

Untersuchung von Faltungs- und  
Funktionsdynamik isolierter Proteindomänen  
mittels Fluoreszenzlöschung

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Simone Schwarze**

geboren in Oberhausen

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Dr. Hannes Neuweiler

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

### Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich des Eides statt, gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg, dass ich die vorliegende Arbeit, unter Einhaltung der Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis, selbstständig und ohne die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung verfasst, keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit bisher oder gleichzeitig keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe. Das Promotionsvorhaben wurde nicht kommerziell vermittelt und zuvor, neben dem Grad des Diplom-Biologen, noch keine anderen akademischen Grade erworben bzw. dies auch nicht versucht.

Würzburg, den

Simone Schwarze



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
2. Theoretische Grundlagen	10
2.1 Absorption und Emission von Licht	10
2.2 Fluoreszenzlöschung	13
2.2.1 H-Dimerbildung	14
2.2.2 Photoinduzierter Elektronentransfer (PET)	15
2.2.3 Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)	17
2.3 Messmethoden	20
2.3.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	20
2.3.2 PET-FCS	23
2.3.3 Zirkulardichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie)	25
2.3.4 Stopped-Flow Spektroskopie	27
2.4 Proteine	27
2.4.1 Entstehung von Proteinen	27
2.4.2 Proteinstruktur	28
2.4.3 Proteinfaltung	29
2.4.4 Protein-Protein Assoziation	31
2.4.5 Dynamiken innerhalb von Proteinen	32
2.5 Untersuchte Proteine	33
2.5.1 Die Bindungsdomäne eines Multienzymkomplexes – BBL	33
2.5.2 Die N-terminale Domäne eines Spinnenseidenproteins	35
2.5.3 Die Ligandenbindungsdomäne eines Glutamatrezeptors	37
3. Material und Methoden	41
3.1 Synthese der isolierten Proteindomänen	41

3.1.1	Proteinexpression, -aufreinigung und Farbstoffmarkierung der Bindungsdomäne BBL	41
3.1.2	Proteinexpression, -aufreinigung und Farbstoffmarkierung der N-terminalen Domäne eines Spinnenseidenproteins	43
3.1.3	Proteinexpression, -aufreinigung und Farbstoffmarkierung der Ligandenbindungsdomäne des Glutamatrezeptors 2	46
3.2	Verwendete Messinstrumente mit dazugehöriger Probenpräparation	48
3.2.1	Absorptionsspektrometer	48
3.2.2	Fluoreszenzspektrometer	49
3.2.3	FCS-Setup	50
3.2.4	CD-Spektrometer	52
3.2.5	Stopped-Flow Spektroskopie	53
4.	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Der entfaltete Zustand der Bindungsdomäne BBL	55
4.2	Die Assoziation und Dissoziation der N-terminalen Domäne eines Spinnenseidenproteins	66
4.3	Dynamiken innerhalb der Ligandenbindungsdomäne des AMPA-spezifischen Glutamatrezeptors 2	90
5.	Zusammenfassung	103
6.	Summary	105
7.	Ausblick	107
8.	Danksagung	108
9.	Literaturverzeichnis	109
10.	Anhang	122
10.1	Medien	122
10.2	Protokolle	123
10.3	Primer	124

10.4 Chromatographie und Massenbestimmung	127
10.4.1 BBL	127
10.4.2 N-terminale Domäne	130
10.4.3 Ligandenbindungsdomäne	132
10.5 Ergänzungen zu den Ergebnissen	135
10.5.1 Bindungsdomäne BBL	135
10.5.2 Spinnenseiden-NTD	137





# Abkürzungsverzeichnis

A *Akzeptor*

Amp *Ampicillin*

AMPA *(S)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure*

APD *Avalanche Photodioden Detektor*

BET *Elektronenrücktransport*

BSA *Bovine Serum Albumin*

CD *Zirkulardichroismus*

CTD *C-terminale Domäne*

CTZ *Cyclothiazid*

D *Donor*

D<sub>phys</sub> *entfaltetes BBL*

DTE *Dithioerythritol*

DTT *Dithiothreitol*

EDTA *Ethylendiamintetraacetat*

F *Fluorophor*

FCS *Fluoreszenzkorrelationspektroskopie*

FRET *Fluoreszenzresonanzenergietransfer*

GluR *Glutamatrezeptor*

GndCl *Guanidiniumchlorid*

H<sub>2</sub>O *Wasser*

H-Brücken *Wasserstoffbrückenbindungen*

HEPES *2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure*

HPLC *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*

IDP *intrinsisch ungeordnetes Protein*

IPTG *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid*

IS *Ionenstärke*

$k_a$  *Assoziationskonstante*

Kainate *(2S,3S,4S)-3-(Carboxymethyl)-4-prop-1-en-2-ylpyrrolidin-2-carboxysäure*

KCl *Kaliumchlorid*

$k_d$  *Dissoziationskonstante*

$K_d$  *Gleichgewichtsdissoziationskonstante*

$K_s$  *Gleichgewichtsassoziationskonstante*

LB *Luria Bertani*

LBD *Ligandenbindungsdomäne*

L-Glu *L-Glutaminsäure*

MES *2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure*

MgCl<sub>2</sub> *Magnesiumchlorid*

MOPS *3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure*

MW *Molekulargewicht*

NaCl *Natriumchlorid*

NBQX *2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamid*

Ni-NTA *Nickel-Nitrilotriessigsäure*

NTD *N-terminale Domäne*

OD *optische Dichte*

PDB *Protein Data Bank*

PET *photoinduzierter Elektronentransfer*

Pi *Phosphat*

PMSF *Phenylmethylsulfonylfluorid*

PSBD *periphere Untereinheitsbindungsdomänen*

Q *Löschmolekül*

RET *Resonanzenergietransfer*

RNS *Ribonukleinsäure*

SDS-PAGE *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*

SEC *Größenausschlusschromatographie*

SOB *Super Optimal Broth*

TB *Terrific Broth*

TCEP *Tris(2-carboxyethyl)phosphin*

TFA *Trifluoressigsäure*

TTET *Triplet-Triplet-Energie-Transfer*

TY *Trypton Hefe*

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Jablonski Diagram	11
Abbildung 2.2: Stokes Verschiebung	12
Abbildung 2.3: H-Dimere	15
Abbildung 2.4: PET-Schema	16
Abbildung 2.5: FRET-Schema	18
Abbildung 2.6: FCS Anregungsprofil	20
Abbildung 2.7: Stopped-Flow-Technik	27
Abbildung 2.8: 2-oxo-acid Dehydrogenasekomplex mit der Bindungsdomäne BBL	34
Abbildung 2.9: Ausbildung des Spinnenseidenfadens auf Grund der Assoziation der NTD	36
Abbildung 2.10: Kristallstruktur der Spinnenseiden-NTD	37
Abbildung 2.11: Schematischer Aufbau von GluRs	38
Abbildung 2.12: Aktivierung des GluR2	39
Abbildung 2.13: Kristallstruktur der GluR2-LBD	40
Abbildung 3.1: Mutationen in BBL	43
Abbildung 3.2: Mutationen in der NTD	45
Abbildung 3.3: Mutationen in der GluR2-LBD	48
Abbildung 3.4: FCS Aufbau	51
Abbildung 4.1: BBL Reportersystem	55
Abbildung 4.2: CD-Spektren von BBL und den Einzelpunktmutanten	56
Abbildung 4.3: Rekonstruierte CD-Spektren von BBL	57
Abbildung 4.4: DichroWeb-Server Analyse der BBL CD-Spektren	59
Abbildung 4.5: FCS-Autokorrelationsfunktionen von BBL	61
Abbildung 4.6: Ringöffnungs- und -Schließungsraten von BBL	63
Abbildung 4.7: FCS $\mu$ s-Kinetik von BBL	64
Abbildung 4.8: Fluoreszenzschalter der NTD <sub>F</sub>	66
Abbildung 4.9: Absorptions- und Emissions-spektren der NTD <sub>F</sub>	67
Abbildung 4.10: pH-abhängige Fluoreszenz-spektren der NTD	68

Abbildung 4.11: Salzabhängigkeit der NTD bei Dimerisierung	69
Abbildung 4.12: Ladungsmutanten der NTD	70
Abbildung 4.13: Exemplarische Stopped-Flow Assoziationsmessungen der NTD <sub>F</sub> und der Ladungsmutanten	71
Abbildung 4.14: Ratenkonstantenbestimmung der Assoziation der NTD und der NTD <sub>F</sub>	72
Abbildung 4.15: Assoziationsraten der NTD-Ladungsmutanten	73
Abbildung 4.16: Stopped-Flow Dissoziationsmessungen der NTD <sub>F</sub> und der Ladungsmutanten	74
Abbildung 4.17: Dissoziationsraten der NTD-Ladungsmutanten	76
Abbildung 4.18: Salzabhängige Stopped-Flow Messungen der NTD <sub>F</sub>	77
Abbildung 4.19: Salzabhängige Raten und freie Energie der NTD <sub>F</sub>	77
Abbildung 4.20: Freie Energieänderungen der NTD-Ladungsmutanten	78
Abbildung 4.21: Das NTD FRET-Reportersystem	82
Abbildung 4.22: FRET Salzabhängigkeitsmessungen der S91C-NTD	83
Abbildung 4.23: Stopped-Flow Dissoziationsmessung der S91C-NTD über FRET	84
Abbildung 4.24: Vergleich der Dissoziationsmessungen über PET und H-Dimere	85
Abbildung 4.25: Fluoreszenzmessungen der unterschiedlich farbstoffmarkierten Ladungsmutanten	86
Abbildung 4.26: Absorptionsmessung der Cy5-NTD	87
Abbildung 4.27: Das GluR2-LBD Reportersystem	90
Abbildung 4.28: Konformationsänderung der GluR2-LBD	91
Abbildung 4.29: Interaktionstest mit ATTO Oxa11	93
Abbildung 4.30: FCS Interaktionstest mit ATTO Oxa11	94
Abbildung 4.31: FCS Messungen der GluR2-LBD basierend auf der G57C	95
Abbildung 4.32: FCS Messungen der GluR2-LBD basierend auf der G59C	96
Abbildung 4.33: Wechselwirkungen von Agonisten und teilweise Agonisten mit der LBD	98
Abbildung 4.34: FCS-Messung der GluR2-LBD mit CTZ	102
Abbildung 10.1: Aufreinigung BBL	128
Abbildung 10.2: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von BBL	129
Abbildung 10.3: Massenspektrum vom farbstoffmarkierten D <sub>phys</sub>	130
Abbildung 10.4: Aufreinigung der Spinnenseiden-NTD	130

Abbildung 10.5: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte der Spinnenseiden-NTD	131
Abbildung 10.6: Aufreinigung GluR2-LBD	132
Abbildung 10.7: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte der GluR2-LBD	133
Abbildung 10.8: Massenanalyse der GluR2-LBD	134
Abbildung 10.9: CD-Spektren der BBL-Einzelpunktmutanten	135
Abbildung 10.10: CD-Spektren BBL bei 90 °C	135
Abbildung 10.11: FCS Autokorrelationsfunktionen von BBL	136
Abbildung 10.12: Salzabhängigkeit der Wildtyp-NTD bei Dimerisierung	137

# 1. Einleitung

Proteine sind an nahezu jedem Prozess des Lebens betreffend beteiligt, worin ihre große Bedeutung liegt. Sie bestehen aus Aminosäuren, deren Abfolge in der Primärstruktur festgelegt ist. Im gefalteten Zustand lagern sich Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter zur meist funktionalen Tertiärstruktur zusammen. Assoziieren mehrere Proteine zu einem Gesamtkomplex wird dies als Quartärstruktur bezeichnet <sup>[1]</sup>. Fehlfunktionen durch fehlerhafte Faltung, Aggregation oder Fibrillogenese können aber auch schwerwiegende Folgen, unter anderem Krankheiten wie Prion, Huntington oder Alzheimer, haben <sup>[2-4]</sup>.

Für ein besseres Verständnis von Proteinen ist es wichtig deren Funktionsweisen aufzuklären, um auch Fehlfunktionen verstehen zu können. Dazu gehören die Faltung aus dem denaturierten in den nativen Zustand, Dynamiken innerhalb von Proteinen sowie die molekulare Erkennung und Assoziation mit Molekülen oder anderen Proteinen.

1969 beschrieb C. Levinthal in seinem Levinthal Paradox <sup>[5]</sup>, dass die Konformationsänderung eines Proteins aus dem denaturierten in den nativen Zustand kein zufälliger Prozess sein kann, da die Faltung sonst mehr Zeit „als die Entstehung des Universums“ in Anspruch nehmen würde. Für die Beschreibung der Proteinfaltung existieren verschiedene Modelle. Das Nukleationswachstumsmodell beschreibt die Faltung durch die Bildung eines Faltungsnukleus, ab dessen Vorhandensein die Faltung ohne Zwischenzustände in den nativen Zustand abläuft <sup>[6]</sup>. Beim Framework- und Diffusions-Kollisions-Modell wird hingegen davon ausgegangen, dass sich erst die Sekundärstrukturen ausbilden, die sich dann zur Tertiärstruktur zusammenlagern <sup>[6, 7]</sup>. Bei dem Modell des hydrophoben Kollaps, wird der zur Verfügung stehende Konformationsraum des Proteins durch den hydrophoben Effekt eingeschränkt, wodurch eine schnelle Faltung möglich ist <sup>[7, 8]</sup>. Auf Grund von Experimenten, die gegen das Framework-Modell und das hydrophobe Kollaps Modell sprachen entstand der Nukleations-Kondensations-Mechanismus, ein Mittelweg aus beiden Modellen <sup>[7]</sup>. In diesem werden Sekundärstrukturen in einem nativ ähnlichen Übergangszustand über Terti-

ärwechselwirkungen stabilisiert, die oft aus Reststrukturen im denaturierten Zustand hervorgehen <sup>[9]</sup>.

Lange wurde davon ausgegangen, dass die native Struktur von Proteinen, jene mit der niedrigsten freien Energie <sup>[10]</sup>, im Wesentlichen deren Funktion bestimmt. Dieses Modell musste jedoch um „die Dimension der Zeit“ <sup>[11]</sup> ergänzt werden, da die Dynamik innerhalb eines Proteins einen entscheidenden Einfluss auf dessen Eigenschaften hat. Dabei wird unterschieden zwischen Bewegungen im  $\mu\text{s}$ -Bereich und langsamer, den sogenannten „tier-0“ Dynamiken, Fluktuationen separiert durch hohe Energiebarrieren und den Bewegungen, die innerhalb der „tier-0“ Zustände stattfinden. Dabei handelt es sich um Ring- bzw. Schleifenbewegungen im ns-Bereich („tier-1“ Dynamik), atomare Veränderungen im ps-Bereich („tier-2“ Dynamik) und Bewegungen höherer „tier“ Ordnungen, wie Bindungsschwingungen im fs-Bereich <sup>[11]</sup>.

Des Weiteren wird die Funktion von Proteinen häufig durch die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beeinflusst. Beschrieben werden diese zum einen durch das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ <sup>[12]</sup>, bei dem die Strukturen von zwei interagierenden Proteinen komplementär sind und zum anderen durch das „induced fit“ Modell <sup>[13]</sup>, bei welchem sich die Konformationen auf die Assoziation hin optimal aneinander anpassen. Bei dem „conformational selection“ Modell <sup>[14]</sup> wird, im Gegensatz zu den anderen zwei Modellen, die Dynamik innerhalb von Proteinen mit berücksichtigt. Der Ligand „wählt“ sich eine der Konformationen des Proteins und bewirkt durch Bindung an diese eine Populationsverschiebung in Richtung dieser Form.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Fluoreszenzlöschmechanismen der H-Dimerbildung und des photoinduzierten Elektronentransfers (PET) anzuwenden, um die für das Verständnis von Proteinen wichtigen Dynamiken der Proteinfaltung, der Protein-Protein Assoziation und der Domänenbewegung an drei isolierten Proteindomänen zu untersuchen. Analysiert wurden die sich sehr schnell faltende Bindungsdomäne eines Multienzymkomplexes (BBL), die für die Materialforschung interessante N-terminale Domäne (NTD) der Spinnenseidenfaser und die an der schnellen synaptischen Signalweiterleitung im Nervensystem beteiligte Ligandenbindungsdomäne (LBD) des (S)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-spezifischen ionotropen Glutamatrezeptors 2. Die Untersu-



chung mittels Fluoreszenz sollte gewählt werden, da organische Farbstoffe, z. B. über Thioldmodifikation, und das Löschmolekül Tryptophan, ortsspezifisch in ein Protein eingebracht werden können <sup>[15]</sup> und es so möglich ist, gezielt Fragestellungen zu analysieren. Die H-Dimerbildung und der PET sind photophysikalische Phänomene, die im Bereich  $\leq 1$  nm sensitiv sind <sup>[15, 16]</sup>, weshalb sich diese gut eignen sollten, um Vorgänge in Proteinen zu untersuchen. Zudem ist es bei PET im Gegensatz zum Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET), der abhängig vom Farbstoffpaar im Bereich 2 – 10 nm sensitiv ist <sup>[17]</sup>, nur notwendig einen anstatt zwei Farbstoffe ortsspezifisch in ein Protein einzubringen. Für die Untersuchungen sollten die zwei Fluoreszenzlöschmechanismen mit der Stopped-Flow Methode und der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) kombiniert und so Methoden mit hoher struktureller und zeitlicher Auflösung zur Anwendung gebracht werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

Proteine sind schon lange Gegenstand der Forschung, denn ihre genauen Funktionsweisen sind oft noch unaufgeklärt. Die Zirkulardichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie) bietet dabei die Möglichkeit Informationen über die Sekundär- und Tertiärstruktur zu erhalten (Kapitel 2.3.3). Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (Kapitel 2.3.1) und die Stopped-Flow Methode (Kapitel 2.3.4) in Kombination mit Fluoreszenzlöschmechanismen (Kapitel 2.2) können Einblicke in dynamische Proteininteraktionen geben. In Kapitel 2.5 werden die drei mit diesen Methoden untersuchten Proteine beschrieben.

### 2.1 Absorption und Emission von Licht

Erstmals beobachtet wurde Fluoreszenz 1852 von G. G. Stokes. Er verstand damals bei der Bestrahlung einer Chinin-Lösung mit UV-Licht, dass sich die Wellenlänge des Lichts nach Austritt aus der Lösung verändert hatte, was heute als Stokes-Verschiebung bezeichnet wird.

Bevor jedoch Fluoreszenz auftreten kann, müssen Moleküle bzw. Atome Licht absorbieren. Durch die Aufnahme (Absorption) eines Photons wird ein Elektron eines Moleküls aus dem Grundzustand  $S_0$  auf ein höheres Energieniveau, z.B.  $S_1$  oder  $S_2$ , angehoben. Die Absorption findet aus dem niedrigsten Schwingungslevel null des  $S_0$  innerhalb von  $10^{-15}$  s statt <sup>[17]</sup>.

Die Emission von Licht, d.h. die Abgabe eines Photons, aus einem angeregten Zustand wird als Lumineszenz bezeichnet. Diese wird nochmals unterteilt in Fluoreszenz und Phosphoreszenz, abhängig von deren angeregtem Zustand (Abbildung 2.1). Im Falle von Fluoreszenz ist das Elektron im angeregten Zustand gepaart mit dem Elektron im Grundzustand, d.h. der Spin ist entgegengesetzt. Die Rückkehr in den nicht angeregten Zustand ist spin-erlaubt und erfolgt z.B. über Fluoreszenz. Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  beschreibt dabei die mittlere Verweildauer eines Moleküls im angeregten Zustand. Meist liegt diese im Bereich von  $10^{-8}$  s. Bei der Phosphoreszenz gelangt das Elektron über „Intersystem Crossing“ in den Triplet Zustand. Das Elektron hat nun durch Spinumkehr die gleiche Orientierung

wie das Elektron im Grundzustand, was spinverboten ist. Die Phosphoreszenz ist meist zu längeren Wellenlängen hin verschoben und ein langsamer Emissionsprozess im Bereich  $> 10^{-6} \text{ s}$  [17, 18].

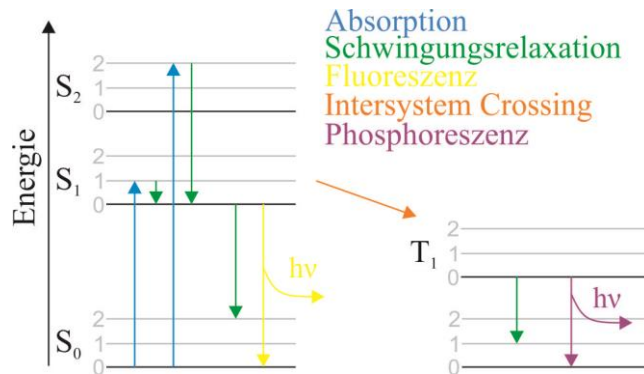


Abbildung 2.1: Jablonski Diagramm

Das Jablonski-Diagramm zeigt die möglichen Übergänge von Elektronen bei Anregung durch Licht.  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  kennzeichnen dabei den Grundzustand und die höheren Energieniveaus, in denen sich die Elektronen befinden können. Mit 0,1,2 werden Schwingungsniveaus der Energieniveaus gekennzeichnet.  $T_1$  steht für den Tripletzustand.

Im Grundzustand  $S_0$  eines Moleküls wird die Position des Atomkerns durch die Coulombkräfte der Elektronen, und die Anwesenheit von anderen Atomkernen bestimmt. Findet ein elektronischer Übergang statt, bewirkt dies, dass ein Elektron seinen Aufenthaltsbereich verändert und die Elektronendichte verschoben wird. Dadurch verändern sich die auf den Atomkern wirkenden Kräfte und dieser fängt an zu schwingen. Auf Grund des großen Massenunterschiedes zwischen Elektronen und Atomkern sowie der Schnelligkeit des elektronischen Übergangs verändert der Atomkern seine ursprüngliche Gleichgewichtslage jedoch innerhalb der Dauer des Anregungszeitraums nicht, sondern behält diese als Ausgangspunkt der Schwingung. Das Molekül kann nicht nur in einen Schwingungszustand angeregt werden, sondern in verschiedene mit unterschiedlichen Frequenzen. Daher entsteht ein breites Absorptionsspektrum und keine einzelne, rein elektronische Absorptionsbande. Mit Hilfe des Franck-Condon-Prinzip, das vertikale elektronische Übergänge beschreibt, weil eine Änderung der Lage der Kerne während eines Elektronenübergangs unwahrscheinlich ist, können die am ehesten denkbaren Schwingungszustände angegeben werden. Dafür wird eine vertikale Linie von der Po-

tenzialkurve des Grundzustandes bis zum Schnittpunkt mit der Potenzialkurve des angeregten elektronischen Zustandes gezogen <sup>[17, 19, 20]</sup>.

Je größer der Überlapp der Schwingungszustände ist, desto wahrscheinlicher ist ein Übergang von einem höheren in ein niedrigeres Energielevel. Der Energieunterschied zwischen den Schwingungsleveln der angeregten Zustände ist gering im Gegensatz zum  $S_1 \rightarrow S_0$  Übergang, weshalb erstere sehr schnell und ohne die Emission von Licht stattfinden. Dies ist der Grund dafür, dass das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungsleistung ist. Dieser Zusammenhang wird in Kashas Regel beschrieben <sup>[17, 19]</sup>.

Darauf, dass die Emission immer aus dem niedrigsten Schwingungslevel des  $S_1$  stattfindet, basiert auch die Stokes Verschiebung. Diese beschreibt das Phänomen, dass Fluorophore bei längeren Wellenlängen emittieren, als sie absorbieren, wie in Abbildung 2.2 dargestellt. Wird ein Photon absorbiert, wird ein Elektron in ein höheres Schwingungslevel eines angeregten Zustandes angehoben. Die Abgabe von Energie aus einem höheren Schwingungslevel auf das niedrigste des  $S_1$  innerhalb von  $10^{-12}$  s wird Schwingungsrelaxation („Internal Conversion“) genannt. Kehrt nun das Elektron zurück in den  $S_0$ -Zustand, emittiert das Molekül bei einer nach rot verschobenen, energieärmeren Wellenlänge <sup>[17]</sup>.

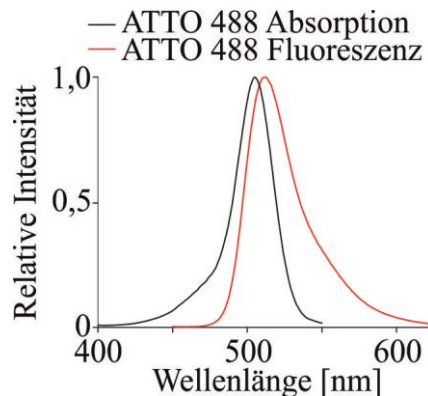


Abbildung 2.2: Stokes Verschiebung

Das Emissionsspektrum (rot) von ATTO 488 ist auf Grund der Stokes Verschiebung zu längeren energieärmeren Wellenlängen als das Absorptionsspektrum (schwarz) verschoben.

Bei der Emission kehrt das Elektron jedoch nicht direkt in den Grundzustand  $S_0$  zurück, sondern auch zuerst in ein höheres Schwingungslevel. Die Geometrie der Schwingungslevel der angeregten Zustände entspricht denen des Grundzustands. Dies bewirkt, dass Absorptions- und Emissionsspektren meist spiegelbildlich aufgebaut sind <sup>[17]</sup>.

Um Wechselwirkungen mit anderen Molekülen zu untersuchen eignet sich die Betrachtung der Fluoreszenz besser, als die der Absorption, da diese im Nanosekundenbereich abläuft und somit Zeit für die Interaktion mit anderen Molekülen ist, während letztere im Femtosekundenbereich stattfindet <sup>[17]</sup>.

## 2.2 Fluoreszenzlöschung

Bei der Fluoreszenzlöschung wird zwischen der dynamischen und der statischen unterschieden. Beide Prozesse sind Vorgänge innerhalb molekularen Kontaktes, in denen die Fluoreszenz der untersuchten Proben durch die Anwesenheit eines Löschmoleküls  $Q$  verringert wird <sup>[17]</sup>.

Bei der dynamischen Löschung treffen das Fluorophor  $F$  und das Löschmolekül durch Diffusion aufeinander und bilden einen Exiplex. Dadurch wird der angeregte Zustand depopuliert, ohne dass es zur Aussendung eines Photons kommt. Diese Art der Fluoreszenzlöschung wird beschrieben durch die Stern-Volmer-Gleichung <sup>[17]</sup>:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad 2.1$$

Dabei ist  $k_q$  die bimolekulare Löschkonstante,  $\tau_0$  ist die Lebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit des Löschmoleküls,  $K_D = k_q \tau_0$  die Stern-Volmer-Löschkonstante,  $I_0$  die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit und  $I$  in Anwesenheit des Löschmoleküls.

Die statische Löschung zeichnet sich durch die Bildung von nicht-fluoreszierenden Absorptionskomplexen zwischen Fluorophor und Löschmolekül aus, die bei Anregung ohne die Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehren <sup>[18]</sup>. Beschrieben wird diese durch Gleichung 2.2:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S [Q] \quad 2.2$$

dabei ist  $K_s$  die Assoziationskonstante der Komplexbildung <sup>[17]</sup>.

Eine Differenzierung zwischen beiden Prozessen findet am besten über Lebensdauer- oder Absorptionsmessungen statt. Temperaturabhängige oder viskositätsabhängige Tests können den Mechanismus ebenfalls aufklären <sup>[17]</sup>.

### 2.2.1 H-Dimerbildung

Organische Farbstoffe neigen in Lösung dazu stabile Homodimere auszubilden, was mit einem Überlapp der Molekülorbitale verbunden ist <sup>[21]</sup>. Dies führt durch Excitonaufspaltung zur Aufteilung der angeregten Zustände auf zwei Energielevel, einem über und einem unter dem der Monomere, woraus die J- und die H-Dimere resultieren. Die nicht-kovalente Interaktion zwischen den Farbstoffen wird getrieben durch den hydrophoben Effekt und stabilisiert durch van der Waals Kräfte <sup>[16]</sup>.

Zuerst entdeckten Jelly <sup>[22]</sup> und Scheibe <sup>[23]</sup> 1936/1937 die J-Dimere. Diese kennzeichnen sich durch eine Rotverschiebung im Absorptionsspektrum und meist sind diese weiterhin fluoreszent. Die H-Dimere hingegen, mit parallel orientierten Übergangsdipolen, sind nicht-fluoreszent und zeigen eine hypsochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum <sup>[24]</sup>. Die Blauverschiebung resultiert daher, dass bei Anregung nur der Übergang zum höheren Energielevel auf Grund des Übergangsmomentes erlaubt ist (Abbildung 2.3). Es folgt ein direkter Übergang zum niedrigeren Energielevel durch Internal Conversion, aus welchem die Rückkehr in den Grundzustand durch Fluoreszenz verboten ist <sup>[16]</sup>. Die Fluoreszenzlöschung durch H-Dimerbildung wird zur Detektion von Interaktionen in biologischen Systemen verwendet <sup>[25, 26]</sup>.

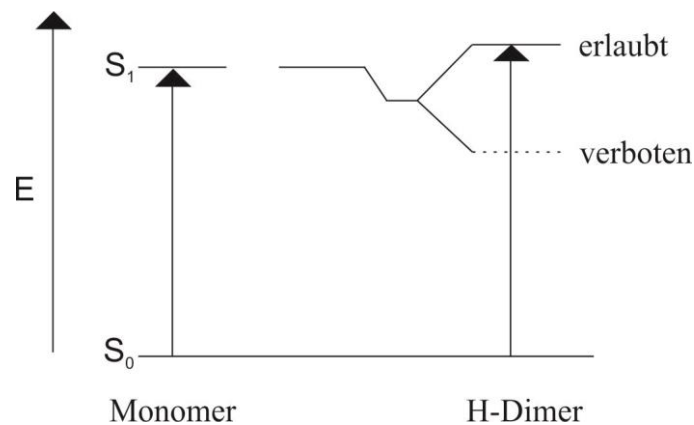


Abbildung 2.3: H-Dimere

Bei der H-Dimerbildung zwischen zwei Farbstoffen kommt es zum Excitonsplitting, wodurch ein Energielevel über und eins unter dem des Farbstoffmonomers entsteht. Nur der Übergang zum oberen Energielevel ist auf Grund des Übergangsmomentes erlaubt, was zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums und Fluoreszenzlöschung führt.

## 2.2.2 Photoinduzierter Elektronentransfer (PET)

Der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) ist ein photochemischer Prozess, bei dem ein Donor (D) ein Elektron an einen Akzeptor (A) abgibt <sup>[15]</sup>. Die Energie für den Elektronentransfer kommt von der Anregung durch Licht, entweder des Donors oder des Akzeptors, aus dem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$ . Ob ein Molekül ein Donor (d.h. ein Oxidant) oder Akzeptor (Reduktant) ist, hängt von den Redoxpotentialen der Moleküle im Grundzustand ab <sup>[27]</sup>. Bei Anregung des Moleküls B ( $B^*$ ) wird der Prozess dann entsprechend oxidativer (Gleichung 2.3) oder reduktiver (Gleichung 2.4) Elektronentransfer genannt.



Ein in biologischen Systemen vorkommender starker Oxidant ist z.B. die Aminosäure Tryptophan. Diese wird häufig in Kombination mit kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen, wie ATTO 655, in PET-Experimenten eingesetzt <sup>[28]</sup>.

Damit ein Elektronentransfer stattfinden kann, muss neben der Absorption eines Photons durch den Donor oder Akzeptor ein weiteres Kriterium erfüllt sein: der Abstand zwischen beiden Molekülen muss innerhalb der van-der-Waals-Radii liegen, d.h.  $\leq 1$  nm. In diesem Bereich können die Elektronenwolken des Donors und des Akzeptors miteinander interagieren und Elektronen austauschen. Die Elektronenaustauschrate bzw. das Löschen der Fluoreszenz nimmt exponentiell mit zunehmender Distanz zwischen den Elektronenwolken ab <sup>[15, 17]</sup>.

Um Elektronen von einem Molekül zum anderen übertragen zu können, bilden Donor und Akzeptor einen Ladungs-Transfer-Komplex. Dieser Komplex kann entweder durch den Elektronenrücktransport (englisch: back electron transfer, BET), Emission von Licht, oder durch Ladungsseparierung (Radikationenbildung) mit anschließendem BET in den Grundzustand zurückkehren (Abbildung 2.4) <sup>[29]</sup>.

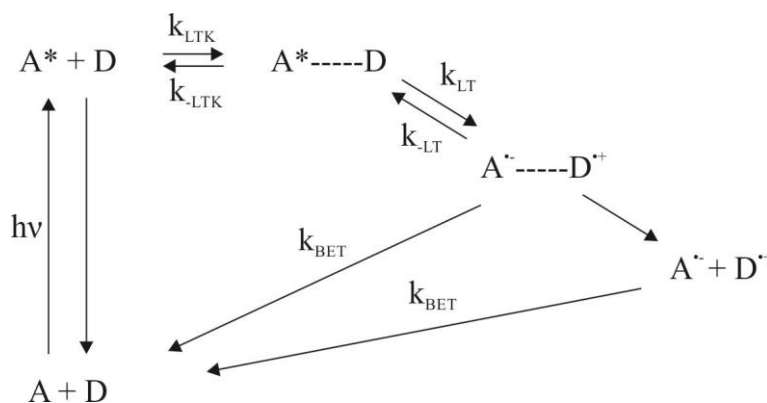


Abbildung 2.4: PET-Schema

Das Schema zeigt den photoinduzierten Elektronentransfer. In diesem Beispiel wird der Akzeptor durch Licht angeregt (A\*). Mit der Rate  $k_{LTK}$  bilden Akzeptor und Donor einen Ladungs-Transfer-Komplex. Ein Ladungstransfer zwischen Akzeptor und Donor findet in diesem mit der Rate  $k_{LT}$  statt. Entweder geht der Komplex direkt mit der Rate  $k_{BET}$  über den Elektronenrücktransport in den Grundzustand zurück oder es entsteht zuvor noch ein Radikationenpaar, das dann mit  $k_{BET}$  in den Ausgangszustand zurückkehrt.

Die Effizienz der Ladungstrennung bei PET kann mit Hilfe der Rehm-Weller-Gleichung berechnet werden:

$$\Delta G = E(D^+/D) - E(A/A^-) - \Delta G_{00} - \frac{e^2}{\epsilon d} \quad 2.5$$



Dabei ist  $E(D^+/D)$  das Oxidationspotential des Donors,  $E(A/A^-)$  das Reduktionspotential des Akzeptors,  $\Delta G_{00}$  die Energiedifferenz des Übergangs des Fluorophors vom Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$  und der letzte Term beschreibt die Coulomb-Anziehungskraft zwischen zwei geladenen Molekülen, wobei  $\epsilon$  die Dielektrizitätskonstante des Mediums und  $d$  der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist <sup>[27]</sup>.

Die Lebensdauer des nichtfluoreszierenden,  $\pi$ -gestapelt angeordneten Komplexes aus Farbstoff und Tryptophan <sup>[30]</sup> ist länger als die der Fluoreszenz des Farbstoffes. Aus diesem Grund kann ein Fluoreszenz „An-“ und „Ausschalten“ beobachtet werden, dass durch die Assoziation und die Dissoziation des Tryptophans mit dem Farbstoff ausgelöst wird <sup>[15]</sup>.

### 2.2.3 Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)

Der Fluoreszenzresonanzenergietransfer ist ein nicht-radiativer Prozess, der erstmals 1948 <sup>[31]</sup> beschrieben wurde. Oft wird dieses Prinzip der Energieübertragung auch nur als Resonanzenergietransfer (englisch: resonance energy transfer, RET) bezeichnet, da dieser nicht die Emission von Licht benötigt. Dem gegenüber steht der radiative Energietransfer, bei dem ein Photon vom Donor emittiert und vom Akzeptor reabsorbiert wird <sup>[17]</sup>.

Beim RET wird Energie über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen. Dabei kann der Donor als oszillierender Dipol angesehen werden, der seine Energie an einen Akzeptor mit ähnlicher Resonanzfrequenz übertragen kann (Abbildung 2.5). Durch die Absorption von Licht gelangt dabei zuerst ein Elektron des Donors aus dem höchsten besetzten Molekülorbital (englisch: highest occupied molecule orbital: HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (englisch: lowest unoccupied molecule orbital: LUMO). Durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen wird die Energie des Elektrons im LUMO an den Akzeptor übertragen und es wechselt in das HOMO zurück. Gleichzeitig wechselt ein Elektron des Akzeptors aus dem HOMO in das LUMO <sup>[17]</sup>.

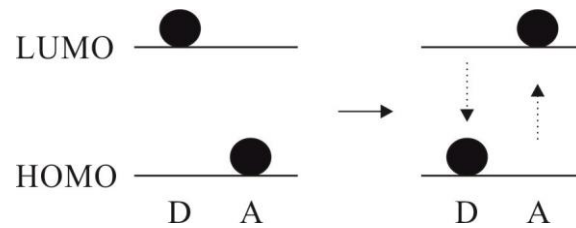


Abbildung 2.5: FRET-Schema

Resonanzenergietransfer des Donors (D) auf den Akzeptor (A). Der durch Licht angeregte D im LUMO gibt seine Energie über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen an den A im HOMO ab. Dabei geht gleichzeitig das Elektron des D in den HOMO zurück und das des A in den LUMO.

Die Energieübertragungsrate  $K_T(r)$  zwischen Donor und Akzeptor lässt sich wie folgt berechnen:

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

Diese ist abhängig von der Lebensdauer  $\tau_D$  des Donors, der Distanz  $r$  zwischen beiden Molekülen und dem Försterradius  $R_0$ . Für einen hohen Energieübertrag sollte  $\tau_D$  länger sein als die Dauer, die der Transfer der Energie benötigt. Ebenso sollte  $R_0$  groß sein. Der Försterradius gibt die Distanz zwischen Donor und Akzeptor an, bei der die FRET Effizienz  $E = 50\%$  ist. Für die meisten Farbstoffpaare liegt  $R_0$  zwischen 2 bis 6 nm <sup>[17]</sup>.

Der Försterradius lässt sich wie folgt berechnen:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} J(\lambda) \quad 2.7$$

Dieser ist somit abhängig von der Quantenausbeute  $Q_D$  des Donors, der Ausrichtung  $\kappa^2$  der Dipole zueinander, dem Brechungsindex der Lösung  $n$ , der Avogadrozahl  $N$  und dem Überlappintegral  $J(\lambda)$  <sup>[17]</sup>.

Das Überlappintegral ist ein Maß dafür, wie stark das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt.

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 2.8$$

$F_D(\lambda)$  ist das auf die Fläche eins normierte Emissionsspektrum des Donors,  $\varepsilon_A(\lambda)$  der Extinktionskoeffizient des Akzeptors in Abhängigkeit des auf eins normierten Absorptionsspektrums des Akzeptors und  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts <sup>[17]</sup>.

Liegt das Überlappintegral in der Einheit  $\text{nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  vor, dann gilt für  $R_0$  in Å:

$$R_0 = 0,211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad 2.9$$

Der Wert für  $\kappa^2$  liegt zwischen null und vier. Der Maximalwert wird erreicht, wenn die Dipole ko-linear ausgerichtet sind. Sind die Dipole parallel zueinander orientiert wird  $\kappa^2$  eins, bei rechtwinkligen null. Meist wird für  $\kappa^2$  aber 2/3 eingesetzt, als Mittelwert aus den möglichen Ausrichtungen der Dipole zueinander <sup>[17]</sup>.

Die zu erwartende FRET Effizienz  $E$  für zwei Farbstoffe kann über den Försterradius und ihre Distanz berechnet werden:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad 2.10$$

Für verlässliche Messungen sollte die Distanz zwischen Donor und Akzeptor in dem Bereich zwischen  $0,5 R_0$  und  $2 R_0$  liegen, da die Effizienz mit dem Verhältnis  $1/r^6$  abnimmt. Mit Hilfe von Fluoreszenz- oder Lebensdauermessungen kann die FRET Effizienz mit folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad 2.11$$

Dabei sind  $F_{DA}$  und  $\tau_{DA}$  die Fluoreszenzintensität und die Lebensdauer des Donors in Anwesenheit und  $F_D$  und  $\tau_D$  in Abwesenheit des Akzeptors.

Auf Grund der Distanzabhängigkeit des FRET wird dieser auch als „molekulares Lineal“ bezeichnet und häufig in Interaktionsstudien verwendet <sup>[17, 32, 33]</sup>.

## 2.3 Messmethoden

### 2.3.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist eine Spektroskopiemethode zur Untersuchung von zeitabhängigen Fluoreszenzfluktuationen. Erstmals beschrieben wurde diese 1972 von Madge, Elson und Webb <sup>[34]</sup>.

Bei der FCS wird die Fluoreszenzintensität eines bestimmten Detektionsvolumens über die Zeit aufgenommen. Fluktuationen in dem detektierten Signal entstehen z.B. durch die Diffusion von fluoreszierenden Molekülen in den Fokus hinein und wieder heraus (Abbildung 2.6) oder durch Bewegungen innerhalb von Molekülen. Durch die Analyse der zeitabhängigen Intensitätsspur mittels Auto- oder Kreuzkorrelation können Informationen über die Diffusion des Moleküls, den hydrodynamischen Radius, Konzentrationen, sowie photochemische und photophysikalische Eigenschaften erhalten werden <sup>[35]</sup>.

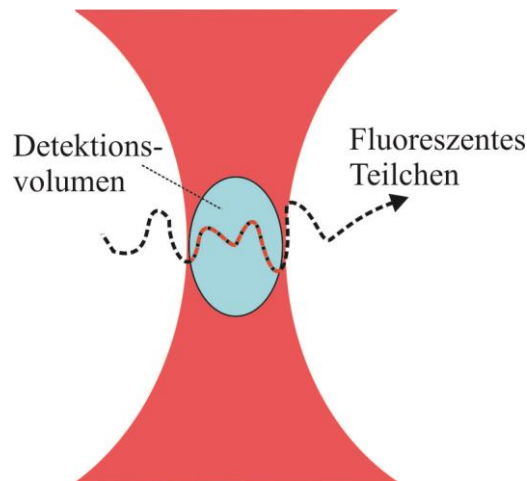


Abbildung 2.6: FCS Anregungsprofil

Ein fluoreszierendes Teilchen diffundiert durch das Anregungsprofil (rot) des konfokalen FCS-Aufbaus, während es angeregt wird. Blau unterlegt ist das Detektionsvolumen von etwa 1 fL.

Die Fluoreszenzfluktuationen  $\delta F(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  in Gleichgewichtsbedingungen werden berechnet aus den Abweichungen  $F(t)$  von der mittleren Fluoreszenzintensität  $\langle F(t) \rangle$  (Gleichung 2.12).

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad 2.12$$

Die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  (Gleichung 2.13) wird erhalten durch Normierung der Gleichung 2.12 auf den Gesamtverlauf des Fluoreszenzsignals.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(\tau + t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad 2.13$$

$\delta F(\tau+t)$  steht hierbei für die Fluoreszenzintensität an einem um  $\tau$  späteren Zeitpunkt von  $t$ .  $G(\tau)$  ist ein Maß dafür, wie selbstähnlich das Fluoreszenzsignal über die Zeit ist <sup>[36]</sup>.

Die Auswertung von  $G(\tau)$  findet durch Anpassen der Daten mit Hilfe einer adäquaten Fitfunktion statt. Dabei muss die Form des Beobachtungsvolumens, die Art der Diffusion und die Herkunft der Fluoreszenzfluktuationen in Betracht gezogen werden. Bei einer dreidimensionalen Diffusion folgt dabei das Profil  $p(r)_{3D}$  des Anregungsvolumens in etwa einer dreidimensionalen Gauss-Funktion:

$$p(r)_{3D} = I_0 \exp[-2(x^2 + y^2)/s^2] \exp(-2z^2/u^2) \quad 2.14$$

mit der Fluoreszenzintensität  $I_0$ , dem Radius  $s$  und der halben Höhe des Beobachtungsvolumens  $u$ . Daraus ergibt sich für die Fitfunktion  $G_{3D}(\tau)$ :

$$G_{3D}(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{(1 + (\frac{\tau}{\tau_D}))} \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{s}{u})^2 (\frac{\tau}{\tau_D})}} \quad 2.15$$

Dabei ist  $V_{eff}$  das betrachtete Volumen,  $\langle C \rangle$  die Konzentration und  $\tau_D$  die Diffusionszeit des Moleküls durch den Fokus <sup>[17, 35, 36]</sup>.

