

---

Bildgebende Zweifarben-Einzelmolekül-  
PET-Fluoreszenzspektroskopie am  
molekularen Chaperon Hsp90

---

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

**Jonathan Schubert**

geboren in Gräfelfing

Würzburg, 2021



Eingereicht am: .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: .....

Gutachter: PD Dr. Hannes Neuweiler

Gutachter: PD Dr. Ingrid Tessmer

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Was soll schon passieren?**

*Gerti Beliu*



## Zusammenfassung

Im Forschungsfeld der Proteindynamik häufen sich in den letzten Jahren Untersuchungen an einzelnen Molekülen. Damit können molekulare Ereignisse, die in konventioneller Spektroskopie durch stochastische Prozesse unentdeckt bleiben, durch direkte Beobachtung identifiziert und analysiert werden, was zu tieferem mechanistischem Verständnis des untersuchten Systems beitragen kann.

Die Implikation des molekularen Chaperons Hsp90 in die korrekte Faltung und Aktivierung einer Vielzahl davon abhängiger Klientenproteine machen es zu einem zentralen Knotenpunkt der zellulären Proteinhomeostase, allerdings ist der Mechanismus seiner breiten Klientenerkennung und -prozessierung bisher nur lückenhaft untersucht. Mit der Erkenntnis, dass Hsp90 ATP-abhängig große, ratenlimitierende Umstrukturierungen erfährt, wurden Reportersysteme entwickelt, die auf dem Förster-Resonanzenergietransfer mit einer räumlichen Auflösung von ca. 2-10 nm basieren. Diese dokumentieren einen Klammerschluss des Chaperons und prognostizieren einen intermediatbasierten Konformations-Zyklus. Details über den Mechanismus der Umstrukturierungen wurden mit der Entwicklung von Reportersystemen ermittelt, die auf dem photoinduzierten Elektronentransfer zwischen der Aminosäure Tryptophan und einem organischen Farbstoff basieren. Die Technik beruht auf kontaktinduzierter Fluoreszenzlöschung und damit verbundenen digitalen Intensitätsübergängen, dabei ermöglicht die räumliche Sensitivität von  $< 1$  nm die Beobachtung von lokalen Umstrukturierungen. In Hsp90 wurden damit mittels konventioneller Spektroskopie drei kritische lokale Umlagerungen untersucht und daraus ein Modell mit heterogenen *apo*-Konformationen sowie ein kooperativer Konformationszyklus abgeleitet, der dem intermediatbasierten Modell gegenübersteht.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde anhand des Hsp90-Chaperons eine Methode entwickelt, die eine bildgebende PET-Fluoreszenzspektroskopie von mehreren Umstrukturierungen gleichzeitig an einzelnen Molekülen erlaubt. Ein umfangreiches Farbstoffscreening führte zur Identifizierung eines Farbstoffpaars,

das die PET-basierte simultane Aufzeichnung zweier Konformations-Koordinaten ermöglicht. Über verschiedene Modifikationen des Chaperons konnten einzelmolekülaugliche Oberflächen hergestellt werden, auf denen zweifach-markierte Hsp90-Proteine immobilisiert sind. Fluoreszenzintensitätszeitspuren einzelner Chaperone und entsprechende Kontrollkonstrukte bestätigen qualitativ den Erfolg der Methode, für die quantitative Analyse wurde eine Routine in der Programmiersprache Python entwickelt, mit welcher kinetische Informationen ermittelt werden konnten.

Diese legen eine enge wechselseitige Abhängigkeit der drei lokalen Elemente nahe, wobei der Großteil der Konformationsübergänge zweier simultan aufgezeichneter Umstrukturierungen Synchronität innerhalb von zwei Sekunden zeigt. Im Vergleich zur Hydrolyse von einem ATP in mehreren Minuten deutet das auf eine enge Kopplung hin. Weiter konnte eine Beschleunigung der Dynamiken durch aromatische Modifikation des N-Terminus von Hsp90 beobachtet werden, zudem erlaubt der Einzelmolekülansatz die Verwendung des nativen Nukleotids ATP, wodurch auch die lokalen Öffnungsdynamiken zugänglich werden. Die zur Bestimmung der Zeitkonstanten durchgeführte Analyse unterstützt die Ansicht heterogener *apo*-Zustände und einer einheitlich geschlossenen Konformation.

Die bildgebende Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie konnte insgesamt zu einem Komplement der Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie entwickelt werden, um damit lokale Konformationsdynamiken zu untersuchen. Der bildgebende Ansatz erlaubt eine einfache Implementierung in einen experimentellen Einzelmolekül-FRET Aufbau bei gleichzeitiger Erweiterung der beobachteten Koordinaten und wird so zu einem breit anwendbaren Werkzeug multidimensionaler Dynamikuntersuchungen einzelner Proteine.

## Summary

Over the past years, the number of investigations of single molecules has risen in the field of protein dynamics studies. Direct observation of molecular events that are obscured by stochastic processes in bulk measurements can provide a deeper mechanistic understanding of the systems under study.

The molecular chaperone Hsp90, as being involved in the correct folding and activation of client proteins, thereby acting at late-stage folding, is a central node of cellular protein homeostasis. The mechanistic understanding of its broad client recognition and processing capability still remains elusive. The discovery of large conformational changes that drive the chaperone through a rate limiting conformational cycle as a reaction of ATP binding led to the development of reporter systems that probe the global rearrangement. As the reporters are based on Förster resonance energy transfer, they are active on a spatial scale of 2-10 nm and report on the molecular clamp closure. The predicted conformational cycle implicates several intermediate states. Details of the underlying rearrangements were obtained by the development of reporter systems based on photoinduced electron transfer between the amino acid tryptophan and an organic dye. As the technique relies on contact-induced quenching of fluorescence, which is accompanied by digital intensity transitions, the resulting spatial resolution of < 1 nm enables probing of local conformational rearrangements. In bulk experiments, three critical local dynamics were probed in Hsp90, leading to the assumption of heterogeneous *apo* conformations and an associated cooperative cycle which faces the intermediate-based model.

Within the scope of this doctoral thesis, two-color single-molecule PET fluorescence imaging spectroscopy was developed using the Hsp90 chaperone to study multiple conformational rearrangements simultaneously on individual proteins. Extensive dye screening identified a dye pair suitable for the PET-based investigation of two different conformational coordinates simultaneously. Modifications on the chaperone protein enabled the immobilization of double-labeled Hsp90 molecules on glass surfaces that are suited for single-molecule

studies. Fluorescence intensity time traces of single chaperones and related control constructs validated qualitatively the success of the method. For quantitative analysis, a routine was developed in the programming language Python to obtain kinetic information.

Derived kinetics pointed to a close interdependence between the three local elements. Furthermore, the majority of state transitions of rearrangements studied at the same time occurred simultaneously within a two-second window, thereby suggesting synchronicity. Compared to the hydrolysis of one ATP molecule taking minutes, this suggests a tight coupling of motions. Further, an aromatic modification of the Hsp90 N-Terminus resulted in accelerated local dynamics. Besides investigating the dynamics accompanying clamp closure, clamp opening kinetics also became accessible through the use of native nucleotide ATP. The analysis performed as part of the determination of time constants supports the view of a heterogeneous *apo* and a uniformly closed conformation.

Two-color single-molecule PET fluorescence imaging spectroscopy was developed into a technique complement to single-molecule FRET spectroscopy that enables the probing of local conformational dynamics in immobilized proteins. The imaging approach allows for easy implementation in a single-molecule FRET setup while expanding the observed coordinates, making the PET-based technique a widely applicable tool for multidimensional dynamics studies of single proteins.

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid-Peptid
ADC	AD counts (engl.)
ADP	Adenosindiphosphat
Aha1	Accelerator of Hsp90 ATPase activity (engl.)
AMP-PNP	Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Avi	Avitag
BSA	Rinderserumalbumin
cc	<i>Coiled-coil</i>
Cdc37	Cell division cycle 37
Cdk4	Cyclin dependent kinase 4
C-His	C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag
CL	geladener Linker, (engl.: charged linker)
Cryo-EM	Kryo-elektronenmikroskopie
CTD	C-terminale Domäne, Carboxy-terminale Domäne
dd	doppelt destilliert
DDS	Dichlordimethylsilan
DNA, DNS	Deoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid

DOL	Degree of Labeling (engl.)
DSPO	Dye-sensitized-photo-oxidation (engl.)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCCD	Electron multiplying charge-coupled device (engl.)
EPI	Epifluoreszenz (engl.)
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FOV	Field of View (engl.)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	Halbwertsbreite, (engl.: Full width at half maximum)
GHKL	Gyrase, Hsp90, Histidinkinase, MutL Superfamilie
GR-LBD	Ligandenbindedomäne des Glukokortikoidrezeptors
GS-Linker	Glycin-Serin reicher Linker
HOMO	Highest occupied electron orbital (engl.)
Hsp	Hitzeschockprotein
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IS	Ionenstärke
ITPG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
$K_D$	Dissoziationskonstante
KOH	Kaliumhydroxid
kDa	Kilodalton
LUMO	Lowest unoccupied electron orbital (engl.)
MWCO	Molecular weight cut off (engl.)
MD	Mittlere Domäne

NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
N-His	N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTD	N-terminale Domäne, Amino-terminale Domäne
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
ROI	Region of Interest (engl.)
ROXS	Redoxsystem (engl.: reducing and oxidizing system)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
SV	Säulenvolumen
TIRF	Totale interne Reflexionsfluoreszenz
TrpZip	Tryptophan Zipper
TRR	Tetratricopeptide repeat (engl.)
TX, TQ	Trolox, Troloxquinone
TY	Trypton-Hefeextrakt
U	Units
WZB1	WinZipB1
WZA2	WinZipA2

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Proteine – Bausteine der Zelle .....	1
1.2 Hsp90 – ein dynamisches Schlüsselprotein der Proteostase .....	2
1.2.1 Hsp90 im Krankheitskontext .....	2
1.2.2 Struktur des molekularen Chaperons .....	4
1.2.3 Konformationsdynamik im ATPase-Zyklus .....	6
1.3 Photoinduzierter Elektronentransfer (PET) zur Untersuchung von Proteindynamik .....	10
1.4 Einzelmoleküluntersuchungen .....	13
1.4.1 Spektroskopie an einzelnen Proteinen im Vergleich zu großen Molekülzahlen .....	14
1.4.2 Herausforderungen der Einzelmolekülspektroskopie .....	16
1.4.3 Einzelmolekülstudien an Hsp90 .....	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit: Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie an Hsp90.....	22
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Transformation und Bakterienkulturen .....	24
2.2 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	25
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	26
2.4 Proteinsynthese und Aufreinigung .....	30
2.5 Proteinmodifikationen .....	35
2.6 Konventionelle Fluoreszenzspektroskopie.....	36
2.7 ATPase-Assay .....	37
2.8 Deckgläserpräparation und Flusskammeraufbau .....	38

2.9	Experimenteller Zweifarben-Einzelmolekül-Aufbau.....	40
2.10	Ein- und Zweifarben-Einzelmolekül-Datenaufnahme .....	41
2.11	Datenanalyse .....	45
2.11.1	Elastische Transformation beider Kanäle und Auslesen der Intensitäten .....	45
2.11.2	Python Code.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1	Hsp90-PET-Fluoreszenzreporter-Konstrukte für die Einzelmolekülspektroskopie .....	48
3.2	Sukzessive Farbstoffselektion für Zweifarben-Einzelmolekül-PET- Experimente .....	51
3.2.1	Löschung durch Tryptophan via PET.....	51
3.2.2	Photobleichen unter verschiedenen Bedingungen .....	52
3.2.3	Spektrale Eigenschaften.....	57
3.2.4	Analyse von Intensitätsfluktuationen.....	58
3.2.5	Atto542 und JF646 als geeignete PET-Fluoreszenzsonden.....	60
3.3	Funktionalitätskontrolle der Hsp90 Einzelmolekülkonstrukte mittels ATPase-Assay .....	61
3.4	Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie von Hsp90 mit Atto542 und JF646.....	63
3.4.1	Immobilisierung über Biotin/Neutravidin-Interaktion.....	63
3.4.2	Identifikation doppelt markierter Hsp90-Heterodimere .....	65
3.4.3	Einzelmolekülzeitspuren der PET-Reporterkombinationen .....	66
3.4.4	Einzelmolekülzeitspuren von Kontrollkonstrukten .....	70
3.4.5	Datensatzgröße.....	72
3.5	Datenanalyse mittels Python Routine <i>2CsmPET</i> .....	72
3.6	Kinetik am einzelnen Molekül.....	76
3.6.1	NM- und Lid-Dynamik.....	76
3.6.2	DS- und NM-Dynamik .....	79
3.6.3	DS- und Lid-Dynamik .....	81
3.6.4	Ähnliche Zeitkonstanten der Dynamiken .....	83

3.6.5	Einfluss der A2W Mutation auf die NM + Lid-Reporterkombination 84	
3.6.6	NM- und Lid-Dynamik ohne <i>coiled-coil</i> -Motiv .....	86
3.7	Synchronität dominiert lokale Konformationsänderungen in Hsp90.....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1	Atto542 und JF646 ermöglichen robuste bildgebende Zweifارben-Einzel-molekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie .....	90
4.2	Analyse der Synchronität lokaler Konformationsänderungen in Hsp90.	94
4.3	Aromatische Gruppen im DS-Reporter beschleunigen die Dynamiken .	96
4.4	Einblicke in den Mechanismus des ATPase-getriebenen Konformationszyklus von Hsp90.....	98
4.5	Etablierte Zweifarben-Einzel-molekül-PET-Spektroskopie als Komplement zu Einzel-molekül-FRET .....	101
<b>5</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>103</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>110</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>122</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>123</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>125</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>126</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteine – Bausteine der Zelle

Die Erbinformation, die DNA (Desoxyribonukleinsäure, DNS, engl. DNA), stellt den Bauplan der Zelle dar und wird bei der Zellteilung an alle Nachfolgerzellen weitergegeben. Aus der DNA als Informationsvorlage werden über Transkription und Translation aus Aminosäuren bestehende Polypeptidketten synthetisiert. Diese als Proteine bezeichneten Einheiten stellen zelluläre Bausteine dar und sind an unzähligen Funktionen und Mechanismen beteiligt. Dazu zählen z.B. die Aufrechterhaltung der Integrität der Erbinformation, strukturgebende Elemente, Transport-, Signaltransduktions- und biochemische Prozesse, aber auch die Proteinbiosynthese selbst. Damit sie so vielfältige Aufgaben erfüllen können, nimmt die große Mehrheit der Proteine eine dreidimensionale Struktur ein (Kim et al. 2013). Seit Auflösung der ersten Proteinkristallstruktur vor über 50 Jahren (Kendrew et al. 1958) wurden bis dato über 170000 Molekülstrukturen in der weltweiten Proteindatenbank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), PDB) hinterlegt (Fersht 2008). Kristallstrukturen halten ein atomares Modell mit Sekundär- und Tertiärstrukturen bereit, suggerieren dabei aber das Bild starrer Formen. In Lösung sind Proteine jedoch dynamisch und als flexible Strukturen zu verstehen, wodurch sie zwischen verschiedenen Konformationen wechseln können. Häufig ist die Funktion von Proteinen an dynamische Strukturelemente geknüpft, weshalb die Untersuchung dieser Dynamiken für das mechanistische Verständnis von großer Bedeutung ist (Mazal und Haran 2019).

