in Abbildung 7.61 dargestellt. Die vermutete RNA-Bindungsstelle liegt innerhalb des positiv geladenen Kanals [25]. Für SARS-nsp8, isoliert und im Komplex mit nsp7, wurde eine Oligonukleotid synthetisierende Aktivität nachgewiesen [29, 25]. Nsp7 scheint nur eine stabilisierende Wirkung bei der Ausbildung des Komplexes einzunehmen. Im Komplex werden eine nsp7 und zwei verschiedene nsp8 Konformationen ausgebildet. Nsp8 bildet jeweils zwei lange golfschlägerartige Strukturen, die sich nur durch einen zusätzlichen Knick in der gestreckten Alphahelix unterscheiden (Abbildung 7.2). Die Struktur der isolierten Einzelproteine und die Stöchiometrie des Komplexes in-vivo sind nicht bekannt. Deshalb ist es wichtig, weitere nsp7:nsp8 Komplexe verschiedener Coronaviren zu untersuchen, um einen weiteren Einblick in den molekularen Mechanismus der RNA-Synthese durch nsp8 und seinen Komplex mit nsp7 zu gewinnen. Außerdem muss der Frage nachgegangen werden, ob die komplizierte hexadekamere Struktur für weitere Coronaviren universell ist. Eine erste Motivation war der Nachweis mittels dynamischer Lichtstreuung, dass die Partikeldurchmesser des nsp8 Proteins von FCoV (*Feline Coronavirus*) und HCoV-229E (*Humaner Co-*

ronavirus) nach Zugabe von nsp7 abnehmen [82], weshalb eine große hexadecamere Struktur hier unwahrscheinlich erscheint.

Die weiterführenden Untersuchungen erfolgen mit den nsp7 und nsp8 Proteinen des FCoV. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Charakterisierung des nsp8 Proteins. Dies ist für die Einzelmolekülmessungen perfekt geeignet, da ohne zusätzliche Mutationen zwei günstig liegende Cysteine für die Farbstoffmarkierung zur Verfügung stehen. Parallel zu den ersten Einzelmoleküluntersuchungen erfolgte die Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung des Komplexes.

Anhand der Entfaltungsreihe kann für nsp8 eindeutig nachgewiesen werden, dass nsp8 nicht komplett entfaltet vorliegt, sondern in Lösung bereits vorstrukturiert ist. Die Struktur ist dabei wesentlich kompakter, als die bekannte Golfschlägerstruktur des SARS-CoV. Außerdem ist nsp8 als Dimer organisiert. Dies konnte mittels Größenausschlusschromatographie zusätzlich bestätigt werden [83]. Die ersten Ergebnisse für den nsp7:nsp8 Komplex gaben ebenfalls einen Hinweis auf eine wesentlich kompaktere Struktur von nsp8 im Komplex. Die Ergebnisse deuten auf eine ähnliche Struktur des freien und komplexierten nsp8 Proteins hin. Außerdem hat es den Anschein, dass die Stöchiometrie des Komplexes mit deutlich weniger beteiligten Proteinen wesentlich einfacher ausfällt. Der Prozess der Komplexbildung erfolgt dabei relativ schnell. Die Komplexbildung lässt sich jedoch mit der möglichen Zeitauflösung der Einzelmoleküluntersuchungen nicht verfolgen. Im Unterschied dazu dissoziieren die nsp8 Dimere nach der Komplexbildung und Anlagerung von nsp7 relativ langsam.

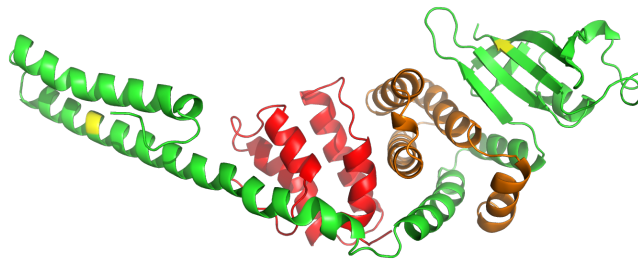


Abb. 7.62: Kristallstruktur des nsp7:nsp8 Komplexes des FCoV (pdb-Schlüssel: 3UB0). nsp7I (orange), nsp7II (rot) und nsp8 (grün). Gelb markiert sind die beiden Cysteine für die Farbstoffmarkierung.

Die Veröffentlichung der Strukturdaten des nsp7:nsp8 Komplexes des FCoV durch Xiao et al. [83], bietet nun eine gute Möglichkeit die Einzelmoleküldaten weiterführend zu interpretieren. Zum Proteinkomplex des SARS-CoV ist ein deutlicher Unterschied festzustellen. Die Vermutung, dass der Komplex eine deutlich einfachere Struktur zeigt, konnte bestätigt werden. Der Komplex des FCoV ist, wie in Abbildung 7.62 dargestellt, als Heterotrimer organisiert. Ein nsp8 und zwei nsp7 Proteine bilden den Komplex. Die Tertiärstrukturen der Einzelproteine zeigen trotzdem eine gute Übereinstimmung mit den Strukturdaten der Einzelproteine des SARS-CoV [83]. Im Gegensatz dazu weicht die Zusammensetzung im Komplex von der Komplexstruktur des SARS-CoV deutlich ab. Die beiden nsp7 Proteine sind gegenüber SARS-CoV gut konserviert. Nsp8 ist im Kopfbereich gut konserviert, knickt jedoch im Bereich des langgestreckten Arms stärker ab. Eine Überlagerung der Strukturen ist in Kapitel 7.7 dargestellt. Die Struktur des FCoV-nsp8 wird deshalb mit einer Pistole verglichen [83]. Trotzdem korrelieren die Abstände aus der Kristallstruktur