Das Beobachtungsvolumen ist nicht scharf abgrenzbar bzw. exakt bestimmbar, da die Werte von  $s$  und  $u$  bei den Distanzen gemessen werden, bei denen das Intensitätsprofil auf  $e^{-2}$  seines Maximalwertes abgefallen ist. Daher ist es nicht exakt bestimmbar.

Eine Abschätzung des Volumens kann mit Hilfe eines Moleküls berechnet werden, dessen Diffusionskoeffizient  $D$  bekannt ist.

$$\tau_D = s^2/4D \quad 2.16$$

Unter Verwendung von Gleichung 2.16 kann dafür der Radius des Volumens bestimmt werden. Die Diffusionszeit ist im Gegensatz zum Diffusionskoeffizienten keine Moleküleigenschaft, sondern abhängig von der Größe des Detektionsvolumens.  $D$  wird beschrieben durch die Stokes-Einstein Gleichung und ist hauptsächlich abhängig von der Viskosität des Mediums  $\eta$  und dem hydrodynamischen Radius des Moleküls  $R_h$ :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad 2.17$$

Weitere Parameter sind die Boltzmann-Konstante  $k$  und die Temperatur  $T$  <sup>[35]</sup>.

Ein weiteres Diffusionsmodell ist die zweidimensionale Diffusion, wie sie z.B. bei der lateralen Membrandiffusion beobachtet wird. Für das planare Anregungsprofil  $p(r)_{2D}$  gilt eine zweidimensionale Gauss-Verteilung:

$$p(r)_{2D} = I_0 \exp[-2(x^2 + y^2)/s^2] \quad 2.18$$

Aus dieser ergibt sich die Datenanpassungsfunktion für die zweidimensionale Diffusion  $G(\tau)_{2D}$ :

$$G(\tau)_{2D} = \frac{1}{V_{eff}\langle C \rangle} \frac{1}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})} \quad 2.19$$

Das  $G(\tau)_{2D}$  Modell ist auch oft zulässig für die dreidimensionale Diffusion, da die  $x$  und  $y$  Komponenten des effektiven Volumens im Verhältnis zur  $z$  Komponente oft sehr klein sind. Somit wird der letzte Term in Gleichung 2.15 eins und die Gleichung 2.19 für die zweidimensionale Diffusion wird erhalten <sup>[35, 36]</sup>.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der FCS ist die Anzahl der Teilchen, ausgedrückt durch  $N$ , die sich aktuell im Beobachtungsvolumen befindet.  $N$  sollte in einem Bereich zwischen 0,1 und 1000 Molekülen liegen, d.h. die Lösung sollte eine Konzentration im unteren nM-Bereich haben, da mit ansteigender Teilchenzahl die Amplitude von  $G(\tau)$  abnimmt und die relativen Fluoreszenzfluktuationen geringer werden <sup>[32]</sup>.  $N$  kann zum Zeitpunkt  $\tau = 0$  bestimmt werden. Dann gilt für die zwei- und dreidimensionale Diffusion:

$$G_{2D/3D}(0) = \frac{1}{V_{eff}\langle C \rangle} = \frac{1}{N} \quad 2.20$$

Die Teilchenzahl  $N$  ist also der Kehrwert von  $G(0)$ .

Die Diffusion von Molekülen ist nicht der einzige Prozess, der mit der FCS untersucht werden kann. Alle photophysikalischen Abläufe,  $X(\tau)_{Kinetik}$ , die reversibel zwischen einem fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zustand wechseln, können detektiert werden. Somit gilt folgendes Datenanpassungsmodell:

$$G(\tau)_{gesamt} = G(\tau)_{Diffusion} X(\tau)_{Kinetik} \quad 2.21$$

Für  $X(\tau)_{Kinetik}$  gilt:

$$X(\tau)_{Kinetik} = 1 - T + T e^{-\frac{\tau}{\tau_{Kinetik}}} \quad 2.22$$

Dabei ist  $T$  der Anteil der Moleküle an diesem Prozess und  $\tau_{Kinetik}$  dessen Relaxationszeit [17, 36].

### 2.3.2 PET-FCS

Die Kombination des photoinduzierten Elektrontransfers mit der Fluoreszenzkorrelationsmethode (PET-FCS) ermöglicht die Untersuchung von Konformationsänderungen im Bereich  $\leq 1$  nm, da es in diesem Bereich zu einem Kontakt zwischen Fluorophor und Löschmolekül kommt [30]. Dieser ist interessant für die Betrachtung von Proteinen, Peptiden und DNS.

Bei PET-FCS dienen die Aminosäure Tryptophan und die DNS-Base Guanin als Elektronendonoren in der PET-Reaktion, da diese ein ausreichend geringes Oxidationspotential aufweisen, um einen Oxazin- oder Rhodaminfarbstoff mit entsprechendem Redoxpotential zu löschen [15].

Dazu müssen ein extrinsisches Fluorophor und ein Löschmolekül, Tryptophan oder Guanin, in dem zu untersuchenden Molekül so positioniert werden, dass diese in van-der-Waals-Kontakt kommen und PET stattfinden kann. Die daraus resultierenden Fluoreszenzfluktuationen können mit der FCS gemessen werden, falls diese innerhalb der Dif-

fusionszeit  $\tau_D$  stattfinden. Diese erscheinen als zusätzlicher Abfall in der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$ . Die Relaxationszeit  $\tau_F$  des Abfalls beinhaltet die Assoziationsrate  $k_1$  und die Dissoziationsrate  $k_{-1}$  des Fluorophors und des Löschmoleküls (Gleichung 2.23).

$$\tau_F = 1/(k_1 + k_{-1}) \quad 2.23$$

Bei Ringschlusskinetiken wird von einem Zweizustandsmodell ausgegangen, in dem das Fluorophor zwischen einem fluoreszierenden und einem dunklen Aus-Zustand wechselt. Für diesen Fall entspricht die Amplitude des Abfalls der Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}$ , für die gilt:

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad 2.24$$

Somit ist es möglich die Assoziations- und Dissoziationsrate von Moleküldynamiken zu bestimmen <sup>[15]</sup>.

Voraussetzung dafür ist das Einbringen eines Löschmoleküls und eines Fluorophors in das Molekül. Bei Proteinen kann das Tryptophan über ortsspezifische Mutagenese an der gewünschten Position eingebracht werden. Etwaige hinderliche native Tryptophane, d.h. diejenigen, die sich in Reichweite des Fluorophors befinden und mit diesem in Interaktion treten könnten, können durch genanntes Verfahren z.B. durch ein Phenylalanin ersetzt werden <sup>[37]</sup>. Nach jeder Mutagenese sollte stets die Funktion des Proteins überprüft werden. Eine gängige Methode um ein Fluorophor ortsspezifisch an ein Protein zu koppeln ist die Thiolmodifikation eines Cysteins. Dieses kann über die ortsspezifische Mutagenese in das Protein eingeführt werden. In einer Markierungsreaktion kann das Cystein kovalent über einen Linker an das Fluorophor gekoppelt werden. Bei Vorhandensein von nativen Cysteinen muss sichergestellt werden, dass nur das eingebrachte Cystein markiert wird. Bei der Wahl des Farbstoffes sollte auf die Photostabilität sowie die Helligkeit geachtet werden <sup>[15]</sup>.

Die Messung der modifizierten Proteine findet in wässrigen Puffern statt. Dabei sollte die Zugabe von organischen und chaotropen Substanzen vermieden werden, da diese die durch hydrophobe Kräfte getriebene  $\pi$ -gestapelte Komplexbildung zwischen Fluorophor und Löschmolekül verhindern <sup>[15]</sup>.



### 2.3.3 Zirkulardichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie)

Die CD-Spektroskopie ist eine oft eingesetzte Methode zur Strukturuntersuchung von Proteinen, Peptiden und DNS. Eingesetzt wird diese bei der Strukturaufklärung, Untersuchungen zu Konformationsänderungen, zur Thermodynamik der Faltung und Entfaltung, bei Interaktionsstudien von Molekülen und bei Faltungskinetiken <sup>[38]</sup>.

Licht kann nicht nur linear, sondern auch zirkular polarisiert sein. Bei zirkular polarisiertem Licht rotiert die Ausrichtung des elektrischen Feldes an einem bestimmten Punkt des Lichtstrahls mit der Zeit. Diese Rotation kann rechts- und linksherum auftreten, was als rechts- und linkszirkularpolarisiertes Licht bezeichnet wird <sup>[39, 40]</sup>.

Bei der CD-Spektroskopie wird der Unterschied  $\Delta A$  zwischen der Absorption von rechts- ( $A_R$ ) und linkszirkularpolarisiertem ( $A_L$ ) Licht gemessen (Gleichung 2.25). Dieser kann auch als Elliptizität  $\theta$  in Grad angegeben werden (Gleichung 2.26), wobei  $b$  und  $a$  die kleine und die große Achse der resultierenden Ellipse sind <sup>[38, 41]</sup>.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad 2.25$$

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad 2.26$$

Tritt ein Unterschied auf, spricht man von Zirkulardichroismus. Voraussetzung dafür ist die Chiralität von Strukturelementen in den zu untersuchenden Molekülen. Chiralität heißt, dass sich Bild und Spiegelbild einer Struktur durch Drehung im dreidimensionalen Raum nicht zur Deckung bringen lassen können. Dies trifft z.B. auf  $\alpha$ -Helices in Proteinen zu. Diese sind rechtsgängige Helices, da Proteine ausschließlich aus L- $\alpha$ -Aminosäuren aufgebaut werden <sup>[42]</sup>.

Als Lichtquelle in CD-Spektrometern wird meist eine Xenon-Lampe eingesetzt, die einen Spektralbereich von 178-1000 nm abdeckt. Um Schäden durch Ozonbildung an den optischen Bauteilen im Gerät zu verhindern, wird der Sauerstoff durch Stickstoffbegasung verdrängt. Für verlässliche Messungen muss die Probe homogen und frei von Partikeln sein. Des Weiteren sollte die optische Dichte (OD) der Probe im zu messenden Wellenlängenbereich nicht über eins liegen. Der Puffer sollte möglichst keine Absorption zeigen <sup>[38]</sup>.

Bei der Untersuchung der Proteinsekundärstruktur ist die Licht absorbierende molekulare Komponente im fernen UV-Bereich (180-260 nm) die Peptidbindung. Das CD-Spektrum in diesem Wellenlängenbereich gibt Informationen über den Sekundärstrukturgehalt. Die charakteristischen  $\alpha$ -Helixbanden liegen mit zwei Minima bei 222 nm und 208 - 210 nm und einem Maximum bei 190 nm.  $\beta$ -Faltblätter hingegen zeigen ein Minimum zwischen 216 – 218 nm und ebenso ein Maximum bei 190 nm <sup>[43]</sup>. Aufschluss über die Tertiärstruktur von Proteinen liefert der nahe UV-Bereich von 260-320 nm. In diesem Wellenlängenbereich absorbieren die aromatischen Aminosäuren <sup>[38, 42]</sup>.

CD-Spektren liefern eine Überlagerung der Signale der einzelnen Strukturelemente, die im untersuchten Protein vorhanden sind. Eine genaue Zuordnung der Strukturelemente zu Abschnitten im Protein ist nicht möglich. Eine weitergehende Analyse ist aber mit Hilfe von Dekonvolationsalgorithmen und Referenzdatenbanken durchführbar. Der Dichro-Web-Server fasst fünf dieser Algorithmen auf einer Oberfläche zusammen, mit Zugang zu verschiedenen Referenzdatensätzen <sup>[44, 45]</sup>.

In den Referenzdatenbanken befinden sich CD-Spektren von Proteinen bekannter Kristallstruktur. Eine gute Datenbank deckt einen großen spektralen Bereich ab, hat eine große strukturelle Vielfalt, verwendet eine hohe Proteinstrukturqualität, eine genaue Proteinkonzentrationsbestimmung und hat gute Kalibrierungsmethoden <sup>[46]</sup>. Eine der möglichen Referenzdatenbanken ist SP175 <sup>[47]</sup>. In dieser wurden die Proteine nach der CATH-Klassifikation (Class, Architecture, Topology, Homologous Superfamily) so ausgewählt, dass diese die Vielfalt an Sekundärstrukturen in der „Protein Data Bank“ (PDB) widerspiegeln.

Einer der Analysealgorithmen ist CDSSTR, entwickelt von Johnson <sup>[48]</sup>. Dieser benötigt für eine Analyse acht Referenzproteine, die zufällig aus einem Referenzset ausgesucht werden. Der Vorgang wird wiederholt und es entsteht eine große Anzahl an Kombinationen aus acht Proteinen deren Ergebnisse mit Hilfe des SVD Algorithmus (singular value decomposition) und fünf SVD Komponenten erhalten werden <sup>[46]</sup>.

## 2.3.4 Stopped-Flow Spektroskopie

Die Stopped-Flow Spektroskopie ist eine Technik, die es ermöglicht, die Geschwindigkeiten chemischer oder biologischer Reaktionen zu messen.

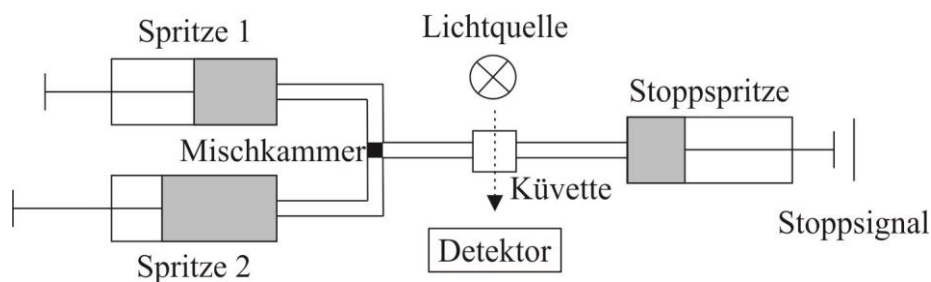


Abbildung 2.7: Stopped-Flow-Technik

Die Reaktionslösungen werden in den Spritzen 1 und 2 vorgelegt und gelangen über die Mischkammer in die Detektionsküvette, woraufhin der Fluss durch die Stoppspritze abrupt gestoppt wird und die Signaländerung über die Zeit verfolgt werden kann. Die Abbildung basiert auf Referenz <sup>[39]</sup>.

Die Reaktanten werden bei der Stopped-Flow Methode in verschiedenen Spritzen vorgelegt (Abbildung 2.7). Von dort gelangen diese in einem bestimmten Verhältnis über eine Mischkammer in die Detektionsküvette. Der Fluss wird durch einen Kolben nach der Detektionsküvette abrupt gestoppt und die Reaktion kann über die Zeit (ms bis s) anhand der Absorption, Fluoreszenz, Lichtstreuung oder des CD-Signals beobachtet werden. Die Zeitauflösung wird dabei durch die Effektivität des Mischvorganges und die Totzeit des Instrumentes bestimmt. Die Methode ist besonders interessant für biochemische Reaktionen, da nur kleine Volumina benötigt werden <sup>[49, 50]</sup>.

## 2.4 Proteine

### 2.4.1 Entstehung von Proteinen

Proteine bestehen aus L- $\alpha$ -Aminosäuren. Sie werden unterteilt in proteinogene und nicht proteinogene Aminosäuren. Erstere sind 20 Aminosäuren, die für den Aufbau von Proteinen benötigt werden. Darunter sind die essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren,

d.h. diejenigen, die nicht vom Organismus selbst hergestellt werden können und mit der Nahrung zugeführt werden müssen, und die, die selber synthetisiert werden können <sup>[1]</sup>.

Die Abfolge der Aminosäuren in einem Protein ist durch den genetischen Code, die Desoxyribonukleinsäure (DNS), festgelegt. Die DNS ist ein planares Molekül aus einem Zucker, einem Phosphat und einer von vier Basen, wovon Adenin (A) und Guanin (G) zu den Purinen und Thymin (T) und Cytosin (C) zu den Pyrimidinen gehören. Diese Einheit wird als Nukleotid bezeichnet <sup>[1]</sup>.

Während der Transkription wird die DNS in die „messenger“ Ribonukleinsäure (mRNS) umgeschrieben. Im Gegensatz zur DNS hat diese als Zucker keine Desoxyribose sondern eine Ribose, d.h. sie hat zusätzlich eine 2'-Hydroxylgruppe. Die Verknüpfung der Nukleotide kann also nicht nur 5'→3' erfolgen sondern auch 5'→2'. Dies ist von Bedeutung im Spliceprozess in Eukaryoten und macht die DNS stabiler gegenüber der RNS. Des Weiteren ist die Base Thymin durch Uracil (U) ersetzt <sup>[1]</sup>.

Die mRNS dient anschließend als Matrize während der Proteinsynthese, bezeichnet als Translation, am Ribosom. Hierbei transportiert die „transfer“ RNS (tRNS) aktivierte Aminosäuren zum Ribosom. Diese werden basierend auf der mRNS-Sequenz über Peptidbindungen, die auf Grund der Länge Doppelbindungscharakter haben, zwischen der  $\alpha$ -Carboxylgruppe und der  $\alpha$ -Aminogruppe der darauffolgenden Aminosäure verknüpft (Polarität: N-, C-terminus). Hierbei codieren immer drei Nukleotide, die ein Codon bilden, eine Aminosäure. Der Code ist nicht überlappend, aber degeneriert, d.h. die meisten Aminosäuren werden durch mehrere Codons dargestellt <sup>[1]</sup>.

### 2.4.2 Proteinstruktur

Die Proteinstruktur ist vorgegeben im genetischen Code, der sich in der Aminosäurenabfolge, der Primärstruktur, widerspiegelt. Die proteinogenen Aminosäuren haben sehr unterschiedliche Eigenschaften: apolar, polar und geladen, wodurch diese die Proteinstruktur maßgeblich beeinflussen können.

Die Sekundärstruktur von Proteinen ist gekennzeichnet durch Strukturelemente wie  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter,  $\beta$ -Kehre („Turn“) und ungeordnete Bereiche. In diesen Strukturmotiven ist eine Tendenz zu einer bestimmten Aminosäurezusammensetzung zu erkennen <sup>[51]</sup>.

Bei  $\alpha$ -Helices liegt das Proteinrückgrat im Inneren und die Seitenketten zeigen nach außen. Stabilisiert wird die Struktur durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) zwischen der CO-Gruppe an Position  $n$  in der Primärstruktur, die als H-Akzeptor fungiert, und der NH-Gruppe an Position  $n+4$ , dem H-Donor. Eine Drehung der Helix ist nach 3,6 Aminosäuren vollzogen. Da Proteine aus L-Aminosäuren bestehen, kommen in Proteinen ausschließlich rechtsgängige Helices vor <sup>[1]</sup>.

Im  $\beta$ -Faltblatt werden zwei oder mehrere nebeneinander liegende Aminosäurestränge durch H-Brücken stabilisiert. Dabei können die Stränge beim parallelen  $\beta$ -Faltblatt die gleiche oder beim antiparallelen die entgegengesetzte Orientierung haben. Bei Letzterem sind jeweils gegenüberliegende CO- und NH-Gruppen über H-Brücken verbunden, wobei beim parallelen  $\beta$ -Faltblatt die Carboxylgruppe mit einer zwei Reste weiter liegenden Aminogruppe verbunden ist <sup>[1]</sup>.

In der  $\beta$ -Kehre, auch als Haarnadelkurve bezeichnet, wird eine H-Brücke zwischen der Carboxylgruppe des Aminosäurerestes  $n$  und der Aminogruppe  $n+3$  ausgebildet und stabilisiert. Die  $\beta$ -Kehren liegen oft an der Oberfläche von Proteinen, genauso wie die in ihrer Struktur unregelmäßigen Schleifen <sup>[52]</sup>.

Die Anordnung, Stabilisierung und Ausrichtung der Sekundärstrukturelemente durch Disulfidbrücken und andere, z.B. elektrostatische, polare oder hydrophobe Wechselwirkungen, wird Tertiärstruktur genannt. Viele Proteine sind erst in einem Komplex aus mehreren Proteinen funktional, der als Quartärstruktur bezeichnet wird <sup>[1]</sup>.

### **2.4.3 Proteinfaltung**

Die Faltung von Proteinen in die richtige funktionale Konformation ist schon lange Gegenstand der Forschung. Eine fehlerhafte Faltung kann gravierende Folgen wie Alzheimer, Diabetes Typ II oder BSE haben <sup>[1, 53]</sup>.

Die Faszination der Proteinfaltung kommt schon 1969 im Levinthal Paradox <sup>[5]</sup> zum Ausdruck. In diesem postulierte Cyrus Levinthal, dass sich Proteine innerhalb von Mikrosekunden bis Sekunden in die richtige Konformation falten können. Wäre dies ein zufälliger Prozess, würde es „länger als die Entstehung des Universums“ dauern.

Für das Erreichen der funktionalen nativen Proteinstruktur gibt es unterschiedliche Modelle. Das Nukleationswachstumsmodell beschreibt die Faltung als sehr schnellen Prozess ohne detektierbare Zwischenzustände. Den Start der Faltung bedingt dabei die Entstehung eines Nukleationsursprunges, von dem aus sich die native Struktur bildet <sup>[6]</sup>. Nach dem Framework- und dem Diffusions-Kollisions-Modell hingegen bilden sich zuerst Sekundärstrukturen aus, die sich in einem nächsten Schritt zu einer kompakten Tertiärstruktur zusammenlagern. Beim Faltungsmodell des hydrophoben Kollaps nimmt das Protein auf Grund des hydrophoben Effektes zuerst eine kompakte Form an, wodurch die möglichen Konformationen eingeschränkt sind und so eine schnelle Faltung des Proteins in den nativen Zustand stattfinden kann <sup>[7]</sup>.

Die Faltung vieler Proteine kann jedoch besser über eine Kombination aus Framework- und hydrophoben Kollaps Modell beschrieben werden, dem Nukleations-Kondensations-Mechanismus. Dabei dient oft vorhandene Reststruktur in denaturierten Proteinen als Faltungsursprung. Daraus bilden sich Sekundärstrukturen, die durch weitreichende Wechselwirkungen (Tertiärinteraktionen) im Übergangszustand stabilisiert werden. Aus dem schon sehr strukturierten und kompakten Übergangszustand geht das Protein dann in den nativen Zustand über, der gekennzeichnet ist durch die niedrigste freie Energie („energy landscape theory“) <sup>[10]</sup>. Mit Hilfe dieses Modells kann sowohl die Zweizustandsfaltung von Proteinen über einen Übergangszustand, sowie auch die hierarchische Faltung erklärt werden. Bei letzterer sind die Sekundärstrukturen stabiler, sodass sich über verschiedene Zwischenzustände der native Zustand bildet <sup>[7, 54]</sup>.

Ein entscheidender Faktor bei der Proteinfaltung ist das Medium, in dem sich Proteine falten. Hierbei handelt es sich immer um wässrige Lösungen. Wasser ist ein polares kohäsives Lösungsmittel mit einer hohen Dielektrizitätskonstante. Dadurch kann eine Hydrathülle um geladene Moleküle gebildet werden, die das Protein stabilisieren. In Proteinen kommen nicht nur polare Seitenketten vor, sondern genauso unpolare. Unpolare Seitenketten können

jedoch nicht über Ionenbindungen oder H-Brücken mit dem Wasser in Wechselwirkung treten, was den Kontakt mit Wasser energetisch ungünstig ausfallen lässt. Deswegen spielt der hydrophobe Effekt eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung, d.h. die ungeladenen Seitenketten werden in das Innere des Proteins und die geladenen in das Äußere der Proteinstruktur gefaltet. Aus Sicht der Entropie ist diese Konformation günstiger, da die Wassermoleküle eine geordnetere Struktur um das entfaltete Protein einnehmen als um die gefaltete Struktur. Somit ist der zweite Hauptsatz der Thermodynamik erfüllt <sup>[1]</sup>.

## 2.4.4 Protein-Protein Assoziation

Bei der Protein-Protein Assoziation verbinden sich zwei oder mehrere Proteine zu einem funktionalen Proteinkomplex. Die meisten Proteine befinden sich bei der Assoziation bereits in der nativen Struktur. Eine Ausnahme bilden die intrinsisch ungeordneten Proteine (IDPs), die sich erst nach der Bindung des Liganden falten. Eventuell ermöglicht dies eine schnellere Bindung oder ist Teil der Zellfunktionsregulation <sup>[55]</sup>.

Das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ <sup>[12]</sup> der Protein-Protein Assoziation besagt, dass die Strukturen der interagierenden Proteine genau zueinander passen und dies eine Bindung ermöglicht. Dem gegenüber steht die „induced fit“ <sup>[13]</sup> Theorie, bei dem sich auf die Bindung des Liganden hin die funktionale Proteinkonformation bildet. Beide Modelle gehen von starren Proteinstrukturen aus und berücksichtigen nicht die für die Funktion wichtigen Dynamiken innerhalb von Proteinen. Anders jedoch das „conformational selection“ Modell, bei dem der Ligand aus allen existierenden Proteinkonformationen diejenige „aussucht“, an welche er binden kann und so eine Populationsverschiebung zu dieser Form bewirkt. Eventuell schließt sich daran noch ein „induced fit“ Schritt an <sup>[14]</sup>.

Die Geschwindigkeit der Protein-Protein Assoziation ist oft sehr wichtig. Eine schnelle Assoziation erhöht dabei die Bindungsaffinität des Proteinkomplexes. Dies ist auch möglich über eine langsame Dissoziationsrate, die allerdings häufig in Signalkaskaden nicht vorteilhaft sind <sup>[56, 57]</sup>. Protein-Protein Assoziationsraten liegen meistens in einem Bereich von  $10^3 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Die basale Ratenkonstante der Assoziation über Diffusion wurde von Smoluchowski auf  $6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bestimmt. Bei der Berechnung wurde indessen nicht be-

rücksichtigt, dass eine richtige Ausrichtung der Bindungspartner zueinander für eine Assoziation notwendig ist. Dadurch verlangsamt sich die basale Ratenkonstante auf  $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Proteinen können die Assoziationsrate jedoch, z.B. durch die richtige Orientierung der Bindungspartner, auf  $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  beschleunigen <sup>[56, 57]</sup>.

Bei der Protein-Protein Assoziation wird davon ausgegangen, dass sich zuerst in einem diffusionslimitierten Schritt ein Übergangskomplex bildet, der schon nahezu die native Ausrichtung und den Abstand der Moleküle zueinander hat. In einem zweiten reaktionskontrollierten Schritt werden weitere Bindungen ausgebildet und das restliche Wasser aus der oft hydrophoben Bindungsgrenzfläche verdrängt und schließlich der native Komplex gebildet (Gleichung 2.27). Ist die Rate  $k_b$ , mit welcher der Übergangskomplex  $A*B$  der Proteinassoziation in den nativen Komplex  $AB$  übergeht deutlich kleiner als die Dissoziationsrate  $k_d$ , mit welcher der Übergangskomplex wieder auseinander diffundiert, ist die Assoziation reaktionslimitiert. Im diffusionslimitierten Fall ist  $k_d$  der Übergangskomplexbildung deutlich kleiner als  $k_b$  und es bildet sich sofort der native Komplex <sup>[56]</sup>.



Zur Stabilisierung von Komplexen können hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Interaktionen, die Ausbildung von Salzbrücken, van-der-Waals Kräfte sowie H-Brücken beitragen <sup>[57]</sup>.

## 2.4.5 Dynamiken innerhalb von Proteinen

Lange Zeit wurde angenommen, dass Proteine starre Strukturen in ihrer nativen funktionalen Konformation sind. Diese Annahme wurde jedoch widerlegt durch die Betrachtung von Proteinstrukturen über die Zeit mit der Erkenntnis, dass Dynamiken innerhalb von Proteinen deren Funktion maßgeblich bestimmen <sup>[11]</sup>.

Die möglichen Konformationen, die ein Protein einnehmen kann, und die Energiebarrieren die diese voneinander trennen, können mit Hilfe eines multidimensionalen „energy landscape“ beschrieben werden <sup>[11, 58, 59]</sup>. Die Konformationsänderungen zwischen Strukturen mit



unterschiedlicher freier Energie finden dabei auf verschiedenen Zeitskalen statt. Dynamiken von großen Domänen im  $\mu\text{s}$ -Bereich und langsamer, sogenannte „tier-0“ Dynamiken, beschreiben Fluktuationen zwischen einer meist geringen Anzahl an Zuständen, die durch hohe Energiebarrieren voneinander getrennt sind. Innerhalb der „tier-0“ Zustände sind die Proteine jedoch nicht starr, sondern fluktuieren auf schnelleren Zeitskalen zwischen einer großen Anzahl an Zuständen, getrennt durch geringe Energiebarrieren. Dabei gibt es die „tier-1“ Dynamiken, die Ring- bzw. Schleifenbewegungen im Protein im ns-Bereich beschreiben. Des Weiteren existieren atomare Fluktuationen, wie z.B. Seitenkettenrotationen. Diese finden im ps-Bereich statt und werden als „tier-2“ Dynamiken deklariert. Bindungsschwingungen im fs-Bereich und andere Bewegungen auf schnelleren Zeitskalen werden höheren „tier“ Zuständen zugeordnet <sup>[11, 58]</sup>.

Die Schwierigkeit bei der Beschreibung von Dynamiken innerhalb von Proteinen besteht jedoch darin, die durch die Struktur vorgegebenen Bewegungen und die daraus resultierenden Zustände zu identifizieren und festzustellen, ob diese die Funktion des Proteins beeinflussen. Dies gestaltet sich einfacher, wenn die Funktion des Proteins bereits bekannt ist <sup>[60]</sup>.

## **2.5 Untersuchte Proteine**

### **2.5.1 Die Bindungsdomäne eines Multienzymkomplexes – BBL**

BBL gehört zu der Familie der peripheren Untereinheitsbindungsdomänen (englisch: peripheral subunit-binding domain, PSBD) des 2-oxo-acid Dehydrogenasekomplexes <sup>[61]</sup>. Dieser Multienzymkomplex, der 2012 Molekül des Monats der PDB war <sup>[62]</sup>, verbindet die Glykolyse mit dem Citratzyklus durch Umsetzung von Pyruvat in Acetyl-Coenzym-A, Kohlendioxid und NADH(H<sup>+</sup>) <sup>[63]</sup>. Zusammengesetzt ist der Multienzymkomplex aus drei wesentlichen katalytischen Komponenten: der Pyruvatdehydrogenase (E1), der Dihydroliipoamidacetyltransferase (E2), und der Dihydroliipoamiddehydrogenase (E3) <sup>[63]</sup> (siehe Abbildung 2.8 A). Die Bindungsdomäne BBL hat in dem Enzymkomplex die Funktion die E3 an die ikosaedrische E2 zu binden <sup>[64]</sup>.

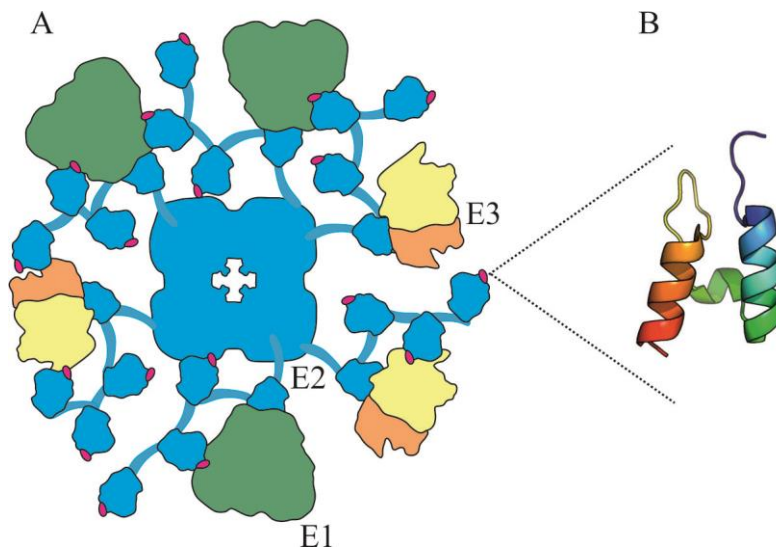


Abbildung 2.8: 2-oxo-acid Dehydrogenasekomplex mit der Bindungsdomäne BBL

(A) Der 2-oxo-acid Dehydrogenasekomplex (die Abbildung basiert auf Referenz <sup>[62]</sup>) bestehend aus drei verschiedenen Enzymen (E1, E2, E3), verbunden zu einem großen funktionalen Komplex. Die Bindungsdomäne BBL ist in pink dargestellt und verbindet E3 mit E2. (B) Kristallstruktur von BBL (pdb: 2bth).

Die aus mesophilen Bakterien stammende und 47 Reste lange, sich ultraschnell faltende Bindungsdomäne BBL ist aus zwei  $\alpha$ -Helices aufgebaut, die über eine Schleife verbunden sind (siehe Abbildung 2.8 B). Bezüglich des Mechanismus der Faltung in die native Konformation gibt es zwei postulierte Wege, die hochkontrovers diskutiert werden. Der erste beschreibt die Faltung als abwärtsgerichteten Prozess („downhill folding“), bei dem der Strukturanteil in BBL vom denaturierten bis hin zum nativen Protein kontinuierlich zunimmt <sup>[65, 66]</sup>. Für diese Theorie spricht eine große Spanne an gemessenen Schmelztemperaturen  $T_m$  in thermischen Denaturierungsexperimenten <sup>[65]</sup>. Der zweite beschreibt BBL als Protein, das über einen kooperativen Zweizustandsmechanismus faltet <sup>[61, 67, 68]</sup>. Hierbei entsteht über den Nukleationskondensationsprozess ein strukturierter Zwischenzustand von dem aus das ultraschnelle Faltungsprotein BBL in den nativen Zustand gelangt. Dies belegen Einzelmolekülexperimente <sup>[69]</sup>, da sich ein Gleichgewicht zwischen dem nativen und denaturierten Protein, getrennt über die Energiebarriere des Zwischenzustandes, einstellt, was ein Hinweis auf die Kooperativität des Faltungsmechanismus ist.

Das ultraschnelle Faltungsprotein BBL wechselt innerhalb von 3-5  $\mu$ s in den nativen Zustand. Für die hohe Geschwindigkeit könnte die Reststruktur im entfalteten Protein verantwortlich sein <sup>[61, 70]</sup>.

## 2.5.2 Die N-terminale Domäne eines Spinnenseidenproteins

Die Spinnenseidenfaser gehört zu den stärksten bekannten Naturstoffen. Diese vereint hohe Reißfestigkeit mit Elastizität bei sehr geringem Gewicht. Diese Eigenschaften machen die Spinnenseidenfaser hoch interessant für die Materialforschung <sup>[71, 72]</sup>.

Die Spinnenseidenfaser setzt sich aus Proteinen, den sogenannten Spidroins, die aus einem mittleren Segment und den zwei flankierenden terminalen Domänen bestehen, zusammen. Dem mittleren Teil werden die mechanischen Eigenschaften zugeordnet. Dieser besteht aus etwa 3500 Resten aus sich wiederholenden poly A und poly GA Sequenzen, die durch GGX oder GPGXX Wiederholungen separiert werden. Dieser Teil der Spinnenseidenfaser variiert je nach Faserart und Spinnenspezies, wohingegen die terminalen Domänen hochkonserviert sind und für die Wasserlöslichkeit und die Ausbildung des Seidenfadens verantwortlich sind <sup>[73-75]</sup>.

Spinnen können bis zu sieben verschiedene Fasertypen mit unterschiedlichen Eigenschaften herstellen. Diese werden nach der Drüse benannt, in der die Spidroins sekretiert werden, z.B. MaSP1 für „Major ampullate Spidroin 1“ <sup>[76]</sup>. Nach der Sekretion werden die Spidroins in der Ampulla in Konzentrationen von bis zu 50 % (w/v) gespeichert. Dabei lagern sich diese in micellenartigen Strukturen zusammen, wobei die polaren terminalen Domänen außen und der repetitive Mittelteil im Inneren angeordnet sind. Die C-terminalen Domänen (CTD), bestehend aus etwa 110 Resten, sind hier in paralleler Ausrichtung über Disulfidbrücken mit je einer weiteren CTD zu Dimeren verbunden (Abbildung 2.9). Bei Bedarf an Spinnenseidenfaser gelangen die Spidroins aus der Ampulla in den Spinnkanal. Direkt am Anfang des Kanals fällt der pH-Wert von sieben auf sechs ab und erreicht gegen Ende pH 5. Des Weiteren ändert sich die Salzzusammensetzung: Natriumchlorid wird durch Kalium- und Phosphationen ersetzt. Diese Veränderungen bewirken, dass die N-terminale Domäne (NTD, ~ 130 Reste) in antiparalleler Orientierung dimerisiert (Abbildung 2.10)

[77]. Die Anordnung der NTDs zueinander resultiert aus einem makromolekularen Dipol, der parallel zu den  $\alpha$ -Helices, auf Grund der Verteilung der geladenen Aminosäuren auf gegenüberliegende Seiten, entsteht [78]. Der Assoziationsprozess wird über einen „Trap-and-Trigger“ Mechanismus [79] und einen Dreistufenprozess [80] beschrieben.

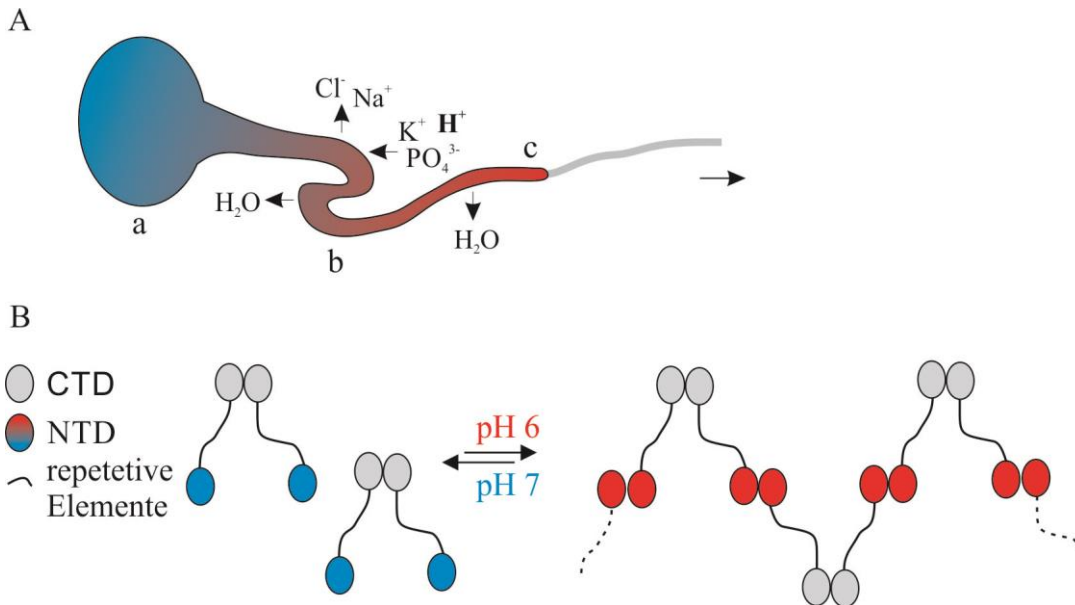


Abbildung 2.9: Ausbildung des Spinnenseidenfadens auf Grund der Assoziation der NTD

(A) Die Spidroine werden in der Ampulla (a) der Spinndrüse gelagert. Von dort gelangen diese bei Bedarf an Spinnseidenfaser in einen sich verjüngenden Kanal (b), in dem sich die Salzzusammensetzung ändert, Scherkräfte wirken und der pH-Wert von pH 7 (blau) auf pH 6 (rot) sinkt. Das Ende des Kanals (c) verlassen die Spidroine als feste Spinnseidenfaser (graue Linie). (B) Spidroine bestehen aus großen zentralen repetitiven Elementen und einer C-terminalen (CTD) und N-terminalen (NTD) Domäne. Bei pH 7 (blau) liegen die CTDs als permanente parallele Dimere vor, während die NTDs ungebunden sind. Bei dem Wechsel des pH-Wertes auf pH 6 (rot) dimerisieren die NTDs in antiparalleler Orientierung.

Neben den Änderungen im pH-Wert und der Salzzusammensetzung im Spinnkanal wird der Lösung Wasser entzogen und es wirken Scherkräfte auf die Spidroine, was zur Ausbildung des kompletten Spinnseidenfadens führt. Die Scherkräfte bewirken, dass der repetitive Mittelteil der Spidroine seine zufällige Anordnung („random coil“) in unlösliche  $\beta$ -Faltblätter ändert. Zur Vorausrichtung dienen dabei die dimerisierten CTDs, deren Disulfidverbindungen bei diesem Prozess gelockert werden [81].

Von großem Interesse bei dem Spinnprozess ist die NTD, der sogenannte pH-Schalter, da dieser eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Faser zu haben scheint. Die NTD besteht

aus fünf  $\alpha$ -Helices. Die Bindungskontaktfläche bilden Helices zwei, drei und fünf. Die geladenen Aminosäuren sind hauptsächlich hier lokalisiert <sup>[77, 78]</sup>.

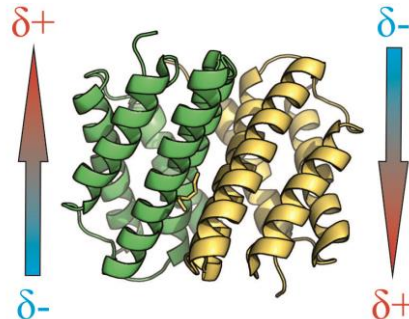


Abbildung 2.10: Kristallstruktur der Spinnenseiden-NTD

Die NTD dimerisiert auf eine pH-Änderung von 7 auf 6 hin in anti-paralleler Orientierung auf Grund der entgegengesetzten Ladungsverteilung ( $\delta^+$ ,  $\delta^-$ ). Die monomeren Kristallstrukturen der NTDs sind in grün und gelb dargestellt (pdb: 3lr2).

### 2.5.3 Die Ligandenbindungsdomäne eines Glutamatrezeptors

Glutamatrezeptoren (GluR) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die hauptsächlich im Nervensystem exprimiert werden. Dort wird die schnelle, exzitatorische synaptische Signalweiterleitung überwiegend durch Glutamat vermittelt. Dieses wird an der Präsynapse freigesetzt und bindet postsynaptisch an einen GluR, woraufhin ein von diesem gesteuerter kationenselektiver Kanal öffnet und die postsynaptische Zelle depolarisiert. Die Aktivierung der glutamatgesteuerten Membranrezeptoren wird mit Lernprozessen und Erinnerungsvorgängen in Verbindung gebracht. Bei Fehlfunktion der GluRs treten Krankheiten wie Epilepsi, Parkinson und Alzheimer auf <sup>[82-85]</sup>.

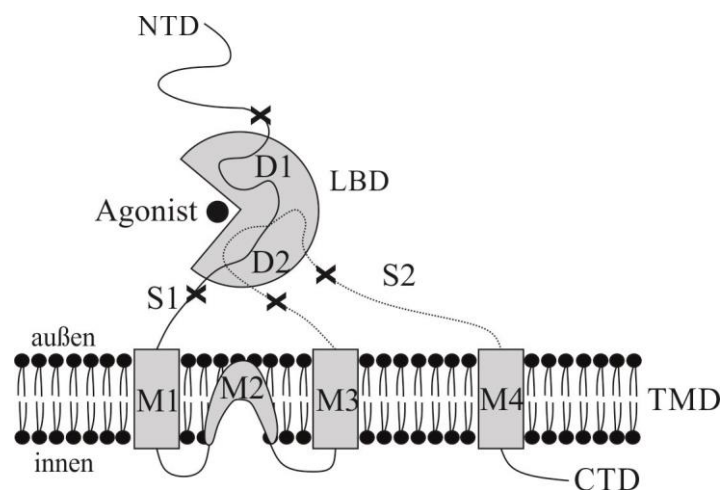


Abbildung 2.11: Schematischer Aufbau von GluRs

GluRs bestehen aus drei Transmembrandomänen (M1, M3, M4), einer in die Membran ragenden Schleife (M2), die den Ionenkanal bildet, der N-terminalen Domäne (NTD), der C-terminalen Domäne (CTD) und der Ligandenbindungsdomäne (LBD). Letztere wird aus der S1 und der S2 Schleife gebildet. Die schwarzen Kreuze kennzeichnen die Schnittstellen, um die isolierte LBD, bestehend aus den Domänen D1 und D2, zu erhalten. Die Abbildung basiert auf Referenz <sup>[85]</sup>.