Lange Zeit wurde spekuliert, dass die Proteinfaltung allein durch Kräfte getrieben wird, die zwischen den Aminosäureseitenketten wirken. Wird der zelluläre Kontext mit der Fülle an Proteinen und den damit verbundenen molekularen *Crowding*-Effekten berücksichtigt, ist dieser Mechanismus *in vivo* allerdings unvollständig. Somit hat sich das Verständnis hin zu einer zellulären Proteinfaltungsmaschinerie – widergespiegelt in molekularen Chaperonen – entwickelt, welche die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt, diese hat sich mit Proteinen ko-evolviert. Ein Beispiel für ein molekulares Chaperon ist das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), dessen elementare Funktion darin besteht, hydrophobe Segmente in nicht gefalteten Polypeptidketten in einem ATP-abhängigen Zyklus zu binden und wieder freizusetzen (Hartl 1996).

## 1.2 Hsp90 – ein dynamisches Schlüsselprotein der Proteostase

Während Hsp70 relativ unspezifisch an hydrophobe Proteinsegmente bindet, hat das molekulare Chaperon Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) ein spezifisches Spektrum an sogenannten Klientenproteinen/Substraten. Eine Besonderheit dieses Chaperons ist seine überwiegende Implikation in späte Stadien der Proteinfaltung. So unterstützt es Klienten, die bereits eine der nativen ähnliche Struktur zeigen, in ihre vollständig native bzw. aktive Konformation überzugehen oder kann diese stabilisieren. Dabei sind bereits eine Vielzahl an Proteinen als Klienten des Chaperons identifiziert worden. Einige davon sind den Klassen der Transkriptionsfaktoren und Kinasen zuzuordnen, welche in zelluläre Signaltransduktionswege involviert sind. So kommt auch Hsp90 selbst eine wichtige regulatorische Funktion zu. Allerdings ist bislang trotz der Vielzahl an verschiedenen Klienten (>500, <https://www.picard.ch>) bisher kein gemeinsames strukturelles Erkennungsmotiv bekannt. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass die große konformative Flexibilität des Chaperons eine zentrale Rolle für die breite Spezifität spielt (Wandinger et al. 2008; Krukenberg et al. 2011). In der Klasse der Kinasen gibt es Hinweise darauf, dass die intrinsische Stabilität eines potenziellen Klienten entscheidend für die Abhängigkeit von Hsp90 ist (Taipale et al. 2012; Wandinger et al. 2008). Die besondere Bedeutung, die Hsp90 in der Proteinhomöostase, auch Proteostase genannt (Kim et al. 2013), zukommt, wird dadurch deutlich, dass das Chaperon hochkonserviert sowohl in bakteriellen als auch in eukaryotischen Zellen vorkommt und in letzteren sogar essenziell ist (S. Lindquist and E. A. Craig 1988; Sima und Richter 2018).

### 1.2.1 Hsp90 im Krankheitskontext

Die Implikation vieler Klienten des Chaperons in Signalwege der Zelle führt dazu, dass Hsp90 mit verschiedenen Krankheiten assoziiert ist, was von der Tatsache untermauert wird, dass das Chaperon 1-2 % aller zytosolischen Proteine ausmacht (Krukenberg et al. 2011; Taipale et al. 2010). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von molekularen Chaperonen als zelluläre Antwort auf verschiedene Stressbedingungen erhöht ist, um die Proteinhomöostase aufrechterhalten zu können und damit das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Diese Eigenschaften sind auch für Tumorzellen relevant, da sie aufgrund ihres überdurchschnittlichen Wachstums oftmals Kombinationen aus verschiedenen Stressoren ausgesetzt sind. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass Tumorzellen Chaperone häufig in erhöhten Leveln exprimieren, die so als biochemische Puffersysteme funktionieren und der

Zelle Toleranz gegenüber genetischen Schäden vermitteln. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Proteinmutationen in Tumorzellen erst durch Chaperone tolerierbar werden, wodurch die Entartung noch verstärkt werden kann. Insbesondere Hsp90 kann hier dazu führen, dass mutierte Proteine aktiv bleiben oder erst aktiviert werden. Gleichzeitig hilft das Chaperon die entstandenen Ungleichgewichte in den Signalwegen zu tolerieren, sodass der normalerweise eintretende, programmierte Zelltod (Apoptose) verhindert wird. Ein Beispiel dafür ist das Tumorsuppressorprotein p53: Wildtypisches p53 wird von der Zelle in einem dynamischen Gleichgewicht exprimiert und wieder abgebaut, wobei es transiente Interaktionen mit Hsp90 eingeht. Die meisten tumorassoziierten Mutationen in p53 führen dazu, dass es seine tumorsupprimierende Funktion verliert, gleichzeitig geht das veränderte p53 deutlich stärkere Interaktionen mit Hsp90 ein, wodurch eine effektive Degradierung verhindert wird. Dadurch häuft sich nicht funktionales p53 an und führt zu verschiedenen negativen Effekten (Whitesell und Lindquist 2005). Hsp90 ist zudem für weitere Funktionen von Tumorzellen wie Metastasierung und Invasion von Bedeutung (Wu et al. 2017). Seine Beteiligung bei der Entstehung unterschiedlicher Krebsarten macht Hsp90 zu einem Ziel intensiver medizinischer Untersuchung, die dabei hauptsächlich an der Inhibition der ATPase-Funktion orientiert ist (Whitesell und Lindquist 2005; Wu et al. 2017). Ein potenter Inhibitor ist z.B. Geldanamycin. Durch die zentrale regulatorische Funktion des Chaperons sind solche therapeutischen Ansätze grundsätzlich vielversprechend, allerdings zeigt die Tatsache, dass bisher kein einziges Hsp90-adressierendes Tumormedikament für die Behandlung am Menschen zugelassen ist, dass das komplexe Chaperon-System und seine Verflechtungen in zelluläre Prozesse eingehender verstanden werden muss (Park et al. 2020; Wang et al. 2021). Dazu gehört auch ein besseres mechanistisches Verständnis von Hsp90 und seiner Interaktion mit Inhibitoren (Wu et al. 2017). Darüber hinaus ist das Chaperon außerdem in Gefäßkrankheiten und virale Erkrankungen involviert, aber auch die neurodegenerative Alzheimersche Krankheit steht in Zusammenhang mit Hsp90 (Krukenberg et al. 2011). Dabei führt die anormale Prozessierung zweier Proteine – Amyloid-Peptide (A $\beta$ ) und Tau, welche beide in Zusammenhang mit Hsp90 stehen – zur pathologischen Bildung von Plaques (A $\beta$ , extrazellulär) und Fibrillen (Tau, intrazellulär). Die Aggregation von Amyloid-Peptiden kann durch Hsp90 alleine inhibiert werden, im Komplex mit Hsp70 und dem Hitzeschockprotein 40 (Hsp40) kann es die Bildung von A $\beta$  verhindern. Eine pharmazeutische Inhibition von Hsp90 wiederum führt zu einem signifikanten Abbau von

hyperphosphoryliertem Tau-Protein in der Zelle, welches über Fehlfaltung und Aggregation zur Ausbildung der Fibrillen führt (Campanella et al. 2018).

### 1.2.2 Struktur des molekularen Chaperons

Das molekulare Chaperon Hsp90 weist eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 60 nM (Hefe Hsp90, Richter et al. 2001) auf und liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer vor (Abbildung 1-1). Jedes Monomer, auch Protomer genannt, besteht aus drei Domänen, der Amino-terminalen Domäne (N-terminale Domäne, NTD), der mittleren Domäne (MD) und der Carboxy-terminalen Domäne (C-terminale Domäne, CTD)(Pearl und Prodromou 2006). Das Homodimer ist dabei hoch flexibel und über die CTDs konstitutiv dimerisiert. Zusätzlich können die N-terminalen Domänen transient dimerisieren (geschlossener Zustand, vgl. Abschnitt 1.2.3). Diese Eigenschaften sind allen bekannten Hsp90-Proteinen gemein (Krukenberg et al. 2011). Neben dem Hsp82 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es eine weitere Hefen-Isoform, das Hsc82, sowie das bakterielle Homolog HtpG und die vier humanen Isoformen Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , Trap1 und Grp94 (Krukenberg et al. 2011; Girstmair et al. 2019). Hsp82 ist die bisher am intensivsten untersuchte Isoform eukaryotischen Ursprungs, weshalb sich im Weiteren, soweit nicht anders angegeben, auf dieses bezogen wird.

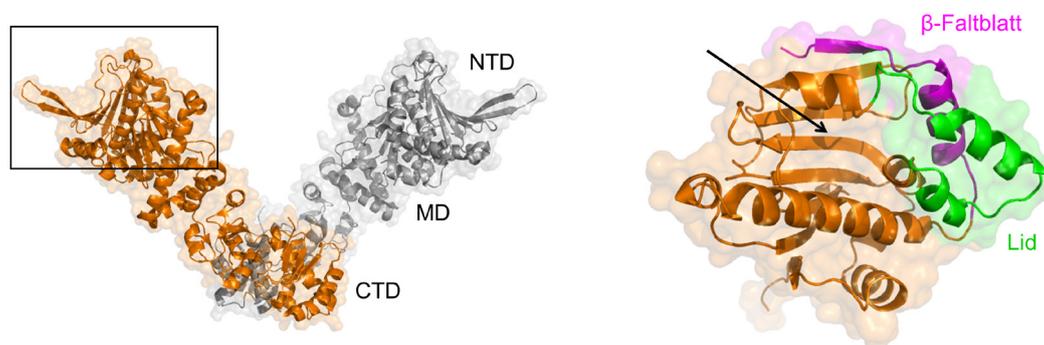
**CTD.** Die Dimerisierung der CTDs erfolgt über ein Bündel aus vier  $\alpha$ -Helices, je zwei pro Monomer, die dicht gegeneinander packen (Pearl und Prodromou 2006). Neben der Funktion als primäre Dimerisierungsstelle ist die Carboxy-terminale Domäne außerdem an der Interaktion mit Co-Chaperonen beteiligt, welche oftmals regulatorische Funktionen haben. Dafür besitzt Hsp90 aus der Hefe und das zytosolische Hsp90 höherer Eukaryoten am extremen C-Terminus ein MEEVD Motiv. Einige Co-Chaperone verfügen über ein spezielles Strukturmotiv (engl.: tetratricopeptide repeat, TPR) über das sie mit dem MEEVD Motiv interagieren (Krukenberg et al. 2011).

**MD.** Die mittlere Domäne stellt die größte der drei Domänen dar. Während das größere Segment der MD strukturelle Ähnlichkeiten zu Proteinen aufweist, die DNA- beeinflussende Eigenschaften haben, ist das kleinere Segment in Hsp90 einzigartig (Pearl und Prodromou 2006). Im Wesentlichen hat die mittlere Domäne zwei Funktionen, zum einen ist sie in die Bindung von Klientenproteinen involviert, zum anderen besitzt sie katalytische Eigenschaften. Als hauptsächliche Interaktionsstelle mit Klienten ist die MD durch ein hydrophobes Tryptophan an

Stelle 300 (Hsp90 Nomenklatur der Hefe) sowie eine amphiphatische Ausstülpung (AS 327-340, Nomenklatur der Hefe) mit einem exponierten hydrophoben und einem positiv geladenen Teil gekennzeichnet, welche für die Interaktion von besonderer Bedeutung sind. Für die Klientenproteine Cdk4, Tau und GR-LBD wurden die mittlere Domäne und teilweise auch die NTD als primäre Interaktionsstelle bereits direkt identifiziert (Radli und Rüdiger 2018). Die katalytische Funktion der Domäne wird durch ein hochkonserviertes Arginin an Stelle 380 (Arg380, Nomenklatur der Hefe), das in einem katalytischen Loop lokalisiert ist, vermittelt. Dieses interagiert während des ATPase-Zyklus (vgl. Abschnitt 1.2.3) mit dem  $\gamma$ -Phosphat des in der NTD gebundenen Adenosintriphosphats (ATP) und führt mutmaßlich zu einer Polarisierung der  $\beta$ - $\gamma$  Phosphodiesterbindung. Das Arg380 ist essenziell für die ATPase Aktivität *in vitro* und für substantielle Funktionen von Hsp90 in der Hefe *in vivo* (Krukenberg et al. 2011; Pearl und Prodromou 2006). Die MD ist darüber hinaus ebenfalls in die Interaktion mit Co-Chaperonen wie Aha1 involviert (Krukenberg et al. 2011).