nicht mit den abgeschätzten Abständen der Einzelmolekülmessungen. Die Kristallstruktur ergibt aufgrund der langgestreckten Alphahelices immer noch einen großen Abstand von $R = 71,1 \text{ \AA}$ zwischen den beiden Farbstoffpositionen. Die Ergebnisse der Einzelmoleküluntersuchung zeigen hingegen Abstände zwischen ca. 33 und 54 $\text{\AA}$. Der nächste Ansatz war, anhand der bekannten Kristallstruktur das Verhalten des Komplexes mittels molekulardynamischer Simulationen abzuschätzen und hierdurch die Einzelmoleküldaten besser validieren zu können.

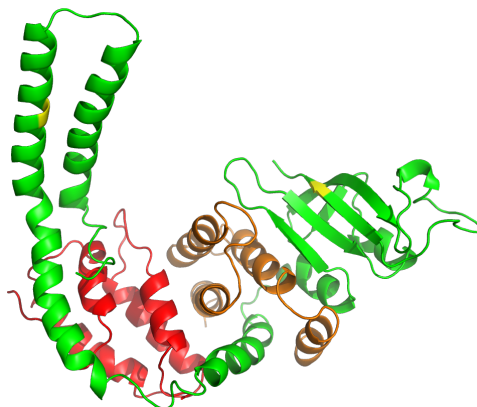


Abb. 7.63: Struktur des nsp7:nsp8 Komplexes des FCoV nach 250 ns Simulationszeit. nsp7I (orange), nsp7II (rot) und nsp8 (grün).

Im Verlauf der Simulation zeigt die Komplexstruktur eine deutliche Konformationsänderung. In Abbildung 7.63 ist die Struktur nach einer Simulationszeit von 250 ns dargestellt. Im Vergleich zur Startstruktur aus Abbildung 7.62 ist der eingeklappte Arm der beiden Alphahelices klar zu erkennen. Die eingeklappte Konformation wird ebenfalls durch die Daten der Röntgenkleinwinkelstreuung bestätigt. Die Kurvenanpassung mit der simulierten Struktur zeigt eine bessere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten als die gestreckte Struktur der Röntgenkristallographie aus Abbildung 7.62. Die Einzelmoleküldaten unterstützen die simulierten Daten ebenfalls. Die kompaktere Struktur mit den wesentlich dichter beieinander liegenden Farbstoffpositionen korreliert gut mit den experimentell ermittelten, hohen Transfereffizienzen. Auch die große Flexibilität, die aufgrund der breiten Verteilung der Transfereffizienz postuliert wurde, kann bestätigt werden. Im Verlauf der Simulation konnte auch gezeigt werden, dass innerhalb der Simulationszeit, die Struktur nicht in ihre Ausgangsposition zurück klappt. Die Struktur scheint die energetisch günstigste Konformation gefunden zu haben. Wird die Position des Armes verfolgt, ist deutlich zu erkennen, dass dieser zwar hoch flexibel ist, jedoch im Mittel nur um eine Position rotiert.

In Bezug zur RNA-Interaktion scheint der flexible Arm eine wichtige Rolle zu spielen. Die Einzelmoleküldaten zeigen bei Zugabe von kurzen Nukleotidsträngen zum Komplex eine deutliche Strukturänderung in Richtung einer noch kompakteren Struktur. Der Arm klappt deutlich in Richtung Kopfgruppe. Die positive Ladung an der Innenseite des Arms lässt darauf schließen, dass die Nukleotide im Zwischenraum von Arm und Kopfgruppe mit dem Komplex interagieren. Der flexible Arm fungiert hier als Greifer und umschließt die Nukleotide.

Die Simulation des freien, isolierten nsp8 Proteins ergibt nach 100 ns Simulationszeit

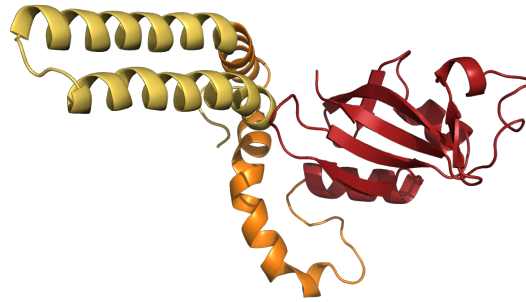


Abb. 7.64: Struktur des isolierten nsp8 Proteins des FCoV nach 100 ns Simulationszeit (Simulation 1). Farbkodierung: gelb - Alphahelices (Prolin 2 .. Serin 54), orange - Mittelteil (Valin 55 .. Methionin 100), rot - Kopfgruppe (Serin 101 .. Threonin 191).