GluRs werden abhängig von deren Spezifität in drei Kategorien eingeteilt: die AMPA- ((S)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure) (GluR1-4), die Kainate- ((2S,3S,4S)-3-(Carboxymethyl)-4-prop-1-en-2-ylpyrrolidin-2-carboxysäure) (GluR5-7) und die NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) (GluN1-3) <sup>[83]</sup>. Jeder der GluRs ist aus drei Transmembrandomänen (M1, M3, M4), einem von der intrazellulären Seite in die Membran ragenden Schleife (M2), die den Ionenkanal bildet, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus aufgebaut (Abbildung 2.11). Vier dieser Strukturen lagern sich zu einem Dimer aus Dimeren, einem tetrameren Gesamtrezeptor, zusammen (Abbildung 2.12 A) <sup>[86]</sup>. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) liegt extrazellulär und wird von zwei globulären Domänen, S1 und S2, gebildet. Die S1 ist zwischen der N-terminalen Domäne (NTD) und M1 lokalisiert, die S2 in der Schleife zwischen M3 und M4. Die Funktion der NTD ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden, diese ist aber vermutlich von regulatorischer Natur <sup>[83, 85, 87]</sup>.

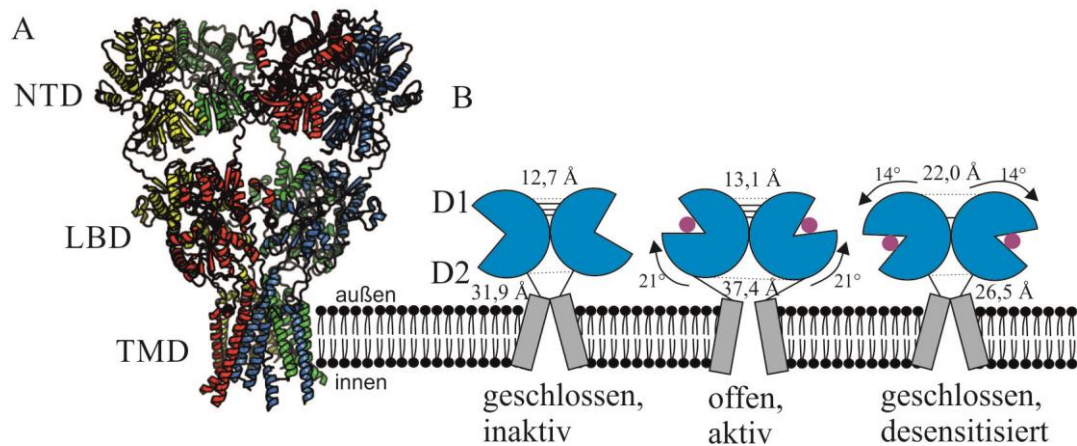


Abbildung 2.12: Aktivierung des GluR2

(A) Kristallstruktur des tetrameren GluR2 (pdb: 3kg2), bestehend aus der Transmembrandomäne (TMD), der Ligandenbindungsdomäne (LBD) und der N-terminalen Domäne (NTD) (B) Bei der Aktivierung des Rezeptors bindet L-Glu (pinkere Kreis) an die D1, woraufhin sich die LBD durch eine Aufwärtsbewegung der D2 schließt und der aktivierte Rezeptor den Ionenkanal öffnet. Bei anhaltender Bindung des L-Glu geht der Rezeptor durch Abwärtsbewegung der D1 und Umordnung der Dimerkontakfläche in einen geschlossenen desensibilisierten Zustand über. Aus der offenen aktiven Form kann der Rezeptor durch Freisetzung des L-Glu jedoch auch in die geschlossene inaktive Konformation übergehen. Der Übersicht halber wurde die NTD nicht dargestellt. Die Abbildung basiert auf Referenz <sup>[85]</sup>.

Die Ligandenbindungsstelle der LBD liegt in einer Tasche zwischen der D1 und der D2 Domäne. Die unterschiedlichen Affinitäten der LBDs für bestimmte vollständige Agonisten, partielle Agonisten und Antagonisten werden durch Aminosäuren an Schlüsselpositionen in der Bindungstasche festgelegt. Bindet Glutamat an die Ligandenbindungsstelle, bewegt sich die D2 Domäne in Richtung der D1 Domäne und die LBD nimmt eine geschlossene Konformation ein, woraufhin sich die Kanalpore öffnet (Abbildung 2.12 B). Der geschlossene Zustand wird nicht nur durch die Ligandenbindung stabilisiert, sondern auch durch Wechselwirkungen zwischen den Domänen. Aus der offenen aktiven Konformation kann der Rezeptor durch die Freisetzung des L-Glu wieder in die geschlossene inaktive Form oder durch anhaltende Bindung des L-Glu und die Veränderung der Dimerverbindungen durch die Abwärtsbewegung der D1 in die geschlossene desensibilisierte übergehen. Bei der Desensibilisierung wird die Bindung von L-Glu mit der Aktivierung entkoppelt <sup>[85, 88, 89]</sup>.

Die GluRs sind Membranproteine, wodurch sich diese als Gesamtrezeptor nur schwer in Lösung exprimieren lassen. Zur isolierten Betrachtung der LBD (Abbildung 2.13) wurde

die Sequenz der S1 Domäne über eine Verknüpfungssequenz direkt an die S2 Domäne kloniert (Abbildung 2.11). Die so gesondert exprimierbare LBD verfügt über die gleichen Ligandenbindungseigenschaften wie der Gesamtrezeptor <sup>[89]</sup>.

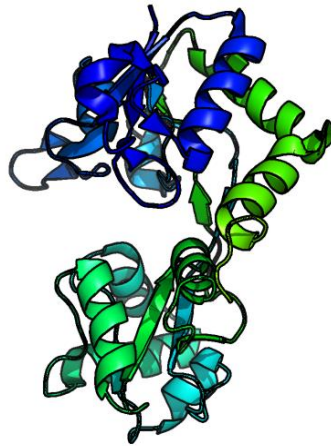


Abbildung 2.13: Kristallstruktur der GluR2-LBD

Kristallstruktur der isolierten GluR2-LBD in der apo-Form (pdb: 1fto).



## 3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Probenherstellung sowie die verwendeten Messinstrumente mit der dazugehörigen Probenpräparation und der Datenauswertung beschrieben. Alle Reagenzien, die keine Herstellerkennzeichnung aufweisen, wurden bei Sigma erworben.

### 3.1 Synthese der isolierten Proteindomänen

In diesem Abschnitt wird die Proteinexpression und –aufreinigung von BBL, der Spinnenseiden-NTD und der GluR2-LBD, sowie die spezifische Farbstoffkopplung an die Proteine beschrieben. Die Protokolle der Kulturmedien, Primersequenzen sowie Chromatogramme und Proteingele der einzelnen Aufreinigungsschritte befinden sich im Anhang (Kapitel 10.1, Kapitel 10.3, Kapitel 10.4).

#### 3.1.1 Proteinexpression, -aufreinigung und Farbstoffmarkierung der Bindungsdomäne BBL

Der modifizierte pRSET-A Vektor (Invitrogen) wurde über Hitzeschocktransformation (Kapitel 10.2) in Bakterien des kompetenten *E. coli*-stammes C41 (DE3) (GeneArt, Life Technologies) eingebracht und auf 2-fach Trypton-Hefe (2TY)-Ampicillin (Amp)-Kulturplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Vektor enthält das Gen von BBL aus *E. coli* mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, gefolgt von dem Fusionsprotein GroEl und einer Thrombinschnittstelle. 100 ml 2TY-Startkulturen mit 100 µg/ml Amp (Melford) wurden durch Inokulation einer Bakterienkolonie angesetzt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die 800 ml 2TY-Hauptkulturen mit 100 µg/ml Amp wurden durch Inokulieren von 8 ml Startkultur angesetzt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 im Schüttelinkubator inkubiert, woraufhin die Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; Melford) erfolgte und die Absenkung der Temperatur auf 18 °C für ~ 20 h. Das Bakterienpellet wurde durch Abzentrifugation für 10 min bei

5000 rpm erhalten und anschließend für die Ultraschallhomogenisierung (10 s Puls, 20 s Pause, Gesamtpulsdauer: 2:30 min; QSONICA) in Nickel-Nitrilotriessigsäure- (Ni-NTA) Chromatographiepuffer (50 mM Phosphat (Pi), 30 mM Imidazol, pH 8) mit Lysozym (0,3 mg/ml), einer Ethylendiamintetraacetat (EDTA) freien Proteaseinhibitortablette (Roche) und DNase (20 µg/ml) resuspendiert. Nach dem Bakterienaufschluss wurde das Homogenisat für 1 h bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde über die Ni-NTA Chromatographie (Ni Sepharose 6 Fast Flow; GE Healthcare) aufgereinigt (Elutionspuffer: 50 mM Pi, 300 mM Imidazol, pH 8), gefolgt vom Thrombinverdau über Nacht bei Raumtemperatur zur Entfernung des His<sub>6</sub>-Tag. Die Probe wurde 1:10 mit Wasser verdünnt, der pH-Wert auf 6 eingestellt und 5 mM Dithiothreitol (DTT; Melford) hinzupipettiert für die anschließende Kationenaustauschchromatographie (HS/20 16x100; Poros, Gradient: in 20 min auf 30 % Puffer B; Puffer A: 20 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), pH 6, 1 mM DTT; Puffer B: 20 mM MES, Ionenstärke (IS) 1 M Natriumchlorid (NaCl), 1 mM DTT). Protein-haltige Fraktionen wurden gefriergetrocknet und für die folgende Größenausschlusschromatographie (SEC; HiLoad 26/60 Superdex 30 Säule, GE Healthcare) in 5 ml Wasser mit 5 mM DTT aufgenommen. Der SEC-Puffer (200 mM Ammoniumbicarbonat) wurde mit Argon begast. Es folgte eine erneute Gefrier Trocknung mit anschließender Lagerung bei -20 °C. Die Einzelpunktmutanten (Abbildung 3.1) wurden nach dem QuikChange Mutageneseprotokoll von Stratagene hergestellt.

Für die Farbstoffkopplung wurden die Cysteinmutanten in 50 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) pH 7,5 mit 6 M Guanidiniumchlorid (GndCl), einem 5-fach molaren Überschuss an Farbstoff ATTO Oxa11 (ATTO TEC) und 10-fach molaren Überschuss an Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Farbstoffgekoppeltes Protein wurde von freiem Fluorophor über eine SEC (Sephadex G25; GE Healthcare) isoliert, gefriergetrocknet und über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Puffer A: Wasser (H<sub>2</sub>O), 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA); Puffer B: Acetonitril, 0,1 % TFA; Methode: in 30 min auf 30 % Puffer B, dann in 35 min auf 47,5 % Puffer B; Kinetex 2.6u PFP 100A, Phenomenex) erneut aufgereinigt. Eine Überprüfung der Identität der einzelnen Punktmutanten fand über Massenspektrometrie statt.

GSQNNDALSPAIRRLLAEHNLDASAIKGTGVGGRLTREDVEKHLAKA	wildtyp BBL
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	A130C_L158G_H166W
GSQNNDC <sup>A</sup> SPAIRRLLAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	L131A
GSQNNDC <sup>L</sup> G <sup>P</sup> PAIRRLLAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	S132G
GSQNNDC <sup>L</sup> SP <sup>G</sup> IRRLLAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	A134G
GSQNNDC <sup>L</sup> SPA <sup>A</sup> RRLLAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	I135A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPA <sup>V</sup> RRLLAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	I135V
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRR <sup>A</sup> LAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	L138A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRR <sup>A</sup> LAEHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	L139A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLL <sup>G</sup> EHNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	A140G
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> ANLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	H142A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HN <sup>A</sup> DASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	L144A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLD <sup>S</sup> AIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	A146G
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDAS <sup>G</sup> IKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	A148G
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASA <sup>V</sup> KGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	I149V
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIK <sup>G</sup> AGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	T152A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIK <sup>G</sup> SGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	T152S
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIKGTG <sup>G</sup> GGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> LAKA	V154G
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> A <sup>R</sup> EDVEK <sup>W</sup> LAKA	T159A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> S <sup>R</sup> EDVEK <sup>W</sup> LAKA	T159S
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TRED <sup>A</sup> EK <sup>W</sup> LAKA	V163A
GSQNNDC <sup>L</sup> SPAIRRLLA <sup>E</sup> HNLDASAIKGTGVGGR <sup>G</sup> TREDVEK <sup>W</sup> A <sup>A</sup> KA	L167A

Abbildung 3.1: Mutationen in BBL

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von BBL im Einbuchstabencode. In Rot markiert sind die Einzelpunktmutationen A130C, L158G und H166W, die in jeder der weiteren Einzelpunktmutanten (blau) enthalten waren.

### 3.1.2 Proteinexpression, -aufreinigung und Farbstoffmarkierung der N-terminalen Domäne eines Spinnenseidenproteins

Der modifizierte pRSET-A Vektor (Invitrogen) wurde über Hitzeschocktransformation (Kapitel 10.2) in Bakterien des kompetenten *E. coli*-stammes C41 (DE3) (GeneArt, Life Technologies) eingebracht und auf 2TY-Amp-Kulturplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Vektor enthält das Gen der NTD des Spidroin 1 der großen ampullenförmigen Drüse der Raubspinne *E. australis* mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, gefolgt von einer Thrombinschnittstelle. 100 ml 2TY-Startkulturen mit 100 µg/ml Amp (Melford) wurden durch Inokulation einer Bakterienkolonie angesetzt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die 800 ml 2TY-Hauptkulturen mit 100 µg/ml Amp wurden durch Inokulieren von 8 ml Startkultur angesetzt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 im Schüttelinku-

bator inkubiert, woraufhin die Induktion mit 1 mM IPTG (Melford) erfolgte und die Absenkung der Temperatur auf 18 °C für ~ 20 h. Das Bakterienpellet wurde durch Abzentrifugation für 10 min bei 5000 rpm erhalten und anschließend für die Ultraschallhomogenisierung (10 s Puls, 20 s Pause, Gesamtpulsdauer: 2:30 min, QSONICA) in Ni-NTA Puffer (50 mM Pi, 30 mM Imidazol, pH 8) mit Lysozym (0,3 mg/ml) und DNase (20 µg/ml) resuspendiert. Nach dem Bakterienaufschluss wurde das Homogenisat für 1 h bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde über die Ni-NTA Chromatographie (Ni Sepharose 6 Fast Flow; GE Healthcare) aufgereinigt (Elutionspuffer: 50 mM Pi, 300 mM Imidazol, pH 8), gefolgt vom Thrombinverdau zur Entfernung des His<sub>6</sub>-Tag für 2 h bei 37 °C und anschließender Dialyse (Dialysierschlauch, Spectra/Por 7 RC, MWCO: 1000) über Nacht im Ionenaustauschpuffer (Puffer A: 20 mM MES, pH 6; bei IE: 1 mM DTT (Melford)). Nach Filtration (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, Berrytec) des Dialyseproduktes und der Zugabe von 5 mM DTT wurde eine Anionenaustauschchromatographie (Puffer B: 20 mM MES, IS 1 M (NaCl), 1 mM DTT; HQ/20 16x100, Poros; Gradient: in 24 min auf 40 % Puffer B) durchgeführt und nachfolgend eine Gefriertrocknung ausgewählter Fraktionen. Das gefriergetrocknete Protein wurde in 5 ml Wasser mit 5 mM DTT aufgenommen, filtriert und eine Größenausschlusschromatographie (Puffer: 200 mM Ammoniumbicarbonat; HiLoad 26/60 Superdex 75 Säule, GE Healthcare) durchgeführt, währenddessen der Puffer mit Argon begast wurde. Es folgte eine erneute Gefriertrocknung mit anschließender Lagerung bei -20 °C. Die Einzelpunktmutanten (Abbildung 3.2) wurden nach dem QuikChange Mutageneseprotokoll von Stratagene hergestellt.

<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIAQSMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	wildtyp NTD
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	Q50C
<p>                     GSGNS <b>A</b>TTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	H6A
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLA <b>Q</b>NFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	E17Q
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQL <b>N</b>DMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	D39N
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLD <b>N</b>MSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	D40N
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQ <b>A</b>TSPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	R60A
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSN <b>A</b>LQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	K65A
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMA <b>Q</b>IAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	E79Q
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAA <b>S</b>EGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	E84Q
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAA <b>S</b>EGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	E85Q
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSL <b>S</b>T <b>A</b>TSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	K93A
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFIN <b>Q</b>ITQLVSMFAQAGMNDVSA                 </p>	E119Q
<p>                     GSGNSHTTPWTPNPLAENFMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIA <b>C</b>SMVQSIQSLAAQGRTPSNKLQA                      LNMAFASSMAEIAASEEGGSLSTKTSSIASAMSN AFLQTTGVVNQPFINEITQLVSMFAQAGM <b>N</b>VSA                 </p>	D134N

Abbildung 3.2: Mutationen in der NTD

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der NTD im Einbuchstabencode. In Rot markiert ist die Einzelpunktmutation Q50C, die in jeder der weiteren Einzelpunktmutanten (blau) enthalten war.

Für die Farbstoffkopplung wurden die Cysteinmutanten in 50 mM MOPS pH 7,5 mit 6 M GndCl, einem 10-fach molaren Überschuss an Farbstoff und 10-fach molaren Überschuss an TCEP für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Farbstoffgekoppeltes Protein wurde von freiem Fluorophor über eine SEC (Sephadex G25; GE Healthcare) isoliert.

Tabelle 1: Verwendete Farbstoff-Maleimide

Farbstoff	Abs / Em [nm]	Extinktionskoeffizient [ $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Hersteller
Alexa 488	499 / 519	71000	life technologies
Alexa 594	590 / 617	90000	life technologies
Cy 3	549 / 562	150000	GE Healthcare

Farbstoff	Abs / Em [nm]	Extinktionskoeffizient [ $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Hersteller
Cy 3b	559 / 570	130000	GE Healthcare
Cy 5	647 / 664	250000	GE Healthcare
ATTO 532	532 / 553	115000	ATTO-TEC
ATTO 565	563 / 592	120000	ATTO-TEC
ATTO Oxa11	663 / 684	125000	ATTO-TEC
ATTO 647N	644 / 669	150000	ATTO-TEC

### 3.1.3 Proteinexpression, -aufreinigung und Farbstoffmarkierung der Ligandenbindungsdomäne des Glutamatrezeptors 2

Der modifizierte pET-22b Vektor (Dr. Ingo Greger, Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, UK Cambridge) wurde über Hitzeschocktransformation (Kapitel 10.2) in Bakterien des kompetenten *E. coli*-stammes Origami 2 (DE3) (GeneArt, Life Technologies) eingebracht und auf Luria-Bertani (LB)-Amp-Kulturplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Vektor enthält das Gen der GluR2-flip-LBD aus *R. norvegicus* mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, gefolgt von einer Thrombinschnittstelle. 100 ml Terrific Broth (TB)-Startkulturen mit 100 µg/ml Amp (Melford) wurden durch Inokulation einer Bakterienkolonie angesetzt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die 800 ml TB-Hauptkulturen mit 100 µg/ml Amp wurden durch Inokulieren von 8 ml Startkultur angesetzt und erst bei 30 °C für 2 h und anschließend bei 18 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 im Schüttelinkubator inkubiert, woraufhin die Herunterkühlung der Kolben im Eisbad, die Induktion mit 0,4 mM IPTG (Melford) und die Absenkung der Temperatur auf 18 °C für ~ 20 h erfolgten. Das Bakterienpellet wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 5000 rpm in der vorgekühlten Zentrifuge erhalten und anschließend für die Ultraschallhomogenisierung (5 s Puls, 20 s Pause, Gesamtpulszeit: 2:30 min, QSONICA) in Ni-NTA Puffer (20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazol, 0,5 M (NaCl), 1 mM L-Glutaminsäure (L-Glu),

pH 8) mit Zugabe von Lysozym (0,3 mg/ml), DNase (40 µg/ml), Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>, 1 mM), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM) und einer EDTA freien Proteaseinhibitortablette (Roche) resuspendiert. Nach dem Bakterienaufschluss wurde das Homogenisat für 1 h bei 15000 rpm in einem vorgekühlten Rotor zentrifugiert. Das Lysat wurde über die Ni-NTA Chromatographie (Ni Sepharose 6 Fast Flow; GE Healthcare) aufgereinigt (Eluationspuffer: 20 mM Tris-HCl, 500 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 1 mM L-Glu, pH 8), gefolgt vom Thrombinverdau über Nacht bei 4 °C zur Entfernung des His<sub>6</sub>-Tag. Nach Filtration der Proteinlösung folgte eine auf 4 °C gekühlte Größenausschlusschromatographie (20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 150 mM NaCl, 1 mM L-GLu, pH 7,5; HiLoad 26/60 Superdex 75 Säule, GE Healthcare) währenddessen der Puffer mit Argon begast wurde. Das Protein wurde in einem Zentrifugalkonzentrator (Viva Spin 20, 10 kDa, Sartorius) konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -20 °C gelagert. Die Einzelpunktmutanten (Abbildung 3.3) wurden nach dem QuikChange Mutageneseprotokoll von Stratagene hergestellt.

Eine Entfernung des L-Glu aus dem Puffer erfolgte über eine Dialyse (Slide-A-Lyzer, 10 kDa, Thermo SCIENTIFIC) in SEC-Puffer ohne L-Glu bei 4 °C mit mehrmaligem Pufferwechsel.

Für die Farbstoffkopplung wurden die Cysteinmutanten in 50 mM MOPS pH 7,5, einem etwa 6-fach molaren Überschuss an Farbstoff (ATTO Oxa11, ATTO TEC) und 10-fach molaren Überschuss an TCEP für 3 h bei 4 °C inkubiert. Farbstoffgekoppeltes Protein wurde von freiem Fluorophor über eine SEC (Sephadex G25; GE Healthcare) isoliert.



```
GANKTVVVTTILESPYVMMKKNHEMLEGNERYEGYCVDLAAEIAKHCGFKYKLTIVGDG
KYGARDADTKIWNGMVGELVYGKADIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKGTPIE
SAEDLSKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRSKIAVFDKMWTYMRSAEPSVFFVRTTAEGVARVRK wildtyp LBD
SKGKYAYLLESTMNEYIEQRKPCDTMKVGGNLDKSGYGIATPKGSSLGNVNLAVLKLNE
QGLLDKLNKWWYDKGECGS

GANKTVVVTTILESPYVMMKKNHEMLEGNERYEGYCVDLAAEIAKHCGFKYKLTIVDG
KYGARDADTKIWNGMVGELVYGKADIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKGTPIE
SAEDLSKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRSKIAVFDKMWTYMRSAEPSVFFVRTTAEGVARVRK G57C
SKGKYAYLLESTMNEYIEQRKPCDTMKVGGNLDKSGYGIATPKGSSLGNVNLAVLKLNE
QGLLDKLNKWWYDKGECGS

GANKTVVVTTILESPYVMMKKNHEMLEGNERYEGYCVDLAAEIAKHCGFKYKLTIVDG
KYGARDADTKIWNGMVGELVYGKADIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKGTPIE
SAEDLSKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRSKIAVFDKMWTYMRSAEPSVFFVRWTAEGVARVRK G57C_T173W
SKGKYAYLLESTMNEYIEQRKPCDTMKVGGNLDKSGYGIATPKGSSLGNVNLAVLKLNE
QGLLDKLNKWWYDKGECGS

GANKTVVVTTILESPYVMMKKNHEMLEGNERYEGYCVDLAAEIAKHCGFKYKLTIVGDG
KYGARDADTKIWNGMVGELVYGKADIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKGTPIE
SAEDLSKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRSKIAVFDKMWTYMRSAEPSVFFVRTTAEGVARVRK G59C
SKGKYAYLLESTMNEYIEQRKPCDTMKVGGNLDKSGYGIATPKGSSLGNVNLAVLKLNE
QGLLDKLNKWWYDKGECGS

GANKTVVVTTILESPYVMMKKNHEMLEGNERYEGYCVDLAAEIAKHCGFKYKLTIVGDG
KYGARDADTKIWNGMVGELVYGKADIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKGTPIE
SAEDLSKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRSKIAVFDKMWTYMRSAEPSVFFVRWTAEGVARVRK G59C_T173W
SKGKYAYLLESTMNEYIEQRKPCDTMKVGGNLDKSGYGIATPKGSSLGNVNLAVLKLNE
QGLLDKLNKWWYDKGECGS
```

Abbildung 3.3: Mutationen in der GluR2-LBD

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der GluR2-LBD im Einbuchstabencode. In Rot markiert sind die Einzelpunktmutationen.

## 3.2 Verwendete Messinstrumente mit dazugehöriger Probenpräparation

### 3.2.1 Absorptionsspektrometer

Die Messungen der Absorptionsspektren wurden am V-650 UV/VIS Spektrophotometer der Firma JASCO durchgeführt.

Absorptionsmessungen im Bereich von 190 bis 900 nm sind möglich, wobei der Wellenlängenbereich zwischen 190 bis 350 nm von einer Deuteriumlampe und der zwischen 330 bis 900 nm von einer Halogenlampe abgedeckt wird.

Bei der Messung der Absorption wird die Intensität  $I_0$  des Lichtes vor Einstrahlung in die Probe ins Verhältnis gesetzt mit der Intensität  $I_1$  nach Durchgang durch die Probe. Mit Hil-



fe des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann mit diesem Verhältnis die Konzentration  $c$  der vermessenen Probe berechnet werden.

$$-\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \varepsilon cd \quad 3.1$$

$\varepsilon$  ist der Extinktionskoeffizient der Probe und  $d$  die Weglänge des Lichtes durch die Probe.

Es wurden die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Puffer verwendet. Für die Messungen bei 25 °C wurde eine Quarzglasküvette (Schichtdicke 10 mm, Volumen 500  $\mu$ L, Hellma) genutzt.

### 3.2.2 Fluoreszenzspektrometer

Das FP-6500 Spektrofluorometer der Firma JASCO wurde zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren verwendet.

Als Lichtquelle dient eine Xenon-Lampe. Das Licht dieser Lampe wird über einen Spiegel, durch den es gebündelt wird, auf einen Anregungsmonochromator geleitet, um monochromatisches Licht zu erzeugen. Anschließend trifft dieses auf einen Strahlteiler, von dem aus ein Teil des Lichtes auf die Probenkammer fokussiert wird, der andere auf die Photomultiplerröhre 1. Das Emissionslicht der Probe trifft auf einen Emissionsmonochromator und dann zur Detektion des monochromatischen Strahls auf die Photomultiplerröhre 2. Um die Messung von Anregungslicht zu reduzieren, wird im rechten Winkel zu diesem detektiert.

Farbstoffgekoppelte Proteine sowie freier Farbstoff wurden in einer 100 nM und unmodifizierte Proteine in einer 5  $\mu$ M Konzentration in einer Quarzglasküvette (Schichtdicke 10 mm, Volumen 500  $\mu$ l, Hellma) bei 25 °C gemessen. Die Salzabhängigkeitsmessung der Wildtyp-NTD wurde dazu abweichend in einer Konzentration von 250 nM durchgeführt.

Als Puffer wurden bei der Spinnenseiden-NTD 10 mM MES, pH 7, IS 150 mM (KCl) oder 50 mM Pi, pH 7, IS 200 mM (KCl) als Monomerpuffer und 50 mM MES, pH 6 als Dimerpuffer mit ansteigender Ionenstärke verwendet.

Die Fluoreszenzmessungen in Zusammenhang mit der GluR2-LBD wurden in 50 mM Pi, pH 7,5, IS 200 mM (KCl) durchgeführt. AMPA (TOCRIS bioscience), L-Glu, Kainate

(TOCRIS bioscience), 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamid (NBQX) und 6-Chloro-3,4-dihydro-3-(2-norbornen-5-yl)-2H-1,2,4-benzothiadiazin-7-sulfonamid-1,1-dioxid (Cyclothiazid, CTZ) wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100  $\mu$ M, 1 mM, 500  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M.

### 3.2.3 FCS-Setup

Das FCS-Setup besteht aus einem konfokalen Fluoreszenzmikroskopaufbau mit einem inversen Stativ (Zeiss Axiovert 100 TV). Der Diodenlaser (Coherent Cube) der Wellenlänge 637 nm wird über einen dichroitischen Spiegel (Omega Optics, 645DLRP) in das Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Plan Apochromat, 63x, NA 1.4) eingekoppelt. Das emittierte Licht der Probe wird durch das gleiche Objektiv gesammelt, durch einen Bandpassfilter geleitet (Omega Optics, 675RDF50) und auf zwei im Durchmesser 100  $\mu$ m große Fasern fokussiert, die mit den Avalanche Photodioden Detektoren (APDs; Perkin Elmer, SPCM-AQRH-15-FC) gekoppelt sind. Die Aufteilung des Fluoreszenzsignals erfolgt über einen kubischen nichtpolarisierenden Strahlteiler (Linos). Die Aufzeichnung der Signale wird im Kreuzkorrelationsmodus des Hardware-Korrelatorgerätes (ALV, 5000/60X0 multiple tau digital real correlator) durchgeführt. Die Kreuzkorrelation des gleichen Signals durch die Verwendung von zwei Detektoren in Verbindung mit einem 50:50 Strahlteiler ist von Vorteil gegenüber der Autokorrelation, da so mögliche Nachpulsereffekte der Detektoren vermieden und in Kombination mit dem Korrelatorgerät eine Zeitauflösung von 6,25 ns erzielt werden kann. Die Leistung des Laserstrahls wurde durch einen drehbaren neutralen optischen Filter vor Einkopplung in das Mikroskop auf 400  $\mu$ W eingestellt. Die Temperatureinstellung auf 25 °C erfolgte durch einen Objektivheizring.

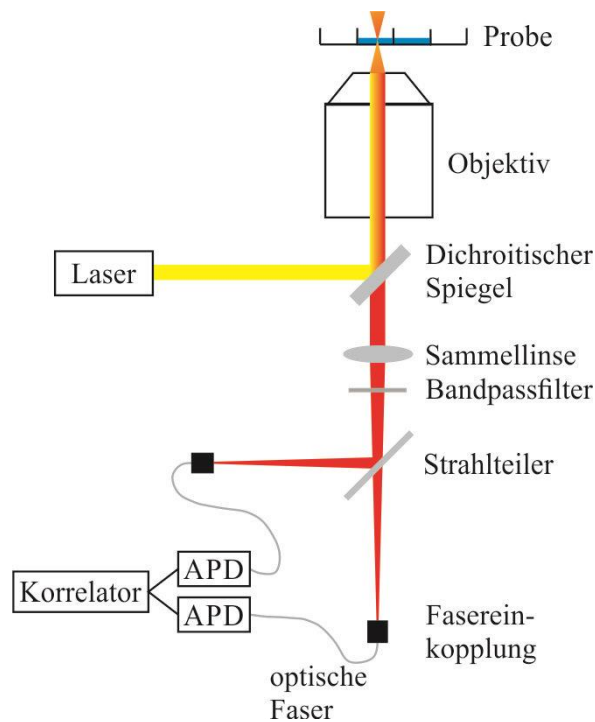


Abbildung 3.4: FCS Aufbau

Der Laser wird über einen dichroitischen Spiegel in das Objektiv eingekoppelt und in die Probe fokussiert. Das emittierte Licht der Probe wird durch das gleiche Objektiv gesammelt und durch den dichroitischen Spiegel auf eine Sammellinse geleitet. Diese fokussiert das Licht nach Durchgang durch einen Bandpassfilter und nach Aufteilung des Signals durch einen Strahlteiler auf zwei optische Fasern, welche mit den APDs verbunden sind. Das Signal wird im Korrelator korreliert.

Die Messungen der  $\sim 1$  nM Proben wurden in 20 mM Pi, pH 7 (BBL) oder 50 mM Pi, pH 7,5, Ionenstärke (IS) 200 mM (Kaliumchlorid (KCl)) (GluR2-LBD) mit der Zugabe von 0,05 % Tween 20 (Sigma) und 0,3 mg proteasefreiem Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) durchgeführt. Letztere und die Beschichtung des Lab-Tek (8-well, Sarsted) mit 5 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma) dienen dazu, Glaswandadsorptionen zu verringern. AMPA (TOCRIS bioscience), L-Glu und Kainate (TOCRIS bioscience) wurden in folgenden Konzentrationen in Messungen der LBD Probe verwendet, um etwa drei Größenordnungen über den entsprechenden  $K_d$ -Werten zu liegen: 100  $\mu$ M, 1 mM, 500  $\mu$ M. CTZ wurde in Kombination mit 10  $\mu$ M Wildtyp-LBD 200  $\mu$ M zur Probe hinzugegeben. Vor der Messung wurden die Proben durch einen 0,2  $\mu$ m Spritzenvorsatzfilter (Millipore) filtriert.

Die detektierten Fluoreszenzfluktuationen wurden mit Gleichung 2.13 analysiert und angepasst an ein Modell mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm und ein, zwei oder drei unabhängigen Exponenten <sup>[90]</sup>:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + K_1 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_1}\right)\right] \quad 3.2$$

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + K_1 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_1}\right) + K_2 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_2}\right)\right] \quad 3.3$$

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + K_1 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_1}\right) + K_2 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_2}\right) + K_3 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_3}\right)\right] \quad 3.4$$

$K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  sind dabei die Anteile der Moleküle an dem jeweiligen Prozess und  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  die dazugehörigen Relaxationszeiten. Die Ringschlusskinetiken der BBL-Proteine wurden mit  $K_2$  und  $\tau_2$  aus Gleichung 3.3 mit Hilfe der Gleichungen 2.23 und 2.24 berechnet.  $K_2$  ist dabei die Amplitude der intramolekularen Kontaktformationsrate und  $\tau_2$  deren Zeitkonstante. Die Standardabweichungen ergeben sich aus 4 wiederholten 5 x 10 min Messungen. Bei der GluR2-LBD handelt es sich um den Standardfehler aus dem Mittel von drei Messungen.

Die Datenauswertung wurde mit der Software Origin sowie einem selbstgeschriebenen Code, basierend auf Python 2.7, durchgeführt.

### 3.2.4 CD-Spektrometer

Das CD-Spektrometer J-815 der Firma Jasco wurde in Kombination mit dem N2-Monitor (2,5 l/min Stickstoff; Jasco), dem Peltier-Element PTC-423SI15 (Jasco) und einer Küvette mit 1 mm Weglänge (Hellma) zur Aufnahme der CD-Spektren verwendet.

Die 50  $\mu$ M Proteinproben für die Messungen bei 25 °C und für die thermische Denaturierung bis 90 °C wurden in 50 mM Pi, pH 7, IS 200 mM (KCl), 500  $\mu$ M Dithioerythritol (DTE) hergestellt. Die Proteine für die chemische Denaturierung wurden 50  $\mu$ M in 50 mM MOPS, pH 7, IS 200 mM (KCl), 500  $\mu$ M DTE, 6 M GndCl Puffer gelöst und bei 25 °C gemessen. Alle Proben wurden durch einen 0,2  $\mu$ m Spritzenvorsatzfilter filtriert.

Für die Auswertung wurden die CD-Spektren auf das Minimum normiert und verglichen. Des Weiteren wurden die CD-Spektren mit Hilfe des DichroWeb-Servers <sup>[44, 45]</sup> mit der CDSSTR-Methode <sup>[48]</sup> und der Referenzdatenbank SP175 <sup>[47]</sup> dekonvoliert.

### 3.2.5 Stopped-Flow Spektroskopie

Für die Aufnahme der Stopped-Flow Messungen wurde das Gerät SFM-2000 von BioLogic Instruments mit den Diodenlasern der Wellenlängen 524 und 639 nm und den optischen Detektionsfiltern Razor Edge 647 RU (Semrock), ET LP 575 (Chroma), und BrightLine HC 582/75 (Semrock) verwendet.

Die markierten NTD Proben wurden für die Bestimmung der Assoziationsrate in verschiedenen Konzentrationen in 10 mM MES, pH 7, IS 150 mM (KCl) vorgelegt und 1:10 in 50 mM MES, pH 6 gemischt. Die Dissoziationsrate wurde über das 1:10 Mischen der 1  $\mu$ M fluoreszenzmarkierten NTD in 50 mM MES, pH 6 zu 5  $\mu$ M Wildtyp-NTD im gleichen Puffer, gemessen („Chasing Experiment“). Bei den FRET-Messungen wurde ein fünffacher Überschuss des mit dem Donor markierten Proteins und bei den PET-Messungen ein zehnfach Überschuss der Q50C zum markierten Ausgangsprotein hinzugegeben. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

Den Messkurven wurden exponentielle Anstieg- oder Abfallfunktionen angepasst. Die  $k_d$ -Werte sind Mittelwerte aus drei gemessenen Ratenkonstanten. Die  $k_a$ -Werte ergeben sich aus der Steigung der linearen Anpassung von fünf Messungen unterschiedlicher Konzentration. Bei der Anpassung wurden die Standardabweichungen der Einzelmessungen (je drei Messungen pro Konzentration) gewichtet. Die freie Energie der Dimerisierung  $\Delta G$  und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_d$  wurden berechnet aus  $k_a$  und  $k_d$  mit Hilfe der Gleichung:

$$\Delta G = -RT \ln(K_d) = -RT \ln\left(\frac{k_d}{k_a}\right) \quad 3.5$$

Dabei ist  $T$  die Temperatur in Kelvin und  $R$  die Gaskonstante. Die Änderung der freien Energie auf eine Mutation hin im Vergleich zum Wildtyp-Protein wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta G = RT \ln\left(\frac{K_d^M}{K_d^{WT}}\right) \quad 3.6$$

$K_d^M$  ist dabei die Gleichgewichtsdissoziationskonstante von der Mutante und  $K_d^{WT}$  die vom Wildtyp-Protein.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Der entfaltete Zustand der Bindungsdomäne BBL

Der entfaltete Zustand eines Proteins ist der Startpunkt für die Faltung in den nativen Zustand <sup>[91, 92]</sup>. Daher ist es wichtig die Eigenschaften des entfaltenen Proteins zu kennen, um den weiteren Verlauf der Proteinfaltungsreaktion zu verstehen <sup>[54, 91, 93]</sup>. Oft wird in Experimenten der entfaltete Zustand durch die Zugabe von GndCl oder Harnstoff erzeugt <sup>[91]</sup>. Dadurch werden allerdings Wechselwirkungen, z.B. H-Brücken, im ungefalteten Protein zerstört, die eigentlich Gegenstand der Untersuchung sind <sup>[91, 94]</sup>. Bei BBL wird durch Einführen eines Glycins (G) an Position 158 (L158G) anstelle eines Leucins (L) ein entfalteter Zustand  $D_{\text{phys}}$  unter physiologischen Bedingungen erzeugt, der in Abwesenheit von chemischen Denaturierungsreagenzien untersucht werden kann. Durch die Einbringung konservativer Punktmutationen sollte der Einfluss einzelner Aminosäureseitenketten-Wechselwirkungen auf die Struktur und Dynamik innerhalb von  $D_{\text{phys}}$  mit Hilfe von CD-Spektroskopie und PET-FCS untersucht werden.

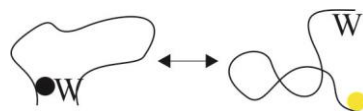


Abbildung 4.1: BBL Reportersystem

Im durch die Mutation L158G entfaltenen Protein BBL wird der Farbstoff ATTO Oxa11 (Kreis) an Position A130C durch Kontakt mit dem Tryptophan (W) an Position H166W gelöscht.

Für PET-FCS ist die Einbringung eines Reportersystems aus einem Cystein (C), für die Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff ATTO Oxa11, und der Aminosäure Tryptophan (W) (Abbildung 4.1), die als Löschmolekül fungiert, notwendig. Dazu wurden die Einzelpunktmutationen A130C am N-terminalen und H166W am C-terminalen Ende von  $D_{\text{phys}}$  eingeführt, die in allen Punktmutanten vorhanden sind. Aus vorangehender Arbeit von

Neuweiler et al. <sup>[95]</sup> ist bestätigt, dass diese zwei Mutationen keine Auswirkungen auf die Struktur und die Funktion des Proteins haben.

Die konservativen Einzelpunktmutationen wurden über die gesamte Sequenz eingefügt, da der Faltungsursprung breit über die Sequenz verteilt ist <sup>[68]</sup>. Zudem wurde eine frühere Studie berücksichtigt <sup>[67]</sup>, die gezeigt hat, welche Aminosäureseitenketten im gefalteten Protein maßgebend zur Stabilität beitragen. Bei den Punktmutationen sind jene interessant, die an weitreichenden stabilisierenden Interaktionen beteiligt sind. Des Weiteren wurden die Alanine (A) durch Glycine (G) ausgetauscht, da dieser Austausch die Stabilität von Helixstrukturen verringert und die Kettenentropie erhöht <sup>[96]</sup>.

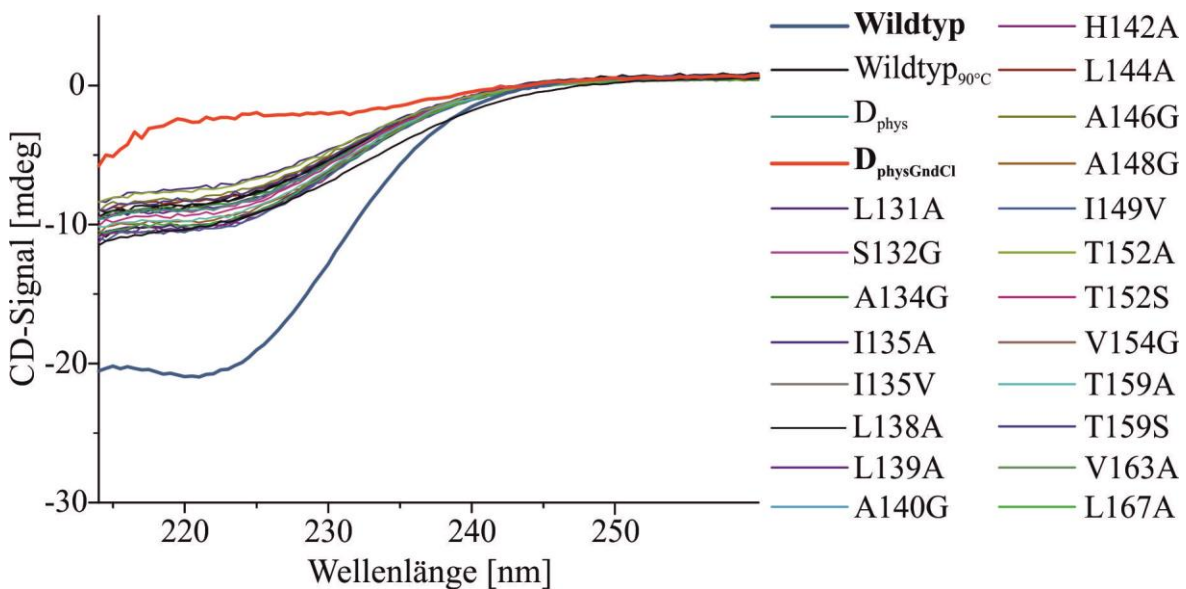


Abbildung 4.2: CD-Spektren von BBL und den Einzelpunktmutanten

CD-Spektren der Einzelpunktmutanten bei 25 °C, des  $D_{phys}$  mit und ohne GndCl bei 25 °C und des Wildtyp-Proteins bei 25 °C und bei 90 °C. Die Spektren sind auf das Minimum normiert (siehe Anhang Abbildung 10.9).

Um zu testen, ob sich die Sekundärstruktur von  $D_{phys}$  in Abhängigkeit der Mutation oder der Temperatur verändert, wurden von dem Wildtyp-Protein,  $D_{phys}$  und dessen Einzelpunktmutanten (Abbildung 4.2) CD-Spektren bei 25 °C und 90 °C aufgenommen, sowie ein CD-Spektrum von  $D_{phys}$  in 6 M GndCl bei 25 °C.