**NTD.** Die Amino-terminale Domäne des Chaperons wurde als die nukleotidbindende Domäne identifiziert (Prodromou et al. 1997). Dabei wurde Hsp90 erst spät als ATPase eingestuft, da die inhärente Aktivität vergleichsweise gering ist und lange Zeit nicht nachgewiesen werden konnte (Wandinger et al. 2008). Erst mit der Entdeckung von Geldanamycin als potentem kompetitivem Inhibitor der ATP-Bindung an Hsp90 (vgl. Abschnitt 1.2.1) konnte die ATPase-Aktivität akkurat bestimmt werden. Es wurde klar, dass die Funktion von Hsp90 eindeutig davon abhängt, ATP binden und dessen Hydrolyse katalysieren zu können, womit Hsp90 in die Superfamilie der GHKL ATPasen eingeordnet wird (Obermann et al. 1998; Pearl und Prodromou 2006). Die ATP-Bindetasche zeigt dabei die Besonderheit, ATP in einer ungewöhnlichen, geknickten Position zu beherbergen und ist darüber hinaus hochkonserviert (Wandinger et al. 2008). Eine als Deckel (engl.: Lid) bezeichnete Struktur in der NTD (AS 94-121, Hefe Nomenklatur, Prodromou 2012) ist nahe der Bindetasche lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle im ATPase-Zyklus, indem sie das Nukleotid in der Tasche fixiert (vgl. Abschnitt 1.2.3). Ein weiteres Merkmal der Domäne ist ein  $\beta$ -Faltblatt am extremen N-Terminus (AS 1-24, Hefe Nomenklatur, Krukenberg et al. 2011), das ebenfalls während des ATPase-Zyklus von großer Wichtigkeit ist, indem es die N-terminal dimerisierte Form von Hsp90 stabilisiert (vgl. Abschnitt 1.2.3) (Krukenberg et al. 2011). Die NTD und die MD sind über einen extrem flexiblen geladenen Linker (engl.: charged linker, CL) verbunden, der zur generellen Flexibilität des Chaperons beiträgt (Saibil 2013). Seine Funktion wurde erst

kürzlich weiter aufgeklärt, seine Länge variiert stark zwischen 10 (*E.coli*) und annähernd 100 Aminosäuren (Eukaryoten) und scheint von größerer Bedeutung zu sein als die genaue Struktur. Obwohl der Linker *in vivo* oftmals nicht essenziell ist, hat er Bedeutung für die ATPase-Rate und die Interaktion mit bestimmten Klientenproteinen (Daturpalli et al. 2017). In jüngsten Studien konnte das in Zusammenhang mit transienten Interaktionen des Linkers mit der NTD gebracht werden, wodurch Interaktionsflächen der Amino-terminalen Domäne zeitweise exponiert werden (López et al. 2020). Neben der CTD ist auch die NTD eine wichtige Interaktionsoberfläche für regulierende Co-Chaperone wie Aha1 oder Cdc37, was unter anderem mit der Beherrschung der ATPase verknüpft ist (Krukenberg et al. 2011).



**Abbildung 1-1: Struktureller Aufbau von Hsp90.** *Links:* Gezeigt ist ein Hsp90 Homodimer, jedes Monomer besteht aus der N-terminalen Domäne (NTD), der mittleren Domäne (MD) und der C-terminalen Domäne (CTD)(PDB Code: 2ioq). Die CTDs vermitteln die konstitutive Dimerisierung. *Rechts:* Vergrößerung der NTD eines Monomers ohne gebundenes Nukleotid. Die Bindetasche ist durch einen Pfeil angezeigt. Die Strukturelemente Lid und  $\beta$ -Faltblatt sind in grün bzw. magenta hervorgehoben (PDB Code: 1am1).

### 1.2.3 Konformationsdynamik im ATPase-Zyklus

Erste Hinweise auf Konformationsänderungen in Reaktion auf die Bindung von ATP gab es bereits vor dem Beweis der ATPase-Aktivität von Hsp90 und auch ein Übergang von einer global offenen in eine geschlossene Konformation als Reaktion auf die Bindung von ATP wurde bereits früh vermutet (Csermely et al. 1993). Intensive Untersuchungen der Konformationsänderungen führen seitdem zu einem immer besseren Verständnis der Funktionsweise des Chaperons. Zusammen mit Ergebnissen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein erster ATP-abhängiger Konformationszyklus rekonstruiert, der seither stetig vollständiger wird (Shiau et al. 2006; Richter und Buchner 2006). Ein wichtiger Meilenstein hierbei

wurde durch die Kristallstruktur des Nukleotid-gebundenen Hsp90 im Komplex mit dem Co-Chaperon p23 erreicht, die Hsp90 in seiner geschlossenen Konformation zeigt (Ali et al. 2006). Die Kristallstruktur offenbart mehrere Umstrukturierungen in verschiedenen Bereichen des Chaperons verglichen mit seiner offenen Konformation (Ali et al. 2006; Pearl und Prodromou 2006). Es wird vermutet, dass die in Hsp90 ablaufenden Konformationsänderungen wiederum Umstrukturierungen in den Klientenproteinen induzieren (Krukenberg et al. 2011).

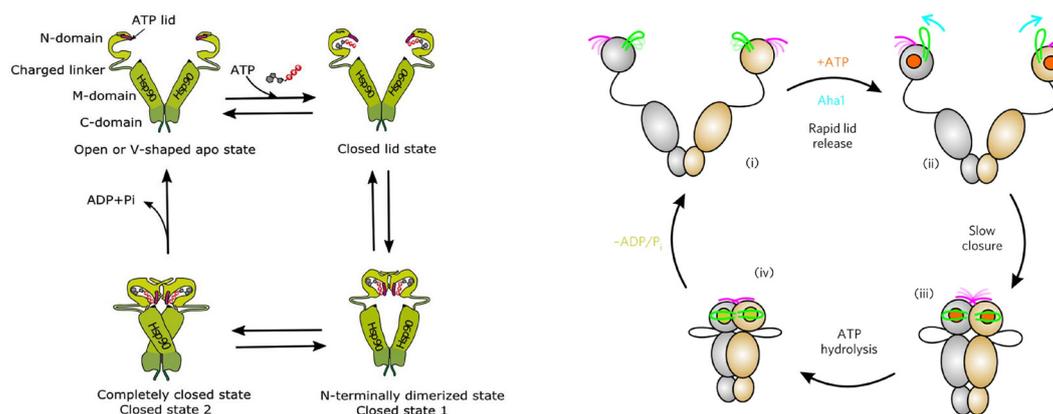
**ATPase-Zyklus.** Zunächst liegt Hsp90 im *apo*-Zustand, also ohne gebundenes Nukleotid, vor. Diese Konformation ist von Heterogenität geprägt (Krukenberg et al. 2011). Das Chaperon kann über die NTD Nukleotid binden, was verschiedene Strukturänderungen zur Folge hat, die schließlich in dem 2006 von Ali et al. entdeckten geschlossenen Zustand resultieren. Übergeordnet gesehen schließt sich Hsp90 wie eine molekulare Klammer, wobei das ATP in seiner Bindetasche fixiert wird. Gleichzeitig laufen auf lokaler Ebene mehrere Umstrukturierungen ab, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird. Nach Ablauf der komplexen Konformationsänderungen befindet sich Hsp90 schließlich in einem ATP-hydrolysekompetenten Zustand (geschlossener Zustand), der nach Hydrolyse nochmal an Kompaktheit gewinnt. Abschließend öffnet sich die Klammer unter Freigabe von Adenosindiphosphat (ADP) wieder und befindet sich erneut im *apo*-Zustand, ein Mechanismus, der für Hsp90 ubiquitär zu sein scheint (Wandinger et al. 2008; Krukenberg et al. 2011). Es wurde beobachtet, dass das Equilibrium der Hsp90-Konformationen in verschiedenen Homologen unterschiedlich stark durch Nukleotid beeinflusst ist. Dennoch induziert die Bindung von Nukleotid eine deutliche Verschiebung des Equilibriums hin zum geschlossenen Zustand von Hsp90 und zeigt damit eine ATP-abhängige Direktionalität des Systems (Southworth und Agard 2008; Shiau et al. 2006).

**Lokale Dynamiken.** Die komplexen Konformationsänderungen können im Wesentlichen in drei lokale Dynamiken unterteilt werden: (1) Umstrukturierung der als Deckel (engl.: Lid) bezeichneten Struktur in der NTD, (2) dramatische Umorientierung von NTD und MD sowie (3) Domänenwechsel des N-terminalen  $\beta$ -Faltblatts. Die Lid-Struktur klappt dabei aus einer Position, in der sie ausgeprägte Interaktionen mit den NTDs des Dimers eingeht, heraus über das in der Bindetasche lokalisierte Nukleotid und verhindert sterisch dessen Freigabe. Untersuchungen haben ergeben, dass die Lid-Struktur in engem Zusammenhang zur ATPase-Rate steht (Hessling et al. 2009; Krukenberg et al. 2011). Die Umorientierung der NTD und MD zueinander ist von wesentlicher Bedeutung. Während die beiden Domänen im *apo*-Zustand flexibel zueinander sind, kommen sie durch die Umstrukturierung

in engen Kontakt. Dabei findet eine Umlagerung des katalytischen Loops statt (vgl. Abschnitt 1.2.2), sodass das Arg380 in Richtung der NTD positioniert wird und dort die in Abschnitt 1.2.2 beschriebene Interaktion mit dem  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen Nukleotids eingeht (Krukenberg et al. 2011). Neuere Erkenntnisse beschreiben einen detaillierten Mechanismus des katalytischen Netzwerks der ATP-Hydrolyse, in dem die Glutaminsäure an Stelle 33 (Glu33, Hefe Nomenklatur) von entscheidender Bedeutung ist. Dabei koordiniert ein Wassermolekül der Lösung spontan zwischen das  $\gamma$ -Phosphat des Nukleotids und Glu33 und überträgt dabei ein Proton. Gleichzeitig reduziert ein  $Mg^{2+}$ -Ion als Kofaktor die Energiebarriere, indem es die Elektronendichte des  $\gamma$ -Phosphats reduziert. Das transient entstandene  $OH^-$  attackiert umgehend das  $\gamma$ -Phosphat und führt zum Aufbrechen der  $\beta/\gamma$ -Phosphatbindung, Arg380 stabilisiert dabei sowohl das attackierende  $OH^-$  als auch die resultierende Phosphatgruppe ( $HPO_4^{2-}$ ) (Mader et al. 2020). Der Domänenwechsel (engl.: domain-swap, DS) des N-terminalen  $\beta$ -Faltblatts führt schließlich zu einer Stabilisierung des N-terminal dimersierten Zustands und damit zu der hydrolysekompetenten Konformation des Chaperons (Krukenberg et al. 2011).

**Zyklus-Modelle.** Schon früh wurde die langsame ATPase in Zusammenhang mit komplexen konformationellen Umstrukturierungen gebracht und diese in ihrer Gesamtheit als ratenlimitierender Schritt identifiziert (Wandinger et al. 2008; Prodromou 2012). Trotz der geringen ATPase-Rate von ungefähr  $0,2 \text{ ATP min}^{-1}$  (Wandinger et al. 2008; Schulze et al. 2016; Daturpalli et al. 2017) ist der Schritt der chemischen Umsetzung optimiert und Hsp90 damit ein effizientes Enzym (Lee et al. 2019). Nach der Identifikation der Strukturänderungen in Hsp90 wurden bald Modelle über den genauen zeitlichen Ablauf des ATP gekoppelten Konformationszyklus aufgestellt, die seither überprüft und verfeinert werden. Dabei kristallisierten sich zwei grundlegende Modelle heraus, wobei einem auf Intermediaten basierenden Zyklus ein Modell der Kooperativität und Gleichzeitigkeit der Dynamiken gegenübersteht (Hessling et al. 2009; Schulze et al. 2016)(Abbildung 1-2). Beide Modelle können die beobachteten mehrfach exponentiell verlaufenden Dynamiken erklären (Schulze et al. 2016), das auf Intermediaten basierende Modell sieht dabei folgende Reihenfolge der Abläufe vor: Zunächst bindet ATP an *apo*-Hsp90, woraufhin sich der Lid über das Nukleotid legt und das erste Intermediat bildet. Die NTDs sind in diesem Zustand nicht dimerisiert. Anschließend bildet sich das zweite Intermediat, indem die NTDs dimerisieren und der Domänenwechsel der N-terminalen  $\beta$ -Faltblätter erfolgt. Darauf folgt die Umorientierung von MD und NTD zueinander und der