ebenfalls eine sehr kompakte Struktur. Der Unterschied zum Komplex liegt hier im Kollaps des Mittelteils. Während im Komplex die beiden nsp7 Proteine zur Stabilisierung des Mittelteils beitragen und nur der einklappende Arm zur Verdichtung der Struktur führt, entfaltet sich der Mittelteil beim freien nsp8. Insgesamt wurden fünf verschiedene Simulationen mit jeweils der selben Startstruktur durchgeführt. Ein Beispiel ist in Abbildung 7.64 dargestellt. Die Bereiche des Arms mit den beiden Alphahelices und die Kopfgruppe bleiben in allen Fällen konserviert. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Einzelmolekülexperimente zeigt ebenfalls eine gute Korrelation. So kann die kompakte Struktur von nsp8 bestätigt werden. Die Entfaltung von nsp8 mittels GdmCl belegt in gleicher Weise, dass das isolierte Protein zumindest teilweise strukturiert und als Zufallsknäuel (*random coil*) vorliegt.

Die Experimente zur RNA-Interaktion zeigten für das freie nsp8 Protein einen etwas anderen Verlauf als für den Komplex. Eine schnelle, strukturelle Änderung direkt nach RNA-Zugabe lässt sich hier ebenfalls wie beim Komplex beobachten. Jedoch zeigt die finale Struktur nach Abbau der Nukleotide ein anderes Verhalten. Das Protein kehrt nicht zur ursprünglichen Struktur zurück, sondern kollabiert. Eine Entfaltung des Proteins kann aber ausgeschlossen werden, da in diesem Fall ein anderer Abstand erwartet wird. Da davon auszugehen ist, dass der Mittelteil bereits entfaltet ist, führt die Wechselwirkung des Proteins mit den Nukleotiden zum Aneinanderlagern von Alphahelices und Kopfgruppe. Der Komplex, dessen Mittelteil durch die beiden nsp7 Proteine stabilisiert wird, kehrt zur Ausgangsstruktur zurück. Das freie nsp8 Protein behält die kollabierte Struktur bei.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Kombination verschiedener Methoden für das detaillierte Verständnis der Struktur und Funktion von Proteinen ist. Anhand der Röntgenkristallographie lassen sich detaillierte Tertiär- und Quartärstrukturen bestimmen. Diese können jedoch aufgrund der Packung im Kristall von der Struktur in Lösung abweichen. Die Einzelmolekülspektroskopie bietet mit FRET die Möglichkeit zeitaufgelöst Abstände und Strukturänderungen des Proteins in Lösung zu detektieren. Vor allem die Wechselwirkung zwischen verschiedenen Bindungspartnern kann durch FRET anschaulich dargestellt werden. Auch können Informationen über verschiedene Konformationen des Proteins gewonnen werden, die aufgrund der Mittelung über das Ensemble bei anderen Methoden verloren gehen. Die Interpretation der Daten in Bezug auf die Tertiär- und Quartärstruktur ist meist

nur möglich, wenn zusätzliche Strukturinformationen bereits bekannt sind. Zeigen die Ergebnisse beider Methoden große Differenzen, bietet die molekulardynamische Simulation die Möglichkeit, ausgehend von bekannten Strukturen, verschiedene Szenarien theoretisch durchzuspielen und mit den experimentellen Ergebnissen zu vergleichen.

Zukünftige Arbeiten betreffen vor allem die Fortführung der Simulationen. So soll die Interaktion der RNA mit nsp8 simuliert werden, um so mögliche Bindungsstellen der Nukleotide mit dem freien und komplexierten nsp8 zu charakterisieren. Ebenso soll die Simulation der Dimere weitergeführt werden, da bisher die Einzelmolekülstrukturen nicht ins letzte Detail verstanden sind. Die Schwierigkeit besteht darin eine mögliche Startstruktur zu finden, da es bisher nicht möglich war, die isolierten nsp8 Proteine zu kristallisieren. Die Einzelmoleküluntersuchungen sollten ebenfalls mit nsp7:nsp8 Komplexen weiterer Coronaviren, wie dem HCoV-229E (*Humaner Coronavirus*), fortgeführt werden. Das Ziel ist hierbei ein mögliches universelles Verhalten der nsp7:nsp8 Komplexstrukturen verschiedener Coronaviren zu identifizieren.

8 Zusammenfassung

Ausgehend von bekannten Strukturen konnte für die untersuchten System ein umfassendes strukturellogisches Bild erstellt werden. Die Kombination von Einzelmoleküluntersuchungen mit Strukturdaten der Röntgenkristallographie, CD-spektroskopischen Untersuchungen und Röntgenkleinwinkelstreuung ergab ein detailliertes Bild des jeweiligen Systems, das innerhalb der Grenzen der konventionellen Methoden nicht erreicht worden wäre.