Bei 25°C zeigt das Wildtyp-Protein von BBL ein typisches  $\alpha$ -Helix Spektrum <sup>[97]</sup> (Abbildung 4.2), dessen CD-Signal bei 222 nm von -20,8 auf -10,1 mdeg bei 90 °C sinkt. Die Restelliptizität im denaturierten Zustand bei 90 °C lässt auf noch vorhandene Sekundärstrukturen schließen, von denen schon berichtet wurde <sup>[68]</sup>.  $D_{\text{phys}}$  zeigt mit einem CD-Signal von -9,9 mdeg keinen wesentlichen Unterschied zum thermisch denaturierten Wildtyp-Protein bei 90 °C (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3). Dies zeigt, dass mit  $D_{\text{phys}}$  der denaturierte Zustand von BBL erhalten wird, an dem das Verhalten des ungefalteten BBL unter physiologischen Bedingungen untersucht werden kann.

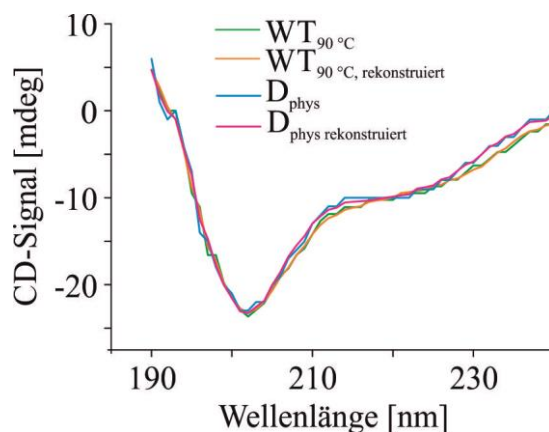


Abbildung 4.3: Rekonstruierte CD-Spektren von BBL

Überlagerung der gemessenen CD-Spektren des Wildtyp-BBL bei 90 °C ( $WT_{90\text{ °C}}$ ) und von  $D_{\text{phys}}$  bei 25 °C ( $WT_{25\text{ °C}}$ ) mit den rekonstruierten der CDS-STR-Methode und der Referenzdatenbank SP175. Die CD-Spektren sind auf das Minimum normiert.

Die CD-Spektren von  $D_{\text{phys}}$  und den Einzelpunktmutanten verändern sich in Abhängigkeit der Temperatur nicht wesentlich, daher sind diese in Abbildung 4.2 lediglich bei 25 °C dargestellt (bei 90 °C siehe Anhang Abbildung 10.10). Dieses Ergebnis für  $D_{\text{phys}}$  ist in Übereinstimmung mit Neuweiler et al. <sup>[95]</sup>. Des Weiteren zeigten sich nur geringe Abweichungen des CD-Signals bei 222 nm der Einzelpunktmutanten zu  $D_{\text{phys}}$ . Die CD-Signale befinden sich alle in einem Bereich von -7 bis -11 mdeg. Die Einzelpunktmutationen scheinen somit wenig Einfluss auf die noch vorhandene Sekundärstruktur in  $D_{\text{phys}}$  zu haben. Die Reststruktur kann aber durch die Zugabe von GndCl zerstört werden, wie in Abbildung 4.2

für  $D_{\text{phys}}$  zu sehen und auch schon gezeigt wurde <sup>[68]</sup>. Die Elliptizität bei 222 nm sinkt nahezu auf 0.

Für eine weitergehende Sekundärstrukturanalyse der CD-Spektren bei 25 °C, sowie zusätzlich des Wildtyp-Proteins bei 90 °C, wurden diese mit der CDSSTR-Methode <sup>[46, 48]</sup> und der Referenzdatenbank SP175 <sup>[47]</sup> mit Hilfe des DichroWeb-Servers <sup>[44, 45]</sup> dekonvolviert. Die Referenzdatenbank wurde gewählt, da diese die Vielfalt an Sekundärstrukturen und Faltungsmotiven der PDB-Datenbank abdeckt <sup>[47]</sup>. Diese Kombination aus Methode und Referenzdatenbank lieferte eine gute Übereinstimmung der gemessenen CD-Spektren mit den vom Programm rekonstruierten (Abbildung 4.3). Die anderen auf dem DichroWeb-Server zur Verfügung gestellten Algorithmen wurden ebenfalls getestet, wobei unter anderem die Methode von Provencher & Glockner <sup>[98]</sup> übereinstimmende Ergebnisse lieferte. Dies spricht für die Verlässlichkeit des verwendeten Algorithmus <sup>[46]</sup>. Im Vergleich mit der NMR-Struktur (pdb: 2bth) wird jedoch der  $\beta$ -Strang Anteil zu hoch gewichtet. Eine Abweichung von Dekonvolutionsalgorithmen zu Röntgenstrukturanalysen wird in anderen Studien ebenfalls gezeigt <sup>[99]</sup>. Eine Schwierigkeit bei der Dekonvolution in dieser Arbeit könnte sein, dass der Algorithmus einerseits das gefaltete BBL und andererseits die entfalteten  $D_{\text{phys}}$ -Mutanten analysieren soll. Die CD-Spektren von Referenzproteinen werden zudem bei 4 °C aufgenommen <sup>[47]</sup>, was eventuell auch zu einer Diskrepanz zu den bei 25 °C gemessenen CD-Spektren führen könnte. Auf Grund der Abweichung des Wildtyp-BBL bei 25 °C zur NMR-Struktur sollten daher die Dekonvolutionswerte nicht als absolute Werte, sondern als Näherungen betrachtet werden.

Beim DichroWeb-Server wird die Sekundärstruktur in folgende Kategorien aufgeteilt: Helix 1, Helix 2,  $\beta$ -Strang 1,  $\beta$ -Strang 2,  $\beta$ -Kehre, Ungeordnet und Gesamt. Die „1“ kennzeichnet dabei reguläre Strukturen und die „2“ deformierte („distorted“). Ausgegeben wird der prozentuale Anteil der Sekundärstrukturform von der Gesamtstruktur, der in Abbildung 4.4 jeweils für die analysierten CD-Spektren graphisch dargestellt ist.

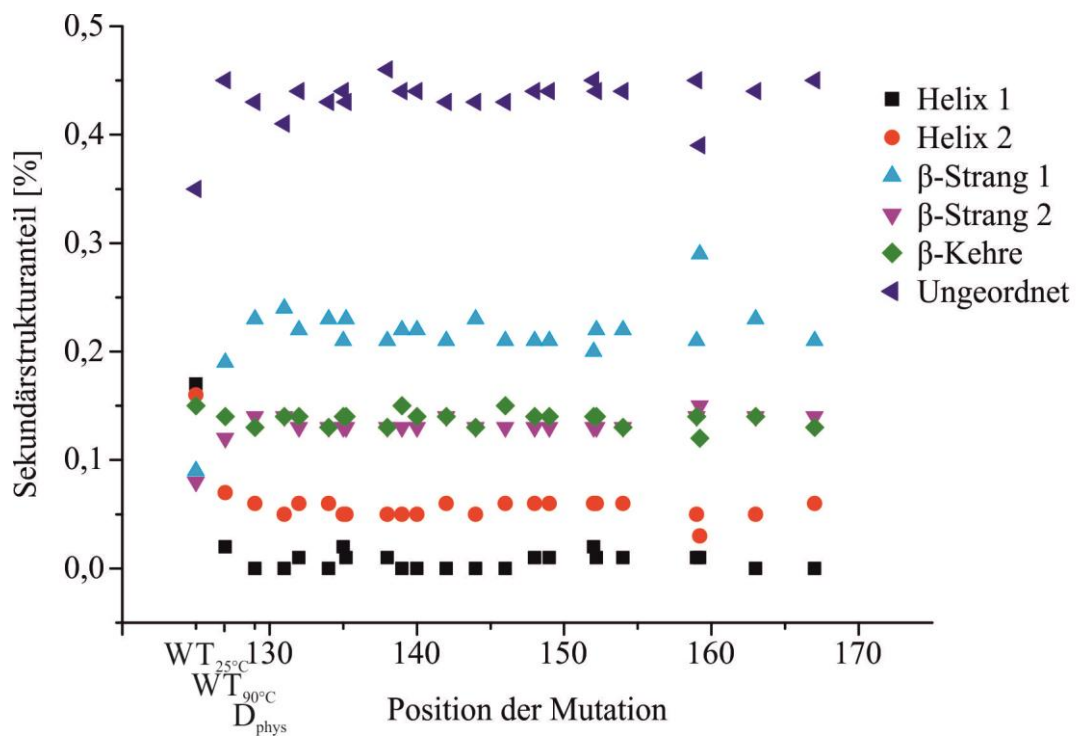


Abbildung 4.4: DichroWeb-Server Analyse der BBL CD-Spektren

Sekundärstrukturanteil nach Dekonvolution der CD-Spektren der Einzelpunktmutanten, von  $D_{\text{phys}}$  und vom Wildtyp-Protein bei 25 °C ( $WT_{25^\circ\text{C}}$ ) und letzterem bei 90 °C ( $WT_{90^\circ\text{C}}$ ) mit Hilfe des DichroWeb-Servers. Die „1“ kennzeichnet dabei die reguläre Struktur und die „2“ die deformierte („distorted“).

Für das Wildtyp-Protein bei 25 °C ergibt die Dekonvolution einen Anteil Helix 1 & Helix 2 von 33 %,  $\beta$ -Strang 1 &  $\beta$ -Strang 2 17 %, Turns 15 % und Ungeordnet 35 %. Dies ändert sich, wenn das Protein bei 90 °C denaturiert wird (siehe Tabelle 2) und zeigt eine ähnliche Sekundärstrukturverteilung wie  $D_{\text{phys}}$ . Diese gute Übereinstimmung zwischen Wildtyp-Protein bei 90 °C und  $D_{\text{phys}}$  spricht erneut dafür, dass es zulässig ist,  $D_{\text{phys}}$  als entfaltetes Wildtyp-BBL unter physiologischen Bedingungen anzusehen. Für die Einzelpunktmutanten gibt es keine wesentliche Abweichung zu  $D_{\text{phys}}$  (Abbildung 4.4). Dies zeigt, dass die im gefalteten Protein wichtigen Seitenketteninteraktionen zur Stabilisierung der Tertiärstruktur<sup>[67]</sup> bei der Stabilisierung der Reststruktur des entfalteten Proteins vermutlich keine ausschlaggebende Funktion haben.

Tabelle 2: Sekundärstrukturanteil von BBL nach DichroWeb-Server Analyse

Strukturanteil	Wildtyp 25 °C	Wildtyp 90 °C	D <sub>phys</sub>
Helix 1 & Helix 2	33 %	9 %	6 %
β-Strang 1 & β-Strang 2	17 %	31 %	37 %
Turn	15 %	14 %	13 %
Ungeordnet	35 %	45 %	43 %

Bei der Entfaltung des BBL Proteins war auf Grund einer früheren Studie <sup>[68]</sup> zu erwarten, dass der Helix 1 & Helix 2 Anteil sinkt. Interessant jedoch ist, dass gleichzeitig der β-Strang 1 & β-Strang 2 Anteil um ~ 20 % ansteigt und neben ungeordneten Bereichen vorherrschendes Sekundärstrukturelement wird (Abbildung 4.4). Dies lässt einen Faltungsweg für das Protein BBL vermuten, der mit H-Brücken stabilisierten β-Strang-Strukturen beginnt und über Konformationsänderungen in einem α-helikalen nativen Protein endet. Eine theoretische Arbeit von Porter et al. <sup>[100]</sup> beschreibt einen solchen Faltungsweg. In dieser wird ein Niedrigenergiefaltungsweg unter Bedingungen, welche die Faltung begünstigen, vom Nordwest- zum Südwest-Quadranten im Ramachandran Plot aufgezeigt (PII / β-Kehre nach Helix), geleitet durch die Umbildung von H-Brücken. Hier wird deutlich, wie wichtig die Ausbildung von H-Brücken für die Proteinfaltung ist, da diese den zur Verfügung stehenden Raum des entfalteten Proteins einschränken und so die Faltung durch Verringerung der freien Energiebarriere beschleunigen könnten <sup>[93, 101-103]</sup>. Gong et al. zeigten, dass maßgeblich das Proteinrückgrat für die Konformationsbildung des Proteins verantwortlich ist, und die Aminosäureseitenketten hauptsächlich eine stabilisierende Funktion in der Tertiärstruktur haben und dadurch die eine native vor anderen Strukturen bevorzugt wird <sup>[104-106]</sup>. Dies würde erklären, warum die Entfernung von einzelnen Aminosäureseitenketten aus dem Protein keine Auswirkung auf die Struktur von D<sub>phys</sub> hat (Abbildung 4.2, Abbildung 4.4), aber auf die Stabilität des Zwischenzustandes der Faltung und das native BBL, wie von Neuweiler et al. gezeigt wurde <sup>[67]</sup>. Der kompakte nativ-ähnliche Übergangszustand wird bereits beeinflusst, zu sehen in einer Φ-Wert Analyse <sup>[67]</sup>, da dieser auch schon über Tertiärinteraktionen stabilisiert wird.

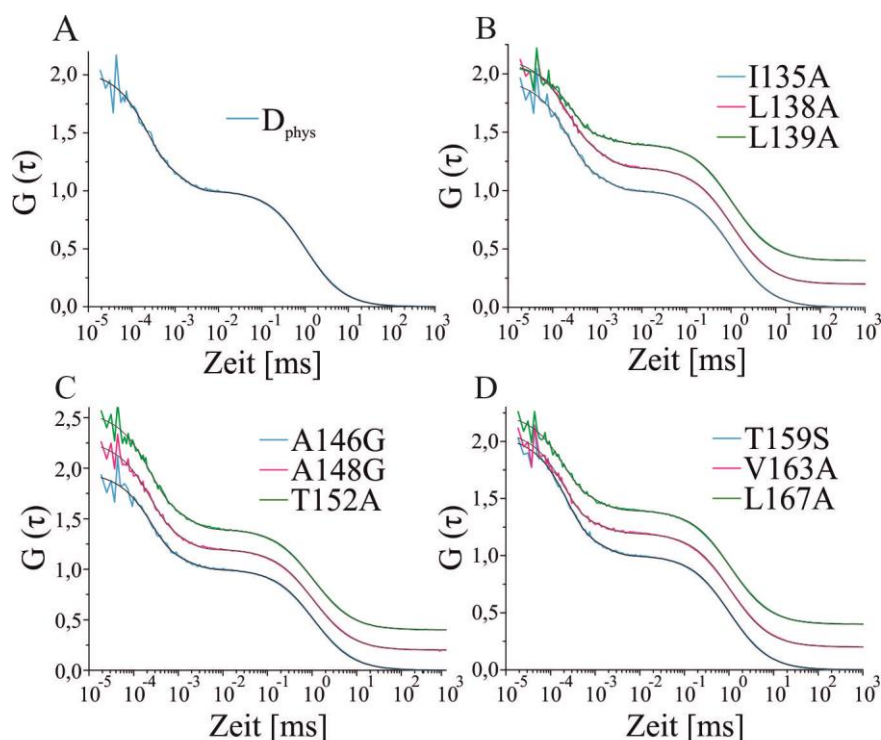


Abbildung 4.5: FCS-Autokorrelationsfunktionen von BBL

FCS-Autokorrelationsfunktionen (grün, pink, blau) von  $D_{\text{phys}}$  (A) und exemplarisch ausgewählten Einzelpunktmutanten aus den drei Strukturelementen in BBL: Helix 1 (B), Turn (C), Helix 2 (D). Diese wurden auf die Teilchenzahl normiert und zur besseren Darstellung mit einem Offset versehen. Die schwarzen Kurven sind die Datenanpassungen an eine Funktion mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm und zwei unabhängigen Exponenten.

Unterstützt wird diese Annahme von den gemessenen Ringschlusskinetiken mit Hilfe von PET-FCS.

In Abbildung 4.5 sind beispielhaft zehn Autokorrelationsfunktionen von  $D_{\text{phys}}$  und je drei Einzelpunktmutanten jedes Strukturelementes dargestellt. Die Ringschließung der terminalen Enden von  $D_{\text{phys}}$  führt zur effizienten Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes ATTO Oxa11 durch Kontakt mit Tryptophan, wie bereits an Modellpeptiden gezeigt wurde <sup>[107]</sup>. Dies resultiert neben dem Abfall im ms-Bereich, auf Grund der Diffusion des Moleküls durch den Fokus, in zwei Abfällen: einem im  $\mu\text{s}$ - und dem anderen im ns-Bereich. Alle Autokorrelationsfunktionen ließen sich gut an die Gleichung 3.3 mit einem Diffusionsterm und zwei unabhängigen Exponentialfunktionen anpassen.

Die Kinetik im ns-Bereich ist die Ringschlusskinetik. Dies wird bestätigt durch Ringschlussstudien an Modellpeptiden über Triplet-Triplet-Energie-Transfer (TTET) von Fierz et al. [108], dessen Zeitauflösung kleiner 5 ps lag, also etwa drei Größenordnungen höher als beim verwendeten FCS-Setup. Deren Ringschlusskinetiken lagen ebenfalls im ns-Bereich, wie auch in anderen Experimenten gezeigt [102, 103, 109], und es wurde keine Kinetik im  $\mu$ s-Bereich detektiert [108].

Die Berechnung der Ringöffnungs- ( $k_-$ ) und Ringschließungsraten ( $k_+$ ) wurde mit Hilfe eines Zweizustandsgleichgewichtsmodells zwischen fluoreszierendem und nichtfluoreszierendem Zustand (Gleichungen 2.23 und 2.24) berechnet. In einer Studie [92] wurde dieses Ergebnis mit einem Faktor drei korrigiert, denn die Löschung zwischen Tryptophan und Farbstoff ist zwar ein diffusionslimitierter Prozess [92, 109-112], aber es kommt erst bei jedem dritten Kontakt zu einem Ladungs-Transfer-Komplex, in dem der Farbstoff gelöscht wird. In Folgestudien [102, 103] hat sich jedoch eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse ohne Einbeziehung des Korrekturfaktors mit TTET Experimenten [108, 111] gezeigt, woraufhin dieser im Weiteren vernachlässigt wurde, sowie auch in diesem Ringschließungsexperiment, bei dem es zudem um den direkten Vergleich der Einzelpunktmutanten zu  $D_{\text{phys}}$  geht.

In Abbildung 4.6 sind die Ringschließungsraten von  $D_{\text{phys}}$  und den Einzelpunktmutanten dargestellt. Diese erstrecken sich über einen Bereich von  $1,6 \pm 0,1 \times 10^6$  bis  $2,2 \pm 0,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ . Im Vergleich zu  $D_{\text{phys}}$  ist keine deutliche Änderung aufgetreten. Dies unterstreicht die These von vorher, dass die Seitenketten keinen entscheidenden Einfluss auf die Strukturbildung im entfalteten Zustand haben.

Studien an Modellpeptiden haben gezeigt, dass die Ringschließungsraten in Anwesenheit von Seitenketten langsamer werden, was auf eine sterische Behinderung zurückzuführen ist [102]. Da in  $D_{\text{phys}}$  jedoch nur einzelne Seitenketten konservativ durch andere ersetzt wurden, war keine Änderung der Raten auf Grund von sterischen Effekten zu erwarten.

In IDPs wurde gezeigt, dass geladene Seitenketten die Ringschließungsraten verlangsamen. Dies ist auf abstoßende Coulombwechselwirkungen zurückzuführen [102]. Die Auswirkungen eines Austausches von geladenen Seitenketten wurden hier weitestgehend vermieden, da diese an komplexen Interaktionen im Protein beteiligt sind und die Ergebnisse somit schwer zu interpretieren gewesen wären.

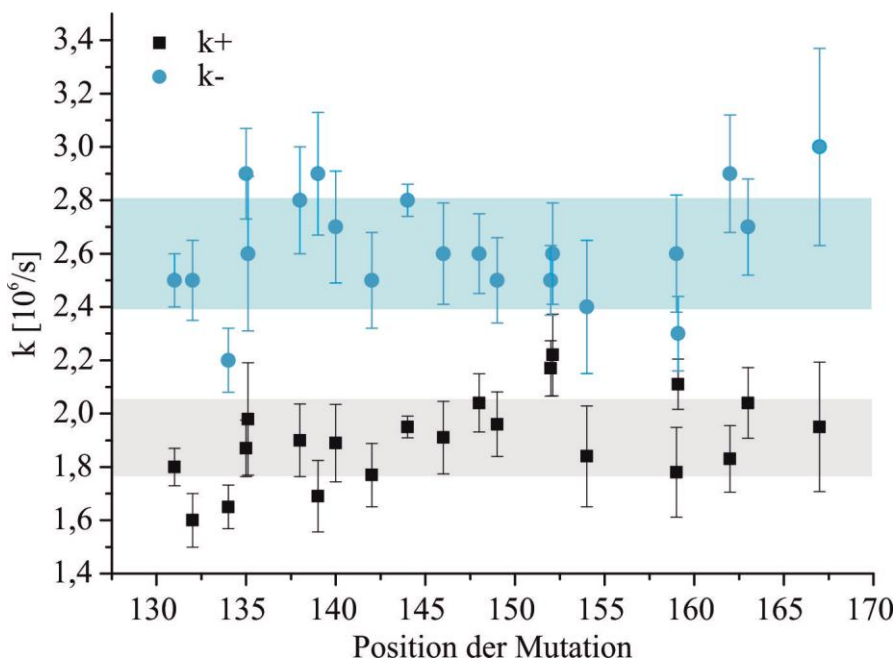


Abbildung 4.6: Ringöffnungs- und -Schließungsraten von BBL

Ringöffnungs- (k-) und Ringschließungsraten (k+) der Einzelpunktmutanten mit Standardabweichungen. In hellblau und grau unterlegt k- und k+ von  $D_{\text{phys}}$  mit Fehlergrenze.

Bei der Betrachtung der Ringöffnungsraten (Abbildung 4.6) muss bedacht werden, dass diese durch die hydrophoben  $\pi$ -gestapelten Wechselwirkungen zwischen dem Oxazinring-system des Farbstoffes und dem Indolring des Tryptophans verlangsamt werden <sup>[103, 107]</sup>. Für die Einzelpunktmutanten liegen die berechneten Raten in einem Bereich von  $2,2 \pm 0,13 \times 10^6$  bis  $3,0 \pm 0,37 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , was keine wesentliche Abweichung zu  $D_{\text{phys}}$  darstellt.

Neben der ns-Kinetik mit einer Amplitude von  $73 \pm 3,1 \%$  ( $D_{\text{phys}}$ ) wurde eine weitere Kinetik im  $\mu\text{s}$ -Bereich mit einer deutlich kleineren Amplitude von  $30 \pm 2,5 \%$  ( $D_{\text{phys}}$ ) gemessen. In Abbildung 4.7 A sind die Amplituden der  $\mu\text{s}$ -Kinetik dargestellt. I135V, T152A und T152S haben im Fehler eine identische Amplitude wie  $D_{\text{phys}}$ . Für alle anderen Einzelpunktmutanten verringert sich der Anteil der Amplitude. Die dazugehörigen Zeitkonstanten aller Einzelpunktmutanten verändern sich nicht deutlich (Abbildung 4.7 B) und liegen in dem Bereich von  $D_{\text{phys}}$  mit  $1,5 \pm 0,1 \mu\text{s}$ .

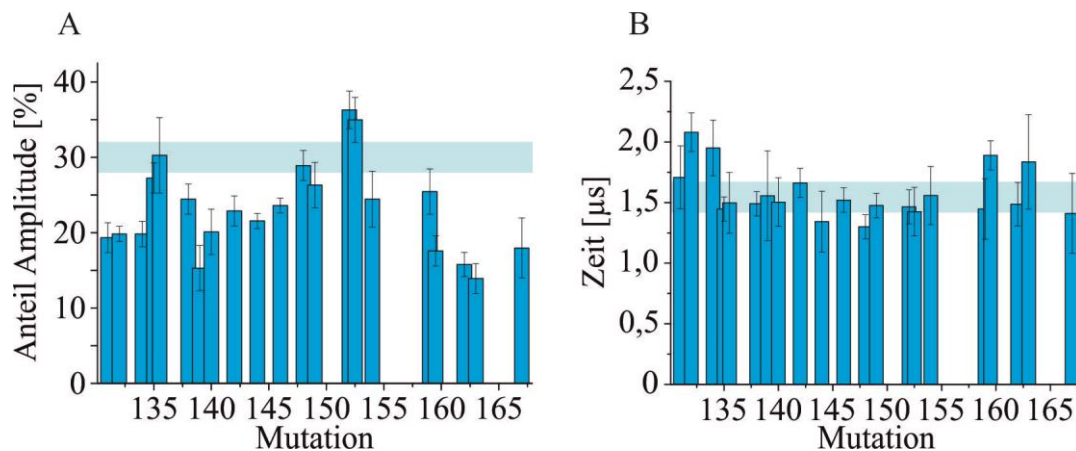


Abbildung 4.7: FCS  $\mu$ s-Kinetik von BBL

(A) Anteil der  $\mu$ s-Kinetik der Einzelpunktmutanten an der Gesamtamplitude der FCS-Autokorrelationsfunktion. In Hellblau unterlegt die Amplitude von  $D_{\text{phys}}$  mit Standardabweichung. (B) Zeitkonstanten der  $\mu$ s-Kinetik der Einzelpunktmutanten. In Hellblau unterlegt die Zeitkonstante von  $D_{\text{phys}}$  mit Standardabweichung.

Die Farbstoffgruppe der Oxazine, wozu ATTO Oxa11 zählt, hat eine sehr geringe „Inter-system Crossing“ Rate, weswegen sich diese laut Doose et al. <sup>[113]</sup> gut für die Untersuchung von  $\mu$ s-Kinetiken eignen. In einem leistungsabhängigen Versuch wurde zudem ausgeschlossen, dass die in dieser Arbeit gemessene  $\mu$ s-Kinetik vom Tripletzustand her resultiert, da sich diese sonst verändert hätte <sup>[114]</sup>.

Die Faltung des ultraschnellen Faltungsproteins BBL geschieht im unteren  $\mu$ s-Bereich (3 – 5  $\mu$ s) <sup>[61, 68]</sup>. Aus diesem Grund wird die beobachtete  $\mu$ s-Kinetik in  $D_{\text{phys}}$  in einer früheren Studie <sup>[95]</sup> einem Wechsel zwischen einer fluoreszierenden, nativ gefalteten Restpopulation und dem entfalteten fluoreszenzgelöschtem Protein zugeordnet.

Im nativen BBL führen die Einzelpunktmutationen zur Destabilisierung des Proteins <sup>[67]</sup>. Die beobachtete Abnahme der  $\mu$ s-Amplitude bei den  $D_{\text{phys}}$ -Mutanten bestätigt dies (Abbildung 4.7 A), denn die Population an Protein im nativen Zustand wird geringer. Da die Zeitkonstante der Faltung konstant bleibt, spricht dies für die These, dass die Aminosäureseitenketten eine stabilisierende Funktion im gefalteten Zustand haben, aber das Proteinrückgrad für die Konformationsänderungen in das funktionale BBL verantwortlich ist.



Die Kompaktheit des entfalteten Zustandes ist nahezu identisch mit der des nativen Proteins, was durch die Ausbildung von H-Brücken erreicht wird <sup>[102]</sup>. Seitenketteninteraktionen spielen dabei anscheinend keine Rolle, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

## 4.2 Die Assoziation und Dissoziation der N-terminalen Domäne eines Spinnenseidenproteins

Spinnen sind in der Lage den Spinnenseidenfaden in einer Geschwindigkeit von bis zu  $1 \text{ m s}^{-1}$  zu synthetisieren <sup>[115-117]</sup>. In dieser kurzen Zeit gelingt es den Achtbeinern die bis jetzt stärkste bekannte Naturfaser herzustellen, die auch die Eigenschaften von menschlich produzierten Materialien, wie Stahl, übertrifft <sup>[74, 118, 119]</sup>. Um im Stande zu sein, den Spinnenseidenfaden nachzubilden, muss das Funktionsprinzip der beteiligten Proteindomänen und die Assoziation dieser verstanden werden. Eine wichtige Funktion bei der Ausbildung des Spinnenseidenfadens hat dabei die NTD. Diese dimerisiert bei einem pH-Wechsel von pH 7 auf pH 6 und ermöglicht so die Polymerisierung der Spidroine <sup>[73, 78, 120]</sup>.

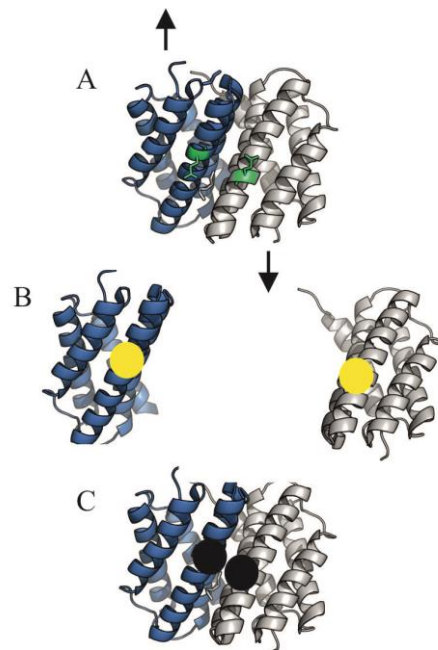


Abbildung 4.8: Fluoreszenzschalter der NTD<sub>F</sub>

Kristallstruktur der dimeren Wildtyp-NTD, bestehend aus den zwei Monomeren in blau und grau (pdb: 3LR2). (A) In grün markiert die Glutamine an Position 50, die zu Cysteinen mutiert und mit ATTO Oxa11 farbstoffmarkiert werden. Die schwarzen Pfeile markieren die Positionen und die Richtung an der NTD, an denen die repetitiven Einheiten des Spidroins weiterlaufen. (B) Fluoreszierende (ATTO Oxa11 = gelber Kreis) NTD<sub>F</sub>-Monomere in pH 7. (C) Durch Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkung nichtfluoreszierende NTD<sub>F</sub>-Dimere in pH 6 (gelöschte ATTO Oxa11 = schwarze Kreise).

Um die Assoziation und die Dissoziation der isolierten NTD nach einem pH-Wechsel mit Hilfe von Stopped-Flow Experimenten untersuchen zu können, wurde ein extrinsischer Fluoreszenzschalter in das Protein eingebracht (Abbildung 4.8). Auf Grund der antiparallelen Wechselwirkungsgeometrie der NTD bei pH 6 <sup>[117]</sup> kommen sich die Seitenketten der Glutamine an Position 50 (Q50) am Rand der Dimerisierungsfläche näher als 1 nm (Abbildung 4.8 A). Da organische Farbstoffe innerhalb dieser kurzen Distanz nichtkovalente Dimere mit veränderten Absorptions- und Emissionseigenschaften bilden <sup>[121]</sup>, wurde das Glutamin zu einem Cystein (Q50C) mutiert, um es mit dem thiolreaktiven Oxazinfarbstoff ATTO Oxa11 zu markieren. Die Idee war also, dass die Farbstoffe bei pH 7 in der Monomerform der NTD fluoreszieren (Abbildung 4.8 B) und bei pH 6 im Homodimer durch Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkung gelöscht sind (Abbildung 4.8 C). Im Weiteren wird die farbstoffmarkierte Q50C als NTD<sub>F</sub> bezeichnet.

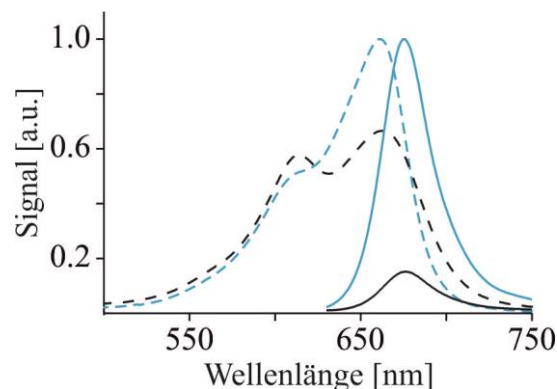


Abbildung 4.9: Absorptions- und Emissionsspektren der NTD<sub>F</sub>

Absorptions- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektren (durchgehende Linie) bei pH 7 (blau) und pH 6 (schwarz) der NTD<sub>F</sub>

Um dies zu überprüfen wurden Absorptions- und Emissionsspektren der NTD<sub>F</sub> bei pH 7 und pH 6 aufgenommen (Abbildung 4.9). Unter Monomerbedingungen zeigt ATTO Oxa11 die normalen Absorptions- und Emissionseigenschaften. In Dimerpuffer hingegen nimmt die Absorption im Absorptionsmaximum bei 663 nm ab und bei ~ 610 nm zu. Begleitet wird dies von einer starken Fluoreszenzabnahme auf unter 20 % im Vergleich zu pH 7. Dies wird bei der H-Dimerbildung von Fluorophoren beobachtet <sup>[21, 121]</sup> und durch das Exci-

tonmodell beschrieben <sup>[16]</sup>. Aus diesem Experiment wurde geschlossen, dass der Farbstoff ATTO Oxa11 an Position Q50C ein sensitiver Marker ist, um die Dimerisierung der NTD<sub>F</sub> über die Fluoreszenzlöschung durch H-Dimerbildung zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit, die Assoziation von zwei NTD-Monomeren zu beobachten, ist über die intrinsische Fluoreszenz eines nativen Tryptophans am N-Terminus. Tryptophan eignet sich gut für die Betrachtung von Veränderungen in Proteinen, da dieses im Vergleich mit den anderen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin mit Abstand den größten Extinktionskoeffizienten hat <sup>[122]</sup> und die Quantenausbeute in Abhängigkeit der Lösungsumgebung zwischen 0,35 und 0,01 variiert <sup>[123, 124]</sup>. Im Monomer liegt das Tryptophan in der NTD eingeschlossen zwischen Helix 1 und Helix 3 im Inneren des Proteins in einer hydrophoben Umgebung. Bei Dimerisierung ändert sich die Position und das Tryptophan kommt in eine lösungsmittelzugänglichere Orientierung <sup>[77]</sup>, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird <sup>[77, 78, 120]</sup>. In Abbildung 4.10 ist dies zu sehen. Die Tryptophanfluoreszenz bei pH 6 nimmt im Vergleich zu pH 7 um etwa die Hälfte ab. Zudem ist eine leichte Rotverschiebung des Emissionsmaximums bei pH 6 zu beobachten. Das spricht auch für eine Veränderung der Lösungsumgebung <sup>[125]</sup>. Der Peak bei ~ 310 nm stammt vermutlich von einem Lösungsmittelartefakt, da in der NTD keine Tyrosine vorhanden sind, die in diesem Bereich <sup>[122]</sup> emittieren.

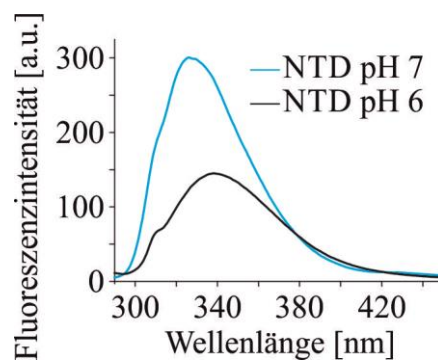


Abbildung 4.10: pH-abhängige Fluoreszenzspektren der NTD

Tryptophanfluoreszenz der Wildtyp-NTD bei pH 7 (blau) und bei pH 6 (schwarz)

Für die Ausbildung des Spinnenseidenfadens ändert die Spinne nicht nur den pH-Wert, sondern verringert auch die Salzkonzentration <sup>[126]</sup>. Durch Erhöhung der IS bei pH 6 kann das Monomer-Dimer Gleichgewicht auf die Seite des Monomers verschoben werden <sup>[73]</sup>. In einem Versuch wurde daher getestet, welche IS bei pH 6 notwendig ist, um die NTD in die Monomerkonformation zu bringen. In Abbildung 4.11 A ist zu sehen, dass mit ansteigender IS die Fluoreszenz der NTD<sub>F</sub> zunimmt und ab 500 mM ein Plateau erreicht ist, das in Übereinstimmung mit der Fluoreszenzintensität der NTD<sub>F</sub> bei pH 7 ist. Durch eine Erhöhung der IS bei pH 6 wird somit die dissoziierte NTD erhalten, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Hagn et al. ist <sup>[73]</sup>.

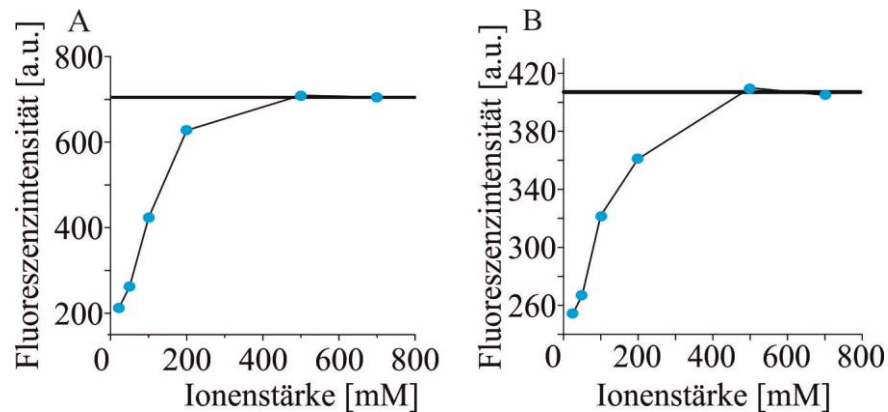


Abbildung 4.11: Salzabhängigkeit der NTD bei Dimerisierung

Fluoreszenzmessungen der (A) NTD<sub>F</sub> (100 nM) und der (B) Wildtyp-NTD (250 nM) in pH 6 Puffer mit steigender Ionenstärke. Die horizontale schwarze Linie markiert die Fluoreszenzintensität der NTD<sub>F</sub> bzw. der Wildtyp-NTD in pH 7 Puffer.

Um auszuschließen, dass der Farbstoff einen Einfluss auf die Messung hatte, wurde gleiches Experiment nochmals mit der Wildtyp-NTD durchgeführt (Abbildung 4.11 B). Auch hier ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Ionenstärke zu beobachten, die ein Maximum ab ~ 500 mM erreicht. Die Fluoreszenzintensität der Wildtyp-NTD bei pH 7 liegt in dem gleichen Bereich. Im Vergleich findet bei der NTD<sub>F</sub> eine etwas stärkere Zunahme der Fluoreszenzintensität im unteren Ionenstärkebereich statt. Bei beiden wird jedoch das Plateau bei ~ 500 mM erreicht. Dieser geringe Unterschied könnte an der 2,5-fach höheren Konzentration (100 nM gegenüber 250 nM) der Wildtyp-NTD liegen, die das

Monomer-Dimer Gleichgewicht mehr auf die Seite des Dimers verschiebt, da bei einer 5  $\mu\text{M}$  Konzentration an Wildtyp-NTD die Zunahme noch schwächer ausfällt, aber ebenso das Plateau bei  $\sim 500 \text{ mM}$  erreicht wird (siehe Anhang Abbildung 10.12). Tryptophan hat einen deutlich geringeren Extinktionskoeffizienten als der Fluoreszenzfarbstoff ATTO Oxa11 ( $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  gegenüber  $125000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Daher wurde die 2,5-fach höhere Konzentration der Wildtyp-NTD gewählt, da bei gleicher die Grenzen der Detektierbarkeit des Spektrometers erreicht gewesen wären.

Das Ergebnis lässt vermuten, dass für die Konformationsänderung des Tryptophans nicht die pH-Änderung, sondern die Dimerisierung auf Grund der pH-Änderung verantwortlich ist, wie auch schon von Jaudzems et al. gezeigt wurde <sup>[77]</sup>.

Die Dimerisierung der NTD folgt auf die pH-Änderung von pH 7 nach pH 6. Da an der Assoziation der NTD daher vermutlich protonierbare Aminosäureseitenketten beteiligt sind, wurden diese nacheinander, basierend auf der Q50C, mutiert. Dabei wurden die acht negativ geladenen Asparagin- (D) und Glutaminsäuren (E) durch ungeladene Asparagine und Glutamine ersetzt. Histidin (H), Arginin (R) und Lysine (K) wurden zu Alanin (A) mutiert (Abbildung 4.12).

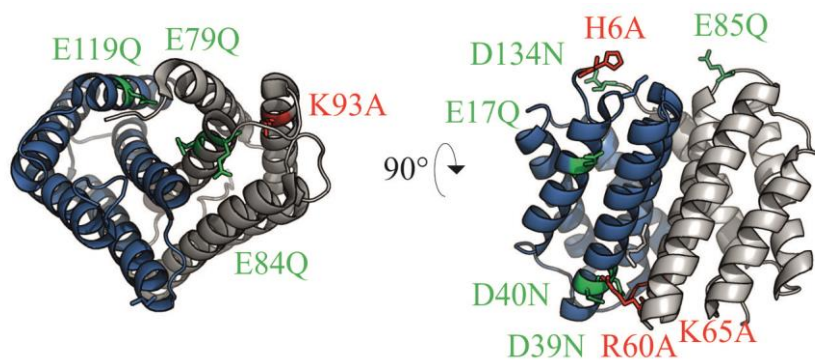


Abbildung 4.12: Ladungsmutanten der NTD

Kristallstrukturen der Wildtyp-NTD in der Dimerkonformation (pdb: 3LR2) mit den Mutationen positiv (rot) und negativ (grün) geladener Seitenketten.

Spinnen sind in der Lage sich mit etwa  $1 \text{ m s}^{-1}$  abzuseilen <sup>[115-117]</sup>. Diese hohe Geschwindigkeit lässt vermuten, dass die NTD auf den pH-Wechsel hin sehr schnell assoziiert. Dies

wurde in Stopped-Flow Experimenten getestet, bei denen die NTD in pH 7 Puffer sehr schnell 1:10 in pH 6 Puffer gemischt und die Fluoreszenzintensität detektiert wurde. Dies wurde für die NTD<sub>F</sub> und die Wildtyp-NTD<sup>[127]</sup> durchgeführt, bei letzterer über die intrinsische Fluoreszenz. Zu beobachten war eine Abnahme des Fluoreszenzsignals für die NTD<sub>F</sub> (Abbildung 4.13 A) und die Wildtyp-NTD (siehe Referenz<sup>[127]</sup>). Diese ließen sich gut an eine Biexponentialfunktion anpassen. Die nicht erwartete Amplitude der zweiten Relaxation aus der Datenanpassung der gemessenen Fluoreszenzsignale der Assoziation betrug weniger als 10 % von der Hauptamplitude und die Ratenkonstante veränderte sich nicht mit zunehmender Konzentration der Proteine. Daher wurde diese einem Hintergrundsignal zugeordnet, das nicht von dem Protein stammt.