geschlossene ATP-hydrolysekompetente Zustand wird ausgebildet. Abschließend wird ATP hydrolysiert, ADP und anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) werden freigesetzt und Hsp90 geht erneut in die *apo*-Konformation über. Dem Modell liegt die Beobachtung zugrunde, dass Hsp90 beim Klammerschluss ein mehrphasiges Verhalten zeigt. Dieses Verhalten wird als Auftreten von Intermediaten entlang der Reaktionskoordinate interpretiert (Hessling et al. 2009) und wurde seither mehrfach und teils unter Zuhilfenahme komplexer Modellierungen unterstützt (Zierer et al. 2016; Balchin et al. 2016; Schmid et al. 2016). Die Kinetikanalyse des Reaktionszyklus ist dabei in Übereinstimmung mit der gemessenen ATPase-Rate (Hessling et al. 2009), dieses Modell wird in seiner grundsätzlichen Form auch aktuell vertreten (Dahiya und Buchner 2019). Ein Konformationszyklus, der auf Kooperativität der einzelnen lokalen Umstrukturierungen und deren gleichzeitigem Ablauf basiert, wurde 2016 von Schulze et al. geschildert und unterstützt die Beobachtung der Kopplung von ATP-Bindung und lokalen Umstrukturierungen (Krukenberg et al. 2011). Dabei liegt Hsp90 in vielen verschiedenen *apo*-Konformationen mit unterschiedlichen Energiebarrieren vor. Das Lid-Segment und das N-terminale  $\beta$ -Faltblatt stellen hoch mobile Strukturen dar. In direkter Reaktion auf die Bindung von ATP modelliert sich das Lid-Segment sehr schnell in einen Intermediatzustand um, in dem es weniger flexibel ist, aber noch nicht über dem gebundenen Nukleotid liegt. Im Anschluss laufen der Lid-Schluss, der Domänenwechsel des  $\beta$ -Faltblatts und die Umorientierung der MD und NTD zueinander langsam und dabei ineinandergreifend ab und führen damit zum geschlossenen ATP-hydrolysekompetenten Zustand von Hsp90. Von diesem ausgehend wird ATP schnell hydrolysiert und durch Öffnen der Klammer unter Freigabe von ADP und  $P_i$  wird wieder der *apo*-Zustand eingenommen. Auch in diesem Modell stimmt die kinetische Analyse der drei lokalen Dynamiken während des Klammerschlusses mit der gemessenen ATPase-Rate überein (Schulze et al. 2016). Während das mehrphasige Verhalten des Klammerschlusses in ersterem Modell als Intermediate interpretiert wird, nimmt das kooperative Modell eine Heterogenität des *apo*-Zustands und damit verbundenen unterschiedlichen Energiebarrieren des Grundzustands an. Die Heterogenität des Grundzustands als Ursprung der multiexponentiellen Dynamiken wird dabei durch mehrere gefundene *apo*-Strukturen und die Flexibilität des offenen Zustands von Hsp90 unterstützt (Shiau et al. 2006; Bron et al. 2008; Krukenberg et al. 2008; Krukenberg et al. 2011).

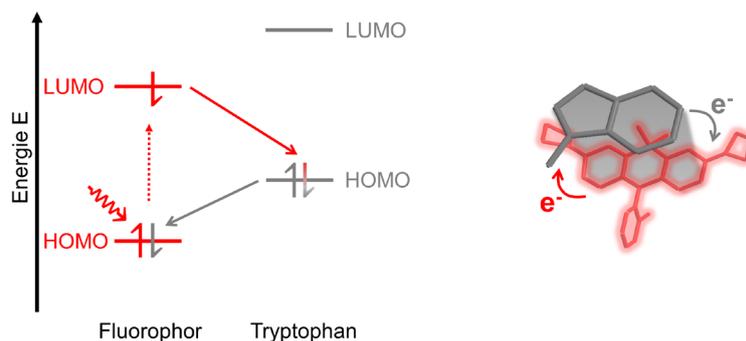


**Abbildung 1-2: Modelle des ATP-abhängigen Konformationszyklus von Hsp90.** Gezeigt sind zwei Modelle, die den ATP-abhängigen Konformationszyklus von Hsp90 beschreiben. *Links:* Das Intermediatmodell beruht auf Intermediaten des Chaperons auf dem Weg zum hydrolysekompetenten Zustand. Nach ATP-Bindung in der NTD schließt sich zunächst die Lid-Struktur (Closed lid state), bevor die NTDs dimerisieren und der Domänenwechsel stattfindet (Closed state 1). Nach anschließender Assoziation von MD und NTD befindet sich Hsp90 in der hydrolysekompetenten Konformation (Closed state 2). Nach Hydrolyse geht das Chaperon wieder in den apo-Zustand (apo state) über (übernommen aus Dahiya und Buchner 2019, Rechte zur Verwendung wurden eingeholt). *Rechts:* Das Kooperativitätsmodell beruht auf kooperativen Effekten und Gleichzeitigkeit der lokalen Konformationsänderungen. Nach ATP-Bindung findet eine schnelle Umstrukturierung des Lid-Segments statt (ii), gefolgt von einem langsamen globalen Klammerschluss, der zur ATP-hydrolysekompetenten Konformation (iii) führt und während welchem der Lid-Schluss, der Domänenwechsel sowie die Assoziation von MD und NTD kooperativ und von Gleichzeitigkeit geprägt ablaufen. Nach der Hydrolyse wird die Klammer nochmals kompakter, bevor sie wieder in die apo-Konformation übergeht (i) (übernommen aus Schulze et al. 2016, Rechte zur Verwendung wurden eingeholt).

### 1.3 Photoinduzierter Elektronentransfer (PET) zur Untersuchung von Proteindynamik

Mit der Beobachtung, dass die Aminosäure Tryptophan (Trp) über ihre Indol-Seitenkette als effizienter Elektronendonator in photoinduzierten Elektronentransfer (PET)-Reaktionen mit Farbstoffen fungieren kann, wurde in den 1990er Jahren der Grundstein für eine neue Spektroskopie-Methode gelegt. Zu diesem Zeitpunkt war bereits mehrfach und konsistent von einem Elektronentransfer zwischen Tryptophan und einem Elektronenakzeptor berichtet worden, was durch die leicht oxidierbare Indol-Gruppe des Tryptophans ermöglicht wird (Jones et al. 1995; Vaiana et al. 2003). Darauf basierend wurde von Neuweiler et al. 2002 im Kontext der Entwicklung einer alternativen Methode zur

Krebsfrüherkennung eine neue Spektroskopie-Technik entwickelt. Hierbei wurde das Ausnutzen der reversiblen und gleichzeitig effizienten Löschung der Fluoreszenz des Oxazin-Farbstoffs MR121 mit einem konfokalen Detektionsvolumen kombiniert, um einzelne Fluoreszenzmoleküle in  $10^{-9}$  bis  $10^{-12}$  molaren Lösungen zu detektieren (Neuweiler et al. 2002). Als Fluoreszenzlöschung wird die nicht radiative Relaxation eines elektronisch angeregten Zustands bezeichnet (Lakowicz 2006). Nach der Untersuchung intermolekularer Interaktionen folgte die Weiterentwicklung hin zur Untersuchung intramolekularer Dynamiken, wofür die Technik aufgrund der räumlichen sub-Nanometer-Detektion sehr gut geeignet ist (Neuweiler et al. 2002; Neuweiler et al. 2003; Vaiana et al. 2003). Die kontaktinduzierte Fluoreszenzlöschung von MR121 durch Tryptophan über PET wurde verwendet, um die Kontaktformationsdynamiken eines Peptids zu untersuchen und gleichzeitig die Löschung selbst zu charakterisieren. Dabei wurde die Ausbildung eines Grundzustandskomplexes aus Tryptophan und Farbstoff in einer gestapelten Geometrie mit Van-der-Waals-Kontakt der Moleküle als Grundvoraussetzung für PET definiert, treibende Kräfte sind hydrophobe und  $\pi$ -Stapelungs-Interaktionen (Neuweiler et al. 2003; Vaiana et al. 2003; Doose et al. 2009). In diesem für mehrere zehn Nanosekunden stabilen Komplex kann abhängig von Redoxpotentialen zwischen dem ersten Singulettzustand des Farbstoffs und dem Tryptophan ein photoinduzierter Elektronentransfer stattfinden, wobei der Farbstoff als Akzeptor und das Tryptophan als Donor oder umgekehrt fungieren. Anschließend geht der Komplex über Ladungsrekombination wieder in den Grundzustand über (Abbildung 1-3). Die Fluoreszenzlöschung erfolgt maßgeblich über statische Löschung. Die PET-Reaktion selbst findet im Bereich von Femto- bis Pikosekunden statt (Doose et al. 2005, 2009). Durch die starke Löscheffizienz geben die Fluoreszenzfluktuationen direkt die Assoziations- und Dissoziationsraten des gemessenen Peptids wieder, welche wiederum durch ein Zwei-Zustands-System einfach analysiert werden können (Neuweiler et al. 2002; Neuweiler et al. 2003; Doose et al. 2005). Die generelle Anwendbarkeit von PET zwischen organischen Farbstoffen und Tryptophan auf Nanometer-Skala und im Bereich von Nanosekunden bis Sekunden machen die Technik zu einem vielfältig einsetzbaren Werkzeug für die Untersuchung von Konformationsdynamiken in Biopolymeren. Gleichzeitig komplettiert PET als Detektionswerkzeug mit einer Sensitivität von  $< 1$  nm die mittels Förster-Resonanzenergietransfer erreichbare räumliche Auflösung von 1-10 nm und stellt damit ein Äquivalent zur Untersuchung lokaler Dynamiken im Vergleich zur Untersuchung globaler Dynamiken dar (Neuweiler und Sauer 2004; Doose et al. 2005).



**Abbildung 1-3: Vereinfachte Darstellung des photoinduzierten Elektronentransfers (PET) zwischen Tryptophan und einem organischen Fluoreszenzfarbstoff.** Gezeigt ist der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor, rot) als Elektronenakzeptor und Tryptophan als Elektronendonator (grau). *Links:* Ein Energieschema der Elektronenorbitale von Farbstoff und Tryptophan und ihren HOMOs (engl.: highest occupied molecular orbital) und LUMOs (engl.: lowest occupied molecular orbital) veranschaulicht die PET-Reaktion. Während des elektronisch angeregten Zustands des Farbstoffs (unterbrochener Pfeil), erreicht durch anregende Photonen (Wellenpfeil), überträgt das Tryptophan ein Elektron aus seinem energetisch höher liegenden Grundzustand auf den Farbstoff (grauer Pfeil). Im Anschluss findet Ladungsrekombination statt (roter Pfeil), wodurch der Komplex nicht radiativ wieder in seinen Grundzustand übergeht. *Rechts:* Geometrie des Farbstoff-Tryptophan-Komplexes. In Van-der-Waals-Kontakt zirkulieren Elektronen über den links gezeigten Mechanismus zwischen Farbstoff und Tryptophan, wodurch die Fluoreszenz effektiv gelöscht wird.

Nach Etablierung der Technik wurde sie anfänglich in Untersuchungen zur Proteinfaltung angewandt. In Kombination mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS, PET-FCS) wurden zunächst frühe Faltungsdynamiken kleiner Proteindomänen untersucht. Dabei waren mechanistische Einblicke in frühe Faltungswege möglich (Neuweiler et al. 2009; Doose et al. 2009). Dieselbe Technik wurde verwendet, um an einem vollständigen Protein kinetische Informationen seines strukturellen Faltungspfades aufzuklären (Neuweiler et al. 2010). PET-FCS wurde seither zur Untersuchung verschiedener Zielstrukturen verwendet, darunter der Influenza-A M2-Protonenkanal und der Mechanismus dessen medikamentöser Inhibition sowie die Selbstassoziation der N-terminalen Domänen von Spinnenseidenproteinen (Ries et al. 2014; Heiby et al. 2019; Rogers et al. 2011). Auch an dem 90 kDa großen Chaperon Hsp90 fand die Technik bereits Anwendung, um die drei lokalen Dynamiken der molekularen Klammer genauer zu analysieren. Durch die hohe Zeitauflösung mittels PET-FCS wurden Zeitkonstanten von wenigen Mikrosekunden bis mehreren hundert Mikrosekunden für die Gleichgewichtsdynamiken der hochflexiblen Lid- und  $\beta$ -

Faltblatt Regionen des Chaperons beobachtet. Unter Verwendung weiterer mit PET kombinierter spektroskopischer Methoden, die auf der Untersuchung einer großen Anzahl synchronisierter Moleküle beruhen, konnte eine extrem schnelle Umorientierung der Lid-Region in direkter Reaktion auf die Bindung von Nukleotid sowie die über Minuten andauernden lokalen Konformationsänderungen aufgezeichnet werden. Zusammen führten die Ergebnisse zu einem neuen Modell des Klammerschlusses von Hsp90 (Schulze et al. 2016) (vgl. Abschnitt 1.2.3). Das PET-fluoreszenzvermittelte Reportersystem des Lid-Schlusses bzw. der NM-Assoziation wurde außerdem verwendet, um Effekte von Co-Chaperonen des Aha-Typus (Homologe von ATPase-Raten beschleunigenden Co-Chaperonen) auf Hsp90 bzw. dessen Öffnungsdynamiken während des Chaperonzyklus zu untersuchen (Mercier et al. 2019; Reidy und Masison 2020).