Neben der Charakterisierung der Komplexstrukturen sind vor allem die Ergebnisse der beiden unkomplexierten Proteine *ESAT-6* und *nsp8* hervorzuheben. Das Modell der *Intrinsically Disordered Proteins* konnte für diese beiden Proteine bestätigt werden. Obwohl beide aus völlig verschiedenen Proteinkomplexen stammen, zeigen sie ein ähnliches Strukturverhalten. Abhängig von den äußeren Bedingungen existieren für beide ein entfalteter Zustand, ein teilstrukturierter *Molten Globule* Zustand und ein gefalteter Zustand. Der komplett gefaltete Zustand stellt sich erst in Kombination mit dem jeweiligen Bindungspartner im Komplex ein. Dieser ist jedoch nicht zwingend notwendig, um eine Funktion auszuführen. Dies konnte in früheren Arbeiten für *nsp8* gezeigt werden, das ohne Bindung mit *nsp7* bereits RNA-synthetisierende Aktivität zeigt [29, 83].

Im Folgenden sind die Ergebnisse der beiden Proteinkomplexe *ESAT-6/CFP-10* des *Mycobacterium tuberculosis* und *nsp7:nsp8* des *Felinen Coronavirus* kurz zusammengefasst. Die detaillierten Zusammenfassungen befindet sich jeweils am Ende der Kapitel 6 und 7.

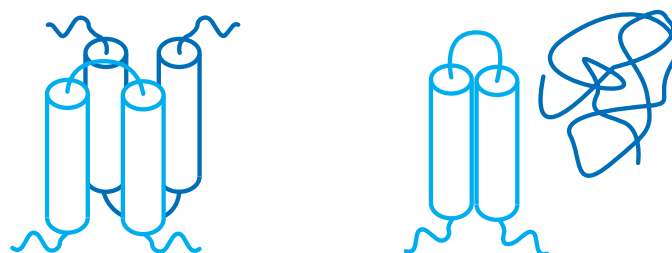


Abb. 8.1: *ESAT-6* (hellblau) und *CFP-10* (dunkelblau). Links: Komplexstruktur von *ESAT-6/CFP-10*. Rechts: Struktur von *ESAT-6* nach hydrophobem Kollaps, *CFP-10* liegt unstrukturiert als *random coil* vor.

In Kombination mit den umfangreichen strukturellogischen Untersuchungen, wie NMR-Spektroskopie, Röntgenkristallographie, Ensemble-FRET und CD-Spektroskopie, konnten anhand der Einzelmoleküluntersuchungen zahlreiche neue Erkenntnisse für *ESAT-6/CFP-10* gewonnen werden. Die Temperaturentfaltungsreihe von *ESAT-6/CFP-10* zeigte eine Dissoziationstemperatur von 35 °C. Im Gegensatz dazu wurde die Schmelztemperatur durch die CD-Spektroskopie mit $T_{melt} = 46$ °C bestimmt. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu den Einzelmoleküldaten, da

die CD-Daten nur die Sekundärstruktur des Proteins zeigen. Wie mittels weiterer Einzelmoleküluntersuchungen nachgewiesen wurde, löst sich die Sekundärstruktur von *ESAT-6* erst bei höheren Temperaturen um 45 °C. Die Dissoziation erfolgt jedoch bereits bei 35 °C.

Für *ESAT-6* konnten außerdem zwei verschiedene strukturierte Zustände nachgewiesen werden: Eine Struktur, die in der Lage ist, mit *CFP-10* zu komplexieren und die typische 4-helikale Struktur auszubilden, und eine weitere Struktur, die aufgrund eines hydrophoben Kollaps der Alphahelices nicht in der Lage ist, mit *CFP-10* eine Bindung einzugehen.

Zusätzliche Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die Komplexe ohne temperaturinduzierte Dissoziation nicht in der Lage sind untereinander auszutauschen.

Die temperaturabhängige Entfaltungsreihe des WXG-100 Analogs *sagEsxA*, welches ebenfalls ein 4-helikales Bündel bildet, zeigte einen identischen Verlauf zu *ESAT-6/CFP-10*. Dies ist ein weiterer Hinweis für das universelle strukturelle Verhalten der verschiedenen WXG-100 Proteinkomplexe.

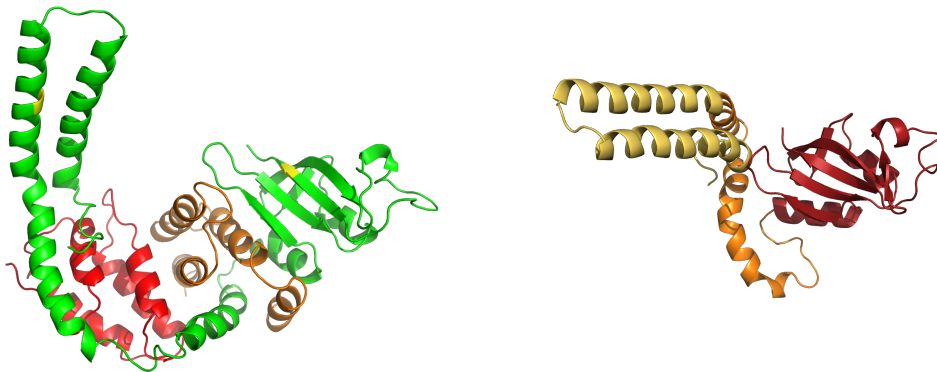


Abb. 8.2: Links: Struktur des nsp7:nsp8 Komplexes des FCoV nach 250 ns Simulationszeit. nsp7I (orange), nsp7II (rot) und nsp8 (grün). Rechts: Eine mögliche Struktur des isolierten nsp8 Proteins des FCoV nach 100 ns Simulationszeit. Alphahelices (gelb), Mittelteil (orange), Kopfgruppe (rot).