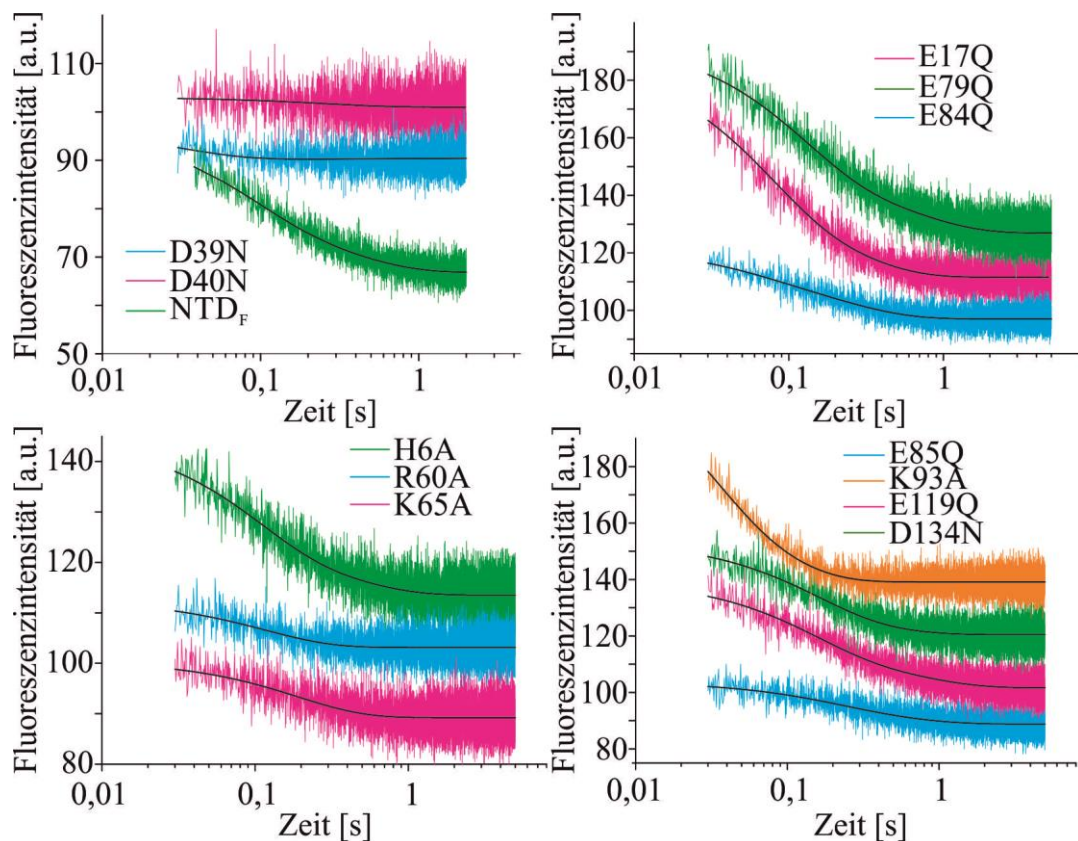


Abbildung 4.13: Exemplarische Stopped-Flow Assoziationsmessungen der NTD<sub>F</sub> und der Ladungsmutanten. Fluoreszenzsignale der Assoziation (grün, blau, pink, orange) von NTD<sub>F</sub> und den Ladungsmutanten, gemessen mittels der Stopped-Flow-Technik durch schnelles Mischen der Proteine von pH 7 in pH 6 Puffer. Die schwarzen Kurven sind die Datenanpassungen an eine Biexponentialfunktion. Gezeigt sind jeweils einzelne Einspritzungen.



Die Assoziationsmessungen mittels der Stopped-Flow-Technik wurden für vier weitere Konzentrationen wiederholt, wie in Abbildung 4.14 A für die NTD<sub>F</sub> gezeigt, und die Raten in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen (Abbildung 4.14 B, C). Zu sehen ist, dass die Raten mit zunehmenden Ausgangskonzentrationen der NTD<sub>F</sub> und der Wildtyp-NTD ansteigen. Dies spricht für eine bimolekulare Reaktion.

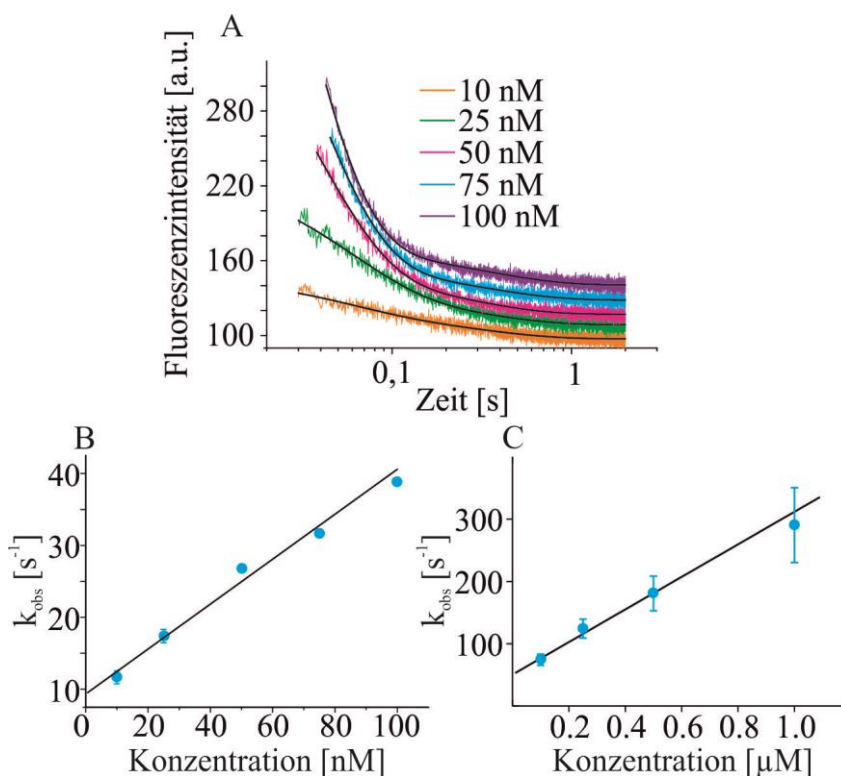


Abbildung 4.14: Ratenkonstantenbestimmung der Assoziation der NTD und der NTD<sub>F</sub>

(A) Fluoreszenzsignale der Assoziation der NTD<sub>F</sub> bei verschiedenen Konzentrationen gemessen mittels Stopped-Flow-Technik. In (B) sind die gemessenen Ratenkonstanten der NTD<sub>F</sub> und in (C) der Wildtyp-NTD bei verschiedenen Konzentrationen der Assoziation aufgetragen gegen die Konzentration. Die Linie ist eine lineare Datenanpassung der Werte. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen aus drei Messungen.

Die Assoziationsraten wurden durch die lineare Anpassung der Daten erhalten (Abbildung 4.14 B, C). Diese ergab für die NTD<sub>F</sub> eine Assoziationsrate  $k_a$  von  $3,0 \pm 0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für die Wildtyp-NTD von  $2,6 \pm 0,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die gute Übereinstimmung der Assoziationsraten aus extrinsischer und intrinsischer Fluoreszenz lässt darauf schließen, dass der



extrinsische Fluoreszenzschalter das Verhalten des Proteins nicht beeinflusst. Daher wurden die Assoziationsraten der Ladungsmutanten über die Fluoreszenz von ATTO Oxa11 bestimmt, da dies weniger Proteinmaterial erforderte und das verwendete Gerät im roten Wellenlängenbereich sensitiver war. Die NTD-Ladungsmutanten wurden ausschließlich farbstoffmarkiert gemessen, daher wird im Weiteren der Einfachheit halber auf die Markierung mit einem  $F$  verzichtet.

Im Weiteren wurden die Assoziationssignale der Ladungsmutanten gemessen. Bis auf die D39N und die D40N, die nahezu keine Fluoreszenzänderungen zeigten, konnte für alle Mutanten ein Fluoreszenzabfall gemessen (Abbildung 4.13) und daraus die Assoziationsraten berechnet werden, wie zuvor für die  $NTD_F$  und die Wildtyp-NTD beschrieben.

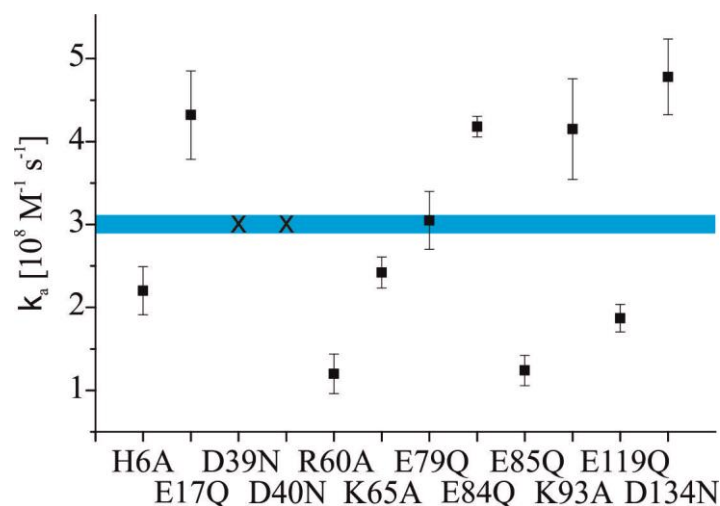


Abbildung 4.15: Assoziationsraten der NTD-Ladungsmutanten

Assoziationsraten der NTD-Ladungsmutanten mit den Standardfehlern. Der horizontale blaue Balken markiert die Assoziationsrate der  $NTD_F$ , inklusive Fehler. Das X bei D39N und D40N zeigt, dass keine Raten gemessen werden konnten.

In Abbildung 4.15 sind die Assoziationsraten der Ladungsmutanten im Vergleich zur  $NTD_F$  dargestellt. Die Raten befinden sich in einem Bereich von  $1,2 \pm 0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $4,8 \pm 0,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Ratenkonstanten sind somit ähnlich zur  $NTD_F$ .

Spinnenseide wird nicht nur schnell synthetisiert, sondern ist gleichzeitig auch sehr stabil. Um Rückschlüsse auf die Stabilität der dimerisierten NTD ziehen zu können, wurden zu-

sätzlich Dissoziationsmessungen durchgeführt. Diese wurden unter physiologischen Bedingungen bei pH 6 durchgeführt, indem die NTD<sub>F</sub> mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik schnell 1:10 in einen Überschuss Wildtyp-NTD gemischt wurde („Chasing-Experiment“). Da das Monomer-Dimer Gleichgewicht dynamisch ist und  $k_a$  vermutlich deutlich größer als  $k_d$ , wurde erwartet, dass jedes fluoreszenzgelöschte NTD<sub>F</sub>-NTD<sub>F</sub>-Dimer reassoziert zu einem fluoreszierenden NTD<sub>F</sub>-Wildtyp-NTD-Dimer. Da sich bei diesem Versuch die Tryptophanfluoreszenz nicht ändert, war es erforderlich die Dissoziationsraten über den extrinsischen Fluoreszenzschalter zu messen.

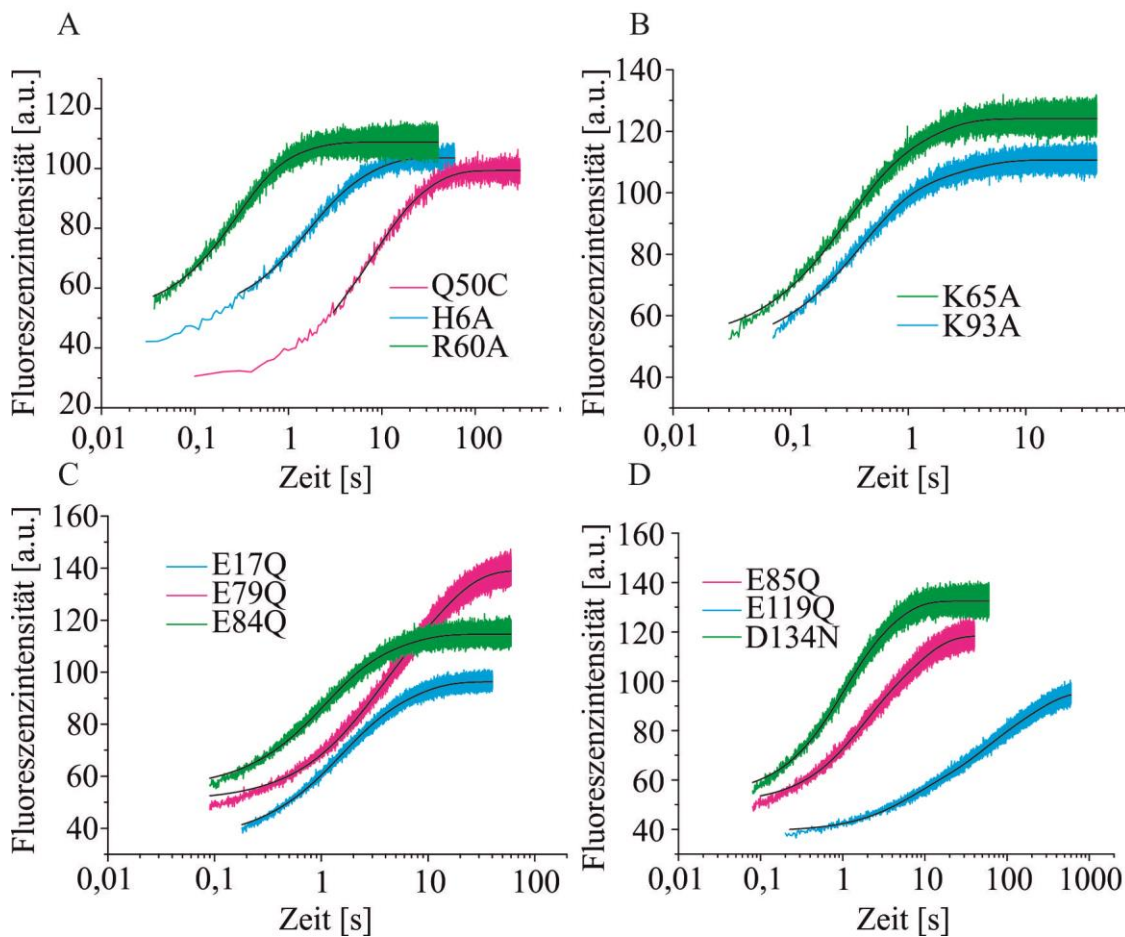


Abbildung 4.16: Stopped-Flow Dissoziationsmessungen der NTD<sub>F</sub> und der Ladungsmutanten

Fluoreszenzsignale von Dissoziationsmessungen (grün, blau, pink) der NTF<sub>F</sub> und den Ladungsmutanten, gemessen an der Stopped-Flow durch schnelles Mischen der Proteine von pH 6 in einen Überschuss Wildtyp-NTD in pH 6. Die schwarzen Kurven sind die Datenanpassungen an eine Exponentialfunktion mit zwei Exponenten. Gezeigt sind jeweils einzelne Einspritzungen.

Die beobachteten Fluoreszenzzunahmen sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Für die D39N und die D40N konnten keine Signale gemessen werden. Die anderen ließen sich gut an biexponentielle Funktionen anpassen. Bei niedrigen Ionenstärken waren die zwei Amplituden aus der Datenanpassung nahezu identisch. Um zu identifizieren, welche Amplitude mit dazugehöriger Ratenkonstante die Dissoziation widerspiegelt, wurden die Proteine auch bei 100 und 175 mM Ionenstärke gemessen. Ab  $\sim 100$  mM verschwindet die zweite Amplitude und es konnte so ein Rückschluss auf die zutreffende Amplitude und Dissoziationsrate gezogen werden. Diese sind in Übereinstimmung mit monoexponentiell angepassten Dissoziationsmessungen (siehe unten). Die Amplitude der zweiten, zwei bis vierfach langsameren Ratenkonstanten, könnte von der Bildung von Aggregaten stammen, in denen zwischen den Farbstoffen Homo-FRET, Energietransfer zwischen zwei identischen Farbstoffen, stattfindet. Wildtyp-NTD-Oligomere wurden bereits in Lichtstreuungsexperimenten bei pH 6 identifiziert, allerdings sonst in keinen weiteren Studien <sup>[77, 120]</sup>.

Um zu testen, ob die  $k_d$ -Werte unabhängig von der Proteinkonzentration sind, wie zu erwarten für eine bimolekulare Reaktion, wurden diese für die NTD<sub>F</sub> bei 25, 50 und 100 nM gemessen mit folgenden Werten:  $0,3 \pm 0,1$ ,  $0,33 \pm 0,05$  und  $0,26 \pm 0,05$  s<sup>-1</sup>. Im Fehler sind diese Werte gleich, und es wurde eine Konzentrationsabhängigkeit ausgeschlossen.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, die Dissoziation der NTD<sub>F</sub> und der Wildtyp-NTD, durch schnelles 1:10 Mischen über die Stopped-Flow-Technik von pH 6 in pH 7 zu detektieren. Hier konnte keine Änderung im Fluoreszenzsignal gemessen werden, weil die Dissoziation unter diesen Bedingungen vermutlich zu schnell für die Zeitauflösung des Gerätes ist, dass eine Totzeit von 1 - 10 ms hat.

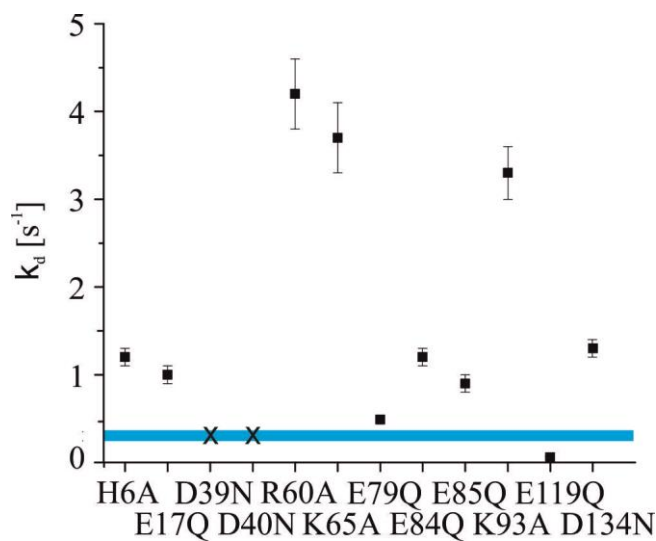


Abbildung 4.17: Dissoziationsraten der NTD-Ladungsmutanten

Dissoziationsraten der NTD-Ladungsmutanten mit den Standardabweichungen aus drei Messungen. Der horizontale blaue Balken markiert die Dissoziationsrate der  $NTD_F$ , inklusive Standardabweichung. Das X bei D39N und D40N zeigt, dass keine Raten gemessen werden konnten.

Die Dissoziationsraten aller Ladungsmutanten im Vergleich mit der  $NTD_F$  ( $k_d = 0,30 \pm 0,05 s^{-1}$ ) sind in Abbildung 4.17 dargestellt. Die Werte unterscheiden sich stark nach Position und sind bis auf die E119Q alle zu größeren  $k_d$ -Werten verschoben, mit einem bis zu dreizehnfachen Anstieg der R60A. Der  $k_d$  der E119Q dagegen ist um ein Fünffaches kleiner als der von der  $NTD_F$ .

In vorangehenden Experimenten in dieser Arbeit (Abbildung 4.11) und auch bei der Bestimmung der Dissoziationsraten hat sich ein Einfluss der Ionenstärke auf die NTD gezeigt. Daher wurden die Assoziations- und Dissoziationsraten mit ansteigender Ionenstärke des pH 6 Puffers gemessen (Abbildung 4.18). Die Fluoreszenzsignale der Assoziation und Dissoziation ließen sich gut mit Biexponentialfunktionen anpassen.

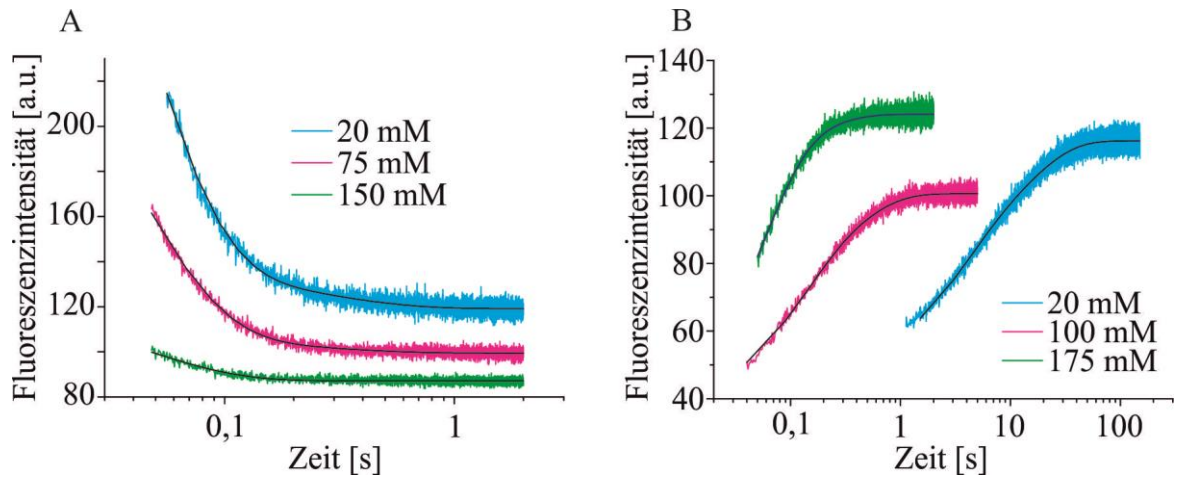


Abbildung 4.18: Salzabhängige Stopped-Flow Messungen der NTD<sub>F</sub>

Fluoreszenzsignale der NTD<sub>F</sub> bei Stopped-Flow (A) Assoziations- und (B) Dissoziationsmessungen in pH 6 Puffern verschiedener Ionenstärke. Die schwarzen Kurven sind die biexponentiellen Datenanpassungen.

Die Assoziationsraten blieben mit steigender Ionenstärke konstant, im Gegensatz zu den Dissoziationsraten. Diese nehmen mit größer werdender Ionenstärke zu (Abbildung 4.19 A).

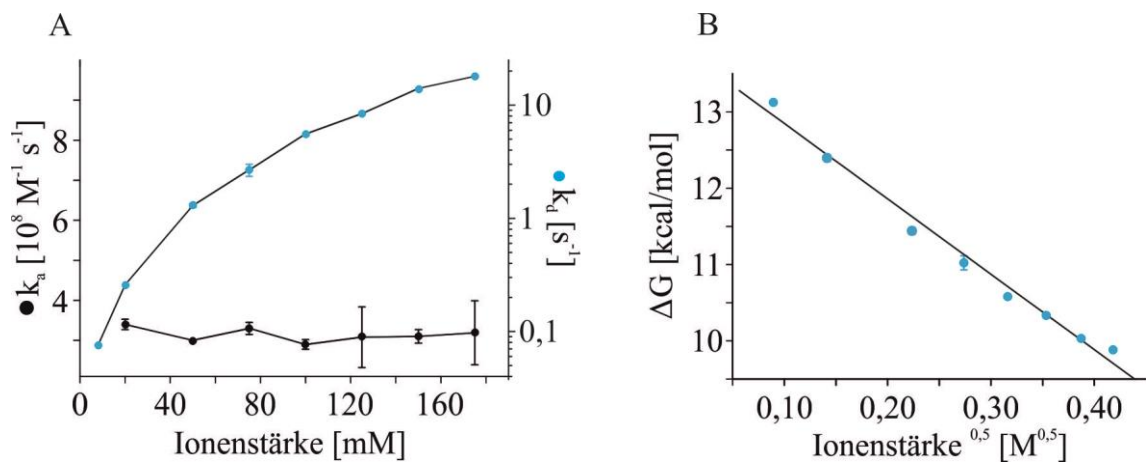


Abbildung 4.19: Salzabhängige Raten und freie Energie der NTD<sub>F</sub>

(A) Assoziationsraten  $k_a$  (schwarze Kreise) und Dissoziationsraten (blaue Kreise) mit Standardabweichungen gemessen bei pH 6 mit steigender Ionenstärke. (B) Freie Energie  $\Delta G$ , berechnet aus  $k_a$  und  $k_d$ , aufgetragen gegen die Wurzel der Ionenstärke. Die schwarze Linie ist die lineare Anpassung der Daten.

Aus den Assoziations- und den Dissoziationsraten wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_d$  berechnet (Tabelle 3). Diese liegen im nM-Bereich und sind, wie in Abbildung 4.19 A zu sehen, stark ionenstärkeabhängig. Über die  $K_d$ -Werte konnte mit Gleichung 3.5 die freie Energie der Dimerisierung der NTD<sub>F</sub> berechnet werden (Tabelle 3, Abbildung 4.20). Auch hier ist eine Positionsabhängigkeit festzustellen. Bis auf die E119Q, deren freie Energie um  $0,7 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  größer wird gegenüber der NTD<sub>F</sub>, sinkt diese um bis zu  $2,1 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  bei der R60A.

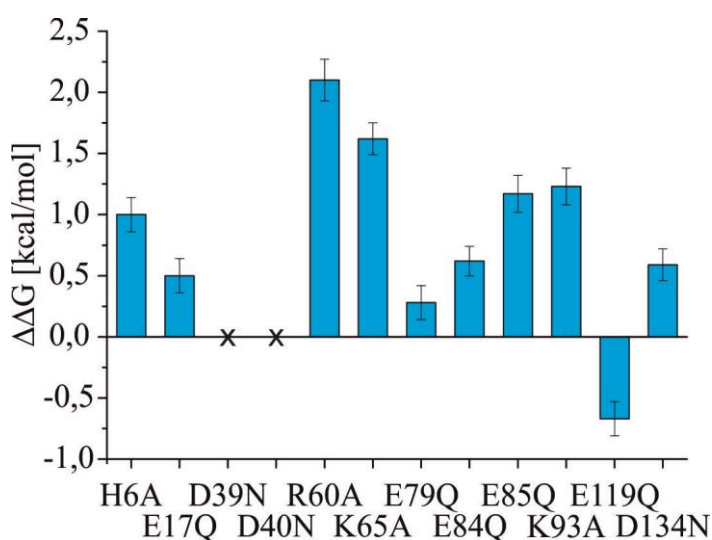


Abbildung 4.20: Freie Energieänderungen der NTD-Ladungsmutanten  
 Änderungen der freien Energie ( $\Delta\Delta G$ ) der NTD-Ladungsmutanten in Bezug auf die NTD<sub>F</sub>. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen, berechnet aus der Fehlerfortpflanzung, an.

Die Debye-Hückel Gleichung beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen von Ionen in Lösung <sup>[128]</sup>. Um zu überprüfen, ob die Änderungen von  $k_d$  und der freien Energie  $\Delta G$  von der Ladungsabschirmung durch die Erhöhung der Ionenstärke stammen, wurde  $\Delta G$  gegen die Wurzel der Ionenstärke aufgetragen. Ist ein funktioneller Zusammenhang vorhanden, ist  $\Delta G$  proportional zu der Wurzel der Ionenstärke <sup>[56, 129]</sup>. Es wurde eine lineare Abhängigkeit der Daten gefunden, wonach davon ausgegangen wird, dass die Debye-Hückel Gleichung zutrifft. Die lineare Datenanpassung wurde für 0 mM Ionenstärke extrapoliert und ein  $k_d$  von  $0,025 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$  und ein  $\Delta G$  von  $13,8 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  erhalten.

Tabelle 3: Übersicht über die Assoziations- ( $k_a$ ) und Dissoziationsraten ( $k_d$ ), die  $K_d$ -Werte und die Änderung der freien Energie  $\Delta\Delta G$  der Ladungsmutanten gegenüber der NTD<sub>F</sub>.

Mutante	$k_a$ [ $10^8 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_d$ [nM]	$\Delta\Delta G$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]
Q50C	$3,0 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,05$	$1 \pm 0,18$	Referenz
H6A	$2,22 \pm 0,29$	$1,2 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,84$	$1 \pm 0,14$
E17Q	$4,32 \pm 0,53$	$1,0 \pm 0,1$	$2,31 \pm 0,37$	$0,5 \pm 0,14$
D39N	-	-	-	-
D40N	-	-	-	-
R60A	$1,2 \pm 0,24$	$4,2 \pm 0,4$	$35 \pm 7,75$	$2,1 \pm 0,17$
K65A	$2,42 \pm 0,19$	$3,7 \pm 0,4$	$15,29 \pm 2,04$	$1,62 \pm 0,13$
E79Q	$3,05 \pm 0,35$	$0,49 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,25$	$0,28 \pm 0,14$
E84Q	$4,18 \pm 0,12$	$1,2 \pm 0,1$	$2,87 \pm 0,25$	$0,62 \pm 0,12$
E85Q	$1,24 \pm 0,18$	$0,9 \pm 0,1$	$7,26 \pm 1,33$	$1,17 \pm 0,15$
K93A	$4,15 \pm 0,61$	$3,3 \pm 0,3$	$7,95 \pm 1,37$	$1,23 \pm 0,15$
E119Q	$1,87 \pm 0,17$	$0,06 \pm 0,007$	$0,32 \pm 0,05$	$-0,67 \pm 0,14$
D134N	$4,78 \pm 0,46$	$1,3 \pm 0,1$	$2,72 \pm 0,34$	$0,59 \pm 0,13$

Die NTD hat wichtige Aufgaben in der Spinne: diese ist für die Wasserlöslichkeit während der Lagerung und für die korrekte Ausbildung des Spinnenseidenfadens verantwortlich <sup>[75]</sup>. Ersteres ist möglich, obwohl nur etwa 9 % der Aminosäureseitenketten ionisierbar sind, zu sonst im Schnitt üblichen 29 % <sup>[130]</sup>. Zu dieser einzigartigen Sequenz wurde bis jetzt auch noch kein Homolog gefunden <sup>[78]</sup>. Des Weiteren sind die ionisierbaren Seitenketten vermutlich auch in den pH-Schalter involviert <sup>[73, 78, 120]</sup>, wobei die monomere NTD durch Protonierung strukturell und/oder chemisch verändert wird. Dieser Mechanismus ist bis jetzt allerdings noch nicht komplett verstanden.

Um an dem pH-Schalter in der NTD beteiligt zu sein, muss der  $pK_a$  der beteiligten Aminosäureseitenkette zwischen pH 7 und pH 6 liegen. Der übliche  $pK_a$  von Carboxylsäuren liegt jedoch in einem Bereich zwischen 3 und 4, was jedoch stark von der Umgebung abhängt <sup>[130]</sup>. Coulombabstoßungen zwischen dicht beieinander liegenden negativen Ladungen können zur Anhebung der  $pK_a$ -Werte führen <sup>[130]</sup>. Vermutet wurde von Askarieh et al. <sup>[78]</sup> anhand der Kristallstruktur und Mutageneseexperimenten, dass zwischen der D40 und der E84 eine direkte Wechselwirkung stattfindet, die für den pH-Schalter verantwortlich ist. Allerdings spricht eine weitere NMR-Studie dagegen, die zeigt, dass strukturelle Unterschiede zwischen der monomeren und der dimeren NTD vorhanden sind, die bewirken, dass die Interaktion zwischen der D40 und der E84 im Monomer nicht vorhanden ist <sup>[77]</sup>.

Die durchgeführten Stopped-Flow Experimente mit den NTD-Ladungsmutanten haben gezeigt, dass scheinbar nur die D39N und die D40N die Dimerisierung der NTD verhindern (Abbildung 4.13). Die E84Q hingegen zeigte im Vergleich zur NTD nur eine geringe Änderung des  $k_a$ -Wertes (Abbildung 4.17). In anderen Studien wurde durch Massenspektrometrie und Fluoreszenzmessungen dieses Ergebnis für die D40N bereits bestätigt <sup>[71, 78]</sup>. Die D39 wurde in anderen Studien noch nicht untersucht. Im Monomer und im Dimer sind D39 und D40 benachbart <sup>[127]</sup>. Dies könnte dazu führen, dass deren  $pK_a$ -Werte in den erforderlichen Bereich zwischen pH 7 und pH 6 angehoben werden. Durch Mutation einer der Asparaginsäuren zu Asparagin würde dieser Effekt nicht auftreten und die Dimerisierung der NTD durch Protonierung würde, wie beobachtet, nicht mehr funktionieren (Abbildung 4.13).

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die E119Q die Dissoziation um das Fünffache verlangsamt und um  $0,7 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  gegenüber der NTD<sub>F</sub> stabilisiert (Abbildung 4.20). Dies könnte daran liegen, dass der  $pK_a$ -Wert durch die Umgebung erhöht wird und somit eine Protonierung bei pH 6 zur Entfernung der Ladung der Carboxylgruppe führt. Computersimulationen zeigen in Übereinstimmung dazu eine Destabilisierung des Dimers durch Eindringen von Wasser bedingt durch die Carboxylgruppe der E119 <sup>[79]</sup>. Bis jetzt sind die experimentellen Untersuchungen zur Protonierung von Seitenketten in der NTD bei pH 6 jedoch noch unvollständig.

In den Stopped-Flow Experimenten hat sich gezeigt, dass auch die R60A und die K65A eine destabilisierende Auswirkung haben, und zwar um eine Abnahme der freien Energie um  $\sim 2 \text{ kcal mol}^{-1}$  gegenüber der NTD. Der Grund dafür könnten die stabilisierenden Salzbrücken <sup>[131]</sup> zwischen den positiv geladenen Seitenketten von R60 und K65 mit D39 und D40 sein. Neben R60A und K65A destabilisiert K93A ebenfalls die dimerisierte NTD. Im Gegensatz zu den anderen Seitenketten liegt diese jedoch im Inneren des Proteins, was die Erklärung schwierig macht. Die H6A und die E79Q haben in anderen durchgeführten Studien keine Auswirkungen auf die Dimerisierung gezeigt <sup>[71, 78]</sup>. Dies konnte mit den Stopped-Flow Messungen bestätigt werden (Abbildung 4.15, Abbildung 4.17).

Die NTD-Assoziationsmessungen lieferten eine Assoziationsrate von  $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Dies ist sehr schnell, wenn man bedenkt, dass die basale Ratenkonstante für die Protein-Protein



Assoziation bei  $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  liegt <sup>[56, 132, 133]</sup> und die für die zufällige Kollision von globulären Proteinen bei 25 °C, berechnet nach der Einstein-Smoluchowski Gleichung, bei  $\sim 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  <sup>[132]</sup>. Somit erreicht die NTD-Assoziationsrate fast das Geschwindigkeitslimit der Protein-Protein Assoziation. Die Frage ist jedoch, was den Assoziationsprozess auf die pH-Änderung von pH 7 auf pH 6 so schnell macht. Bekannt ist, dass auf Grund von entgegengesetzter Ladungsverteilung auf Proteinkontaktflächen Coulombkräfte entstehen, die Assoziationen von Proteinen beschleunigen können <sup>[56]</sup>. Dieser Effekt wird jedoch durch die Zugabe von Elektrolyten zur Lösung aufgehoben <sup>[56, 129, 134-138]</sup>. Erstaunlicherweise verhielt sich die NTD genau entgegengesetzt zu sonst beobachtetem Verhalten <sup>[56]</sup>: Die Dissoziationsrate wurde durch Erhöhung der Ionenstärke beschleunigt und die Assoziationsrate nicht beeinflusst (Abbildung 4.19). Einen Einfluss zeigten zudem die Ladungsmutanten lediglich auf die Dissoziationsrate (Abbildung 4.17). Eine Erklärung dafür könnte der makromolekulare Dipol parallel zur Helixachse sein, der auf Grund der entgegengesetzten Ladungsverteilung in der NTD entsteht <sup>[78]</sup> (Abbildung 2.10). Durch die antiparallele Homodimerisierung kommt es somit zu einer anziehenden Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die die treibende Kraft der Assoziation sein könnte und nicht durch die Ionenstärke beeinflusst wird. Berechnungen bezüglich der Elektrostatik in Proteinen haben gezeigt, dass Lösungsmittelabschirmungen bei Dipolwechselwirkungen vernachlässigt werden können <sup>[139]</sup>. Experimentell wurde auch bestätigt, dass Helix-Dipol-Wechselwirkungen in Proteinen kaum durch die Ionenstärke beeinflusst werden <sup>[140]</sup>.

Bei der Betrachtung der Assoziationsraten muss bedacht werden, dass die NTD in den Experimenten isoliert untersucht wurde. Diese macht jedoch etwa nur 5 % des Gesamtgewichtes eines Spidroins von  $\sim 300 \text{ kDa}$  aus, was die gemessenen Assoziationsraten verlangsamen könnte. Hinzu kommt, dass die größere Viskosität, bedingt durch die hohe Konzentration an Spidroins von bis zu 50 % (w/v) <sup>[117]</sup>, die Mobilität der NTD in der Spinne vermindern könnte. Dennoch wäre eine Assoziationsrate im Bereich der basalen Ratenkonstante zu langsam, um eine Synthese der Spinnenseidenfaser in einer Geschwindigkeit von  $1 \text{ m s}^{-1}$  zu erreichen.

Das biologische System der Spinnenseiden-NTD wurde im Folgenden dazu verwendet, die Fluoreszenzlöschmechanismen PET, FRET und die H-Dimerbildung zu vergleichen.

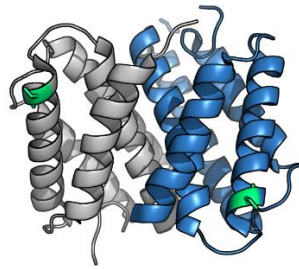


Abbildung 4.21: Das NTD FRET-Reportersystem

Kristallstruktur der dimeren Wildtyp-NTD, bestehend aus den zwei Monomeren in blau und grau (pdb: 3LR2). In grün markiert die Serine an Position 91, die zu Cysteinen mutiert und mit thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

Dazu wurde die Mutante S91C synthetisiert, in der ein Serin an Position 91 (Abbildung 4.21) gegen ein Cystein ausgetauscht wurde für die Markierung mit einem thiolreaktivem Farbstoff. Diese Position wurde gewählt, da es durch die räumliche Trennung durch das Protein zu keiner Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen mehr kommen sollte. Die Dissoziationsrate konnte daher nicht mehr über die Auflösung der Farbstoff H-Dimere detektiert werden. Stattdessen sollte dies nun über FRET möglich sein. Dazu wurde ein Teil des S91C Proteins mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3, dem Donor, und der andere Teil mit Cy5, dem Akzeptor, markiert. Der Försterradius der beiden Farbstoffe wurde zuvor mit Gleichung 2.9 berechnet. Dieser liegt bei  $\sim 5,6$  nm. Der Abstand der Cysteine an Position 91 im NTD-Dimer wurde mit Hilfe des Programmes PyMol (pdb: 3lr2) auf 3,3 nm abgeschätzt. Da der Försterradius von Cy3 und Cy5 deutlich größer ist als der Abstand der Cysteine zueinander, sollte ein FRET-Übertrag möglich sein <sup>[17]</sup>.

Dies wurde in einer Fluoreszenzmessung getestet (Abbildung 4.22). Dazu wurde die Cy3-NTD in pH 6 Puffer alleine gemessen, und mit einem fünffachen Überschuss an Cy5-NTD mit steigender Ionenstärke des Puffers. Der Überschuss an Cy5-NTD wurde eingesetzt, damit möglichst jede Cy3-NTD eine Cy5-NTD gebunden hat. Angeregt wurde bei 510 nm, sodass Cy5 nicht direkt angeregt werden konnte und ein möglicher Emissionspeak von einem Energietransfer stammt.

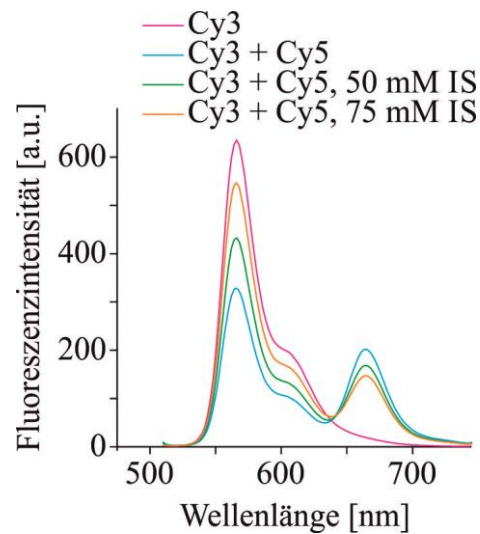


Abbildung 4.22: FRET Salzabhängigkeitsmessungen der S91C-NTD

Fluoreszenzspektren aufgenommen in pH 6 Puffer der Cy3-NTD alleine (pink), zusammen mit einem fünffach Überschuss Cy5-NTD mit 20 mM (blau), 50 mM (grün) und 75 mM (orange) Ionenstärke.

Die Messung der Cy3-NTD alleine zeigt ein typisches Cy3 Emissionsspektrum mit der maximalen Fluoreszenzintensität von  $\sim 650$  a.u. bei  $\sim 570$  nm. Diese nimmt bei Zugabe eines Überschusses Cy5-NTD auf  $\sim 320$  a.u. ab und es entsteht ein zusätzlicher Peak im Emissionsmaximum von Cy5 (664 nm) mit einer Intensität von  $\sim 200$  a.u.. Dieser Peak verringert sich mit steigender Ionenstärke des Puffers, woraufhin der andere bei  $\sim 570$  nm wieder ansteigt. Dieser Versuch zeigt durch das Aufkommen des zweiten Emissionspeaks bei 664 nm und der Abnahme der Donorfluoreszenz, dass ein FRET-Übertrag von Cy3 auf Cy5 stattgefunden hat. Es ist bekannt, dass durch die Erhöhung der Ionenstärke das Monomer-Dimer Gleichgewicht auf Seiten des Monomers verschoben wird <sup>[73]</sup>, in Abbildung 4.22 an dem sinkenden Energieübertrag zu erkennen. Gleiches wurde in dieser Arbeit zuvor auch schon durch die Fluoreszenzlöschung bei H-Dimerbildung und die intrinsische Tryptophanfluoreszenz gezeigt (Abbildung 4.11).

Um die H-Dimerbildung der Farbstoffe an der dimeren S91C auszuschließen, wurde diese, wie zuvor die Q50C, für eine Stopped-Flow Messung mit ATTO Oxa11 markiert. Die Dissoziation wurde über das 1:10 Mischen der ATTO Oxa11-S91C in einen Überschuss Wildtyp-NTD gemessen. Es war keine Änderung des Fluoreszenzsignals zu detektieren

(Abbildung 4.23). Dies lässt darauf schließen, dass keine Interaktion zwischen den Farbstoffen an Position S91C möglich ist.

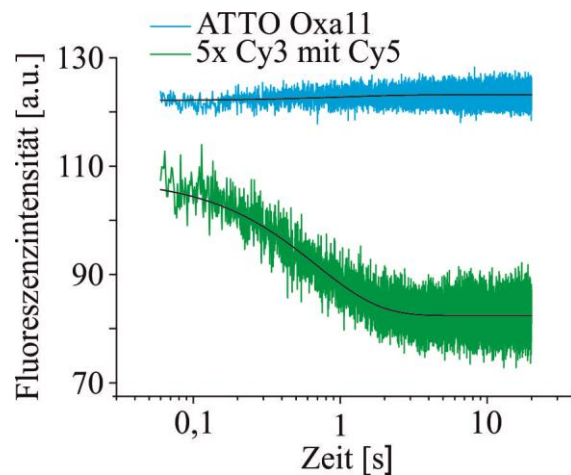


Abbildung 4.23: Stopped-Flow Dissoziationsmessung der S91C-NTD über FRET

Fluoreszenzsignale bei Stopped-Flow Dissoziationsmessungen in pH 6 Puffern der S91C markiert mit ATTO Oxa11 (blau) oder mit Cy3 und Cy5 (grün). Bei letzterem FRET Experiment wurde Cy3 mit einer Laserdiode der Wellenlänge 524 nm angeregt und die Emission von Cy5 detektiert. Die schwarzen Kurven sind die monoexponentiellen Datenanpassungen.

In einem nächsten Experiment sollte die Dissoziationsrate über FRET und ohne direkte Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkung gemessen werden. Dazu wurde ein Fünffachüberschuss an Cy3-NTD mit Cy5-NTD in pH 6 Puffer vorgelegt und über Stopped-Flow-Technik 1:10 in einen Überschuss Wildtyp-NTD gemischt. Der Überschuss an Cy3-NTD wurde eingesetzt, damit möglichst jede Cy5-NTD mit einer Cy3-NTD dimerisiert. Angeregt wurde bei Cy3 mit einer Laserdiode der Wellenlänge 524 nm. Detektiert wurde die Emission von Cy5. Zu beobachten war eine Abnahme des Fluoreszenzsignals (Abbildung 4.23), das monoexponentiell angepasst werden konnte. Die monoexponentielle Datenanpassung lässt darauf schließen, dass die zweite Kinetik der Dissoziationsmessung der NTD<sub>F</sub> (Abbildung 4.16) einem Farbstoffartefakt und nicht der Aggregatbildung des Proteins zuzuschreiben ist. Die gemessene Dissoziationsrate beträgt  $1,46 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ . Im Vergleich dazu ist der  $k_d$ -Wert von der NTD<sub>F</sub> mit  $0,30 \pm 0,05 \text{ s}^{-1} \sim 4,8$ -mal kleiner. Dies spricht für eine stabilisierende Wirkung der Farbstoff H-Dimere auf die dimerisierte NTD<sub>F</sub>. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Bollmann et al., die von stabilisierenden Effekten bei H-Dimeren berichten <sup>[21]</sup>.