### 1.4 Einzelmoleküluntersuchungen

Den Zusammenhang zwischen dynamischer Struktur und Funktion von Biomolekülen zu erforschen ist ein großes Ziel in der Biologie. Um die dazu nötige Wechselbeziehung von Konformationszuständen und deren Übergänge sowie biochemische Funktionen aufzuschlüsseln, ist es notwendig, Struktur und Dynamik eines biologischen Systems genau zu kennen (Lerner et al. 2021). Einzelmoleküluntersuchungen können hierzu einen entscheidenden Beitrag leisten. Das Feld der Untersuchung einzelner Moleküle entwickelte sich in den letzten drei Jahrzehnten rasant, was einerseits die Entwicklung immer neuer Techniken, wie Einzelmolekül-Verfolgung (engl.: single-molecule tracking) oder Kryoelektronenmikroskopie (Cryo-EM), und andererseits die Anwendung vorhandener Methoden zur Aufklärung von (biologischen) Fragestellungen beinhaltet. Die Bereiche, in denen Einzelmolekülmethoden Anwendung finden, reichen von Proteinfaltung und Strukturuntersuchungen von DNA und RNA (Ribonukleinsäure) über Untersuchungen von biologischen Anordnungen sowie Enzymologie bis hin zu molekularen Motoren und Lebendzelluntersuchungen. Die Untersuchung von DNA- und RNA-Molekülen hat aufgrund der leichten Handhabung eine vergleichsweise lange Geschichte in der Einzelmolekülforschung. Hierbei werden häufig optische Pinzetten genutzt, um unterschiedlich starke mechanische Kräfte auszuüben und so die physikalischen Eigenschaften der Moleküle zu untersuchen. Diese Art der Untersuchung wird den Manipulationsmethoden zugeordnet. Aber auch fluoreszenzbasierte Techniken wie der Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (engl.: single-molecule Förster

resonance energy transfer, smFRET) werden verwendet, um z.B. Rekombinationsmechanismen der Erbinformation zu beleuchten. Daneben wird u.a. die Enzymklasse der Ribozyme intensiv mittels Einzelmolekültechniken untersucht, genauer steht dabei der Zusammenhang zwischen Konformationsänderungen und chemischer Umsatzrate der Enzyme im Mittelpunkt. Ein weiteres Beispiel sind Lebendzelluntersuchungen zur Zellmembran und ihren physikalischen Eigenschaften, wobei Einzelmolekül-Bildgebung und -Tracking signifikant zur Aufklärung des inhomogenen Aufbaus und dessen Auswirkung auf biologische Funktionen beigetragen haben. Neben den überblicksartig angeführten Beispielen gibt es weitere nicht explizit erwähnte Methoden sowie deren Anwendung (Deniz et al. 2008; Cheng 2015). In den folgenden Kapiteln soll nun vorrangig fluoreszenzbasierte Spektroskopie im Mittelpunkt stehen.

### 1.4.1 Spektroskopie an einzelnen Proteinen im Vergleich zu großen Molekülzahlen

Was ist nun aber der Unterschied bei der Spektroskopie einzelner Moleküle, z.B. Proteine, im Vergleich zur Beobachtung großer Molekülzahlen? Zunächst werden bei der konventionellen Spektroskopie viele Millionen Moleküle gemessen und dabei das Signal gemäß statistischer Thermodynamik summiert oder gemittelt. Dabei ist es oftmals notwendig, das im Fokus stehende System zu synchronisieren, andernfalls heben sich gegenläufige Vorgänge in der Datenmittelung auf und sind nicht zu identifizieren (Mashaghi et al. 2014). Zur Synchronisation von Proteinsystemen werden häufig Effektormoleküle in Form von Interaktionspartnern, Liganden oder Nukleotid zugegeben, die den Start eines Reaktionspfades bedeuten. Dadurch wird das Equilibrium gestört und stattdessen werden die Proteinmoleküle forciert, eine bestimmte Reaktion einzugehen (Schuler und Hofmann 2013). Das summierte oder gemittelte Signal stellt ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis bereit, da das Rauschen invers mit der Quadratwurzel der untersuchten Anzahl an Molekülen variiert. Jedoch geht damit auch ein Informationsverlust einher, da das Rauschen wertvolle Information enthalten kann, z.B., wenn gegenläufige Signale als netto Null gewertet werden. Biologische Systeme sind üblicherweise ergodisch. Das bedeutet, Beobachtungen, die gleichzeitig an einer Vielzahl an Molekülen gemacht werden, decken sich prinzipiell mit denen eines einzelnen Moleküls, wenn es nur über einen ausreichend langen Zeitraum beobachtet wird. Dadurch werden Untersuchungen von einzelnen

Proteinmolekülen zu einem mächtigen Werkzeug, da über die Informationen von konventionellen Messmethoden hinaus weitere Information erlangt werden kann. Zunächst ist keine Synchronisation des Systems mehr vonnöten, da stattdessen einzelne Proteine direkt beobachtet werden, wodurch kinetische Informationen eines Systems im Equilibrium untersucht werden können. In diesem Zusammenhang ist es zudem möglich nur kurzzeitig oder selten eingenommene Zustände aufzuzeichnen. Das können z.B. Subpopulationen oder Intermediate sein, die in konventionellen Spektroskopie-Techniken verloren gehen, solange sie unterhalb eines gewissen Schwellenwertes liegen. Außerdem ist durch die direkte Beobachtung die Aufnahme von Heterogenität eines Systems möglich, z.B. unterschiedliche Konformationen eines Proteins in einem übergeordneten Zustand, zwischen denen das Protein fluktuiert (Mashaghi et al. 2014; Deniz et al. 2008; Neuweiler und Sauer 2004; Mazal und Haran 2019).

**Fluoreszenzbasierte Untersuchung.** Bei der fluoreszenzbasierten Erforschung kinetischer Informationen einzelner Proteine kann man basierend auf der zeitlichen Skala der zu beobachtenden Dynamik zwei Ansätze unterscheiden. Stehen sehr schnelle Konformationsdynamiken im Bereich von Nanosekunden bis Mikrosekunden im Fokus der Untersuchungen, werden normalerweise diffusionsbasierte Techniken, wie z.B. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), angewandt (Mazal und Haran 2019; Schuler und Hofmann 2013). Dazu können durch konfokale Mikroskopie erreichte femtolitergroße Detektionsvolumina in Kombination mit hochverdünnten Lösungen des fluoreszierenden Moleküls verwendet werden, um einzelne Moleküle zu beobachten. Üblicherweise werden Punktdetektoren mit sehr hoher zeitlicher Auflösung zur Datenaufnahme und Korrelationstechniken zur Datenanalyse genutzt. Diffusionsbasierte Einzelmoleküluntersuchungen sind dabei durch die Dauer der Diffusion des fluoreszierenden Moleküls durch das Detektionsvolumen begrenzt. Gilt es hingegen, langsamere Konformationsdynamiken im Bereich von Millisekunden bis Sekunden zu beobachten, werden die zu untersuchenden Moleküle häufig auf einer Oberfläche immobilisiert. Das ermöglicht die Beobachtung des selben Moleküls über einen längeren Zeitraum hinweg, wodurch die Untersuchung langsamer Dynamiken erst möglich wird. Anstelle von Punktdetektoren ist die Signaldetektion hierbei meist kamerabasiert und mit TIRF-Mikroskopie (Totale interne Reflexionsfluoreszenz, engl.: total internal reflection fluorescence) gekoppelt (Deniz et al. 2008; Mazal und Haran 2019; Schuler und Hofmann 2013). Diese Art der Datenaufnahme ist von besonderer Relevanz für fluoreszenzbasierte Einzelmoleküluntersuchungen des Chaperons Hsp90, das

durch einen langsamen ATPase-Zyklus geprägt ist (vgl. Abschnitt 1.2). Daher wird in nachfolgendem Kapitel genauer auf dabei auftretende Herausforderungen eingegangen.

### 1.4.2 Herausforderungen der Einzelmolekülspektroskopie

**Immobilisierung.** Die Immobilisierung von einzelnen Proteinen kann über verschiedene Wege erreicht werden. Meistens ist es wichtig, das zu untersuchende Protein dabei spezifisch und in einer funktionalen Anordnung zu immobilisieren. Dazu werden Ankerpunkte in Form von zufällig auf eine gereinigte Glasoberfläche adsorbierenden Molekülen wie z.B. Streptavidin verwendet. Kombiniert mit einer Passivierungsschicht, die sich zwischen die Ankerproteine legt, wird eine unspezifische Adsorption an das Glas verhindert. Das Protein von Interesse wird häufig über eine artifizielle Modifikation, z.B. Biotin, befähigt, spezifisch an das Ankerprotein zu binden (Schmid et al. 2016; Götz et al. 2016; Wortmann et al. 2017; Ye et al. 2018; Sturzenegger et al. 2018). Durch die starke Interaktion wird das Protein so über Minuten bis Stunden hinweg immobilisiert (Nguyen et al. 2012; Gust et al. 2014). Außerdem ist es möglich bzw. nötig, über die Konzentration der verschiedenen Komponenten die finale Anzahl der immobilisierten Moleküle zu steuern, um eine separierte Beobachtung zu gewährleisten (Roy et al. 2008; Joo und Ha 2012; Hua et al. 2014).

**Dissoziationskonstante.** Wird ein Protein untersucht, das aus mehreren Monomeren besteht, können die zwingend zu verwendenden niedrigmolaren Lösungen der fluoreszierenden Untereinheiten (meist Pikomolar bis Nanomolar) dazu führen, dass das Protein von Interesse nicht mehr in seinem funktionalen Zustand vorliegt. Dabei wird dessen Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) unterschritten. Der  $K_D$ -Wert ist die Konzentration, bei der das Protein zur Hälfte assoziiert und zur Hälfte dissoziiert vorliegt. Bei einem  $K_D$  von ungefähr  $> 50$  nM (Gust et al. 2014) ist es deshalb notwendig, die Dissoziationskonstante des untersuchten Proteins künstlich zu verringern. Das wird häufig über das artifizielle Einbringen von *Coiled-coil* (cc) Proteinstrukturmotiven am Proteinterminus erreicht, welche extrem niedrige  $K_D$ -Werte aufweisen und somit die Dissoziation des Proteins bei den eingesetzten Konzentrationen verhindern sollen (Gust et al. 2014; Schmid et al. 2018; Ye et al. 2018; Wortmann et al. 2017). Darüber soll die funktionale Anordnung des Proteins gewährleistet werden. Eine andere, bisher nicht so häufig verwendete Möglichkeit bieten Zero-Mode Waveguides, mit denen höhere

Konzentrationen des markierten Moleküls verwendet werden können. Das Prinzip basiert auf kleinsten Vertiefungen (Zeptoliter groß,  $10^{-21}$  L) in einer glasbasierten, metallbeschichteten Probenkammer. Die Vertiefungen sind dabei kleiner als die verwendete Wellenlänge und verhindern die Ausbreitung des anregenden Laserlichts weiter oben in die Probe, wodurch nur einzelne sich in den Vertiefungen befindende Moleküle angeregt werden. Diese Methode wurde bereits in Bindungskinetik-Studien genutzt und findet industrielle Anwendung in der Einzelmolekül-Sequenzierung (van Oijen 2011).

**Signal-zu-Rausch Verhältnis.** Eine weitere Herausforderung stellt die Detektion der solchermaßen einzeln immobilisierten Moleküle mit einem verwertbaren Signal-zu-Rausch-Verhältnis dar. Die verwendete TIRF-Mikroskopie kann dabei das Hintergrundsignal um das bis zu 2000-fache verringern (Gust et al. 2014), dazu wird das Anregungslicht in einem kritischen Winkel auf die Grenzfläche zwischen Glas und wässriger Probe gelenkt, sodass es zu einer totalen Reflexion kommt. Dadurch bildet das Anregungslicht in der Lösung ein evaneszentes Feld aus, dessen Intensität exponentiell abfällt und damit ca. 100-200 nm in die Probe hineinreicht. So werden selektiv nur Moleküle in direkter Nähe zur Glasoberfläche angeregt, während Signale aus dem Hintergrund weitestgehend unterdrückt werden (Deniz et al. 2008; Monachino et al. 2017; Lakowicz 2006; Wazawa und Ueda 2005).

**Fluoreszenzfarbstoffe.** Die wahrscheinlich größte Herausforderung stellt die mit der Detektion zusammenhängende Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe dar, denn diese müssen eine Vielzahl an Voraussetzungen erfüllen. Zuallererst müssen sie über biochemisch konjugierbare Gruppen verfügen und eine gewisse Helligkeit zeigen, da anders als in konventioneller Spektroskopie das Signal eines einzelnen Farbstoffs detektiert werden muss. Dafür sind ein Extinktionskoeffizient von mindestens  $50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bis  $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und eine Fluoreszenzquantenausbeute von  $> 10 \%$  nötig (Lerner et al. 2021; Gust et al. 2014). Je nach Art der Untersuchung soll das Fluoreszenzlabel außerdem möglichst klein sein, um einerseits Konformationsdynamiken akkurat wiederzugeben und andererseits, um die biologische Funktion so wenig wie möglich zu beeinflussen. Daher werden häufig organische Farbstoffe mit einer Größe von weniger als einem bis hin zu zwei Nanometern verwendet (Gust et al. 2014; Roy et al. 2008; Ha und Tinnefeld 2012). Ein weiteres Kriterium ist die Photostabilität, die in Photobleichen und Blinkverhalten untergliedert werden kann. Beide Aspekte sind von enormer Bedeutung für Einzelmoleküluntersuchungen, da sie häufig limitierende Faktoren bezüglich der Dauer der Aufzeichnung darstellen und dabei nicht an die konventionelle Spektroskopie anknüpfen können (Ye et al. 2018; Tsunoyama et al.

2018). Ein Fluoreszenzfarbstoff im angeregten Zustand tendiert zu chemischen Reaktionen, die häufig reaktive Sauerstoffspezies beinhalten und zur Zerstörung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems führen können. Dieser Prozess wird Photobleichen bzw. Photozerstörung genannt und führt zu einem irreversiblen Verlust der Fähigkeit zu fluoreszieren, was sich als augenblicklicher Fluoreszenzverlust zeigt. Eine prominente Methode, die Lebenszeit der Fluoreszenzfarbstoffe und damit einhergehend die gesamte Messdauer zu verlängern, besteht darin Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen, z.B. über ein enzymatisches sauerstofffangendes System (engl.: oxygen-scavenger-system). Allerdings kann das Entfernen des molekularen Sauerstoffs der Lösung in Folge das Blinkverhalten des Farbstoffs negativ beeinflussen. Blinken bedeutet, der angeregte Farbstoff nimmt verschiedene nicht fluoreszierende Zustände ein, z.B. den Triplettzustand oder Radikalionenzustände. Die transienten Übergänge können zu Fluktuationen der Fluoreszenzintensität führen, ohne dabei biologischen Ursprungs zu sein und können so mit dem aufzuzeichnenden Signal interferieren. In Anwesenheit von Sauerstoff können solche Dunkelzustände effektiv depopuliert werden, wohingegen eine sauerstofffreie Lösung das Gegenteil bewirken kann. Daher werden sauerstofffreien Messlösungen häufig Kombinationen aus Reduktions- und Oxidationsmitteln (engl.: reducing and oxidizing system, ROXS) zugegeben, die anstelle von Sauerstoff die Dunkel-Zustände schnell depopulieren sollen. Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, um solche blinkunterdrückenden Substanzen kovalent an Farbstoffe zu koppeln und so die direkte räumliche Nähe der beiden Moleküle dauerhaft sicherzustellen (Tinnefeld und Cordes 2012). Während die erwähnten Möglichkeiten alleine oder in Kombination bei manchen Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. Cy5, zu erheblichen Verbesserungen der Photostabilität führen, sind andere davon nicht oder nur kaum beeinflusst (Gust et al. 2014; Roy et al. 2008; Ha und Tinnefeld 2012; Vogelsang et al. 2008).