Der Proteinkomplex nsp7:nsp8 spielt im Replikations- und Transkriptionsprozess der Coronaviren eine wichtige Rolle [24]. Durch die Kombination aus Strukturdaten der Röntgenkristallographie, Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie und molekulardynamische Simulationen sollte ein tieferer Einblick und ein besseres Verständnis der Rolle von nsp7 und nsp8 im Bezug zur RNA-Synthese erreicht werden. So konnte anhand der Kristallstruktur für den FCoV-Komplex eine heterotrimere Struktur, bestehend aus zwei nsp7 und einem nsp8 Protein, nachgewiesen werden [83]. Die Tertiärstruktur der Einzelproteine zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Struktur der nsp7 und nsp8 Proteine des SARS-Coronavirus [83]. Im Widerspruch dazu steht die wesentlich aufwendiger hexadecamere Komplexstruktur des SARS-CoV [25].

Anhand der bekannten Kristallstruktur wurden mittels Einzelmolekülexperimenten und MD-Simulationen die Struktur des nsp7:nsp8 Komplexes und des isolierten nsp8 Proteins in Lösung untersucht. Hierdurch konnte für den Komplex eine Struktur verifiziert werden, die gegenüber der Kristallstruktur eine deutlich kompaktere Konformation zeigt. Es wurde statt des gestreckten Arms des nsp8 Proteins ein sehr

flexibler, angewinkelter Arm der beiden Alphahelices im Komplex bestimmt. Die Interaktion des Komplexes mit RNA konnte ebenfalls nachgewiesen werden und führte zu einer deutlich kompakteren Struktur. Dieses scheinbare Greifen des Arms ist nach Abbau der Nukleotide reversibel und die Struktur relaxiert in ihre Ausgangskonformation.

Für das isolierte nsp8 Protein konnte ebenfalls eine sehr kompakte Struktur ermittelt werden. Im Unterschied zum Komplex fehlt die stabilisierende Wirkung der nsp7 Proteine, was in Konsequenz zum Kollaps des alphahelikalen Mittelteils führt. Das Einzelprotein entfaltet aber nicht komplett, so sind weiterhin Teile des Proteins strukturiert. Der Arm mit den beiden Alphahelices und der Kopfgruppe bleibt gegenüber dem Komplex konserviert. Die Interaktion mit RNA konnte für das isolierte nsp8 Protein ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Relaxation zur Ausgangskonformation nach dem Abbau der Nukleotide konnte hier nicht nachgewiesen werden, da das Protein aufgrund des unstrukturierten Mittelteils scheinbar komplett kollabiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das isolierte nsp8 in Lösung Dimere ausbildet.

Literaturverzeichnis

- [1] D. P. Herten and M. Sauer. Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie – Analytik an der ultimativen Grenze der Empfindlichkeit. *Bunsenberichte*, 1:5–16, 2003.
- [2] T. Hirschfeld. Optical microscopic observation of single small molecules. *Appl. Opt.*, 15(12):2965–2966, Dec 1976.
- [3] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, and S. A. Soper. Detection of single fluorescent molecules. *Chemical Physics Letters*, 174(6):553 – 557, 1990.
- [4] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8):3597–3619, Aug 2003.
- [5] L. Stryer and R. P. Haugland. Energy transfer - a spectroscopic ruler. *PNAS*, 58(2):719ff, 1967.
- [6] B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, and W. A. Eaton. Polyproline and the spectroscopic ruler revisited with single-molecule fluorescence. *PNAS*, 102(8):2754–2759, Feb 2005.
- [7] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2(1-2):55–75, 1948.
- [8] G. Haran. Single-molecule fluorescence spectroscopy of biomolecular folding. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 15(32):R1291, 2003.
- [9] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, and S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *PNAS*, 93(13):6264–6268, Jun 1996.
- [10] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, and P. G. Schultz. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *PNAS*, 96(7):3670–3675, 1999.
- [11] E. L. Elson and D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1):1–27, 1974.
- [12] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers*, 13(1):29–61, 1974.
- [13] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*, 22:169–175, 1993.