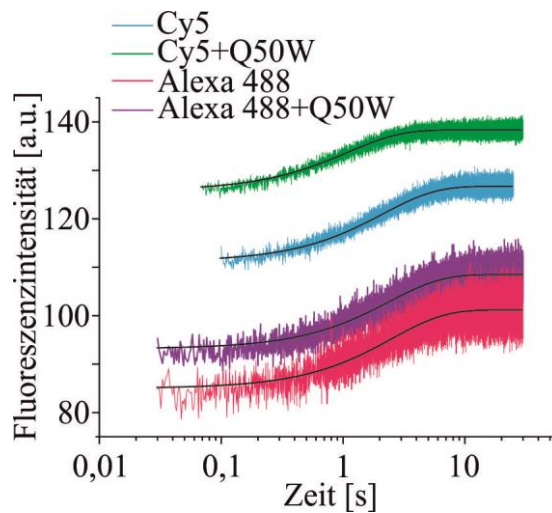


Abbildung 4.24: Vergleich der Dissoziationsmessungen über PET und H-Dimere

Fluoreszenzsignale bei Stopped-Flow Dissoziationsmessungen in pH 6 Puffern der Q50C markiert mit Cy5 (blau) und zusätzlich einem Überschuss der Q50W (grün) oder mit Alexa 488 (pink) und der Q50W (lila). Die schwarzen Kurven sind die monoexponentiellen Datenanpassungen

Im Weiteren wurde die Q50C mit acht weiteren Farbstoffen (siehe Tabelle 1) markiert, um zu testen, wie stark diese das NTD<sub>F</sub>-Dimer stabilisieren.

Dazu wurde die farbstoffmarkierte NTD wieder in pH 6 Puffer vorgelegt und 1:10 in einen Überschuss Wildtyp-NTD (pH 6 Puffer) gemischt und das Fluoreszenzsignal detektiert. Nur die Dissoziationssignale der Cy5- und der Alexa 488-NTD ließen sich mit monoexponentiellen Funktionen anpassen (Abbildung 4.24), für alle anderen waren bi- oder triexponentielle Funktionen notwendig und eine Identifizierung der zutreffenden Dissoziationsrate war nicht möglich. Ein Grund dafür könnten wieder Farbstoffartefakte sein. Für die Cy5- und die Alexa 488-NTD liegen die Dissoziationsraten bei  $0,46 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und  $0,38 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ . D.h. diese zwei Farbstoffe haben ebenfalls eine stabilisierende Wirkung auf die dimerisierte NTD<sub>F</sub>. Im Fehler ist  $k_d$  für Alexa 488 identisch im Vergleich zu ATTO Oxa11 und für Cy5 etwas größer.

Die NTD<sub>F</sub> Dissoziation sollte im Weiteren auch über PET gemessen werden. Dazu wurde anstelle eines Cysteins an Position 50 (Q50C) (Abbildung 4.8) der NTD ein Tryptophan (Q50W) über ortsspezifische Mutagenese eingefügt. Die Idee war, die farbstoffmarkierten NTDs mit einem Überschuss Q50W zu mischen, sodass sich NTD<sub>F</sub>-Q50W Dimere bilden,

in denen die Farbstoffe in nahen Kontakt mit dem Tryptophan kommen und durch PET gelöscht werden. Dies wurde zuerst in einem Ensembleexperiment in pH 6 Puffer getestet, indem zuerst die farbstoffmarkierte NTD allein gemessen wurde, dann mit einem Zehnfachüberschuss Q50W und in einer dritten Messung mit einem 33-fachen Überschuss an Wildtyp-NTD. Letzterer, um die farbstoffgelöschten NTD<sub>F</sub>-Q50W-Dimere in fluoreszierende NTD<sub>F</sub>-Wildtyp-NTD-Dimere umzuwandeln (Abbildung 4.25).

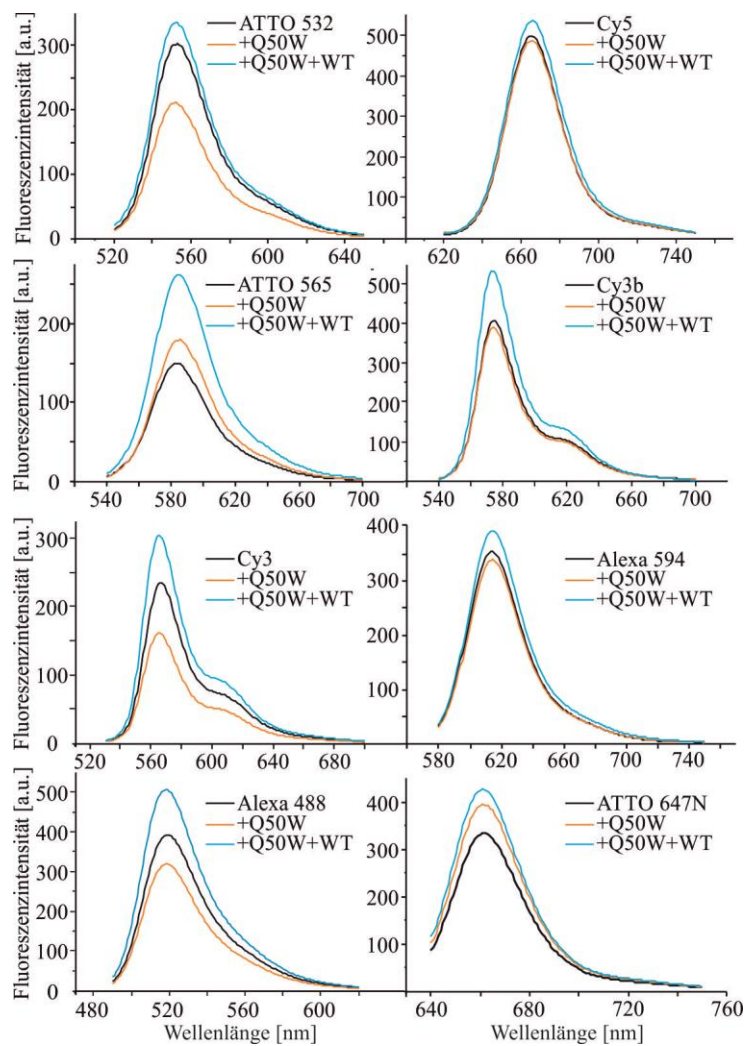


Abbildung 4.25: Fluoreszenzmessungen der unterschiedlich farbstoffmarkierten Ladungsmutanten

Fluoreszenzspektren in pH 6 Puffer der Q50C gelabelt mit ATTO 532, Cy5, ATTO 565, Cy3b, Cy3, Alexa 594, Alexa 488 und ATTO 647N (schwarze Spektren), nach Zugabe der Q50W (orange Spektren) und nach Zugabe von Wildtyp-NTD (blaue Spektren).

Zu beobachten ist, dass bei drei der untersuchten Farbstoffe, ATTO 532, Cy3 und Alexa 488, die Fluoreszenz abnimmt nach Zugabe der Q50W, für ATTO 565 und ATTO 647N zunimmt und für Cy5, Cy3b und Alexa 594 konstant bleibt. Nach der Applikation des Wildtyp-Proteins zeigen alle Farbstoffe eine maximale Fluoreszenzintensität. Parallel zu den Emissionsspektren wurden auch Absorptionsmessungen durchgeführt. In diesen ist auf die Zugabe der Q50W hin eine Abnahme des Peaks bei der kürzeren Wellenlänge zu beobachten, exemplarisch für die Cy5-NTD gezeigt (Abbildung 4.26).

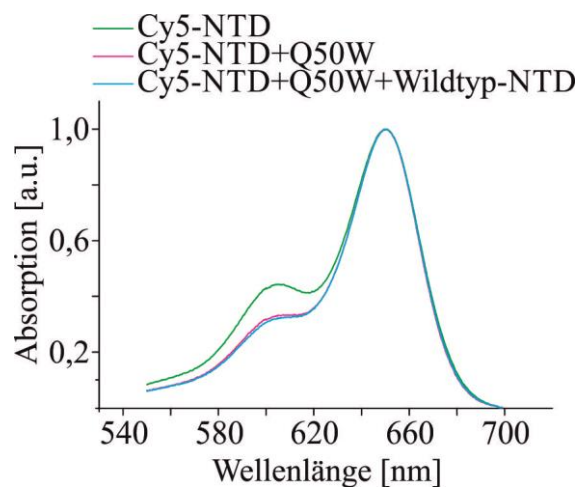


Abbildung 4.26: Absorptionsmessung der Cy5-NTD

Absorptionsspektren in pH 6 Puffer der Cy5-NTD alleine (grün), zusammen mit einem Überschuss der Q50W (pink) und einem Überschuss der Wildtyp-NTD (blau).

Die Ergebnisse aus den Emissions- und Absorptionsmessungen zeigen, dass die Zugabe der Q50W den Löschprozess der Farbstoffe ändert. Die charakteristischen H-Dimer Spektren der Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkung verschwinden und je nach Farbstoff werden diese stärker, schwächer oder gleich stark von Tryptophan gelöscht.

Da somit gezeigt wurde, dass das Tryptophan der Q50W vermutlich über PET mit den Farbstoffen wechselwirkt, wurde diese Art der Fluoreszenzlöschung auch dafür verwendet die Dissoziation der farbstoffmarkierten NTDs zu messen. Dazu wurden die farbstoffmarkierten NTDs mit einem Zehnfachüberschuss Q50W in pH 6 Puffer vorgelegt und mit Hilfe der Stopped-Flow 1:10 in Wildtyp-NTD, im gleichen Puffer, gemischt. Zu beobachten war

für alle farbstoffmarkierten NTDs eine Fluoreszenzabnahme, die aber nur für die Cy5-NTD und die Alexa 488-NTD monoexponentiell angepasst werden konnte (Abbildung 4.24). Für alle anderen konnte die Dissoziationsrate nicht identifiziert werden, da zwei oder drei Exponenten zur Datenanpassung notwendig waren. Eine mögliche Fehlerquelle in diesem Experiment könnte sein, dass nicht alle farbstoffmarkierten NTDs mit einer Q50W dimerisiert sind und es auch noch zur Ausbildung von H-Dimeren kommt. Die Raten für die Cy5-NTD und die Alexa 488-NTD liegen bei  $0,88 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  und  $0,41 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ . Somit scheint die Wechselwirkung von Cy5 mit Tryptophan etwas schwächer zu sein als die Cy5 H-Dimer Interaktion. Bei Alexa 488 ist kein Unterschied zu beobachten. Das Experiment hat gezeigt, dass die Dissoziationsrate, abhängig vom Farbstoff, um das etwa 1,6- bis 3,6-fache verlangsamt wird.

Auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen in wässrigen Lösungen neigen viele Fluorophore dazu, nichtfluoreszierende H-Dimere zu bilden <sup>[141]</sup> (Abbildung 4.9). Durch Untersuchung des biologischen Systems der Spinnenseiden NTD über PET, FRET und H-Dimere hat sich gezeigt, dass H-Dimere und die  $\pi$ -gestapelte Interaktion zwischen Farbstoff und Tryptophan eine stabilisierende Wirkung auf dimerisierte NTDs haben. Von stabilisierenden Effekten bei H-Dimerbildung und zwischen Farbstoff und Tryptophan berichteten unter anderem Daidone et al. <sup>[21, 103, 107]</sup>. In einer weiteren Studie <sup>[30]</sup> wurde herausgefunden, dass es unterschiedlich starke Tendenzen von Farbstoffen gibt, nichtfluoreszierende Absorptionskomplexe mit Tryptophan zu bilden. Ein Grund dafür sind die unterschiedlichen Elektronenaffinitäten der Farbstoffe. Im Vergleich mit Rhodaminen und Cyaninen haben Oxazine die höchste Tendenz Elektronen aufzunehmen <sup>[142]</sup>. Eventuell könnte dies eine Erklärung für die unterschiedlichen Fluoreszenzabnahmen der Farbstoffe auf die Zugabe der Q50W zu den fluoreszenzmarkierten NTDs sein (Abbildung 4.25). Trotz der schwachen Interaktion (Elektronenaufnahmetendenz) des Carbocyanins Cy5 mit Tryptophan <sup>[143]</sup> konnte über PET die Dissoziationsrate bestimmt werden. Für Cy5 zeigte sich ebenfalls nur eine geringe Fluoreszenzlöschung auf H-Dimerbildung hin (Abbildung 4.25), was eventuell an der negativen Ladung <sup>[143]</sup> des Farbstoffes liegen könnte. Der Vergleich der gemessenen Dissoziationsraten über PET und H-Dimerbildung der Alexa 488-NTD und der Cy5-NTD zeigt für erstere keinen Unterschied und für letztere eine etwas größere Dissoziationsrate bei der PET Messung. Der Anstieg der Dissoziationsrate könnte eventuell an



der höheren Bindungsstärke zwischen Farbstoffen gegenüber Farbstoff und Tryptophan liegen <sup>[21]</sup>. Beobachtet werden konnte auch anhand der Emissions- und Absorptionsspektren (Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26), dass sich der Löschprozess der H-Dimerbildung von PET unterscheidet.

Die Experimente haben gezeigt, dass die Spinnenseiden-NTD gut über die Fluoreszenzlöschmechanismen PET, H-Dimerbildung und FRET untersucht werden kann, die Mechanismen aber unterschiedliche Dissoziationsraten und Exponentialitäten der Anpassungsfunktionen liefern. Keine Auswirkungen hat die H-Dimerbildung dabei auf die Assoziation der NTD. Dieses wurde im Vergleich der Assoziationsraten, gemessen über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz und den extrinsischen Fluoreszenzschalter, gezeigt. Die stabilisierende Wirkung der Farbstoff H-Dimere verändert die Aussage über die Auswirkungen der NTD-Ladungsmutanten auf die Dissoziation nicht, da bei allen diese Wechselwirkung gleichermaßen beteiligt war. Für weitere Experimente wäre jedoch das FRET vor dem PET System und der H-Dimerbildung zu bevorzugen, da es hier anscheinend nicht zu stabilisierenden Wechselwirkungen kommt.

### 4.3 Dynamiken innerhalb der Ligandenbindungsdomäne des AMPA-spezifischen Glutamaterezeptors 2

Glutamaterezeptoren haben eine wichtige Aufgabe im Nervensystem von Vertebraten: diese regulieren die schnelle exzitatorische synaptische Transmission [82, 84, 144, 145]. Bei Fehlfunktion kann es zu Krankheiten wie Epilepsi, Parkinson oder Alzheimer kommen [82]. Bindet Glutamat an die Agonistenbindungsstelle der LBD des GluR zwischen der S1- und der S2-Domäne, geht die LBD aus der offenen zweischaligen ungebundenen apo-Form durch Bewegung der S2-Domäne in eine geschlossene über [89]. Daraufhin öffnet sich die Kanalpore und ein Ionenstrom kann fließen [89]. Die Veränderungen der Dynamiken in der isolierten GluR2-LBD, die auf die Bindung von Agonisten und unvollständigen Agonisten stattfinden, sollten mit Hilfe von PET-FCS untersucht werden.

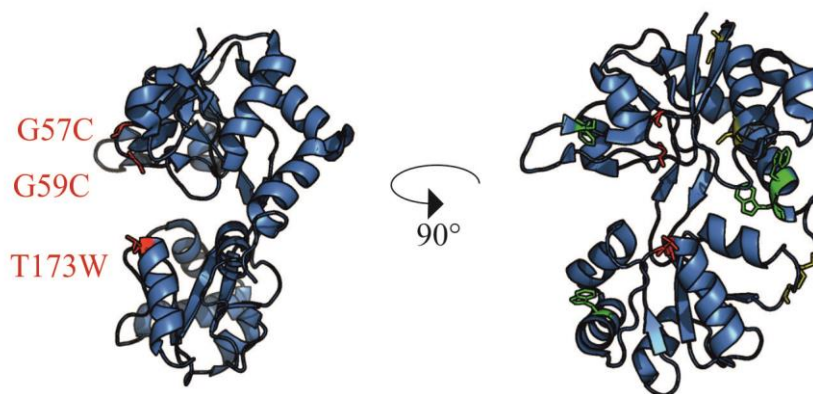


Abbildung 4.27: Das GluR2-LBD Reportersystem

Kristallstruktur der GluR2-LBD in der apo-Form (pdb: 1fto). Links: Seitenansicht mit den in rot markierten Mutationen für das PET-Reportersystem. Rechts: Frontansicht mit den vier in grün markierten Tryptophanen, den vier Cysteinen in gelb und den drei in Rot dargestellten Mutationen.

Dafür musste ein PET-Reportersystem in die LBD eingebracht werden, bestehend aus einem Cystein (C) für die Fluoreszenzmarkierung mit dem thiolreaktiven Farbstoff ATTO Oxa11 und der Aminosäure Tryptophan (W), dem Löschmolekül. Cystein und Tryptophan mussten dafür so an den Enden der D1- und D2-Domänen positioniert werden, dass

der Farbstoff nicht in Kontakt mit einem der vier nativen Tryptophane kommen kann (Abbildung 4.27). Als beste mögliche Positionen für das Cystein wurden die Glycine (G) an Stelle 57 und 59 in der D1 gefunden. Das Tryptophan wurde über ortsspezifische Mutagenese gegenüberliegend in der D2 an Position 173, anstelle eines Threonins (T), eingebracht.

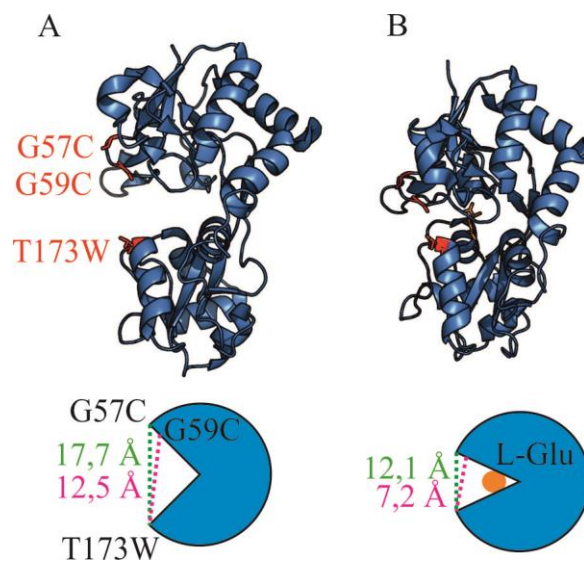


Abbildung 4.28: Konformationsänderung der GluR2-LBD

In (A) ist die Kristallstruktur der apo-Form der GluR2-LBD (pdb:1fto) und in (B) die der L-Glu gebundenen Form (pdb: 3dp6) dargestellt. Rot markiert sind jeweils die Positionen für die Cysteine (C) und das Tryptophan (W) des PET-Reportersystems. In schematischen Zeichnungen sind in (A) und (B) die Distanzen zwischen der G57C und der T173W (grün) und der G59C und der T173W (pink) dargestellt, die sich auf die Bindung von L-Glu (orange) hin ändern.

Die Konformation der LBD ändert sich auf die Bindung von L-Glu hin, sodass sich die Distanz zwischen G57C und T173W von  $\sim 17,7 \text{ \AA}$  auf  $\sim 12,1 \text{ \AA}$  und zwischen G59C und T173W von  $\sim 12,5 \text{ \AA}$  auf  $\sim 7,2 \text{ \AA}$  (pdb: 1fto und 3dp6) verringert, also um  $\sim 5,6 \text{ \AA}$  und  $\sim 5,3 \text{ \AA}$  (Abbildung 4.28). Diese geringe Distanzänderung benötigt zur Detektion ein photophysikalisches Phänomen mit hoher Ortsauflösung. FRET ist in einem Bereich zwischen 0,5 -2-mal dem Försterradius sensitiv, um Distanzänderungen zu messen <sup>[17]</sup>, d.h. für die meisten Farbstoffpaare etwa zwischen 2 – 10 nm, wozu dieser häufig verwendet wird, den

Bereich hier jedoch nicht abdeckt. PET hingegen geschieht bei van-der-Waals Kontakt, und eignet sich somit Änderungen im Bereich  $\leq 1 \text{ nm}$  <sup>[15]</sup> aufzulösen. Daher wurde PET in Kombination mit FCS, welche eine zeitliche Auflösung von 6,25 ns hat, für die Untersuchung der Bewegungen innerhalb der LBD verwendet.

Die Schwierigkeit bei der Farbstoffmarkierung der GluR2-LBD war, dass es neben dem eingebrachten Cystein auch vier native Cysteine hat, wobei zwei durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Daher musste als Kontrolle beim Markieren der Cysteinmutanten auch der Wildtyp mit der gleichen Markierungsmethode behandelt werden. Dieser wurde unter den gewählten Markierungsbedingungen im Gegensatz zu den Cysteinmutanten nicht farbstoffmarkiert, was durch eine Größenausschlusschromatographie überprüft wurde.

In weiteren Experimenten sollte das Verhalten der LBD auf die Zugabe von den Agonisten L-Glu und AMPA, dem unvollständigen Agonisten Kainate, dem Antagonisten NBQX <sup>[89]</sup> und von CTZ untersucht werden. Dazu musste aber zuvor ausgeschlossen werden, dass diese Stoffe die photophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffes ATTO Oxa11 beeinflussen. In einem Küvettenexperiment wurde daher die Fluoreszenzänderung von ATTO Oxa11 nach Zugabe der genannten Stoffe untersucht (Abbildung 4.29). CTZ, L-Glu, AMPA und Kainate bewirken nur eine geringe Abnahme der Fluoreszenzintensität, wohingegen NBQX diese um mehr als die Hälfte verringert.

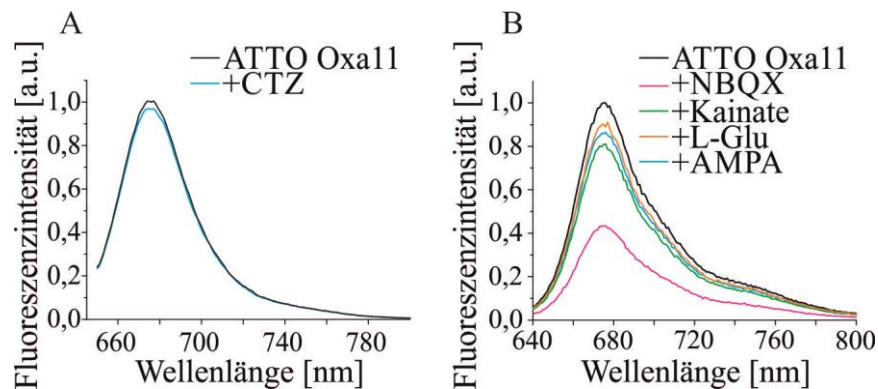


Abbildung 4.29: Interaktionstest mit ATTO Oxa11

Fluoreszenzspektren des Farbstoffes ATTO Oxa 11 und im Beisein von (A) CTZ (blau) und (B) NBQX (pink), Kainate (grün), L-Glu (orange) oder AMPA (blau). Die Konzentrationsverhältnisse zwischen Farbstoff und zugegebenem Stoff entsprechen denen in FCS-Messungen verwendeten.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurden FCS-Messungen des Farbstoffes ATTO Oxa11 mit CTZ, L-Glu, AMPA, Kainate und NBQX durchgeführt. Bei Zugabe aller Stoffe, bis auf NBQX, ist nur ein Abfall der Diffusion in der Autokorrelationsfunktion zu beobachten (Abbildung 4.30). Dieser kann mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm angepasst werden. Die Diffusionszeiten stimmen mit der vom Farbstoff alleine gemessenen, mit  $\tau_D = 0,4 \pm 0,01$  ms, überein. In der Messung mit NBQX ist neben dem Abfall der Diffusion des Farbstoffes durch den Fokus ein zweiter zu beobachten (Abbildung 4.30 B). Dieser hat eine Zeitkonstante von  $2,7 \pm 0,5$   $\mu$ s und resultiert vermutlich aus einer löschenden Wechselwirkung des NBQX mit ATTO Oxa11. Da die Versuche gezeigt haben, dass NBQX mit ATTO Oxa11 interagiert (Abbildung 4.29 und Abbildung 4.30) wurde dieses in anschließenden Experimenten nicht verwendet.

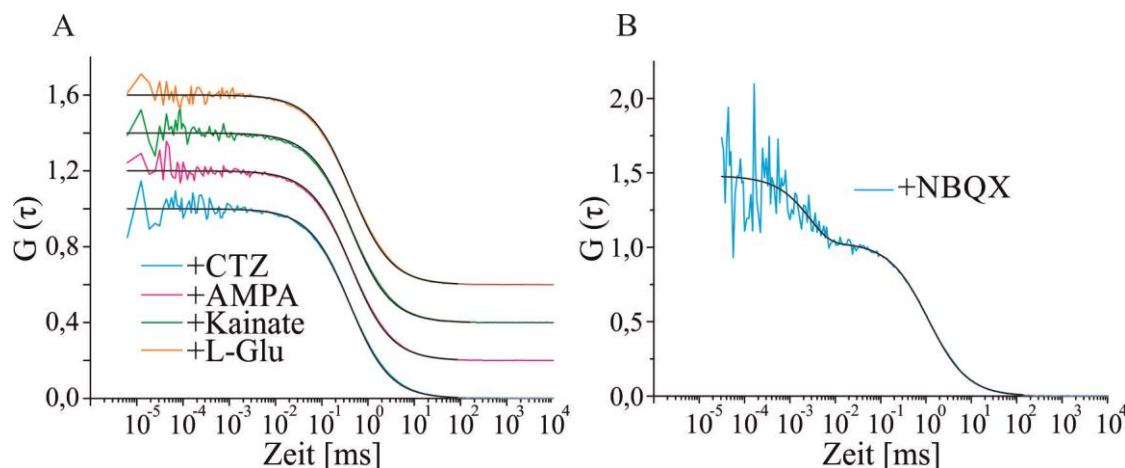


Abbildung 4.30: FCS Interaktionstest mit ATTO Oxa11

FCS-Autokorrelationsfunktionen des Farbstoffes ATTO Oxa11 gemessen im Beisein von (A) CTZ (blau), AMPA (pink), Kainate (grün), L-Glu (orange) oder (B) NBQX (blau), an einem Setup mit größerem konfokalen Volumen. Die Autokorrelationsfunktionen in (A) ließen sich mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm (schwarz) anpassen, die in (B) benötigte einen zusätzlichen Exponenten (schwarz). Die Autokorrelationsfunktionen wurden auf die Teilchenzahl normiert und in (A) mit einem Offset versehen.

Im Weiteren wurden die Mutanten G57C und G59C synthetisiert und farbstoffmarkiert. Diese wurden benötigt, um zu testen, ob ATTO Oxa11 ohne das Tryptophan an Position T173W, schon mit einem der nativen Tryptophane oder Teilen des Proteins Löschkinetiken verursacht. In Abbildung 4.31 A ist die Autokorrelationsfunktion von G57C in der apo-Form zu sehen, mit einem großen Abfall der Diffusion und einem zweiten Abklingverhalten mit einer Amplitude von  $3 \pm 0,3 \%$  und einer Zeitkonstante von  $1,7 \pm 0,4 \mu\text{s}$ . Da die zweite Amplitude vernachlässigbar gering ist, war die G57C für weitere Versuche geeignet. Gleiches gilt für die G59C. In deren Autokorrelationsfunktion der apo-Form war nur ein Abfall, verursacht durch Diffusion, zu beobachten (Abbildung 4.32 A). Es kommt also bei der G59C zu keiner Löschdynamik des Farbstoffes mit dem Protein.

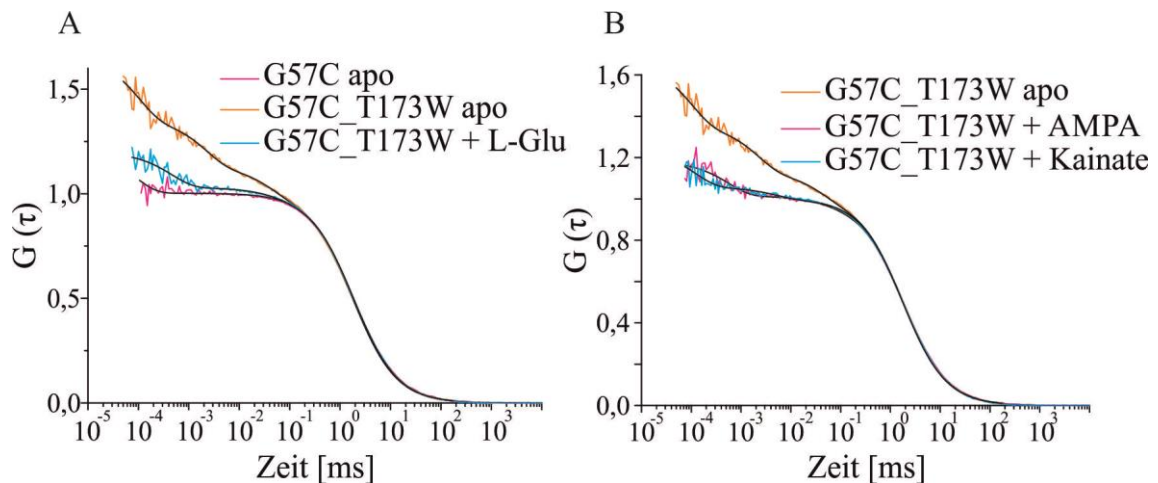


Abbildung 4.31: FCS Messungen der GluR2-LBD basierend auf der G57C

Autokorrelationsfunktionen der GluR2-LBD Mutanten. (A) G57C (pink) und G57C\_T173W (orange) in der apo-Form und mit L-Glu (blau). (B) G57C\_T173W mit AMPA (pink), Kainate (blau) und in der apo-Form (orange). Die Autokorrelationsfunktionen wurden auf die Teilchenzahl normiert und mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm und ein (G57C apo), zwei (G57C\_T173W L-Glu / AMPA / Kainate) oder drei (G57C\_T173W apo) unabhängigen Exponenten angepasst (schwarze Kurven).

Basierend auf diesen Konstrukten wurden die Doppelmutanten G57C\_T173W und G59C\_T173W exprimiert, aufgereinigt und farbstoffmarkiert. In FCS-Messungen wurde deren Verhalten auf die Zugabe von L-Glu, AMPA und Kainate hin in Lösung untersucht.

Die FCS-Autokorrelationsfunktionen der G57C\_T173W und der G59C\_T173W in der apo-Form und der G59C\_T173W mit Kainate wurden mit Gleichung 3.4 angepasst, einem zweidimensionalen Diffusionsterm mit drei unabhängigen Exponenten. Die G57C\_T173W mit L-Glu, AMPA, Kainate und die G59C\_T173W mit L-Glu und AMPA wurden mit Gleichung 3.3, einem zweidimensionalen Diffusionsterm mit zwei unabhängigen Exponenten ausgewertet (Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32).

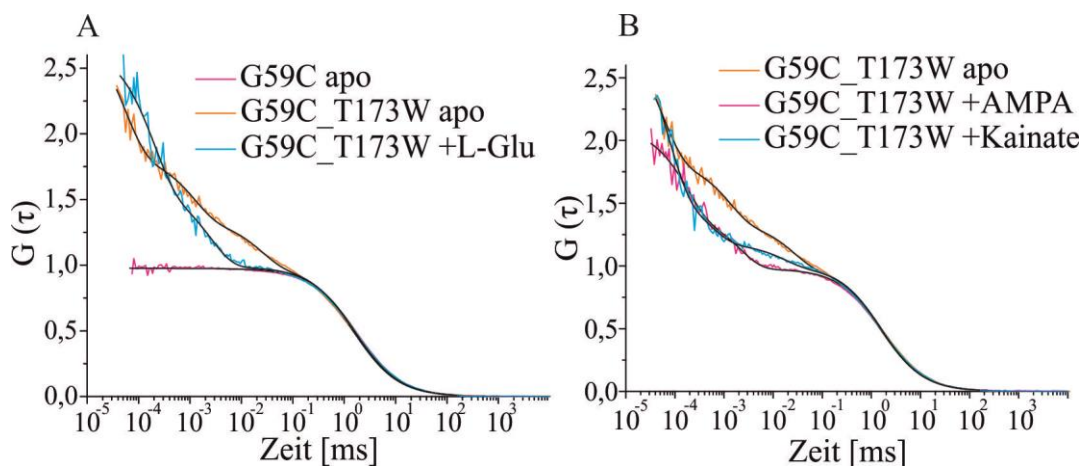


Abbildung 4.32: FCS Messungen der GluR2-LBD basierend auf der G59C

Autokorrelationsfunktionen der GluR2-LBD Mutanten. (A) G59C (pink) und G59C\_T173W (orange) in der apo-Form und mit L-Glu (blau). (B) G59C\_T173W mit AMPA (pink), Kainate (blau) und in der apo-Form (orange). Die Autokorrelationsfunktionen wurden auf die Teilchenzahl normiert und mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm alleine (G59C apo) oder mit zwei (G59C\_T173W L-Glu / AMPA) oder drei (G59C\_T173W apo / Kainate) unabhängigen Exponenten angepasst (schwarze Kurven).

Der erste Vergleich der Autokorrelationsfunktionen zeigt deutlich kleinere Amplituden und langsamere Zeitkonstanten für die G57C\_T173W gegenüber der G59C\_T173W (Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32). Dies könnte an dem größeren Abstand der T173W zur G57C, als zur G59C liegen, denn erstere sind nach einer Abschätzung mit Hilfe des Programmes PyMol in der L-Glu gebundenen Form (pdb: 3dp6)  $\sim 1,2$  nm und zweitere  $\sim 0,7$  nm voneinander entfernt und PET funktioniert optimal bei van-der-Waals Kontakt,  $\leq 1$ nm. Des Weiteren befindet sich noch eine kleine Schleife des Proteins zwischen der G57C und der T173W (Abbildung 4.27), der den Kontakt auch einschränken und die kleineren Amplituden erklären könnte. Für beide PET-Reportersysteme sind jedoch die gleichen Veränderungen auf die Bindung von L-Glu und AMPA an die LBD zu beobachten: eine Kinetik im  $\mu$ s-Bereich entfällt im Vergleich zur apo-Form (Tabelle 4). Im Weiteren wird auf Grund der größeren Amplituden die G59C\_T173W betrachtet.

Optisch und qualitativ (Amplituden und Zeitkonstanten) verhält sich die G59C\_T173W auf die Bindung von L-Glu und AMPA ähnlich. Die etwas kleineren Amplituden bei AMPA Bindung könnten eventuell von der stärkeren Bindung von AMPA gegenüber L-Glu an die LBD stammen ( $K_d$  AMPA: 10 nM,  $K_d$  L-Glu: 820 nM) <sup>[146]</sup>. Dazu unterscheiden sich deut-



lich die apo-Form und die Kainate-gebundene Form. Bei der G59C\_T173W kommt für diese die Amplitude  $K_I$  hinzu, die bei Kainatebindung deutlich kleiner ist als in der apo-Form.

Die LBDs von AMPA GluRs scheinen keine starre Strukturen zu sein, sondern wechseln im Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen <sup>[147-149]</sup>, was durch die beobachteten PET-FCS Amplituden in den Autokorrelationsfunktionen der G57C\_T173W und der G59C\_T173W sichtbar wird. Auf Grund dieser Konformationsänderungen innerhalb der LBD kommen Farbstoff und Tryptophan in nahen Kontakt und dieser kann über PET gelöscht werden <sup>[15]</sup>.

Auf die Bindung von L-Glu und AMPA hin schließt sich die zweischalige Struktur der GluR2-LBD um  $\sim 20^\circ$ , bei Kainate um  $\sim 12^\circ$  gegenüber der apo-Form <sup>[89]</sup>. Dies ist jedoch das Ergebnis von Kristallstrukturdaten, in denen das Protein jeweils durch Kristallkontakte in einer bestimmten Konformation „eingefroren“ ist. L-Glu und AMPA rufen die gleichen elektrophysiologischen Signale in AMPA GluRs hervor, obwohl AMPA im Durchschnitt etwa 20-fach stärker bindet <sup>[150, 151]</sup>. Signale auf die Zugabe von Kainate hingegen sind deutlich kleiner, was mit der geringeren Schließung der LBD in Verbindung gebracht wird <sup>[89, 152, 153]</sup>. Diese Phänomene könnten sich in den ähnlichen, beobachteten Zeitkonstanten der Autokorrelationsfunktionen in Anwesenheit von L-Glu und AMPA widerspiegeln und den Unterschied zu Kainate erklären (Tabelle 4).

Simulationen von Arinaminpathy et al. <sup>[144]</sup> zeigen für die GluR2-LBD, dass die Fluktuationen in der L-Glu gebundenen Form am geringsten sind, in der Kainate-Form zunehmen und am größten in der apo-Form sind. Dies könnte an den zwei stabilisierenden H-Brücken zwischen der D1- und der D2-Domäne liegen, die bei Bindung von L-Glu oder AMPA entstehen und in der apo- und Kainate-Form fehlen <sup>[89]</sup>. Zu sehen ist dies möglicherweise in den Autokorrelationsfunktionen durch die dritte Kinetik  $K_I$  in der apo- und Kainate-Form im  $\mu$ s-Bereich, die in der Amplitude für letztere aber noch um mehr als die Hälfte geringer ist, aber schon die zunehmende Flexibilität in der LBD anzeigen könnte.

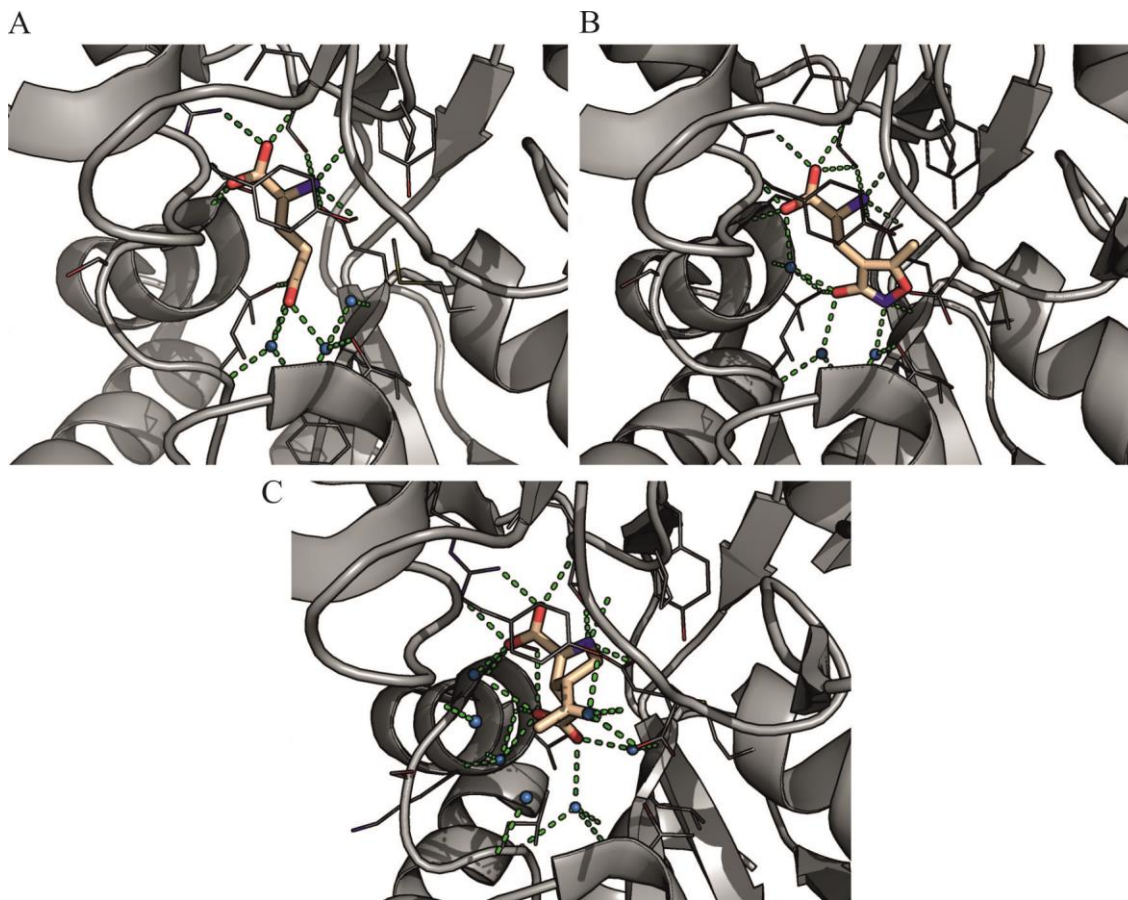


Abbildung 4.33: Wechselwirkungen von Agonisten und teilweise Agonisten mit der LBD

Kristallstrukturen der GluR2-LBD mit gebundenem (A) L-Glu (pdb: 3dp6), (B) AMPA (pdb: 1ftm) und (C) Kainate (pdb: 1ftk). Dargestellt sind jeweils die H-Brücken (grün) der Agonisten und teilweise Agonisten mit der LBD und ausgewählte Wassermoleküle (blau).

Die  $\alpha$ -Carboxyl- und  $\alpha$ -Aminogruppen von L-Glu, AMPA und Kainate wechselwirken mit der D1- und D2-Domäne der LBD-Bindungstasche über sieben Ionenpaare und H-Brücken<sup>[89]</sup> (Abbildung 4.33). Arg485, Pro478, Thr480, Ser654 und Glu705 spielen dabei eine wichtige Rolle<sup>[89]</sup> (Nummerierung hier bezogen auf den Gesamtrezeptor). Die Interaktionen von AMPA und Kainate mit der D1-Domäne sind gleich, die mit der D2-Domäne unterscheiden sich, was bewirkt, dass die Kainate gebundene Form nicht die geschlosseneren von L-Glu oder AMPA einnehmen kann<sup>[89]</sup>. Die noch geringere Amplitude  $K_I$  in der Kainate-Form gegenüber der apo-Form der PET-FCS Messungen könnte somit an den Wechselwirkungen mit der D1- und D2-Domäne liegen, die in der ungebundenen Form fehlen.

Der Gyrationradius wird auf die Bindung von L-Glu hin um  $0,8 \text{ \AA}$  kleiner <sup>[89, 144]</sup>. Über die Diffusionszeit konnte dies mittels FCS in dieser Arbeit nicht gemessen werden, da so geringe Unterschiede nicht aufgelöst werden können. Bei den Strukturdaten handelt es sich um Kristallstrukturen, welche den gemessenen hydrodynamischen Radius dieser flexiblen Domäne in Lösung nicht vollständig widerspiegeln könnten. „All-atom molecular dynamics“ Simulationen von Lau et al. <sup>[147]</sup> haben dahingehend ergeben, dass die apo-Form der GluR2-LBD um  $\sim 10^\circ$  weiter geöffnet ist, im Vergleich zu der Kristallstruktur.

Der Ionenkanal der GluRs öffnet sich, wenn ein Agonist oder unvollständiger Agonist an die LBD bindet und sich diese daraufhin schließt. Es wurde jedoch von Plested et al. berichtet, dass die GluR2-LBD auch in der apo-Form die geschlossene Konformation einnimmt <sup>[149]</sup>, was die vorliegenden Ergebnisse unterstützen, durch die zusätzliche PET-FCS Amplitude  $K_I$  in der apo-Form (Abbildung 4.32). Diese könnte somit den Übergang aus der offenen in die geschlossene LBD widerspiegeln. Für NMDA- und Kainate-Rezeptoren wurde ebenfalls beschrieben, dass diese in der apo-Form oder auf die Bindung von partiellen Agonisten hin die geschlossene Konformation der Bindung eines Agonisten einnehmen und somit das Ausmaß der Domänenschließung nicht den Grad der Aktivierung des Rezeptors erklären kann <sup>[154-156]</sup>. Eine Rolle bei der Aktivierung könnten da eventuell die unterschiedlichen in dieser Arbeit über PET-FCS beobachteten Dynamiken innerhalb der GluR2-LBD spielen, die in den gebundenen Formen zu beobachten sind, denn es ist ja bekannt, dass Bewegungen innerhalb von Proteinen deren Funktion beeinflussen können <sup>[11]</sup>. Lau et al. zeigen auf Grund von „free energy landscape“ Berechnungen, dass sich die L-Glu gebundene Form der GluR2-LBD in einer tiefen Energiesenke („energy trap“) befindet und ein Wechsel in offenere Konformationen in der gebundenen Form unwahrscheinlich ist <sup>[147]</sup>. Das lässt vermuten, dass die hier beobachteten Dynamiken der L-Glu gebundenen LBD innerhalb dieses Energieniveaus stattfinden.