### 1.4.3 Einzelmolekülstudien an Hsp90

Das molekulare Chaperon Hsp90 wird seit über 30 Jahren untersucht, dabei werden seit mehr als einem Jahrzehnt verschiedene Einzelmolekülmethoden angewandt, manipulations- sowie fluoreszenzbasierter Art. Im Folgenden werden einige Beispiele und ihr jeweiliger Beitrag zum heutigen Verständnis des Chaperons beschrieben.

**Kryo-EM.** Die Kryoelektronenmikroskopie (Cryo-EM) basiert grundsätzlich auf in dünnen wässrigen Filmen durch blitzschnelle Gefrierung in nativer Form

gefangenen Molekülen, die mittels Elektronenmikroskopie auf atomarer Ebene abgebildet werden. Durch Verhindern der Wasserkristallbildung ordnen sich die Biomoleküle in verschiedenen nativen Zuständen zufällig an, die anschließend miteinander verrechnet eine 3D-Struktur liefern (Dubochet et al. 1982; Frank 2006). Damit war es zum ersten Mal möglich, die Struktur des eukaryotischen Volllängen-Hsp90-Proteins in seinem *apo*-Zustand aufzulösen, wobei ein Konformationsequilibrium von zwei unterschiedlichen *apo*-Konformationen des Chaperons direkt beobachtet wurde (Bron et al. 2008). Ein weiterer Meilenstein wurde mit der 3,9 Å genauen Strukturauflösung eines Komplexes aus geschlossenem Hsp90, seinem Co-Chaperon Cdc37 (engl.: cell division cycle 37) sowie der Klientenkinase Cdk4 (engl.: cyclin dependent kinase 4) erzielt, die eine Reihe Interaktionen zwischen den beteiligten Molekülen offenbart. Die Struktur gibt neue Einblicke in den Bindungsmodus des Co-Chaperons und lässt Schlussfolgerung einer Umlagerung desselben von der Hsp90-NTD zur MD während des ATPase-Zyklus zu. Darüber hinaus zeigt sich eine teilweise entfaltete Klientenkinase, die zwischen den MDs von Hsp90 hindurchgefädelt im Komplex stabilisiert wird (Kliment A. Verba et al. 2016).

**Optische Pinzetten.** Ein fokussierter Laserstrahl kann dazu benutzt werden, ein dielektrisches Teilchen – sogenannte Beads – räumlich zu fixieren. Verwendet man zwei solcher optischen Fallen, kann man auf ein Molekül das an den Beads befestigt ist, definierte Kräfte ausüben bzw. auftretende Kräfte auslesen. Der Aufbau wird deshalb als optische Pinzette bezeichnet (Mashaghi et al. 2014; Jahn et al. 2014). In einer kombinierten Untersuchung mit solchen optischen Pinzetten (engl.: optical tweezers) wurde der geladene Linker von Hsp90, der die NTD und die MD miteinander verbindet, genauer untersucht. Dieser ist aufgrund seiner Flexibilität in kristallographischen Untersuchungen meist nicht aufzulösen und damit verbunden seine Funktion schwierig zu benennen. Mittels optischer Pinzetten konnte dem geladenen Linker eine Rolle zugeordnet werden, in der er transiente Interaktionen mit der NTD des Chaperons eingeht und darüber einen Zustand vermittelt, in dem die NTD angedockt an die MD stabilisiert wird. Ohne die Einwirkung von Kräften befinden sich die Domänen in einem 75 zu 25 %-Gleichgewicht im angedockten bzw. nicht angedockten Zustand, wobei sie hunderte Male pro Sekunde zwischen den Zuständen wechseln. In letzterem kann die NTD frei re-orientieren und gewinnt an Rotationsflexibilität (Jahn et al. 2014).

**smFRET.** Bei Förster Resonanzenergietransfer (FRET)-Messungen wird, vereinfacht gesagt, der Abstand zwischen zwei als Akzeptor und Donor bezeichneten Fluoreszenzmolekülen anhand der Effizienz der nicht-radiativen

Energieübertragung bestimmt. Dieser kann durch den Anteil der Akzeptorfluoreszenzintensität an der Gesamtintensität abgeschätzt werden. Die Effizienz der Energieübertragung  $E$  ist dabei durch den Zusammenhang

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

beschrieben,

wobei  $R$  die Distanz zwischen den Fluoreszenzmolekülen und  $R_0$  den Försterradius beschreibt, bei dem  $E = 0,5$  ist.  $R_0$  beinhaltet außerdem die Orientierungen der Fluoreszenzfarbstoffe (Roy et al. 2008; Ha 2001). Durch oben beschriebenen Zusammenhang ermöglicht FRET eine theoretische räumliche Auflösung von 1-10 nm (Doose et al. 2005) und eine typische Auflösung von 2,5-10 nm (Lerner et al. 2021), wodurch sich die Methode sehr gut zur Untersuchung makromolekularer Dynamiken eignet. Einzelmolekül-FRET (engl.: single-molecule FRET, smFRET) bezeichnet dementsprechend die Anwendung der Methode auf Einzelmolekülebene. Die Technik erlaubt neben der Untersuchung von Proteindynamiken auch eine genaue Bestimmung der Distanzen zwischen den Farbstoffmolekülen (Lerner et al. 2021).

In mehreren Untersuchungen mittels Mehrfarben smFRET mit bis zu vier Farben gibt es Hinweise darauf, dass Hsp90 die Zustandsübergänge während seines Konformationszyklus auch ohne ATP vollziehen kann. Die Bindung des Nukleotids führt jedoch zu Direktionalität des Systems, was die gängige Ansicht der ATP-Abhängigkeit stützt, wenngleich sie dennoch Diskussionsgegenstand ist. Zusätzlich kann die Direktionalität des Systems durch Co-Chaperone reguliert werden. Darüber hinaus wurde eine Asymmetrie der Nukleotidbindung in den beiden Untereinheiten beobachtet, ebenso wie für die Bindung des Co-Chaperons p23. In beiden Fällen bindet das zweite Molekül nicht unabhängig von der Anwesenheit des ersten an die homodimere molekulare Klammer, was die bereits vermutete Bedeutung der Asymmetrie im Chaperon weiter stützt. Für die beiden Nukleotidbindetaschen wurde dabei ein kooperativer Mechanismus entdeckt. Darüber hinaus kann Hsp90 sowohl im geöffneten als auch im geschlossenen Zustand Nukleotid binden (Mickler et al. 2009; Ratzke et al. 2014; Ratzke et al. 2012; Wortmann et al. 2017; Schmid et al. 2018).

In smFRET-Untersuchungen zu Effekten durch Inhibitoren von Hsp90 zeigte sich, dass die globalen Konformationsdynamiken kaum beeinflusst sind, weshalb ein Mechanismus über die direkte Störung dieser Dynamiken als unwahrscheinlich gilt. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass sich viele kleine Effekte aufsummieren

und letztlich zur beobachteten wirksamen Inhibition führen. Daran knüpfen Untersuchungen an, die eine Feineinstellung der Konformationsflexibilität zur Steuerung der Hsp90-Funktion zeigen. Hierbei wirken stimulatorische Effekte auf das Chaperon, indem sie über sogenannte Konformationsbeschränkung die Möglichkeiten katalytisch inaktiver Konformationen von Hsp90 reduzieren und damit die katalytisch aktive Konformation propagieren (Schmid et al. 2018; Schmid und Hugel 2020).

Eine weitere smFRET-Untersuchung beschäftigt sich mit dem Hsp90-Homolog aus dem endoplasmatischen Retikulum Grp94, welches unter ATP-Bedingungen den geschlossenen Zustand ausgeprägt einnimmt. Vor diesem Hintergrund konnte ein zusätzlicher geschlossener Zustand identifiziert werden, der durch ein bereits hydrolysiertes Nukleotid (ADP) in einer Untereinheit und ein noch nicht hydrolysiertes Nukleotid (ATP) in der anderen Untereinheit charakterisiert ist. Zwischen diesen Konformationen kann das Chaperon mehrfach wechseln, bevor auch das zweite ATP hydrolysiert wird und das Chaperon wieder in die offene Klammer übergeht. Die beiden geschlossenen Zustände könnten dabei entweder global oder lokal unterschiedliche Konformationen darstellen (Huang et al. 2019).

**Plasmon-Lineal.** Als Plasmon-Lineal wird ein Paar aus plasmonischen Nanosphären bezeichnet, die z.B. über ein Biomolekül verbunden sind. Licht kann in solchen Edelmetall-Nanosphären eine kollektive Schwingung der Leitungselektronen mit einer spezifischen Frequenz verursachen, die als Partikelplasmon bezeichnet wird. Mit Änderung des Abstands der beiden Nanosphären verändern sich auch die Plasmonresonanz sowie die Streueffizienz. Dieser Effekt wurde bei einer Untersuchung an Hsp90 ausgenutzt, um die globalen Öffnungs- und Schließungsdynamiken der Klammer zu beobachten. Der Vorteil dieses Plasmon-Lineals liegt in der deutlich längeren Beobachtungszeit im Vergleich zu fluoreszenzbasierten Untersuchungen, was in deren außerordentlicher Photostabilität und Lichtstreuung begründet ist. Die Öffnungs- und Schließungsdynamiken einzelner Hsp90 Moleküle konnten so über bis zu 24 Stunden hinweg beobachtet und dabei langlebige Zustände mit Lebensdauern von mehreren Minuten gefunden werden (Ye et al. 2018).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit: Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie an Hsp90

Einzelmolekülmethoden haben den Vorteil, dass sie die Untersuchung von Messgrößen durch direkte Beobachtung einzelner Moleküle erlauben. Dadurch können auch selten oder kurzzeitig eingenommene Zustände von zu untersuchenden Proteinen entlang ihrer Reaktionskoordinate beobachtet werden. In konventioneller Spektroskopie sind solche Beobachtungen begrenzt und nur durch forcierte Synchronisation des Systems möglich. Liegen bestimmte Reaktionsanteile unter einem gewissen Schwellenwert, gehen sie in den dominierenden Reaktionsanteilen verloren und können nicht aufgelöst werden. In den letzten Jahrzehnten gewährten verschiedene Methoden innerhalb des wachsenden Feldes der Einzelmolekülforschung immer neue Einblicke in molekulare Interaktionen sowie zelluläre Maschinerien und deren Funktionsweisen. Die Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer-Methode ist dabei seit über einem Jahrzehnt ein verbreitetes Werkzeug, um unter anderem globale Konformationsdynamiken diverser molekularer Proteine zu untersuchen. Das molekulare Chaperon Hsp90 ist dabei seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Getrieben wird dies einerseits durch starkes medizinisches Interesse, andererseits durch die Tatsache, dass Hsp90 eine mit smFRET gut zu untersuchende Struktur darstellt. Das liegt an seiner Funktionsweise als molekulare Klammer, wobei es Konformationsänderungen innerhalb mehrerer Nanometer durchläuft. Die vergleichsweise neue Technik, bei der PET-Fluoreszenzsonden genutzt werden, um lokale Konformationsdynamiken aufzulösen, wurde bisher in PET-FCS-Messungen an verschiedenen Proteinen angewandt. Darüber hinaus wurden in konventionellen Fluoreszenzspektroskopiemessungen lokale Dynamiken innerhalb des Chaperons Hsp90 während des ATPase-Zyklus durch PET-Fluoreszenzsonden beobachtet.

In dieser Arbeit sollte die Methode der PET-Fluoreszenzsonden-vermittelten Beobachtung lokaler Proteindynamiken bildgebend auf die Einzelmolekülebene angewandt werden. Dabei werden lokale Konformationsänderungen als Fluktuationen der Fluoreszenzintensität beobachtbar. Hierfür wurde aufbauend auf Ergebnissen aus (Schulze 2017) eine Methode zur gleichzeitigen Spektroskopie verschiedener PET-Fluoreszenz-Reporter und damit mehrerer lokaler Dynamiken in einzelnen Hsp90-Molekülen etabliert. Dazu wurde ein ausführliches Farbstoffscreening, das auf Eignung zur Mehrfarben-Einzelmolekül-Detektion prüft, durchgeführt. Anschließend sollten mit diesen Farbstoffen die lokalen

Dynamiken von Strukturen innerhalb des Chaperons in bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopischen Aufzeichnungen untersucht und eine geeignete Auswertung der Daten entwickelt werden. Abschließend sollte eine bildgebende Mehrfarben-Einzelmolekül-PET Methode entstehen, die zur breiten Anwendung in Untersuchungen lokaler Konformationsdynamiken in Proteinen geeignet ist.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die verwendeten Materialien sowie Methoden aufgelistet. Alle selbst hergestellten Lösungen wurden mit Reinstwasser (doppelt destilliert, ddH<sub>2</sub>O, >18 MΩm, Barnstead GenePure Pro Water Purification System, Thermo Fisher) aufbereitet und durch einen Zellulose-Acetat Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (Sartorius).