- [14] R. H. Webb. Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59(3):427, 1996.
- [15] T. Torres and M. Levitus. Measuring Conformational Dynamics: A New FCS-FRET Approach. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(25):7392–7400, June 2007.
- [16] Martin Karplus and J. Andrew McCammon. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9(9):646–652, September 2002.
- [17] J. A. McCammon, B. R. Gelin, and M. Karplus. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267, 1977.
- [18] E. Apol et al. *GROMACS 4.5.4*. www.gromacs.org, 2010.
- [19] J. L. Klepeis, K. Lindorff-Larsen, R. O. Dror, and D. E. Shaw. Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(2):120 – 127, 2009.
- [20] B. Schuler. Single-molecule fluorescence spectroscopy of protein folding. *ChemPhysChem*, 6(7):1206–1220, Jul 2005.
- [21] X. Michalet, S. Weiss, and M. Jäger. Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics. *Chemical Reviews*, 106(5):1785–1813, May 2006.
- [22] P. Brodin, M. I. de Jonge, L. Majlessi, C. Leclerc, M. Nilges, S. T. Cole, and R. Brosch. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant t-cell antigen of mycobacterium tuberculosis, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40):33953–33959, 2005.
- [23] C. Poulsen. *CFP-10/ESAT-6 complex and WXG100 proteins: Type VII and VIIb secretion systems*. PhD thesis, University of Aarhus, Denmark, July 2009.
- [24] S. G. Sawicki, D. L. Sawicki, and S. G. Siddell. A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of Virology*, 81(1):20–29, Jan 2007.
- [25] Y. J. Zhai, F. Sun, X. M. Li, H. Pang, X. L. Xu, M. Bartlam, and Z. H. Rao. Insights into sars-cov transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(11):980–986, Nov 2005.
- [26] Margaret A. Johnson, Kristaps Jaudzems, and Kurt Wuethrich. NMR Structure of the SARS-CoV Nonstructural Protein 7 in Solution at pH 6.5. *Journal of Molecular Biology*, 402(4):619–628, OCT 1 2010.
- [27] C. B. Anfinsen. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096):223–230, 1973.
- [28] A. K. Dunker, J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S.

- Nissen, R. Reeves, C. H. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner, and Z. Obradovic. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 19:26 – 59, 2001.
- [29] I. Imbert, J.-C. Guillemot, J.-M. Bourhis, C. Bussetta, B. Coutard, M.-P. Egloff, F. Ferron, A. E. Gorbalenya, and B. Canard. A second, non-canonical rna-dependent rna polymerase in sars coronavirus. *EMBO Journal*, 25(20):4933–4942, Oct 2006.
- [30] J. R. Lakowicz and B. R. Masters. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, third edition, 2008.
- [31] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society*, (9):14–19, 1950.
- [32] R. Winter and F. Noll. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner-Studienbücher: Chemie, Stuttgart, 1998.
- [33] S. Doose, H. Neuweiler, and M. Sauer. A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *ChemPhysChem*, 6(11):2277–2285, 2005.
- [34] M. Berberan-Santos and M. J. E. Prieto. Monte carlo simulation of orientational effects on direct energy transfer. *Journal of Chemical Physics*, 88(10):6341–6349, 1988.
- [35] M. Minsky. Microscopy aparatus, 1961.
- [36] M. Prummer and C.G. Hübner. *Single-Molecule Fluorescence: Biophysics*. 2009.
- [37] I. Gopich and A. Szabo. Theory of photon statistics in single-molecule förster resonance energy transfer. *Journal of Chemical Physics*, 122(1):14707, 2005.
- [38] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708, September 1972.
- [39] Jerker Widengren, Rudolf Rigler, and Ülo Mets. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 4:255–258, 1994. 10.1007/BF01878460.
- [40] Y. Santoso, Catherine M. Joyce, O. Potapova, L. Le Reste, J. Hohlbein, J. P. Torella, N. D. F. Grindley, and A. N. Kapanidis. Conformational transitions in DNA polymerase I revealed by single-molecule FRET. *PNAS*, 107(2):715–720, January 2010.
- [41] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat, and S. Weiss. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *PNAS*, 101(24):8936–8941, 2004.
- [42] B. K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle, and D. C. Lamb. Pulsed interleaved excitation. *Biophysical Journal*, 89(5):3508 – 3522, 2005.

- [43] C. Eggeling, A. Volkmer, and C. A. M. Seidel. Molecular photobleaching kinetics of rhodamine 6g by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy. *ChemPhysChem*, 6(5):791–804, 2005.
- [44] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91:43–56, 1995.
- [45] www.pymol.org.
- [46] J. Neumann. *Molecular dynamics simulations of protein-protein interactions and THz driving of molecular rotors on gold*. PhD thesis, LMU München, 2011.
- [47] M. Born and R. Oppenheimer. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*, 389(20):457–484, 1927.
- [48] W. Nolting. *Grundkurs Theoretische Physik 5/1: Quantenmechanik - Grundlagen*. Springer Verlag, 2009.
- [49] F. Schwabl. *Quantenmechanik: Eine Einführung*. Springer Verlag, 2007.
- [50] F. Schwabl. *Quantenmechanik für Fortgeschrittene*. Springer Verlag, 2008.
- [51] P. Ehrenfest. Bemerkung über die angenäherte Gültigkeit der klassischen Mechanik innerhalb der Quantenmechanik. *Zeitschrift für Physik*, 45(7-8):455–457, 1927.
- [52] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives. The OPLS potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, 110(6):1657–1666, 1988.
- [53] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen. A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*, 103(19):8577–8593, Nov 1995.
- [54] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Chemical Physics*, 81(8):3684–3690, Oct 1984.
- [55] A. Benda, M. Hof, M. Wahl, M. Patting, R. Erdmann, and P. Kapusta. TCSPC upgrade of a confocal FCS microscope. *Review of Scientific Instruments*, 76(3), Mar 2005.
- [56] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay, R. H. Ebright, and S. Weiss. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophysical Journal*, 88(4):2939 – 2953, 2005.
- [57] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(45):11225–11236, Jan 1996.