Die Ergebnisse der PET-FCS Messungen zeigen durch veränderte Amplituden und Zeitkonstanten, dass eine Veränderung auf die Bindung von den Agonisten AMPA und L-Glu und dem partiellen Agonisten Kainate in der LBD stattfindet gegenüber der apo-Form. Erklärt werden könnten diese Änderungen durch das „induced fit“ Modell, das Yao et al. <sup>[154]</sup> auf Grund von „free energy landscape“ Berechnungen für die Bindung von L-Glu an die

GluR2-LBD beschreiben. Sie beziehen sich aber auch auf Bucher et al. <sup>[157]</sup>, die darlegen, dass sich das „conformational selection“ und „induced fit“ Modell nicht ausschließen. Es wäre also auch möglich, dass das L-Glu erst über das „conformational selection“ Modell an die flexible apo-Form der LBD bindet und daraufhin durch einen „induced fit“ Schritt noch Veränderungen im Protein ablaufen.

Die PET-FCS Messungen zeigen Kinetiken in der GluR2-LBD im  $\mu\text{s}$  – ns-Bereich. In einer smFRET Studie von Landes et al. lagen diese im 100 ms Bereich <sup>[148]</sup>. Dem entgegen stehen zwei andere Studien, die Konformationsänderungen im Bereich von  $\mu\text{s}$  bis ms berichten <sup>[158, 159]</sup>. Erstere, im 100 ms-Bereich dokumentierten Kinetiken, sind vermutlich zu langsam für die Änderungen auf die Bindung von Agonisten und Antagonisten an die LBD, da die AMPA GluRs innerhalb von 1 ms aktiviert werden <sup>[85]</sup>. Die Zeitauflösung bei Landes et al. <sup>[148]</sup> lag zudem bei 1 ms, weshalb diese auf Grund des Nyquist Kriteriums <sup>[160]</sup> lediglich Dynamiken im Bereich des  $\sim 2,3$ -fachen der Auflösung präzise detektieren können <sup>[161]</sup>, woher wahrscheinlich die Diskrepanz zwischen diesen und den hier mit einer Zeitauflösung von 6,25 ns gemessenen Daten stammt. Vermutlich wurden somit unterschiedliche Dynamiken innerhalb der GluR2-LBD gemessen.

Tabelle 4: Übersicht der PET-FCS Kinetiken der GluR2-LBD

Mutante	Diffusionszeit $\tau$ [ms]	$K_1$ [%]	$\tau_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$K_2$ [%]	$\tau_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$K_3$ [%]	$\tau_3$ [ns]
G57C apo	$1,84 \pm 0,01$			$3 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,4$		
G57C_T173W apo	$1,75 \pm 0,03$	$13 \pm 1$	$38,5 \pm 7,2$	$20 \pm 1$	$2,2 \pm 0,3$	$22 \pm 2$	$99,6 \pm 13,9$
G57C_T173W L-Glu	$1,86 \pm 0,03$	$3 \pm 1$	$48 \pm 21,1$	-	-	$17 \pm 1$	$456,8 \pm 41,2$
G57C_T173W AMPA	$1,87 \pm 0,04$	$3 \pm 1$	$50,8 \pm 25,2$	-	-	$17 \pm 1$	$563,2 \pm 54,5$
G57C_T173W Kainate	$1,76 \pm 0,02$	-	-	$6 \pm 0,5$	$4,9 \pm 1,1$	$18 \pm 2$	$119,7 \pm 19,7$
G59C apo	$1,77 \pm 0,02$	-	-	-	-	-	-
G59C_T173W apo	$1,71 \pm 0,04$	$35 \pm 2$	$23,4 \pm 2,2$	$36 \pm 1$	$1,2 \pm 0,1$	$58 \pm 4$	$52,1 \pm 4,2$
G59C_T173W L-Glu	$1,62 \pm 0,06$			$61 \pm 3$	$2,5 \pm 0,2$	$68 \pm 3$	$197,2 \pm 15,4$

Mutante	Diffusionszeit $\tau$ [ms]	$K_1$ [%]	$\tau_1$ [ $\mu$ s]	$K_2$ [%]	$\tau_2$ [ $\mu$ s]	$K_3$ [%]	$\tau_3$ [ns]
G59C_T173W AMPA	$1,67 \pm 0,09$			$48 \pm 6$	$2,2 \pm 0,4$	$41 \pm 5$	$249,1 \pm 49,6$
G59C_T173W Kainate	$1,7 \pm 0,1$	$14 \pm 2$	$44,4 \pm 2,9$	$33 \pm 4$	$1,1 \pm 0,2$	$87 \pm 6$	$73,1 \pm 7,1$
G59C_T173W L-Glu, WT	$1,72 \pm 0,03$			$48 \pm 2$	$3,4 \pm 0,2$	$60 \pm 2$	$312,6 \pm 16,6$
G59C_T173W L-Glu,WT,CTZ	$2,11 \pm 0,04$	$26 \pm 4$	$4,8 \pm 0,9$	$65 \pm 5$	$0,71 \pm 0,08$	$43 \pm 5$	$79,3 \pm 14,2$

In einem weiteren Experiment wurden die Auswirkungen von CTZ auf die LBD getestet. Die GluR2-LBD liegt in Lösung als Monomer vor mit einem  $K_d$ -Wert von 6 mM, der in Anwesenheit von CTZ zu 1,2  $\mu$ M verschoben wird <sup>[88]</sup>. Dabei entsteht das Dimer dadurch, dass zwei CTZ zwischen zwei GluR2 binden <sup>[88]</sup>. Im Versuch wurde Wildtyp-LBD in einem Zehnfachüberschuss über dem  $K_d$ -Wert in Anwesenheit von CTZ und L-Glu zur G59C\_T173W hinzugegeben. Dies zeigte sich in der Abnahme der Amplituden  $K_1$  und  $K_2$  und langsameren Zeitkonstanten gegenüber der L-Glu-Form der LBD ohne Wildtyp-LBD (Tabelle 4). Die Autokorrelationsfunktion konnte ebenfalls gut mit Gleichung 3.3 angepasst werden. Nach Zugabe von CTZ, muss die Autokorrelationsfunktion mit Gleichung 3.4 ausgewertet werden, einem unabhängigen Exponenten mehr. Das gleiche Experiment wurde auch für die apo-Form der G59C\_T173W in Kombination mit der apo Wildtyp-LBD wiederholt. Hier gab es jedoch bei der Messung durch starke Fluoreszenzanstiege in der Fluoreszenzintensitätsspur Anzeichen für Aggregatbildung <sup>[162]</sup>, weshalb diese nicht ausgewertet werden konnten.

Zu beobachten ist für die L-Glu-Form der LBD, dass sich die Diffusionszeit mit CTZ von  $1,72 \pm 0,03$  ms auf  $2,11 \pm 0,04$  ms erhöht. Die Berechnungen der Gyrationradii  $R_g$  mit dem Programm PyMol und den Skripten für den Gyrationradius <sup>[163]</sup> und das Massezentrum <sup>[164]</sup> ergaben für das Monomer 18,56 Å, was gut mit Referenz <sup>[144]</sup> übereinstimmt, und für das Dimer 23,72 Å (Abbildung 4.34 B, C), also eine Zunahme um  $\sim 28$  %. Dies ist in Übereinstimmung mit der Zunahme des hydrodynamischen Radius  $R_h$ , der um  $23 \pm 4$  % größer wird. Berechnet wurden diese mit Gleichungen 2.16 und 2.17 und dem Diffusionskoeffizienten des Farbstoffes ATTO 655 <sup>[165]</sup>. Die Zunahmen von  $R_g$  und  $R_h$  im Dimer würden die langsamere Diffusionszeit der LBD mit CTZ erklären und darauf hindeuten, dass tat-

sächlich das Dimer entstanden ist. Dies ist in Übereinstimmung mit Sun et al. [88], die auch eine Dimerisierung der LBD auf die Zugabe von CTZ beobachtet haben.

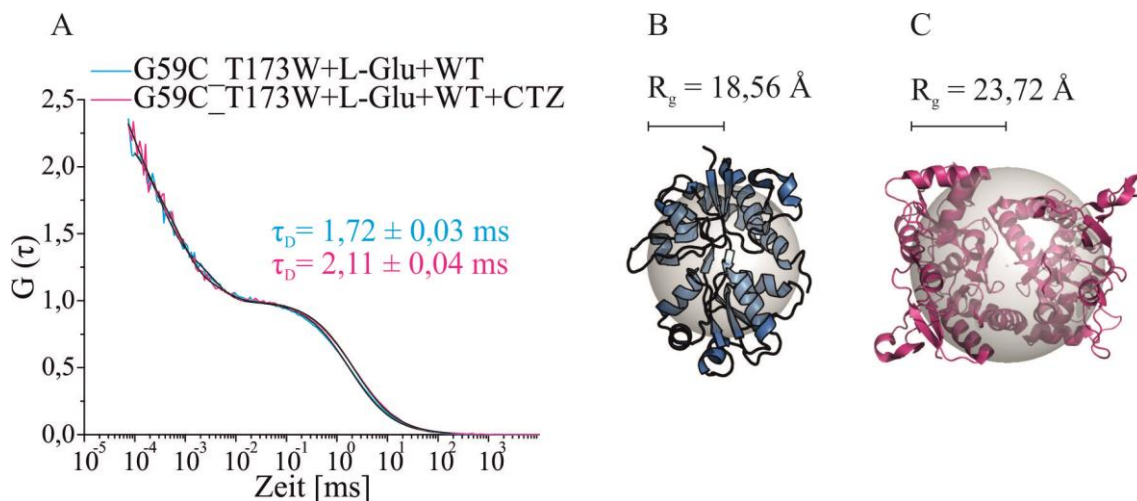


Abbildung 4.34: FCS-Messung der GluR2-LBD mit CTZ

(A) Autokorrelationsfunktionen der G59C\_T173W GluR2-LBD Mutante in Gegenwart von L-Glu und Wildtyp-Protein (WT) (pink) und nach Zugabe von CTZ (blau). Die Autokorrelationsfunktionen wurden auf die Teilchenzahl normiert und mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm und zwei (pink) oder drei (blau) unabhängigen Exponenten angepasst (schwarze Kurven). (B) zeigt die Kristallstruktur der GluR2-LBD mit gebundenem L-Glu (pdb: 3dp6) als Monomer mit einem Gyrationradius  $R_g$  von 18,56 Å und (C) als Dimer mit  $R_g = 23,72$  Å.

CTZ inhibiert die Desensitizierung [88, 166] durch die Stabilisierung der D1-D1 Dimerwechselwirkung [88]. Die Interaktionen zwischen den D1-Domänen bestehen aus zwei Salzbrücken, H-Brücken und van-der-Waals Kontakten zwischen hydrophoben Resten [89], welche die Bewegung der D1-Domäne einschränken, während die D2-Domäne frei beweglich bleibt [167]. Diese Veränderungen, welche die Dimerisierung von zwei LBDs und die Zugabe von CTZ bewirken, könnten die Ursache für die zusätzliche Amplitude bei der Datenanpassung und die veränderten Amplituden und Zeitkonstanten sein (Tabelle 4).

Durch PET-FCS konnten somit die veränderten Dynamiken innerhalb der GluR2-LBD auf die Bindung von Agonisten und partiellen Agonisten sowie die Zugabe von CTZ nachgewiesen werden

## 5. Zusammenfassung

Proteine bestehen aus einer spezifischen Sequenz verschiedener Aminosäuren, die ihre charakteristische Funktion bestimmt. Die große Variabilität an Aminosäuresequenzen ermöglichte die Evolution einer nahezu unbegrenzten Anzahl an Proteinen. Meistens nehmen diese Schlüsselpositionen ein, von robusten Baustoffen bis hin zu molekularen Maschinen. Daher kann eine Fehlfunktion gravierende Auswirkungen auf das Leben haben, z.B. Krankheiten wie Alzheimer oder Epilepsi. Um die Funktionen und Fehlfunktionen zu verstehen, ist eine umfassende Kenntnis der Proteinfaltung, der Protein-Protein Assoziation, sowie den Dynamiken innerhalb von Proteinen erforderlich. Diese Vorgänge wurden in dieser Arbeit an drei isolierten Proteindomänen durch die Anwendung der Fluoreszenzlöschmechanismen der H-Dimerbildung und des photoinduzierten Elektronentransfers untersucht.

Der entfaltete Zustand der Bindungsdomäne BBL, das Teil des 2-oxo-acid Dehydrogenasekomplexes ist, wurde unter physiologischen Bedingungen mit Zirkulardichroismus (CD) und einer Kombination aus photoinduziertem Elektronentransfer und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie analysiert. Beide Methoden zeigten übereinstimmend anhand von 20 in BBL einzeln eingefügten konservativen Punktmutationen, dass Seitenketteninteraktionen keine Auswirkungen auf die Sekundärstruktur des denaturierten Zustandes, den Ausgangspunkt der Faltung, haben. Mit Hilfe der Dekonvolution der CD-Spektren wurde zudem gezeigt, dass die Reststruktur im denaturierten Zustand der helikalen Proteindomäne von  $\beta$ -Strängen und  $\beta$ -Kehren dominiert wird, die eine entscheidende Funktion bei der Faltung in den nativen Zustand haben könnten.

Die N-terminale Domäne (NTD), der für die Materialforschung hochinteressanten Spinnenseidenfaser, ist für die Polymerisation des Spinnenseidenfadens auf den pH-Wechsel von pH 7 auf pH 6 hin verantwortlich. Dieser für die Proteinfunktion wichtige Prozess wurde durch die Einbringung eines extrinsischen Fluoreszenzschalters, basierend auf der H-Dimerbildung, mit der Stopped-Flow-Technik untersucht. Es wurde gezeigt, dass die NTDs

mit einer Rate von  $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  assoziieren und somit nahezu das Geschwindigkeitslimit der Protein-Protein Assoziation erreicht wird. Zwei geladenen Seitenketten, der D39 und D40, kommt eine entscheidende Funktion in dem Prozess zu, da eine Mutation dieser die Assoziation verhindert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die NTD auf eine Erhöhung der Ionenstärke entgegengesetzt zu anderen Proteinen verhält: die Dissoziation wird beschleunigt, die Assoziation nicht beeinflusst. Gleiches Verhalten wurde auf den einzelnen Austausch der übrigen protonierbaren Aminosäureseitenketten hin beobachtet, ausgenommen die Mutation der E119, welche die Dissoziation verlangsamt. Daher scheint der makromolekulare Dipol, der auf Grund der Ladungsverteilung in der NTD entsteht, die Assoziation maßgeblich zu beeinflussen.

Glutamatrezeptoren sind an der schnellen synaptischen Signalweiterleitung im Nervensystem von Vertebraten beteiligt. Die Konformationen der Ligandenbindungsdomäne (LBD) haben dabei entscheidende Auswirkungen auf die Funktion des Gesamtrezeptors. Diese wurden mit einer Kombination aus photoinduziertem Elektronentransfer und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie untersucht. Mit dieser Methode wurde ein dynamisches Bild der gebundenen sowie ungebundenen Form der AMPA-spezifischen Glutamatrezeptor 2-LBD gezeigt. Es wurde zudem gezeigt, dass sich die Dynamiken in Abhängigkeit der Bindung von den Agonisten Glutamat und AMPA, dem partiellen Agonisten Kainate oder Cyclothiazid (CTZ), welches eine Dimerisierung der LBDs bewirkt, unterschiedlich verändern. Dies könnte eine Auswirkung auf die Funktion der Rezeptoren haben.

Die Anwendung der Fluoreszenzlöschmechanismen der H-Dimerbildung und des photoinduzierten Elektronentransfers in dieser Arbeit hat gezeigt, dass diese die Möglichkeit bieten, unterschiedlichste Fragestellungen zu beantworten und so Einblicke in dynamische Funktionsweisen von Proteinen eröffnen. Kombiniert mit etablierten Fluoreszenzmethoden ist es so möglich quantitativ Kinetiken auf unterschiedlichen Zeitskalen zu untersuchen.



## 6. Summary

Proteins are composed of a specific sequence of variable amino acids that specify their specific function. The vast variability of possible amino acid sequences allowed for the evolution of a nearly infinite number of different proteins. Mostly these will have key positions, reaching from strong building material to molecular machines. Therefore a malfunction will have an immense effect on life, i.e. diseases like Alzheimer disease or epilepsy. In order to understand the function and malfunction an intense understanding of the protein folding, the protein-protein association, as well as the protein dynamics is essential. These processes have been investigated in this thesis with three isolated protein domains by the application of the fluorescence quenching mechanisms of the H-dimer-formation and by the photoinduced electron transfer.

The unfolded state of the binding domain BBL, which is part of the 2-oxo-acid-dehydrogenase-complex, was analysed under physiological conditions by circular dichroism (CD), and a combination of photoinduced electron transfer and fluorescence correlation spectroscopy. Both methods showed accordingly, using 20 singly implanted conservative point mutations in BBL, that side-chain interactions have no effect on the secondary structure of the denatured condition, the initial state of the folding. Using deconvolution on the CD spectra it was shown in addition, that the remaining structure of the helical protein domain in the denatured state is dominated by  $\beta$ -strands and  $\beta$ -turns. These may have a decisive function during the folding in the native state.

The N-terminal domain of the spider silk fibre, which is of high interest for the material research, is responsible for the polymerisation of the spider silk fibre during the pH-change from pH 7 to pH 6. This important process for the protein function was investigated with the Stopped-Flow technique by the application of an extrinsic fluorescence switch, based on the H-dimer formation. It was shown, that NTDs associate with a rate of  $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , and so nearly reach the speed limit of the protein-protein association. In this process two charged side chains, the D39 and D40, have a decisive function, as a mutation of these will

avoid the association. Furthermore it was shown, that the NTD will react in opposition to other proteins on the increase of the ionic strength: the dissociation will be speeded up, and the association is not influenced. The identical behaviour was observed with the single exchange of the other protonable amino acid side chains, except for the mutation of E119, which retards dissociation. Therefore the macromolecular dipol, that is formed by the charge distribution of the NTD, is obviously influencing the association.

Glutamate receptors participate in the fast synaptic signal transfer in vertebrates. Here different conformations of the ligand binding domain (LBD) have decisive effects on the function of the entire receptor. These have been investigated with a combination of photoinduced electron transfer and fluorescence correlation spectroscopy. Using this method a dynamic behaviour of the bound and unbound form of the AMPA specific glutamate receptor 2 LBD was shown. Furthermore it was shown, that the dynamics will change differently in dependence of the binding of the agonist glutamate and AMPA, the partial agonist kainate or Cyclothiazide (CTZ), which effects a dimerization of the LBDs. This may have an effect on the function of the receptors.

The use of the fluorescence quenching mechanisms of the H-dimer formation and the photoinduced electron transfer in this thesis has shown, that these offer the opportunity to answer a large range of questions and open a view to the dynamic functionality of proteins. Combined with established fluorescence methods it is possible to quantitatively investigate kinetic rates at different time scales.

## 7. Ausblick

Die Versuche an der GluR2-LBD haben gezeigt, dass sich PET-FCS auf Grund der hohen zeitlichen und örtlichen Auflösung gut dazu eignet, die Domänenbewegung der LBD zu untersuchen. Daher wurden bereits Proteinexpressionstest an weiteren LBDs anderer Rezeptortypen (Kainate, NMDA) durchgeführt, um das etablierte System auf diese übertragen zu können. Dieses sollte möglich sein, da die Hauptstrukturelemente über die Rezeptortypen hinweg konserviert sind <sup>[168, 169]</sup>.

Von großem Interesse sind dabei die NMDA Rezeptoren. Diese binden je nach Typ L-Glu oder Glycin <sup>[154]</sup>. Bei einer Dimerisierung von zwei unterschiedlichen NMDA Typen durch CTZ könnte somit direkt die Auswirkung der Bindung eines Agonisten an die eine LBD auf die Dynamik der anderen LBD untersucht werden. Interessant wäre zudem die Mutation L483Y in die LBD einzubringen, die den  $K_d$ -Wert der Dimerisierung von zwei LBDs auf 30 nM senkt <sup>[88]</sup> und zu untersuchen, ob eine Dimerisierung durch CTZ die gleichen Veränderungen in den Dynamiken in den LBDs hervorruft wie über diese Mutation.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle wird es Zeit, Danke zu sagen.

Vielen Dank an Dr. Hannes Neuweiler, für die Möglichkeit in diesem interessanten Themenbereich meine Arbeit verfassen zu können und für die stetige Unterstützung, die zum Gelingen beigetragen hat.

Vielen Dank an Prof. Dr. Markus Sauer für die Möglichkeit am Lehrstuhl für Biotechnologie & Biophysik diese Arbeit durchführen zu können.

Vielen Dank an Dr. Ingo Greger, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe am MRC LMB in Cambridge drei Monate mitarbeiten zu können. Danke auch an Beatrice und den Rest der Gruppe für die schöne Zeit.

Vielen Dank an alle aus der Arbeitsgruppe Biophysik & Biotechnologie, allen voran PD Dr. Sören Doose, die ihr stets ein offenes Ohr hattet bei Problemen. Es war eine schöne Zeit mit euch, auch außerhalb der Arbeit beim Skifahren, Fußball, Grillen oder diversen Kickerturnieren.

Vielen Dank an meinen Bürokollegen und Freund Christian für die schöne gemeinsame Zeit.

Vielen Dank an alle meine Freunde, die ihr mir Mut zugesprochen habt.

Vielen Dank an meine Eltern, die ihr mich immer unterstützt habt und immer für mich da seid.

Vielen Dank an meinen Bruder Alex, ich bin froh, dass ich dich habe.

Vielen Dank an Sebastian, dass du für mich da warst, mich unterstützt und beim Entstehen dieser Arbeit immer wieder aufgemuntert hast.

## 9. Literaturverzeichnis

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer, *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verl. , Heidelberg [u.a.], 5. Auflage, 2003.
2. D. R. Booth, M. Sunde, V. Bellotti, C. V. Robinson, W. L. Hutchinson, P. E. Fraser, P. N. Hawkins, C. M. Dobson, S. E. Radford, C. C. Blake and M. B. Pepys, *Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis*, in *Nature*. 1997. p. 787-93.
3. M. Eigen, *Prionics or the kinetic basis of prion diseases*, in *Biophysical Chemistry*. 1996. p. A1-18.
4. V. E. Bychkova and O. B. Ptitsyn, *Folding intermediates are involved in genetic diseases?*, in *FEBS Letters*. 1995. p. 6-8.
5. C. Levinthal, *How to fold graciously*, in *Mössbaun Spectroscopy in Biological Systems Proceedings*. 1969. p. 22-24.
6. P. S. Kim and R. L. Baldwin, *Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding*, in *Annual Review of Biochemistry*. 1982. p. 459-89.
7. V. Daggett and A. R. Fersht, *Is there a unifying mechanism for protein folding?*, in *Trends in Biochemical Sciences*. 2003. p. 18-25.
8. C. Tanford, *Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins* in *Journal of the American Chemical Society*. 1962. p. 4240-4247.
9. A. R. Fersht, *Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1995. p. 10869-73.
10. P. G. Wolynes, J. N. Onuchic and D. Thirumalai, *Navigating the folding routes*, in *Science*. 1995. p. 1619-20.
11. K. Henzler-Wildman and D. Kern, *Dynamic personalities of proteins*, in *Nature*. 2007. p. 964-72.
12. E. Fischer, *Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme*, in *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 1894. p. 2984-2993.

13. D. E. Koshland, *Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1958. p. 98-104.
14. D. D. Boehr, R. Nussinov and P. E. Wright, *The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition*, in *Nature Chemical Biology*. 2009. p. 789-96.
15. M. Sauer and H. Neuweiler, *PET-FCS: probing rapid structural fluctuations of proteins and nucleic acids by single-molecule fluorescence quenching*, in *Methods in Molecular Biology*. 2014. p. 597-615.
16. M. Kasha, H. R. Rawls and M. Asharaf El-Bayoumi, *The Exciton Model In Molecular Spectroscopy*, in *Pure and Applied Chemistry*. 1965. p. 371-392.
17. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, 3. Ausgabe, 2006.
18. N. J. Turro, V. Ramamurthy and J. C. Scaiano, *Modern Molecular Photochemistry Of Organic Molecules*. University Science Books, Sausalito, Calif., 2010.
19. K. Bethge, G. Gruber and T. Stöhlker, *Physik der Atome und Moleküle*. WILEY-VCH, Weinheim, 2. Auflage, 2004.
20. P. W. Atkins and J. de Paula, *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*. WILEY-VCH, Weinheim, 4. Auflage, 2008.
21. S. Bollmann, M. Löllmann, M. Sauer and S. Doose, *Dimer formation of organic fluorophores reports on biomolecular dynamics under denaturing conditions*, in *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. p. 12874-82.
22. E. E. Jelly, *Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State*, in *Nature*. 1936. p. 1009-1010.
23. G. Scheibe, L. Kandler and H. Ecker, *Polymerisation und polymere Adsorption als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von organischen Farbstoffen*, in *Naturwissenschaften*. 1937. p. 75.
24. F. Wurthner, T. E. Kaiser and C. R. Saha-Moller, *J-aggregates: from serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials*, in *Angewandte Chemie International Edition*. 2011. p. 3376-410.
25. R. Zhou, S. Kunzelmann, M. R. Webb and T. Ha, *Detecting intramolecular conformational dynamics of single molecules in short distance range with subnanometer sensitivity*, in *Nano Letters*. 2011. p. 5482-8.
26. N. R. Conley, A. K. Pomerantz, H. Wang, R. J. Twieg and W. E. Moerner, *Bulk and single-molecule characterization of an improved molecular beacon utilizing H-*

- dimer excitonic behavior*, in *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007. p. 7929-31.
27. P. Ceroni and V. Balzani, *The Exploration of Supramolecular Systems and Nanostructures by Photochemical Techniques*. Springer Science+Business Media B.V, Dordrecht Heidelberg London New York, 2012.
  28. S. Doose, H. Neuweiler and M. Sauer, *A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan*, in *Chemphyschem*. 2005. p. 2277-85.
  29. N. Manoj, *Photoinduced electron transfer: design and study of new sensitizers to control back electron transfer*. Mahatma Gandhi University, August 2010.
  30. A. C. Vaiana, H. Neuweiler, A. Schulz, J. Wolfrum, M. Sauer and J. C. Smith, *Fluorescence quenching of dyes by tryptophan: interactions at atomic detail from combination of experiment and computer simulation*, in *Journal of the American Chemical Society*. 2003. p. 14564-72.
  31. T. Förster, *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, in *Annalen der Physik*. 1948. p. 55-75.
  32. H. Sahoo and P. Schwille, *FRET and FCS--friends or foes?*, in *Chemphyschem*. 2011. p. 532-41.
  33. B. Schuler and W. A. Eaton, *Protein folding studied by single-molecule FRET*, in *Current Opinion in Structural Biology*. 2008. p. 16-26.
  34. D. Madge, E. L. Elson and W. W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy*, in *Physical Review Letters*. 1972. p. 705-708.
  35. J. A. Fitzpatrick and B. F. Lillemeier, *Fluorescence correlation spectroscopy: linking molecular dynamics to biological function in vitro and in situ*, in *Current Opinion in Structural Biology*. 2011. p. 650-60.
  36. P. Schwille and E. Haustein, *Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications*, in *Online Biophysics Textbook*. 2004.
  37. J. K. Lum, H. Neuweiler and A. R. Fersht, *Long-range modulation of chain motions within the intrinsically disordered transactivation domain of tumor suppressor p53*, in *Journal of the American Chemical Society* 2012. p. 1617-22.
  38. S. M. Kelly and N. C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*, in *Current Protein and Peptide Science*. 2000. p. 349-84.
  39. B. Nölting, *Protein Folding Kinetics*. Springer, Berlin Heidelberg 2. Auflage, 2006.

40. D. Meschede, *Gerthsen Physik*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 23. Auflage 2006.
41. S. M. Kelly, T. J. Jess and N. C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*, in *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. p. 119-39.
42. B. Ranjbar and P. Gill, *Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review*, in *Chemical Biology & Drug Design*. 2009. p. 101-20.
43. S. Venyaminov, I. A. Baikalov, C. S. Wu and J. T. Yang, *Some problems of CD analyses of protein conformation*, in *Analytical Biochemistry*. 1991. p. 250-5.
44. L. Whitmore and B. A. Wallace, *Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases*, in *Biopolymers*. 2008. p. 392-400.
45. L. Whitmore and B. A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*, in *Nucleic Acids Research*. 2004. p. W668-73.
46. N. Sreerama and R. W. Woody, *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set*, in *Analytical Biochemistry*. 2000. p. 252-60.
47. J. G. Lees, A. J. Miles, F. Wien and B. A. Wallace, *A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space*, in *Bioinformatics*. 2006. p. 1955-62.
48. W. C. Johnson, *Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures*, in *Proteins*. 1999. p. 307-12.
49. H. Roder, K. Maki, H. Cheng and M. C. Shastry, *Rapid mixing methods for exploring the kinetics of protein folding*, in *Methods*. 2004. p. 15-27.
50. H. Roder and M. R. Shastry, *Methods for exploring early events in protein folding*, in *Current Opinion in Structural Biology*. 1999. p. 620-6.
51. P. Y. Chou and G. D. Fasman, *Empirical predictions of protein conformation*, in *Annual Review of Biochemistry*. 1978. p. 251-76.
52. P. Y. Chou and G. D. Fasman, *Beta-turns in proteins*, in *Journal of Molecular Biology*. 1977. p. 135-75.
53. K. A. Dill and J. L. MacCallum, *The protein-folding problem, 50 years on*, in *Science*. 2012. p. 1042-6.



54. V. Daggett and A. Fersht, *The present view of the mechanism of protein folding*, in *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003. p. 497-502.
55. T. Kiefhaber, A. Bachmann and K. S. Jensen, *Dynamics and mechanisms of coupled protein folding and binding reactions*, in *Current Opinion in Structural Biology*. 2012. p. 21-9.
56. G. Schreiber, G. Haran and H. X. Zhou, *Fundamental aspects of protein-protein association kinetics*, in *Chemical Reviews* 2009. p. 839-60.
57. C. Kleanthous, *Protein-Protein Recognition*, in *Frontiers in Molecular Biology*. Oxford University Press, New York, 2000.
58. H. Frauenfelder, S. G. Sligar and P. G. Wolynes, *The energy landscapes and motions of proteins*, in *Science*. 1991. p. 1598-603.
59. R. Nussinov and P. G. Wolynes, *A second molecular biology revolution? The energy landscapes of biomolecular function*, in *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014. p. 6321-2.
60. P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon and R. D. Young, *Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2004. p. 14408-13.
61. N. Ferguson, T. D. Sharpe, P. J. Schartau, S. Sato, M. D. Allen, C. M. Johnson, T. J. Rutherford and A. R. Fersht, *Ultra-fast barrier-limited folding in the peripheral subunit-binding domain family*, in *Journal of Molecular Biology*. 2005. p. 427-46.
62. <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=153>. Stand: 23.07.2014.
63. M. S. Patel, N. S. Nemeria, W. Furey and F. Jordan, *The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 2014. p. 16615-16623.
64. S. S. Mande, S. Sarfaty, M. D. Allen, R. N. Perham and W. G. Hol, *Protein-protein interactions in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: dihydrolipoamide dehydrogenase complexed with the binding domain of dihydrolipoamide acetyltransferase*, in *Structure*. 1996. p. 277-86.
65. M. M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J. M. Sanchez-Ruiz and V. Munoz, *Experimental identification of downhill protein folding*, in *Science*. 2002. p. 2191-5.
66. A. N. Naganathan, R. Perez-Jimenez, J. M. Sanchez-Ruiz and V. Munoz, *Robustness of downhill folding: guidelines for the analysis of equilibrium folding experiments on small proteins*, in *Biochemistry*. 2005. p. 7435-49.

67. H. Neuweiler, T. D. Sharpe, T. J. Rutherford, C. M. Johnson, M. D. Allen, N. Ferguson and A. R. Fersht, *The folding mechanism of BBL: Plasticity of transition-state structure observed within an ultrafast folding protein family*, in *Journal of Molecular Biology*. 2009. p. 1060-73.
68. H. Neuweiler, T. D. Sharpe, C. M. Johnson, D. P. Teufel, N. Ferguson and A. R. Fersht, *Downhill versus barrier-limited folding of BBL 2: mechanistic insights from kinetics of folding monitored by independent tryptophan probes*, in *Journal of Molecular Biology*. 2009. p. 975-85.
69. F. Huang, L. Ying and A. R. Fersht, *Direct observation of barrier-limited folding of BBL by single-molecule fluorescence resonance energy transfer*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2009. p. 16239-44.
70. A. R. Fersht and V. Daggett, *Protein folding and unfolding at atomic resolution*, in *Cell*. 2002. p. 573-82.
71. M. Landreh, G. Askarieh, K. Nordling, M. Hedhammar, A. Rising, C. Casals, J. Astorga-Wells, G. Alvelius, S. D. Knight, J. Johansson, H. Jornvall and T. Bergman, *A pH-dependent dimer lock in spider silk protein*, in *Journal of Molecular Biology*. 2010. p. 328-36.
72. A. Rising, M. Widhe, J. Johansson and M. Hedhammar, *Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications*, in *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. p. 169-84.
73. F. Hagn, C. Thamm, T. Scheibel and H. Kessler, *pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk--implications for fiber formation*, in *Angewandte Chemie International Edition*. 2011. p. 310-3.
74. M. Heim, D. Keerl and T. Scheibel, *Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber*, in *Angewandte Chemie International Edition*. 2009. p. 3584-96.
75. L. Eisoldt, C. Thamm and T. Scheibel, *Review the role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins*, in *Biopolymers*. 2012. p. 355-61.
76. R. V. Lewis, *Spider silk: ancient ideas for new biomaterials*, in *Chemical Reviews*. 2006. p. 3762-74.
77. K. Jaudzems, G. Askarieh, M. Landreh, K. Nordling, M. Hedhammar, H. Jornvall, A. Rising, S. D. Knight and J. Johansson, *pH-dependent dimerization of spider silk N-terminal domain requires relocation of a wedged tryptophan side chain*, in *Journal of Molecular Biology*. 2012. p. 477-87.
78. G. Askarieh, M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson and S. D. Knight, *Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay*, in *Nature*. 2010. p. 236-8.

79. J. A. Wallace and J. K. Shen, *Unraveling A Trap-and-Trigger Mechanism in the pH-Sensitive Self-Assembly of Spider Silk Proteins*, in *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2012. p. 658-662.
80. N. Kronqvist, M. Otkovs, V. Chmyrov, G. Chen, M. Andersson, K. Nordling, M. Landreh, M. Sarr, H. Jornvall, S. Wennmalm, J. Widengren, Q. Meng, A. Rising, D. Otzen, S. D. Knight, K. Jaudzems and J. Johansson, *Sequential pH-driven dimerization and stabilization of the N-terminal domain enables rapid spider silk formation*, in *Nature Communications*. 2014. p. 3254.
81. F. Hagn, L. Eisoldt, J. G. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel and H. Kessler, *A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly*, in *Nature*. 2010. p. 239-42.
82. N. G. Carlson, J. Howard, L. C. Gahring and S. W. Rogers, *RNA editing (Q/R site) and flop/flip splicing of AMPA receptor transcripts in young and old brains*, in *Neurobiology of aging*. 2000. p. 599-606.
83. R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie and S. F. Traynelis, *The glutamate receptor ion channels*, in *Pharmacological Reviews*. 1999. p. 7-61.
84. J. R. Howe, *CrossTalk proposal: TARPs modulate AMPA receptor gating transitions*, in *The Journal of Physiology*. 2013. p. 1581-3; discussion 1589.
85. S. F. Traynelis, L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine, *Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function*, in *Pharmacological Reviews*. 2010. p. 405-96.
86. A. I. Sobolevsky, M. P. Rosconi and E. Gouaux, *X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor*, in *Nature*. 2009. p. 745-56.
87. M. L. Mayer, *Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activation and modulation*, in *Current Opinion in Neurobiology*. 2011. p. 283-90.
88. Y. Sun, R. Olson, M. Horning, N. Armstrong, M. Mayer and E. Gouaux, *Mechanism of glutamate receptor desensitization*, in *Nature*. 2002. p. 245-53.
89. N. Armstrong and E. Gouaux, *Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core*, in *Neuron*. 2000. p. 165-81.
90. O. Krichevsky and G. Bonnet, *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*, in *Reports on Progress in Physics* 2002. p. 251–297.
91. K. A. Dill and D. Shortle, *Denatured states of proteins*, in *Annual Review of Biochemistry*. 1991. p. 795-825.

92. H. Neuweiler, M. Löllmann, S. Doose and M. Sauer, *Dynamics of unfolded polypeptide chains in crowded environment studied by fluorescence correlation spectroscopy*, in *Journal of Molecular Biology*. 2007. p. 856-69.
93. A. Möglich, K. Joder and T. Kiefhaber, *End-to-end distance distributions and intrachain diffusion constants in unfolded polypeptide chains indicate intramolecular hydrogen bond formation*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006. p. 12394-9.
94. D. W. Bolen and G. D. Rose, *Structure and energetics of the hydrogen-bonded backbone in protein folding*, in *Annual Review of Biochemistry*. 2008. p. 339-62.
95. H. Neuweiler, C. M. Johnson and A. R. Fersht, *Direct observation of ultrafast folding and denatured state dynamics in single protein molecules*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2009. p. 18569-74.
96. K. A. Scott, D. O. Alonso, S. Sato, A. R. Fersht and V. Daggett, *Conformational entropy of alanine versus glycine in protein denatured states*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007. p. 2661-6.
97. J. P. Hennessey, Jr. and W. C. Johnson, Jr., *Information content in the circular dichroism of proteins*, in *Biochemistry*. 1981. p. 1085-94.
98. S. W. Provencher and J. Glockner, *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*, in *Biochemistry*. 1981. p. 33-7.
99. N. J. Greenfield, *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*, in *Nature Protocols*. 2006. p. 2876-90.
100. L. L. Porter and G. D. Rose, *Redrawing the Ramachandran plot after inclusion of hydrogen-bonding constraints*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2011. p. 109-13.
101. G. D. Rose, P. J. Fleming, J. R. Banavar and A. Maritan, *A backbone-based theory of protein folding*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006. p. 16623-33.
102. D. P. Teufel, C. M. Johnson, J. K. Lum and H. Neuweiler, *Backbone-driven collapse in unfolded protein chains*, in *Journal of Molecular Biology*. 2011. p. 250-62.
103. I. Daidone, H. Neuweiler, S. Doose, M. Sauer and J. C. Smith, *Hydrogen-bond driven loop-closure kinetics in unfolded polypeptide chains*, in *PLoS Computational Biology*. 2010. p. e1000645.
104. H. Gong, P. J. Fleming and G. D. Rose, *Building native protein conformation from highly approximate backbone torsion angles*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005. p. 16227-32.

105. P. J. Fleming, H. Gong and G. D. Rose, *Secondary structure determines protein topology*, in *Protein Science*. 2006. p. 1829-34.
106. Y. Zhang, I. A. Hubner, A. K. Arakaki, E. Shakhnovich and J. Skolnick, *On the origin and highly likely completeness of single-domain protein structures*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006. p. 2605-10.
107. H. Neuweiler, A. Schulz, M. Bohmer, J. Enderlein and M. Sauer, *Measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in peptides at the single-molecule level*, in *Journal of the American Chemical Society*. 2003. p. 5324-30.
108. B. Fierz, H. Satzger, C. Root, P. Gilch, W. Zinth and T. Kiefhaber, *Loop formation in unfolded polypeptide chains on the picoseconds to microseconds time scale*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007. p. 2163-8.
109. O. Bieri, J. Wirz, B. Hellrung, M. Schutkowski, M. Drewello and T. Kiefhaber, *The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1999. p. 9597-601.
110. R. R. Hudgins, F. Huang, G. Gramlich and W. M. Nau, *A fluorescence-based method for direct measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in biopolymers: an exploratory study with polypeptides*, in *Journal of the American Chemical Society*. 2002. p. 556-64.
111. F. Krieger, B. Fierz, O. Bieri, M. Drewello and T. Kiefhaber, *Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding*, in *Journal of Molecular Biology*. 2003. p. 265-74.
112. H. Neuweiler, S. Doose and M. Sauer, *A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005. p. 16650-5.
113. S. Doose, H. Neuweiler and M. Sauer, *Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: a reporter for conformational dynamics of macromolecules*, in *Chemphyschem*. 2009. p. 1389-98.
114. J. Widengren, R. Rigler and U. Mets, *Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy*, in *Journal of Fluorescence*. 1994. p. 255-8.
115. C. S. Ortlepp and J. M. Gosline, *Consequences of forced silking*, in *Biomacromolecules*. 2004. p. 727-31.
116. D. N. Breslauer, L. P. Lee and S. J. Muller, *Simulation of flow in the silk gland*, in *Biomacromolecules*. 2009. p. 49-57.
117. F. Vollrath and D. P. Knight, *Liquid crystalline spinning of spider silk*, in *Nature*. 2001. p. 541-8.

118. J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp and K. N. Savage, *The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function*, in *The Journal of Experimental Biology*. 1999. p. 3295-303.
119. M. B. Hinman, J. A. Jones and R. V. Lewis, *Synthetic spider silk: a modular fiber*, in *Trends in Biotechnology*. 2000. p. 374-9.
120. W. A. Gaines, M. G. Sehorn and W. R. Marcotte, Jr., *Spidroin N-terminal domain promotes a pH-dependent association of silk proteins during self-assembly*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. p. 40745-53.
121. B. Z. Packard, D. D. Topygin, A. Komoriya and L. Brand, *Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996. p. 11640-5.
122. J. A. Ross and D. M. Jameson, *Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence*, in *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2008. p. 1301-12.
123. M. R. Eftink, *Fluorescence techniques for studying protein structure*, in *Methods of Biochemical Analysis*. 1991. p. 127-205.
124. J. Ervin, J. Sabelko and M. Gruebele, *Submicrosecond real-time fluorescence sampling: application to protein folding*, in *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 2000. p. 1-15.
125. J. T. Vivian and P. R. Callis, *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*, in *Biophysical Journal*. 2001. p. 2093-109.
126. O. Tokareva, M. Jacobsen, M. Buehler, J. Wong and D. L. Kaplan, *Structure-function-property-design interplay in biopolymers: spider silk*, in *Acta Biomaterialia*. 2014. p. 1612-26.
127. S. Schwarze, F. U. Zwettler, C. M. Johnson and H. Neuweiler, *The N-terminal domains of spider silk proteins assemble ultrafast and protected from charge screening*, in *Nature Communications*. 2013.
128. P. Debye and E. Hückel, *Zur Theorie der Elektrolyte. Gefrierpunktserniedrigung und verwandte Erscheinungen.*, in *Physik*. 1923. p. 185-206.
129. S. Gianni, A. Engstrom, M. Larsson, N. Calosci, F. Malatesta, L. Eklund, C. C. Ngang, C. Travaglini-Allocatelli and P. Jemth, *The kinetics of PDZ domain-ligand interactions and implications for the binding mechanism*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 2005. p. 34805-12.
130. C. N. Pace, G. R. Grimsley and J. M. Scholtz, *Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 2009. p. 13285-9.