### 2.1 Transformation und Bakterienkulturen

2xTY-Medium, pH 7,4 (1 L):      16 g Trypton (Melford)  
   10 g Hefeextrakt (Melford)  
   5 g Natriumchlorid (Sigma-Aldrich)  
   pH auf 7,4 eingestellt mit NaOH (Sigma-Aldrich), flüssigautoklaviert.

2xTY Agarplatten:      500 ml 2xTY-Medium  
   bei ca. 50°C + 0,1 mg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich).

pH-Meter (Mettler-Toledo)

Für die Transformation wurden kompetente XL1-Blue oder C41(DE3) *E.coli*-Zellen verwendet. Die Transformation von QuikChange PCR- und Ligationsprodukten wurde mit XL1-Blue Zellen (Novagen) durchgeführt. Für QuikChange PCR-Produkte wurde zu 3 µl DNA 40 µl frisch auf Eis aufgetaute Zellen gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wird das Plasmid von den Zellen aufgenommen und die Ampicillin-Resistenz vermittelt. Anschließend wird der komplette Ansatz auf 2xTY Agarplatten ausplattiert, diese werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Ligationsprodukte wurden 5 µl DNA verwendet.

Für die Vermehrung aufgereinigter Plasmid-DNA wurden zu 1 µl DNA 20 µl XL1-Blue Zellen gegeben und nach Inkubation auf Eis 5 µl ausplattiert.

Für anschließende Minipräparationen werden 8 ml 2xTY Flüssigkulturen, die frisch mit 0,1 mg/ml Ampicillin versetzt wurden, mit einer Kolonie der Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Die Transformation für die Proteinexpression wird mit C41(DE3)-Zellen (Novagen) durchgeführt. Hierbei werden zu 1 µl Plasmid-DNA 20 µl frisch auf Eis aufgetaute Zellen gegeben, für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 5 µl davon auf 2xTY-Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Hiervon wird eine Kolonie gepickt, um eine 100 ml 2xTY Flüssigkultur (Vorkultur) – zuvor frisch mit 0,1 mg/ml Ampicillin versetzt – anzupflanzen. Diese wird über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert und davon werden wiederum 8 ml verwendet, um eine 800 ml 2xTY-Flüssigkultur (Hauptkultur) – zuvor frisch mit 0,1 mg/ml Ampicillin versetzt – anzupflanzen und bei 37°C in einem Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific, Innova 4330) zu inkubieren.

## 2.2 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Die verwendeten *E.coli*-Zelllinien XL1-Blue und C41(DE3) wurden auf die gleiche Weise kompetent gemacht und bei -80°C langzeitgelagert. Alle verwendeten Gefäße wurden zuvor trockenautoklaviert.

Transformationspuffer (TP, 1 L):    3 g PIPES (Sigma-Aldrich)  
   2,2 g Calciumchlorid Dihydrat (Merck)  
   18,6 g Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich)  
   75 g Glukose (Sigma-Aldrich)  
   pH mit KOH auf 6,7 einstellen.  
   + 10,9 g Manganchlorid Tetrahydrat (Sigma-Aldrich).  
   auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O und bei 4°C lagern.

### pH-Meter

Eine Transformation sowie eine 100 ml- und 800 ml Flüssigkultur wird analog zu Abschnitt 2.1, aber ohne Plasmid-DNA und deshalb auch ohne Antibiotikum, durchgeführt. Ist die 800 ml Flüssigkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 gewachsen, wird der Inkubator für 30 min auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert, in 100 ml eiskaltem TP resuspendiert, wiederum für 10 min abzentrifugiert und in 200 ml eiskaltem TP resuspendiert, bevor sie für 30 min auf Eis inkubiert werden. Nach abermaligem Zentrifugationsschritt werden sie in 25 ml eiskaltem TP resuspendiert und zu 25 ml 14 %-igem DMSO (Merck) in TP gegeben. Die Zellsuspension wird in Aliquots über ein Ethanol-Trockeneisbad schockgefrostet. Zur Kontrolle können die Zellen mit einem Plasmid bzw. ddH<sub>2</sub>O Test-transformiert werden.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

**Primer.** Das Hsp90-Gen wurde unter Verwendung verschiedener Primer modifiziert. Grundsätzlich wurden Primer für Punktmutationen nach dem Protokoll der von Stratagene entwickelten QuikChange-PCR designt. Die dabei verwendeten komplementären Primer (vorwärts, fwd, rückwärts, rev) kodieren bereits die gewünschte Mutation, sodass diese in den während der PCR neu synthetisierten DNA Strängen vorhanden ist. Nach dem Verdau der Ausgangs-DNA (Template) wird die Mutation-tragende, aber einen Strangbruch aufweisende, DNA in *E.coli*-Zellen transformiert, in welchen sie von zelleigenen Reparaturmechanismen ligiert wird (Liu und Naismith 2008). Eine Liste der für Punktmutationen verwendeten Primer ist in Tabelle 2-1 gegeben. DNA-Konstrukte, deren Mutationen in diesem Kapitel nicht explizit aufgeführt sind, wurden von Andrea Schulze hergestellt. Alle Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt.

**Tabelle 2-1: Verwendete Primer für Punktmutationen.** Gelistet sind die verwendeten Primer, deren Nukleotidsequenz sowie die Originalbezeichnung. Die Punktmutation ist jeweils unterstrichen.

Primer	Nukleotidsequenz	Originalbezeichnung
A2C_fwd	5'-CATCATCATGGTATG <u>TGC</u> AGCGAAACTTTTGAA TTTCAAGC-3'	A2C_fwd
A2C_rev	5'-GCTTGAAATTCAAAAGTTTCGCT <u>GCA</u> CATACCA TGATGATG-3'	A2C_rev
A2W_fwd	5'-CATCACCACATG <u>IGG</u> AGCGAAACTTTTGAATTT C-3'	fwd_A2W_NHis_neu2
A2W_rev	5'-GAAATTCAAAAGTTTCGCT <u>CCA</u> CATGTGGTGAT G-3'	rev_A2W_NHis_neu2
E162W_fwd	5'-GGTTCTTTCACTGTTACTCTAGACT <u>TGG</u> GTTAATG AAAGAATTGG-3'	Hsp90 E162W fwd
E162W_rev	5'-CCAATTCATTAAC <u>CC</u> AGTCTAGAGTAACA GTGAAAGAACC-3'	Hsp90 E162W rev

Darüber hinaus wurde für die Deletion der DNA-Sequenz, die für das *coiled-coil* (cc) Strukturmotiv kodiert, eine auf dem QuikChange-Protokoll aufbauende Methode, die von Liu und Naismith 2008 entwickelt wurde, angewendet. Durch ein Design, bei welchem die Primer über die komplementäre Region hinaus durch eine nicht komplementäre Sequenz erweitert sind, wird es in Kombination mit einem modifizierten PCR-Programm ermöglicht, Deletionen oder Insertionen größerer

Fragmente, ohne weitere Schritte wie Phosphorylierung oder Ligation, durchzuführen. Die Primer-Primer-komplementären Sequenzabschnitte weisen dazu einen Schmelzpunkt 5-10 °C über dem der nicht komplementären Abschnitte auf, wodurch letztere den auftretenden Strangbruch überbrücken und somit effizient an die neu synthetisierten DNA-Stränge binden können (Liu und Naismith 2008). Die so designierten Primer sind in Tabelle 2-2 gelistet.

**Tabelle 2-2: Verwendete Primer für die Deletion der cc-Sequenz.** Gelistet sind die verwendeten Primer, die Nukleotidsequenz sowie die Originalbezeichnung. Primer-Primer-Komplementaritäts-Regionen sind fett hervorgehoben, Nukleotide zwischen welchen in der Ausgangssequenz die cc-Sequenz lokalisiert ist, sind unterstrichen.

Primer	Nukleotidsequenz	Originalbezeichnung
del_cc_fwd	5'- <b>CACCACCGCCTGAAC</b> <u>GATATTTTTGAAGCGCA</u> GAAAATTGAATGGC-3'	del cc_fwd neu
del_cc_rev	5'- <b>G TTCAGGCCGGTGGTG</b> <u>CT</u> ACC ACTGGTGGATCC ATCTAC-3'	del cc_rev neu

Für die Umklonierung des His<sub>6</sub>-Tags von C- zu N-Terminus wurden eine Kombination aus Deletion und Insertion über konventionelle Überhangprimer verwendet und gleichzeitig Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen NdeI und HindIII sowie kurze Verlängerungen eingefügt, um ein effizientes Schneiden derselben zu ermöglichen. Die entsprechenden Primer sind in Tabelle 2-3 gelistet.

**Tabelle 2-3: Verwendete Primer für die Umklonierung des terminalen His<sub>6</sub>-Tags.** Gelistet sind die Primer zur Umklonierung des His-Tags vom C- zum N-Terminus, deren Nukleotidsequenz sowie Originalbezeichnung. Der Primerüberhang ist fett, das Start- bzw. Stoppcodon kursiv und der His<sub>6</sub>-Tag unterstrichen hervorgehoben. Die Erkennungssequenz für NdeI bzw. HindIII sind grau unterlegt.

Primer	Nukleotidsequenz	Originalbezeichnung
add_NdeI+His6N _fwd	5'- <b>ACAGCG</b> <u>CATATGCATCATCACCATCACCA</u> <u>C</u> ATGGCTAGCGAAACTTTTGAATTTCAAGC-3'	cc addNdeI+His6 N-Ter_fwd
del_His6+HindIII C_rev	5'- <b>ACAGCG</b> <u>AAGCTTTT</u> ATTCATGCCATTCAATT TTCTGCGC-3'	cc delHis6+HindIII C-Ter_rev

**PCR.** Über Verwendung der jeweiligen Primer konnte das Hsp90-Gen an verschiedenen Stellen modifiziert werden. Dafür wurde pro 50 µl großem Ansatz wie folgt pipettiert:

10 µl Q5 Polymerase Puffer (New England Biolabs)  
 15 ng Ausgangs-DNA  
 1 µl Vorwärtsprimer (125 ng/µl in ddH<sub>2</sub>O)  
 1 µl Rückwärtsprimer (125 ng/µl in ddH<sub>2</sub>O)  
 1 µl dNTPs (25 mM, Sigma-Aldrich)  
 1 µl Q5 HF Polymerase (2 U/µl, New England Biolabs)  
 aufgefüllt auf 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O.

Folgende PCR Programme wurden verwendet.

<u>Programm (1)</u>		<u>Programm (2)</u>	
98°C	1 min	98°C	30 s
x 20	98°C	98°C	30 s
	55°C / 65°C	52,5°C / 62,5°C	30 s
	72°C	72 °C	2,5 min
	72°C	46,1°C / 56,1°C	30 s
	4°C	72°C	5 min
		72°C	2 min
		4°C	

Für Punktmutationen und die Umklonierung des His<sub>6</sub>-Tags wurde Programm (1), für die Deletion der cc-Sequenz hingegen Programm (2) verwendet. Als Kontrolle wird ein PCR-Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O anstelle der Primer pipettiert. Es wurden jeweils zwei identische Ansätze pipettiert und je einer bei 55°C und 65°C bzw. 52,5°C und 62,5°C/46,1°C und 56,1°C (Schritt 3 bzw. 3 und 5) laufen gelassen.

**Agarose-Gelelektrophorese.** Für die Überprüfung des Erfolgs der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wird unter Verwendung eines 0,5x TBE-Puffers (0,5 L: 2,7 g Tris, 1,38 g Borsäure, 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) ein 1-2 %-iges Agarose-Gel mit 1:10000 verdünntem SafeView (abm) gegossen. 10 µl des PCR Produkts werden mit 2 µl LoadingDye(6x) (New England Biolabs) versetzt, auf das Gel aufgetragen und dieses für ca. 1 h bei 100 V, 90 mA und 5 W laufen gelassen. Zur späteren Identifikation der DNA-Fragmente wird 1 µl einer geeigneten DNA-Leiter (2-log bzw. 100 bp, New England Biolabs) mit 9 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt, ebenfalls mit 2 µl LoadingDye versetzt und auf demselben Gel laufen gelassen. Unter einem UV-Transilluminator (Intas) wurde der Erfolg der PCR unter Berücksichtigung des Kontrollansatzes verifiziert.

**Restriktionsendonuklease-Verdau.** Nach der PCR muss die restliche nicht für die Gelelektrophorese genutzte Ausgangs-DNA verdaut werden, um Interferenz mit der modifizierten DNA zu verhindern. Dafür macht man sich zunutze, dass aus Bakterien stammende DNA natürlicherweise ein Methylierungsmuster aufweist,

über PCR generierte synthetische DNA hingegen nicht. Wird 1 µl DpnI (20 U/µl, New England Biolabs) zum Ansatz gegeben und für 1,5 h bei 37°C inkubiert, verdaut dieses selektiv nur die methylierte Ausgangs-DNA.

Im Fall der Umklonierung des His<sub>6</sub>-Tags wurde das DpnI-verdaute PCR-Produkt im Zuge der molekularen Klonierung zunächst aufgereinigt (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen NdeI (New England Biolabs) und HindIII-HF (New England Biolabs) verdaut, um die zwischen den Schnittstellen gelegene Gensequenz aus dem Amplifikat auszuschneiden (Insert). Frisches Ausgangsplasmid wurde analog zum PCR-Produkt zusätzlich zu NdeI und HindIII mit EcoRI (EcoRI-HF, New England Biolabs) verdaut. EcoRI zerschneidet dabei zusätzlich das C-terminal getaggte Hsp90-Gen aus dem Ausgangsplasmid, da dieses sonst in etwa so groß ist wie der zu extrahierende leere Vektor. Damit wäre es im nachfolgenden Schritt nicht möglich, den geschnittenen leeren Vektor aus dem Gel zu extrahieren. Die Verdaue wurden nach folgendem Schema pipettiert und für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

<u>Insert (=PCR Produkt)</u>	<u>Vektor (=Ausgangsplasmid, 2µg)</u>
40 µl DNA (mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt)	40 µl DNA
1 µl NdeI (20 U)	1 µl NdeI (20 U)
1 µl HindIII (20 U)	1 µl HindIII (20 U)
4,7 µl 10x CutSmart Puffer	1 µl EcoRI (20 U)
	4,8 µl 10x CutSmart Puffer (New England Biolabs)

Anschließend wurde erneut eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden die Ansätze von ~50 µl DNA + 10 µl LoadingDye für das Insert bzw. den Vektor aufgetrennt.