- [58] W.F. van Gunsteren H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma and J.Hermans. Interaction models for water in relation to protein hydration. *Intermolecular Forces*, pages 331–342, 1981.
- [59] J. M. Nitsche, H.-C. Chang, P. A. Weber, and B. J. Nicholson. A transient diffusion model yields unitary gap junctional permeabilities from images of cell-to-cell fluorescent dye transfer between xenopus oocytes. *Biophysical Journal*, 86(4):2058–2077, Apr 2004.
- [60] P. Kapusta. Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration. *PicoQuant GmbH*, Rev.1, Jul 2010.
- [61] A. N. Bashkatov and E. A. Genina. Water refractive index in dependence on temperature and wavelength: a simple approximation. *Proc. SPIE*, pages 393–395, 2003.
- [62] N. W. Schluger and W. N. Rom. The host immune response to tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(3):679–691, Mar 1998.
- [63] D. G. Russell. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*, 5:39–47, 2007.
- [64] S. H. E. Kaufmann and A. J. McMichael. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against aids and tuberculosis. *Nature Medicine*, Apr 2005.
- [65] WHO. Global tuberculosis report. *WHO*, 2012.
- [66] W. Bitter, E. N. G. Houben, D. Bottai, P. Brodin, E. J. Brown, J. S. Cox, K. Derbyshire, S. M. Fortune, L.-Y. Gao, J. Liu, N. C. Gey van Pittius, A. S. Pym, E. J. Rubin, D. R. Sherman, S. T. Cole, and R. Brosch. Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathogens*, 5(10):e1000507, 10 2009.
- [67] P. S. Renshaw, K. L. Lightbody, V. Veverka, F. W. Muskett, G. Kelly, T. A. Frenkiel, S. V. Gordon, R. G. Hewinson, B. Burke, J. Norman, R. A. Williamson, and M. D. Carr. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO Journal*, 24(14):2491–2498, 2005.
- [68] C. Poulsen, S. Holton, A. Geerlof, M. Wilmanns, and Y.-H. Song. Stoichiometric protein complex formation and over-expression using the prokaryotic native operon structure. *FEBS Letters*, 584(4):669 – 674, 2010.
- [69] R. Simeone, D. Bottai, and R. Brosch. ESX/type VII secretion systems and their role in host–pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1):4 – 10, 2009.
- [70] K. N. Lewis, R. Liao, K. M. Guinn, M. J. Hickey, S. Smith, M. A. Behr, and D. R. Sherman. Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. *Journal of Infectious Diseases*, 187(1):117–23, 2003.

- [71] D. E. Makarov and K. W. Plaxco. Measuring distances within unfolded biopolymers using fluorescence resonance energy transfer: The effect of polymer chain dynamics on the observed fluorescence resonance energy transfer efficiency. *Journal of Chemical Physics*, 131(8):085105, 2009.
- [72] B. Schuler, E. A. Lipman, and W. A. Eaton. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419(6908):743–747, Oct 2002.
- [73] K. L. Lightbody, D. Ilghari, L. C. Waters, G. Carey, M. A. Bailey, R. A. Williamson, P. S. Renshaw, and M. D. Carr. Molecular features governing the stability and specificity of functional complex formation by mycobacterium tuberculosis cfp-10/esat-6 family proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25):17681–17690, 2008.
- [74] V. Ivanov, M. Li, and K. Mizuuchi. Impact of emission anisotropy on fluorescence spectroscopy and fret distance measurements. *Biophysical Journal*, 97(3):922–929, Aug 2009.
- [75] H. Yuan, T. Xia, B. Schuler, and M. Orrit. Temperature-cycle single-molecule fret microscopy on polypyrrolines. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13:1762–1769, 2011.
- [76] M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker. *Brock Mikrobiologie*. 2003.
- [77] M. J. van Hemert, S. H. E. van den Worm, K. Knoops, A. M. Mommaas, A. E. Gorbalenya, and E. J. Snijder. Sars-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity. *PLoS Pathogens*, 4(5), 2008.
- [78] Y. Chen, H. Cai, J. Pan, N. Xiang, P. Tien, T. Ahola, and D. Guo. Functional screen reveals sars coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap n7 methyltransferase. *PNAS*, 106(9):3484–3489, Mar 2009.
- [79] E. Decroly, C. Debarnot, F. Ferron, M. Bouvet, B. Coutard, I. Imbert, L. Gluais, N. Papageorgiou, A. Sharff, G. Bricogne, M. Ortiz-Lombardia, J. Lescar, and B. Canard. Crystal structure and functional analysis of the sars-coronavirus rna cap 2'-o-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathogens*, 7(5), May 2011.
- [80] R. Hilgenfeld, J. Tan, S. Chen, X. Shen, and H. Jiang. Structural proteomics of emerging viruses: the examples of SARS-CoV and other coronaviruses. In *Sussman J, Silman I (ed), Structural proteomics and its impact on the life sciences*, page 361–433, Singapur, 2008.
- [81] A. J. W. te Velthuis, J. J. Arnold, C. E. Cameron, S. H. E. van den Worm, and E. J. Snijder. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Research*, 39(21):9458, 2011.
- [82] R. Ponnusamy. *Crystallographic and Biochemical Investigations on Coronavirus Replication Proteins – Non-Structural Proteins 8 and 9*. PhD thesis, University of Lübeck, Germany, 2010.