131. G. Gronau, Z. Qin and M. J. Buehler, *Effect of sodium chloride on the structure and stability of spider silk's N-terminal protein domain*, in *Biomaterials Science*. 2013. p. 276-284.
132. J. Janin, *The kinetics of protein-protein recognition*, in *Proteins*. 1997. p. 153-61.
133. M. Schlosshauer and D. Baker, *Realistic protein-protein association rates from a simple diffusional model neglecting long-range interactions, free energy barriers, and landscape ruggedness*, in *Protein Science*. 2004. p. 1660-9.
134. R. Alsallaq and H. X. Zhou, *Prediction of protein-protein association rates from a transition-state theory*, in *Structure*. 2007. p. 215-24.
135. G. Schreiber and A. R. Fersht, *Rapid, electrostatically assisted association of proteins*, in *Nature Structural & Molecular Biology*. 1996. p. 427-31.
136. T. Selzer, S. Albeck and G. Schreiber, *Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes*, in *Nature Structural & Molecular Biology*. 2000. p. 537-41.
137. F. B. Sheinerman, R. Norel and B. Honig, *Electrostatic aspects of protein-protein interactions*, in *Current Opinion in Structural Biology*. 2000. p. 153-9.
138. J. M. Rogers, A. Steward and J. Clarke, *Folding and binding of an intrinsically disordered protein: fast, but not 'diffusion-limited'*, in *Journal of the American Chemical Society*. 2013. p. 1415-22.
139. M. K. Gilson, A. Rashin, R. Fine and B. Honig, *On the calculation of electrostatic interactions in proteins*, in *Journal of Molecular Biology*. 1985. p. 503-16.
140. D. J. Lockhart and P. S. Kim, *Electrostatic screening of charge and dipole interactions with the helix backbone*, in *Science*. 1993. p. 198-202.
141. B. Z. Packard, D. D. Toptygin, A. Komoriya and L. Brand, *Characterization of fluorescence quenching in bifluorophoric protease substrates*, in *Biophysical Chemistry*. 1997. p. 167-76.
142. E. M. Stennett, M. A. Ciuba and M. Levitus, *Photophysical processes in single molecule organic fluorescent probes*, in *Chemical Society Reviews*. 2014. p. 1057-75.
143. N. Marme, J. P. Knemeyer, M. Sauer and J. Wolfrum, *Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan*, in *Bioconjugate Chemistry*. 2003. p. 1133-9.
144. Y. Arinaminpathy, M. S. Sansom and P. C. Biggin, *Molecular dynamics simulations of the ligand-binding domain of the ionotropic glutamate receptor GluR2*, in *Biophysical Journal*. 2002. p. 676-83.

145. D. M. Schauder, O. Kuybeda, J. Zhang, K. Klymko, A. Bartesaghi, M. J. Borgnia, M. L. Mayer and S. Subramaniam, *Glutamate receptor desensitization is mediated by changes in quaternary structure of the ligand binding domain*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2013. p. 5921-6.
146. A. H. Ahmed, A. P. Loh, D. E. Jane and R. E. Oswald, *Dynamics of the SIS2 glutamate binding domain of GluR2 measured using 19F NMR spectroscopy*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. p. 12773-84.
147. A. Y. Lau and B. Roux, *The free energy landscapes governing conformational changes in a glutamate receptor ligand-binding domain*, in *Structure*. 2007. p. 1203-14.
148. C. F. Landes, A. Rambhadran, J. N. Taylor, F. Salatan and V. Jayaraman, *Structural landscape of isolated agonist-binding domains from single AMPA receptors*, in *Nature Chemical Biology*. 2011. p. 168-73.
149. A. J. Plested and M. L. Mayer, *AMPA receptor ligand binding domain mobility revealed by functional cross linking*, in *The Journal of Neuroscience*. 2009. p. 11912-23.
150. H. Bräuner-Osborne, J. Egebjerg, E. O. Nielsen, U. Madsen and P. Krogsgaard-Larsen, *Ligands for glutamate receptors: design and therapeutic prospects*, in *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000. p. 2609-45.
151. P. H. Andersen, C. K. Tygesen, J. S. Rasmussen, L. Soegaard-Nielsen, A. Hansen, K. Hansen, A. Kiemer and C. E. Stidsen, *Stable expression of homomeric AMPA-selective glutamate receptors in BHK cells*, in *European Journal of Pharmacology*. 1996. p. 95-100.
152. D. K. Patneau, L. Vyklicky, Jr. and M. L. Mayer, *Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate*, in *The Journal of Neuroscience*. 1993. p. 3496-509.
153. Y. Stern-Bach, S. Russo, M. Neuman and C. Rosenmund, *A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors*, in *Neuron*. 1998. p. 907-18.
154. Y. Yao, J. Belcher, A. J. Berger, M. L. Mayer and A. Y. Lau, *Conformational analysis of NMDA receptor GluN1, GluN2, and GluN3 ligand-binding domains reveals subtype-specific characteristics*, in *Structure*. 2013. p. 1788-99.
155. A. Inanobe, H. Furukawa and E. Gouaux, *Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors*, in *Neuron*. 2005. p. 71-84.
156. K. Frydenvang, L. L. Lash, P. Naur, P. A. Postila, D. S. Pickering, C. M. Smith, M. Gajhede, M. Sasaki, R. Sakai, O. T. Pentikainen, G. T. Swanson and J. S. Kastrop, *Full domain closure of the ligand-binding core of the ionotropic glutamate receptor*



- iGluR5 induced by the high affinity agonist dysiherbaine and the functional antagonist 8,9-dideoxyneodysiherbaine*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 2009. p. 14219-29.
157. D. Bucher, B. J. Grant and J. A. McCammon, *Induced fit or conformational selection? The role of the semi-closed state in the maltose binding protein*, in *Biochemistry*. 2011. p. 10530-9.
  158. R. L. McFeeters and R. E. Oswald, *Structural mobility of the extracellular ligand-binding core of an ionotropic glutamate receptor. Analysis of NMR relaxation dynamics*, in *Biochemistry*. 2002. p. 10472-81.
  159. E. R. Valentine and A. G. Palmer, 3rd, *Microsecond-to-millisecond conformational dynamics demarcate the GluR2 glutamate receptor bound to agonists glutamate, quisqualate, and AMPA*, in *Biochemistry*. 2005. p. 3410-7.
  160. H. Nyquist, *Certain topics in telegraph transmission theory*, in *Transactions AIEE*. 1928. p. 617-644.
  161. M. M. Frigault, J. Lacoste, J. L. Swift and C. M. Brown, *Live-cell microscopy - tips and tools*, in *Journal of Cell Science*. 2009. p. 753-67.
  162. M. A. Medina and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology*, in *Bioessays*. 2002. p. 758-64.
  163. [http://www.pymolwiki.org/index.php/Radius\\_of\\_gyration](http://www.pymolwiki.org/index.php/Radius_of_gyration). Stand: 08.06.2014.
  164. [http://www.pymolwiki.org/index.php/Center\\_Of\\_Mass](http://www.pymolwiki.org/index.php/Center_Of_Mass). Stand: 08.06.2014.
  165. T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor and J. Enderlein, *Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements*, in *Chemphyschem*. 2007. p. 433-43.
  166. K. A. Yamada and C. M. Tang, *Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents*, in *The Journal of Neuroscience*. 1993. p. 3904-15.
  167. R. Jin, S. K. Singh, S. Gu, H. Furukawa, A. I. Sobolevsky, J. Zhou, Y. Jin and E. Gouaux, *Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain*, in *Embo Journal*. 2009. p. 1812-23.
  168. M. L. Mayer, *Glutamate receptor ion channels*, in *Current Opinion in Neurobiology*. 2005. p. 282-8.
  169. R. L. McFeeters and R. E. Oswald, *Emerging structural explanations of ionotropic glutamate receptor function*, in *Faseb Journal*. 2004. p. 428-38.

# 10. Anhang

## 10.1 Medien

### 2TY, 1 l:

16 g Trypton (Melford)

10 g Hefeextrakt (Melford)

5 g NaCl (Sigma)

pH auf 7,4 einstellen, autoklavieren

### Terrific Broth (TB), 1 l:

12 g Trypton

24 g Hefeextrakt

4 ml Glycerol (Sigma)

100 ml Phosphatlösung (0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma)

Autoklavieren

### Super Optimal Broth (SOB):

5 g/l Hefeextrakt

20 g/l Trypton

0,6 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

10 mM  $\text{MgCl}_2$  (Merck)

10 mM  $\text{MgSO}_4$  (Merck)

---

Nach dem Autoklavieren 10 ml/l einer 2 M  $Mg^{2+}$ -Lösung aus 1 M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  und 1 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  zum Rest hinzugeben. (pH zwischen 6,8 und 7)

## 10.2 Protokolle

### Kompetente Zellpräparation:

#### Lösungen und Gebrauchsmittel:

1. Transformationspuffer:
  - 3,0 g PIPES (Sigma)
  - 2,2 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Merck)
  - 18,6 g KCl
  - 75 g Glucose (Merck)
  - auf 980 ml  $H_2O$
  - mit KOH auf pH 6,7 einstellen
  - 10,9 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (Sigma)
  - Volumen auf 1000 ml einstellen und sterilfiltrieren
2. DMSO (Merck)
3. Trockeneis, Ethanol
4. Sterile Zentrifugengefäße, gekühlt
5. Sterile Eppis, gekühlt

#### Durchführung:

- Bakterien auf Agarplatten ohne Amp ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- Startkulturen ansetzen und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- 0,75 l Hauptkultur mit 7,5 ml Startkultur ansetzen und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 wachsen lassen
- Kultur für 30 min auf 4 °C herunterkühlen
- Abzentrifugieren bei 4 °C für 10 min bei 4000 rpm
- In 100 ml gekühltem TB-Puffer resuspendieren
- Abzentrifugieren bei 4 °C für 10 min bei 4000 rpm

- In 200 ml gekühltem TB-Puffer resuspendieren
- Abzentrifugieren bei 4 °C für 10 min bei 4000 rpm
- In 25 ml gekühltem TB-Puffer resuspendieren
- 25 ml gekühlten TB-Puffer mit 14 % DMSO hinzugeben
- In gekühlte sterile Eppis aliquotieren und im Trockeneis-Ethanol Gemisch einfrieren und bei -80 °C lagern

Hitzeschocktransformation:

- 50 µl kompetente Origami 2 (DE3) / 20 µl kompetente C41 (DE3) / 40 µl XL-1 Blue mit 1 µl DNS (Plasmid, c ~ 30-40 ng/µl) in sterilen Eppis 10 Minuten auf Eis inkubieren
- Die C41 (DE3) / XL-1 Blue Bakterien ausplattieren
- Die Origami 2 (DE3) 30 Sekunden bei 42 °C inkubieren
- 2 Minuten auf Eis
- 200 µl SOB Medium hinzugeben und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubieren
- Origami 2 (DE3) Bakterien ausplattieren

## 10.3 Primer

Tabelle 5: Verwendete Primer zur Herstellung der Einzel- und Doppelmutanten. Die Primer wurden bei Sigma synthetisiert.

Protein	Mutation	Sequenz (5'-3')
BBL	C130A fwd	GGATCCCAAACAACGATGCGTTAAGCCCGGCGATCCG
	C130A rev	CGGATCGCCGGGCTTAACGCATCGTTGTTTTGGGATCC
L131A	fwd	CCCAAACAACGATTGCGCGAGCCCGGCGATCCGTCGC
	rev	GCGACGGATCGCCGGGCTCGCGCAATCGTTGTTTTGGG
S132G	fwd	CCCAAACAACGATTGCTTAGGCCCGGCGATCCGTCGC
	rev	GCGACGGATCGCCGGGCTAAGCAATCGTTGTTTTGGG
P133A	fwd	CCCAAACAACGATTGCTTAAGCGCGGCGATCCGTCGCCTGC
	rev	GCAGGCGACGGATCGCCGCGCTTAAGCAATCGTTGTTTTGGG
A134G	fwd	CGTTGCTTAAGCCCGGGCATCCGTCGCCTGCTGGC
	rev	GCCAGCAGGCGACGGATGCCCGGGCTTAAGCAATCG
I135A	fwd	CGATGCGTTAAGCCCGGCGGCGGTCGCCTGCTGGCTGAATGG
	rev	CCATTCAGCCAGCAGGCGACGCGCCCGGGCTTAACGCATCG

Protein	Mutation	Sequenz (5'-3')
	I135V fwd	CGATGCGTTAAGCCCGGGCGCGCTCGCCTGCTGGCTGAATGG
	I135V rev	CCATTACAGCCAGCAGGCGACGCACCCGCCGGCTTAACGCATCG
	L138A fwd	GCCCGGCGATCCGTCGCGCTGGCTGAATGGAATCTCG
	L138A rev	CGAGATTCCATTACAGCCAGCGCGACGGATCGCCGGGC
	L139A fwd	CCGGCGATCCGTCGCCTGGCGGCTGAATGGAATCTCGACGCC
	L139A rev	GGCGTCGAGATTCCATTACGCCAGGCGACGGATCGCCGG
	A140G fwd	GCGATCCGTCGCCTGCTGGGCGAATGGAATCTCGACGC
	A140G rev	GCGTCGAGATTCCATTGCCAGCAGGCGACGGATCGC
	H142A fwd	CGCCTGCTGGCTGAAGCGAATCTCGACGCCAGCG
	H142A rev	CGCTGGCGTCGAGATTGCTTCAGCCAGCAGGCG
	L144A fwd	GCTGGCTGAATGGAATGCGGACGCCAGCGCCATTAAAGGC
	L144A rev	GCCTTTAATGGCGCTGGCGTCCGCATTCCATTACGCCAGC
	A146G fwd	GGCTGAACACAATCTCGACGGCAGCGCCATTAAAGGC
	A146G rev	GCCTTTAATGGCGCTGCCGTCGAGATTGTGTTCAGCC
	A148G fwd	GGAATCTCGACGCCAGCGGCATTAAAGGCACCCGGTGTGGG
	A148G rev	CCCACACCGGTGCCTTTAATGCCGCTGGCGTCGAGATTCC
	I149V fwd	GGAATCTCGACGCCAGCGCCGTGAAAGGCACCCGGTGTGGG
	I149V rev	CCCACACCGGTGCCTTTCACGGCGCTGGCGTCGAGATTCC
	T152A fwd	GCCAGCGCCATTAAAGGCGCGGGTGTGGGTGGTTCG
	T152A rev	CGACCACCCACACCCGCGCCTTTAATGGCGCTGGC
	T152S fwd	GCCAGCGCCATTAAAGGCAGCGGTGTGGGTGGTTCGTGGC
	T152S rev	GCCACGACCACCCACACCGCTGCCTTTAATGGCGCTGGC
	V154G fwd	GCCATTAAAGGCACCCGGTGGCGGTGGTCTGACTC
	V154G rev	CGAGTCAGACGACCACCGCCACCCGGTGCCTTTAATGGC
	T159A fwd	GGTGTGGGTGGTCTGCTGGCGCGTGAAGATGTG- GAAAAACATCTGGCG
	T159A rev	CGCCAGATGTTTTTCCACATCTTCACGCGCCAGACGACCAC- CCACACC
	T159S fwd	CGGTGTGGGTGGTCTGTCGGCAGCCGTGAAGATGTGG
	T159S rev	CCACATCTTCACGGCTGCCACGACCACCCACACCCG
	V163A fwd	CGTCTGACTCGTGAAGATGCGGAAAAACATCTGGCG
	V163A rev	CGCCAGATGTTTTTCCGCATCTTCACGAGTCAGACG
	L167A fwd	CGTGAAGATGTGGAAAAACATGCGGCGAAAGCTTGAATCC
	L167A rev	GGATTCAAGCTTTCGCCGCATGTTTTTCCACATCTTCACG
NTD	H6A fwd	GGATCCGGCAATAGCGCAACCACCCCGTGGACC
	H6A rev	GGTCCACGGGGTGGTTGCGCTATTGCCGATCC
	W10A fwd	GGCAATAGCCATACCACCCCGCAACCAATCCGGGTCTGG
	W10A rev	CCAGACCCGGATTGGTTGCCGGGGTGGTATGGCTATTGCC
	E17Q fwd	CCAATCCGGGTCTGGCACAGAATTTTATGAATAGC
	E17Q rev	GCTATTCATAAAATTCTGTGCCAGACCCGGATTGG
	D39N fwd	GGTTTTACCGCAAGCCAGCTGAATGATATGAGCACCATTGC
	D39N rev	GCAATGGTGCTCATATCATTACAGCTGGCTTGGCGTAAAACC
	D40N fwd	GCAAGCCAGCTGGATAATATGAGCACCATTGCACAGAGC
	D40N rev	GCTCTGTGCAATGGTGCTCATATTATCCAGCTGGCTTGC

Protein	Mutation	Sequenz (5'-3')
	R60A fwd	GCCTGGCAGCACAGGGTGCAACCAGCCCGAATAAACTGC
	R60A rev	GCAGTTTATTCGGGCTGGTTGCACCCTGTGCTGCCAGGC
	K65A fwd	CGTACCAGCCCGAATGCACTGCAGGCACTGAATATGGC
	K65A rev	GCCATATTCAGTGCCTGCAGTGCATTCGGGCTGGTACG
	E79Q fwd	GCAAGCAGCATGGCACAGATTGCAGCAAGCGAAGAAGG
	E79Q rev	CCTTCTTCGCTTGCTGCAATCTGTGCCATGCTGCTTGC
	E84Q fwd	GCAGAAATTGCAGCAAGCCAGGAAGGTGGCGGTAGC
	E84Q rev	GCTACCGCCACCTTCCTGGCTTGCTGCAATTTCTGC
	E85Q fwd	GCAGAAATGCAGCAAGCGAACAGGGTGGCGGTAGCCTGAGC
	E85Q rev	GCTCAGGCTACCGCCACCTGTTCGCTTGCTGCAATTTCTGC
	K93A fwd	GGTAGCCTGAGCACCGCAACCAGCAGCATTGCAAGC
	K93A rev	GCTTGCAATGCTGCTGGTTGCGGTGCTCAGGCTACC
	E119Q fwd	GCCGTTTATTAATCAGATTACCCAGCTGGTTAGC
	E119Q rev	GCTAACCAGCTGGGTAATCTGATTAATAAACGGC
	D134N fwd	GCACAGGCAGGTATGAATAATGTTAGCGCATAATAAGAATTTCCG
	D134N rev	CGAAATTCTTATTATGCGCTAACATTATTCATACCTGCCTGTGC
	Q50C fwd	GCACAGAGCATGGTTTGCAGCATTCAGAGCCTGG
	Q50C rev	CCAGGCTCTGAATGCTGCAAACCATGCTCTGTGC
	Q50W fwd	GCACAGAGCATGGTTTGGAGCATTCAGAGCCTGG
	Q50W rev	CCAGGCTCTGAATGCTCCAACCATGCTCTGTGC
LBD	G57C fwd	CAAGCTGACTATTGTTTGCATGGCAAGTATGGG
	G57C rev	CCCATACTTGCCATCGCAAACAATAGTCAGCTTG
	G59C fwd	GACTATTGTTGGGGATTGCAAGTATGGGGCCAGG
	G59C rev	CCTGGCCCCATACTTGCAATCCCCAACAATAGTC
	T173W fwd	CTCTGTGTTTGTGAGGTGGACCGCAGAAGGAGTAG
	T173W rev	CTACTCCTTCTGCGGTCCACCTCACAACACAGAG

Polymerase-Kettenreaktion für BBL und die NTD:

Schritt 1: 95 °C für 30 s

Schritt 2: 95 °C für 30 s

Schritt 3: 55 °C für 1 min

Schritt 4: 68 °C für 10 min

➔ Schritte 2 bis 4 20-mal wiederholen, danach auf 4 °C runterkühlen, alle Schritte mit Deckelheizung auf 105 °C

Polymerase-Kettenreaktion für die LBD:

Schritt 1: 95 °C für 2 min

Schritt 2: 95 °C für 20 s

Schritt 3: 60 °C für 10 s

Schritt 4: 68 °C für 3 min

Schritt 5: 68 °C für 5 min

- ➔ Schritte 2 bis 4 18-mal wiederholen, nach Schritt 5 auf 4 °C runterkühlen, alle Schritte mit Deckelheizung auf 105 °C

## **10.4 Chromatographie und Massenbestimmung**

### **10.4.1 BBL**

Exemplarisch sind in Abbildung 10.1 Chromatogramme von  $D_{\text{phys}}$  gezeigt, die in den Retentionszeiten mit dem Wildtyp-Protein und den Ladungsmutanten übereinstimmen. Bei der Kationenaustauschchromatographie ist der zweite Peak (Fraktionen 14 - 17) der von  $D_{\text{phys}}$ , zu sehen auch bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE; Abbildung 10.2).

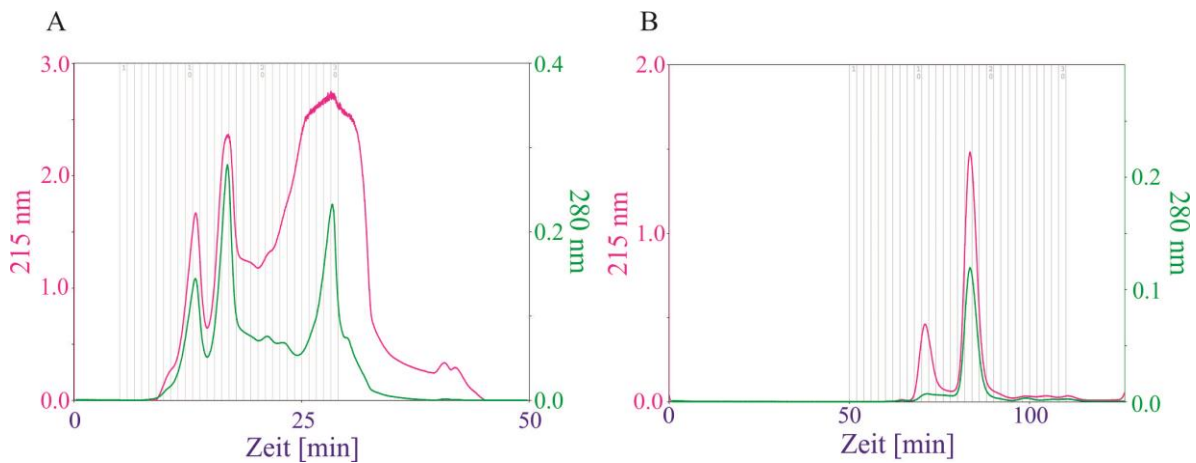


Abbildung 10.1: Aufreinigung BBL

Chromatogramme von  $D_{\text{phys}}$  von (A) der Kationenaustauschchromatographie und (B) der Größenausschlusschromatographie.

Die Retentionszeit der Größenausschlusschromatographie beträgt  $\sim 78$  min (HiLoad 26/60 Superdex 30 Säule). Nach diesem Aufreinigungsschritt waren keine Verunreinigungen mehr bei der SDS-PAGE (Bolt® Bis-Tris Plus Gel, life technologies; Proteinleiter: Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, life technologies) zu sehen (Abbildung 10.2).



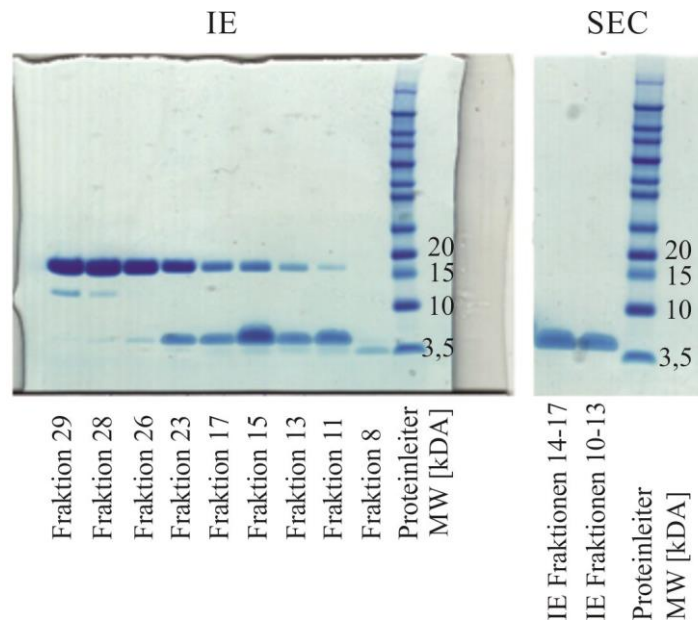


Abbildung 10.2: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von BBL

SDS-PAGE von  $D_{\text{phys}}$  nach der Kationenaustauschchromatographie (IE) und der Größenausschlusschromatographie (SEC). BBL hat ein Molekulargewicht von 5,0 kDa. Bei der IE wurden die Fraktionen 10 - 13 und 14 - 17 vereinigt und jeweils eine SEC durchgeführt.

Eine Massenbestimmung für  $D_{\text{phys}}$  und jede Einzelpunktmutante wurde nach der Farbstoffmarkierung mit ATTO Oxa11 in Auftrag gegeben, um sicherzustellen, dass die Proteine tatsächlich die Punktmutation beinhalten. Diese lieferten eindeutige Ergebnisse, exemplarisch für  $D_{\text{phys}}$  gezeigt (Abbildung 10.3).

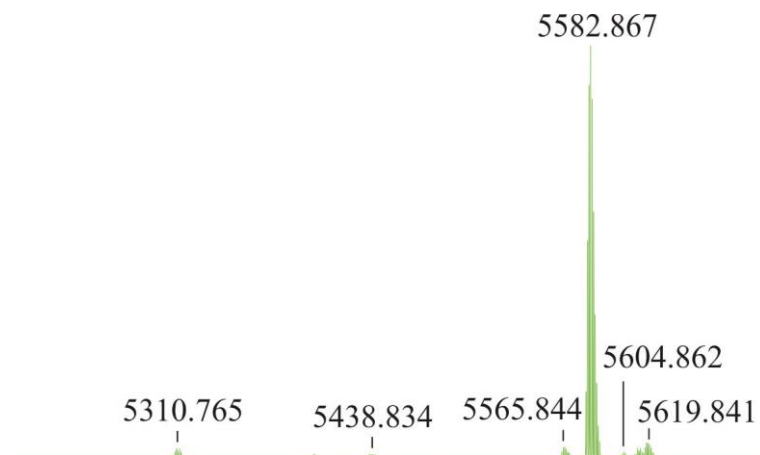


Abbildung 10.3: Massenspektrum vom farbstoffmarkierten  $D_{\text{phys}}$

Massenspektrum von  $D_{\text{phys}}$  markiert mit ATTO Oxa11. Der Hauptpeak mit einem Molekulargewicht von 5,582 kDa spiegelt die Masse des Proteins mit dem Farbstoff wieder.

### 10.4.2 N-terminale Domäne

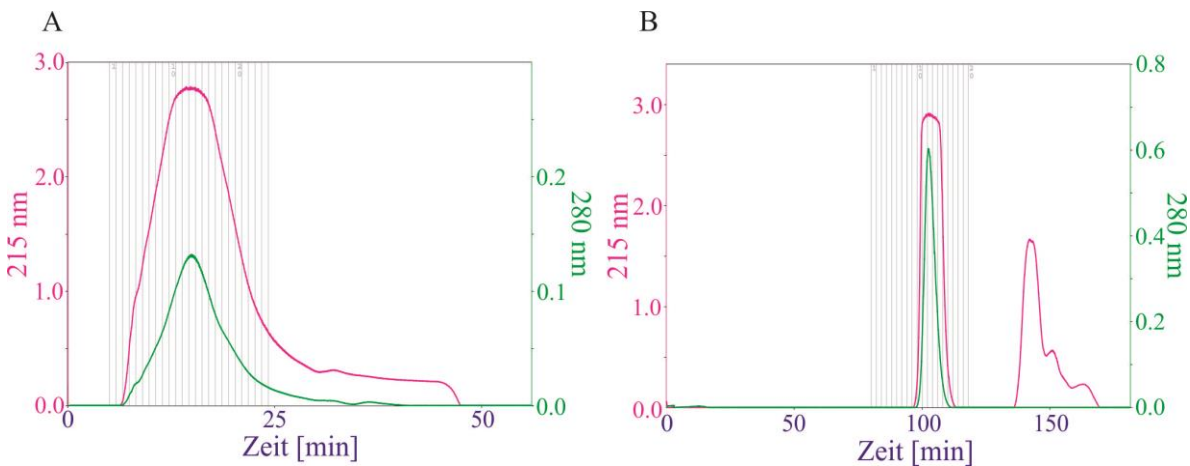


Abbildung 10.4: Aufreinigung der Spinnenseiden-NTD

Chromatogramme von der Wildtyp-NTD von (A) der Anionenaustauschchromatographie und (B) der Größenausschlusschromatographie

Abbildung 10.4 zeigt exemplarisch die Chromatogramme der Wildtyp-NTD von der Anionenaustauschchromatographie und der Größenausschlusschromatographie. Die Retentionszeit für letztere war für alle Mutanten gleich (HiLoad 26/60 Superdex S75 Säule). Je nach

Ladungsmutation hat sich die Retentionszeit bei der Anionenaustauschchromatographie jedoch leicht zu früheren oder späteren Zeiten verschoben.

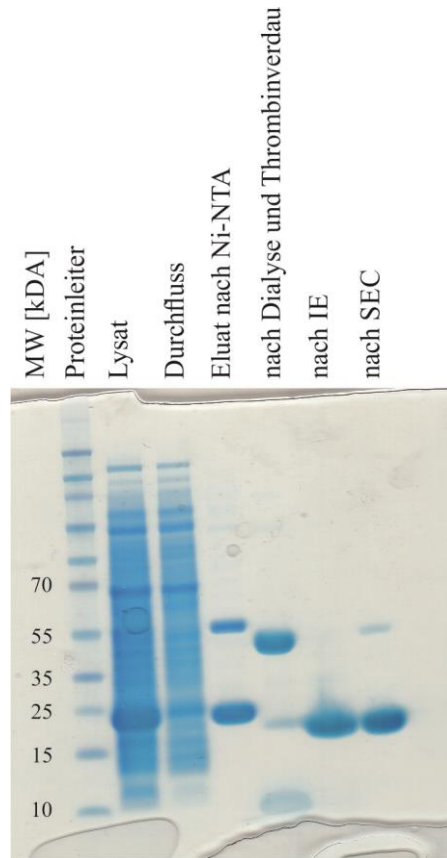


Abbildung 10.5: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte der Spinnenseiden-NTD

Exemplarisch dargestellt die SDS-PAGE der Q50C. Die NTD hat ein Molekulargewicht von 14,18 kDa. Das Protein läuft jedoch wie eins mit einem Molekulargewicht von ~ 20 kDa.

Nach der Größenausschlusschromatographie wurde ein sauberes Protein erhalten (Abbildung 10.5). Dieses läuft bei der SDS-PAGE (Bolt® Bis-Tris Plus Gel, life technologies; Proteinleiter: vorgefärbte Proteinleiter, 10 – 250 kDa, Thermo Scientific) wie ein Protein mit einem Molekulargewicht (MW) von ~ 20 kDa. Durch eine Massenbestimmung wurde das Protein als das Zielprotein identifiziert.

### 10.4.3 Ligandenbindungsdomäne

Die GluR2-LBDs wurden neben einer Ni-NTA über eine Größenausschlusschromatographie aufgereinigt, in Abbildung 10.6 exemplarisch für die Wildtyp-NTD gezeigt. Der zweite Peak bei einer Retentionszeit von ~ 87 min ist das Zielprotein. Dies wurde durch eine SDS-PAGE (Bolt® Bis-Tris Plus Gel, life technologies; Proteinleiter: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, life technologies) (Abbildung 10.7) und eine Massenbestimmung (Abbildung 10.8) überprüft.

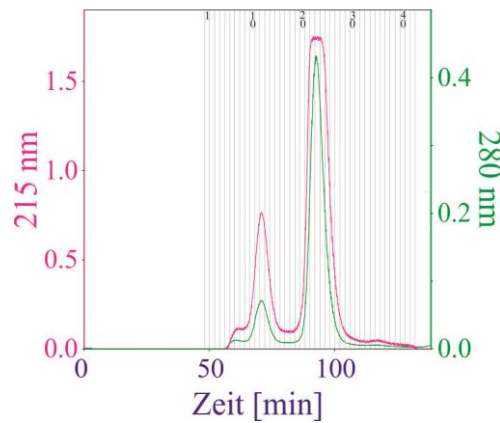


Abbildung 10.6: Aufreinigung GluR2-LBD

Größenausschlusschromatographie der Wildtyp-GluR2-LBD. Nach einer Retentionszeit von ~ 87 min kommt das Zielprotein von der Säule (Superdex 75 Säule).

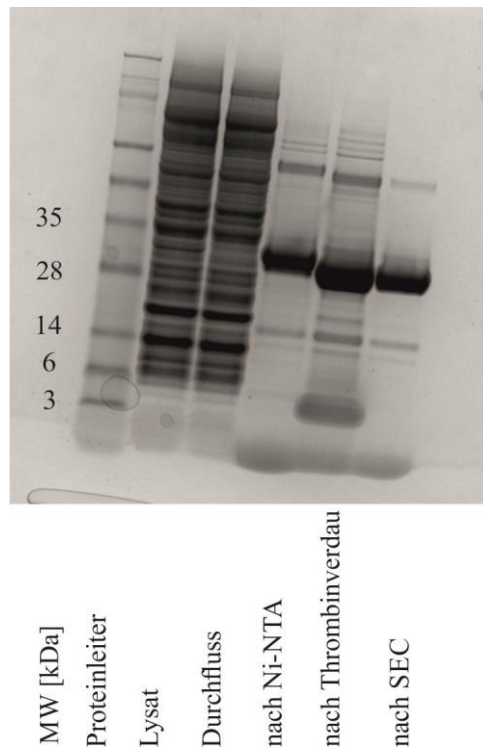


Abbildung 10.7: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte der GluR2-LBD

SDS-PAGE der Wildtyp-GluR2-LBD. Das Zielprotein hat ein Molekulargewicht von 29,22 kDa

Auswertung des InFLI-Trypsinverdaus von gluR2_LBD vom 11.12.2013							
Probe: gluR2_LBD							
Monoisotopische Masse	Fehler	Mods.	USS	Sequenzabdeckung			tot.
				von AS	bis AS		
Soll	gemessen	[ppm]					
1196.496	1196.503	5,9	1C	--	1	12	12
1810.969	1810.974	2,8	--	--	17	32	16
1228.538	1228.544	4,9	--	--	34	43	10
1285.559	1285.569	7,8	1C	--	34	43	0
1601.752	1601.760	5,0	1C	--	44	57	14
1658.773	1658.779	3,6	2C	--	44	57	0
648.292	648.294	3,1	1C	--	58	62	5
1150.647	1150.652	4,3	1C	1	63	72	10
802.467	802.470	3,7	--	--	65	72	0
859.488	859.480	-9,3	1C	--	65	72	0
1465.751	1465.755	2,7	--	--	82	94	13
1522.772	1522.780	5,3	1C	--	82	94	0
1466.894	1466.901	4,8	--	--	95	108	14
1523.916	1523.925	5,9	1C	--	95	108	0
1374.718	1374.718	0,0	--	1	129	141	13
1431.733	1431.738	3,5	1C	1	129	141	0
1246.616	1246.619	2,4	--	--	130	141	0
1303.638	1303.645	5,4	1C	--	130	141	0
1570.760	1570.769	5,7	--	--	142	156	15
1627.781	1627.789	4,9	1C	--	142	156	0
655.320	655.322	3,1	1C	--	157	160	4
1775.897	1775.908	6,2	--	2	162	175	14
1832.919	1832.929	5,5	1C	2	162	175	0
692.398	692.400	2,9	--	--	164	169	0
749.419	749.421	2,7	1C	--	164	169	0
1560.770	1560.775	3,2	--	1	164	175	0
1617.792	1617.804	7,4	1C	1	164	175	0
887.390	887.393	3,4	--	--	170	175	0
991.521	991.525	4,0	--	--	176	184	9
1048.542	1048.547	4,8	1C	--	176	184	0
1059.591	1059.609	17,0	--	1	185	194	10
1116.612	1116.628	14,3	1C	1	185	194	0
2022.948	2022.960	5,9	--	--	200	215	16
2079.969	2079.980	5,3	--	--	200	215	0
846.432	846.434	2,4	1C	--	223	230	8
863.462	863.466	4,6	1C	--	231	238	0
1306.711	1306.724	9,9	--	1	231	243	13
954.598	954.600	2,1	--	--	244	252	9
1011.620	1011.624	4,0	1C	--	244	252	0
988.531	988.535	4,0	--	--	253	261	0
1045.552	1045.556	3,8	1C	--	253	261	0
1229.710	1229.714	3,3	--	1	253	263	11
1286.731	1286.735	3,1	1C	1	253	263	0
1513.653	1513.661	5,3	1C	2	264	275	12
1271.515	1271.522	5,5	1C	1	266	275	0
1328.536	1328.546	7,5	2C	1	266	275	0
					Sequenzabdeckung insg.:		228
					von AS insg.:		275
					entspricht [%]:		82,9

Abbildung 10.8: Massenanalyse der GluR2-LBD

Auswertung der in Auftrag gegebenen Massenbestimmung der GluR2-LBD. Für die Massenbestimmung wurde das Protein mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden die gemessenen Fragmente mit den zu erwartenden verglichen (Soll).

## 10.5 Ergänzungen zu den Ergebnissen

### 10.5.1 Bindungsdomäne BBL

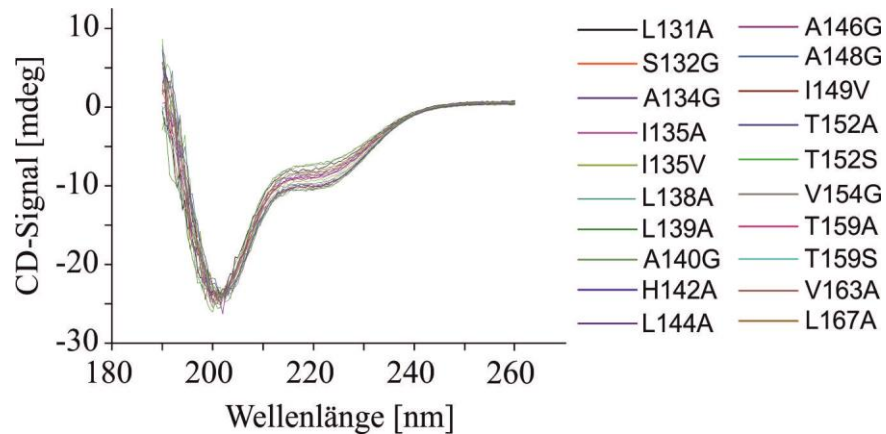


Abbildung 10.9: CD-Spektren der BBL-Einzelpunktmutanten

CD-Spektren der Einzelpunktmutanten bei 25 °C. Die Spektren sind auf das Minimum normiert.

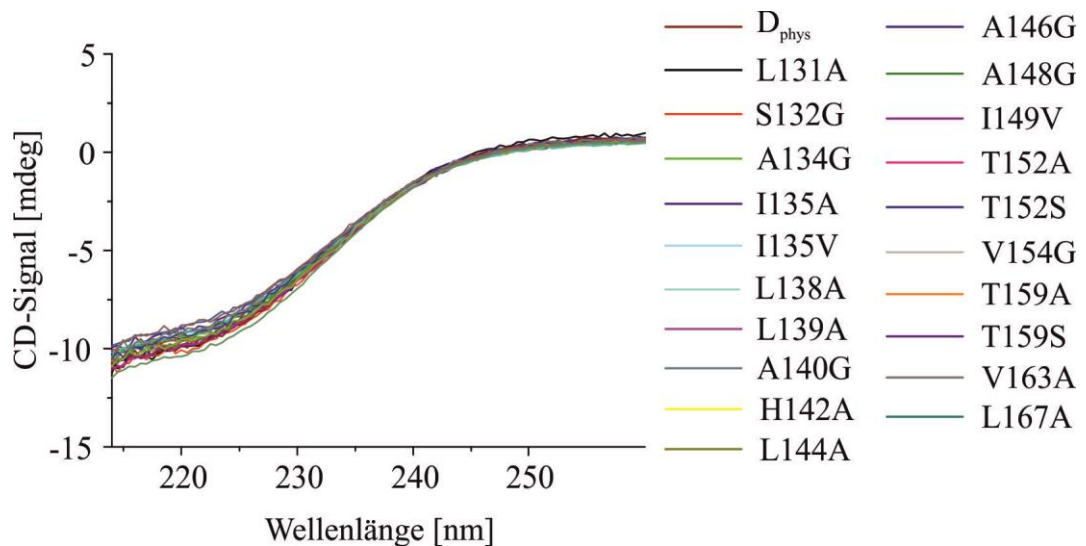


Abbildung 10.10: CD-Spektren BBL bei 90 °C

CD-Spektren der Einzelpunktmutanten und von  $D_{\text{phys}}$  bei 90 °C, normiert auf das Minimum.

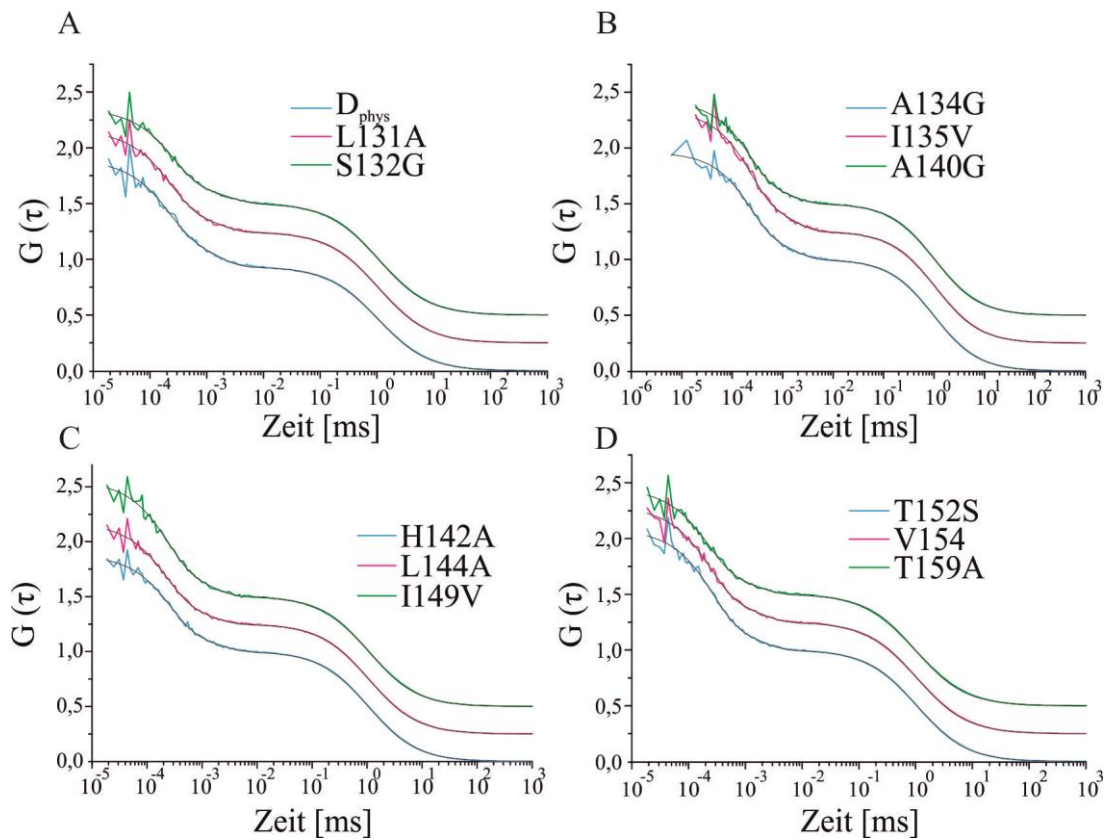


Abbildung 10.11: FCS Autokorrelationsfunktionen von BBL

FCS-Autokorrelationsfunktionen (grün, pink, blau) von Einzelpunktmutanten (A-D) aus den drei Strukturelementen in BBL. Diese wurden auf die Teilchenzahl normiert und zur besseren Darstellung mit einem Offset versehen. Die schwarzen Kurven sind die Datenanpassungen an eine Funktion mit einem zweidimensionalen Diffusionsterm und zwei unabhängigen Exponenten.



## 10.5.2 Spinnenseiden-NTD

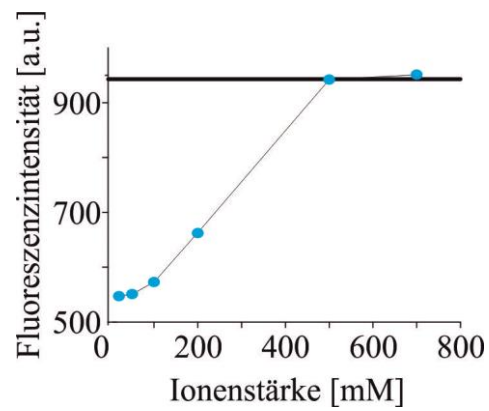


Abbildung 10.12: Salzabhängigkeit der Wildtyp-NTD bei Dimerisierung

Fluoreszenzmessungen der Wildtyp-NTD (5  $\mu$ M) in pH 6 Puffer mit steigender Ionenstärke. Die horizontale schwarze Linie markiert die Fluoreszenzintensität der Wildtyp-NTD in pH 7 Puffer