- [83] Y. Xiao, Q. Ma, T. Restle, W. Shang, D.I. Svergun, R. Ponnusamy, G. Sczakiel, and R. Hilgenfeld. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent rna polymerase activity. *Journal of Virology*, 86(8):4444–54, 2012.
- [84] A. Hoffmann, A. Kane, D. Nettels, D. E Hertzog, P. Baumgärtel, J. Lengefeld, G. Reichardt, D. A. Horsley, R. Seckler, O. Bakajin, and B. Schuler. Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *PNAS*, 2006.
- [85] E. P. O’Brien, G. Morrison, B. R. Brooks, and D. Thirumalai. How accurate are polymer models in the analysis of förster resonance energy transfer experiments on proteins? *Journal of Chemical Physics*, 130(12):124903, 2009.
- [86] W. Peti, M. A. Johnson, T. Herrmann, B. W. Neuman, M. J. Buchmeier, M. Nelson, J. Joseph, R. Page, R. C. Stevens, P. Kuhn, and K. Wuthrich. Structural genomics of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: Nuclear magnetic resonance structure of the protein nsp7. *Journal of Virology*, 79(20):12905–12913, Oct 2005.
- [87] V. N. Maiorov and G. M. Crippen. Size-independent comparison of protein three-dimensional structures. *Proteins*, 22(3):273–283, 1995.
- [88] <http://fizz.cmp.uea.ac.uk/dyndom/>.
- [89] T. Y. Yoo, S. P. Meisburger, J. H., L. P., G. Haran, T. R. Sosnick, and K. Plaxco. Small-angle X-ray scattering and single-molecule FRET spectroscopy produce highly divergent views of the low-denaturant unfolded state. *Journal of Molecular Biology*, 418(3–4):226 – 236, 2012.
- [90] J. B. Udgaonkar. Polypeptide chain collapse and protein folding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1–2):24 – 33, 2013.
- [91] K. A. Henzler-Wildman, V. Thai, M. Lei, M. Ott, M. Wolf-Watz, T. Fenn, E. Pozharski, M. A. Wilson, G. A. Petsko, M. Karplus, C. G. Hübner, and D. Kern. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, 450, Dec 2007.

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

ALEX	engl. <i>alternating laser excitation</i>
APD	Avalanche Photodiode
CD	Circular dichroismus
CEF	engl. <i>collection efficiency function</i>
CFP	engl. <i>culture filtrated protein</i>
ESAT	engl. <i>early-secreted antigenic target</i>
FAMS	engl. <i>fluorescence-aided molecule sorting</i>
FCoV	Feline Coronavirus
FCS	engl. <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GdmCl	Guanidiniumchlorid
IC	engl. <i>internal conversion</i>
ISC	engl. <i>intersystem crossing</i>
rISC	engl. <i>reverse intersystem crossing</i>
MD	Molekulardynamik
MDE	engl. <i>molecular detection efficiency</i>
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NSP	engl. <i>non-structured protein</i>
PALM	engl. <i>photoactivated localization microscopy</i>
PDB	engl. <i>protein data bank</i>
PEEK	Polyetheretherketon
PIE	engl. <i>pulsed interleaved excitation</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
POE	engl. <i>pulsed overlaid excitation</i>
PSF	engl. <i>point spread function</i>
RdRp	engl. <i>RNA-dependent RNA-polymerase</i>
RMSD	engl. <i>root mean squared displacement</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Replikations- und Transkriptionskomplex
SARS	engl. <i>severe acute respiratory syndrome</i>
SAXS	engl. <i>small-angle X-ray scattering</i>
SNR	engl. <i>signal-to-noise ratio</i>
STED	engl. <i>stimulated emission depletion</i>

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

STORM	engl. <i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>
TCSPC	engl. <i>time correlated single photon counting</i>
TFP	Tetrafluorophenylester
TIRF	engl. <i>total internal reflection microscopy</i>
TTTR	engl. <i>time-tagged-time-resolved</i>
UTR	engl. <i>untranslated region</i>
WLC	engl. <i>wormlike chain</i>