**Gelextraktion und Ligation.** Im Falle der Umklonierung des His<sub>6</sub>-Tags wurde im Zuge der molekularen Klonierung nach der zweiten Gelelektrophorese eine Gelextraktion von verdautem Insert und Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) und dabei in DNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert, um die DNA-Konzentration photometrisch bestimmen zu können. Nach der Gelextraktion wird Insert und Vektor in einem 5:1 Verhältnis (DNA-Menge) über Nacht bei 16°C mithilfe der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) ligiert.

15 µl Insert
3 µl Vektor
2 µl T4 DNA Ligase-Puffer (New England Biolabs)

1 µl T4 DNA Ligase  
auf 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

**Minipräparation und Sequenzierung.** Die DNA-Produkte aus QuikChange-PCR werden nach DpnI-Verdau und die der molekularen Klonierung nach der Ligation, in kompetente XL1-Blue *E.coli*-Zellen transformiert. Anschließend wird nach Herstellerangabe (NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey Nagel) eine Minipräparation der Bakterienkultur bzw. der DNA durchgeführt und für die Sequenzierung an einen externen Dienstleister (eurofins Genomics) geschickt. Die erhaltenen Sequenzierungen werden über die Software BioEdit und SnapGene Viewer verifiziert, die DNA-Proben bei -20°C gelagert.

## 2.4 Proteinsynthese und Aufreinigung

Alle Proteinlösungen wurden vor der Beladung auf eine Chromatographiesäule durch einen 0,2 µm-Filter filtriert.

**Plasmide.** Das pRSET A-Plasmid (Invitrogen), das das Gen für Hsp90 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert, wurde freundlicherweise von Chrisostomos Prodromou (University of Sussex, Brighton) zur Verfügung gestellt und trägt einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Das Hsp90-Gen steht dabei unter der Kontrolle eines mit IPTG (Melford) induzierbaren T7 Promotors. Für die Einzelmolekülmessungen wurde das Hsp90-Gen wie teilweise in (Schulze 2017) beschrieben modifiziert, worauf an geeigneten Stellen genauer eingegangen wird. Im Zuge dessen befand sich in einigen Hsp90-Konstrukten der His<sub>6</sub>-Tag am C-Terminus. Das Plasmid pET21a kodiert die BirA Ligase aus *E.coli* mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und wurde freundlicherweise von Thomas Müller (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Alle Plasmide tragen ein Ampicillin-Resistenzgen. Tabelle 2-4 gibt einen Überblick über die verwendeten Konstrukte und Abbildung 2-1 zeigt schematisch den dazugehörigen Aufbau der Einzelmolekülkonstrukte. BirA, C-His wurde nicht zu spektroskopischen Zwecken exprimiert und ist daher nicht in Tabelle 2-4 gelistet. Aufgrund besserer Markierungseffizienz ist bei A2C-Konstrukten der His<sub>6</sub>-Tag am N-Terminus lokalisiert. Im Zuge dessen ist für eine bessere Vergleichbarkeit der His<sub>6</sub>-Tag in den Konstrukten E192C-N298W-WZA2 Avi-Hsp90, N-His und A2W-E192C-N298W-WZA2 Avi-Hsp90, N-His ebenfalls am N-Terminus platziert, sodass das spätere Hsp90-Heterodimer eine C- und eine N-terminal His<sub>6</sub>-getaggte Untereinheit enthält.

**Tabelle 2-4: Liste der für spektroskopische Zwecke verwendeten Konstrukte.** Gelistet sind alle verwendeten Konstrukte, untergliedert in Konstrukte für konventionelle Spektroskopie und Einzelmolekülspektroskopie. N-His = N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag, C-His = C-terminaler His<sub>6</sub>-Tag, WZB1 = WinZipB1 *coiled-coil*, WZA2 = WinZipA2 *coiled-coil*, Avi = Avitag.

für konventionelle Spektroskopie	für Einzelmolekülspektroskopie
Hsp90, N-His	WZB1 Avi-Hsp90, C-His
A2W-Hsp90, N-His	WZA2 Avi-Hsp90, C-His
E192C-Hsp90, N-His	A2C-WZA2 Avi-Hsp90, N-His
E192C-N298W-Hsp90, N-His	A2C-WZB1 Avi-Hsp90, N-His
S51C-A110W-Hsp90, N-His	E192C-WZA2 Avi-Hsp90, C-His
	S51C-WZB1 Avi-Hsp90, C-His
	E162W-S51C-A110W-WZB1 Avi-Hsp90, C-His
	E162W-E192C-N298W-WZA2 Avi-Hsp90, C-His
	E192C-N298W-WZA2 Avi-Hsp90, N-His
	S51C-A110W-WZB1 Avi-Hsp90, C-His
	A2W-E192C-N298W-WZA2 Avi-Hsp90, N-His
	S51C-A110W Avi-Hsp90, C-His
	E192C-N298W Avi-Hsp90, N-His



**Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau der Hsp90-Einzelmolekülkonstrukte.** Schemazeichnung des Aufbaus der Hsp90-Proteine für die Einzelmolekülspektroskopie. Die einzelnen Domänen sowie der geladene Linker (CL) sind eingezeichnet. Wie in (Schulze 2017) beschrieben, ist das Hsp90-Protein am C-Terminus mit einem Glycinerin-reichen Linker (GS-Linker, GSTSGSTT), gefolgt vom jeweiligen *Coiled-coil* (WZB1 oder WZA2) und dem Avitag modifiziert. Der His<sub>6</sub>-Tag ist entweder am C-Terminus oder am N-Terminus lokalisiert (gestrichelte Linie). Außerdem sind die

Mutationen und deren ungefähre Lokalisation innerhalb des Proteins in orange (Cystein-Mutationen) bzw. blau (Tryptophan-Mutation) eingezeichnet.

**Expression.** Nach Transformation und Flüssigvorkultur wurden je nach Konstrukt zwischen 1-4 Kolben 800 ml 2xTY Flüssighauptkultur angesetzt und diese bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Über photometrische Bestimmung des OD<sub>600</sub>-Werts – bei dieser Wellenlänge absorbiert die *E.coli*-Zellwand – wurde bei einem Wert von 0,6-0,8 die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Melford) induziert und für ca. 17 h bei 20°C und 190 rpm exprimiert. Die BirA-Ligase wurde für 3 h bei 30°C und 190 rpm exprimiert.

#### **Zellaufschluss und Proteinisolierung.**

Puffer N1: 50 mM Phosphat, 30 mM Imidazol, pH 8,0 (Merck, Sigma-Aldrich)  
pH-Meter

Nach Expression wurden die Zellen pelletiert (10 min, 2900 g) und in ca. 20 ml Puffer N1 resuspendiert, bevor pro Zellpellet ca. 650 U DNase (50 µl, AppliChem) und einige mg Lysozym (40000 U/mg, Sigma-Aldrich) zugegeben wurden. Das Lysozym verdaut die bakterielle Zellwand, die DNase verhindert durch Zerschneiden der DNA eine zu hohe Viskosität der Lösung. Anschließend wurde der Zellaufschluss über einen mechanischen Aufschluss per Ultraschall-Homogenisator (Cl-334, QSonica sonicators LLC) abgeschlossen. Es wurden 2,5 min gepulst, wobei auf 5 s Puls 20 s Pause folgten, um eine zu große Wärmeentwicklung zu verhindern. Zudem wurde die Zelllösung durch ein Eisbad gekühlt. Die entstandenen Zellfragmente wurden über einstündige Ultrazentrifugation (25000 g, Sorvall RC 5B Plus, Du Pont Instruments) pelletiert und somit von der Proteinlösung im Überstand getrennt.

#### **Proteinaufreinigung.**

Puffer N1: 50 mM Phosphat, 30 mM Imidazol, pH 8,0  
Puffer N2: 300 mM Imidazol, pH 8,0  
Puffer I1: 20 mM Tris, pH 8,0 (Sigma-Aldrich)  
Puffer I2: 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,0 (Sigma-Aldrich)  
Puffer S1: 40 mM HEPES, 200 mM IS(KCl), pH 7,5 (Sigma-Aldrich)  
pH-Meter

Der Überstand aus der Ultrazentrifugation wurde zunächst über die Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei bildet der His<sub>6</sub>-Tag spezifisch Chelatkomplexe mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen der stationären Phase des Säulenmaterials und bindet damit auf der Säule. Proteine ohne entsprechendes

Strukturmotiv passieren das Säulenmaterial ohne spezifisch damit zu interagieren. His<sub>6</sub>-getaggte Proteine können anschließend selektiv durch Waschen mit Elutionspuffer, dessen Bestandteile mit der Interaktion zwischen His<sub>6</sub>-Tag und Ni<sup>2+</sup>-Ionen konkurrieren, von der Säule gewaschen und aufgefangen werden. Dazu wurde die Nickelsäule zunächst mit 3-4 Säulenvolumina (SV) Puffer N1 equilibriert, bevor die Proteinlösung aufgeladen wird. Nach Waschen mit 2-3 SV Puffer N1 wurde über Waschen mit Puffer N2 eluiert, dabei wurden 12-15 Fraktionen á 3 ml aufgefangen. Um das Säulenmaterial zu regenerieren, wurde mit 2-3 SV Puffer N2 und 3-4 SV Puffer N1 gewaschen. Nach photometrischer Bestimmung des OD<sub>280</sub>-Werts wurden 4-8 Fraktionen mit den höchsten OD-Werten vereinigt. Die BirA Ligase wurde anschließend bei 4°C gegen PBS, pH 7,4 (Sigma-Aldrich) dialysiert (Slide-A-Lyzer Dialysis Casette, 10000 MWCO, ThermoFisher), auf etwa 3 ml aufkonzentriert (Vivaspin 20, 5000 MWCO, Sartorius) und damit die Aufreinigung für die BirA Ligase abgeschlossen.

In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie (engl.: ion exchange chromatography, IEC) durchgeführt. Hsp90 liegt mit einem isoelektrischen Punkt von ca. 4,95 bei einem pH-Wert von 8,0 netto negativ geladen vor, weshalb eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde. Dabei bindet das Protein an die positiv geladene stationäre Phase der Säule, bevor es durch Ionen des Elutionspuffers wieder verdrängt und damit eluiert und aufgefangen wird. Analog zur Nickelchromatographie wurde die Proteinlösung mithilfe einer Chromatographie-Anlage (NGC Chromatography Systems, Bio-Rad) auf die Säule (Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) geladen. Im Falle von Cystein-Mutanten wurde die Proteinlösung zuvor mit 10 mM DTT (Sigma-Aldrich) versetzt für 30 min bei 4°C inkubiert, um Disulfid-Brücken zu verhindern, bevor sie mindestens 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt wurde, um die Ionenstärke der Lösung zu verringern und eine Bindung an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Die Säule wurde zuvor mit 3-4 SV Puffer I1 equilibriert. Anschließend wurde ein zunehmender Gradient mit Puffer I2 gefahren, um das Protein von der Säule zu eluieren und gleichzeitig 4 ml-Fraktionen des Eluats aufgefangen (BioFrac Fraction Collector, Bio-Rad). Das OD<sub>215</sub>- sowie OD<sub>280</sub>-Signal wurde fortwährend detektiert, um die Fraktionen mit der höchsten Proteinmenge zu identifizieren und zu vereinigen. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 100 % Puffer I2 und anschließend 100 % Puffer I1 gewaschen. Im Fall von Cystein-Mutanten wurden alle Puffer mit 1 mM DTT versetzt, um die Ausbildung von Disulfid-Brücken während der Chromatographie zu verhindern. Nach spätestens 10 Läufen wurde die Säule nach Herstellerangabe (1 M NaOH für 60 min bei 1 ml/min, dann 40 min ddH<sub>2</sub>O bei 4 ml/min) gereinigt,

um Material, das durch die Regenerierung nicht beseitigt wird, von der Säule zu waschen. Falls die Aufreinigung nach der IEC abgeschlossen war (die meisten cc-Konstrukte), wurde das Eluat über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 20, 10000 MWCO, Sartorius) auf ca. 0,1-0,5 ml aufkonzentriert und bei 4°C gegen Puffer S1 dialysiert.

Bei der Größenausschlusschromatographie (engl.: size exclusion chromatography, SEC) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei große Proteine durch das Ausschlussvolumen der Säule laufen und früh eluiert werden, kleinere Proteine hingegen in das poröse Säulenmaterial eindiffundieren und später eluieren. Für die Größenausschlusschromatographie wurde das Eluat aus der IEC auf ca. 5-10 ml aufkonzentriert und auf die entsprechende Säule (HiPrep 26/60 Sephacryl S-400HR, Pharmacia Biotech AG) geladen. Im Fall von Cystein-Mutanten wurden zuvor 10 mM DTT zur Proteinlösung zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Außerdem wurde die Säule zuvor mit Puffer S1 equilibriert. Nach Applikation der Proteinlösung wurde die Säule mit einem vollständigen SV Puffer S1 gewaschen und 4 ml-Fractionen aufgefangen. Durch die gleichzeitige Detektion des OD<sub>215</sub>- und OD<sub>280</sub>-Signals konnten die Protein enthaltenden Fraktionen identifiziert und vereinigt werden. Anschließend wurde die Proteinlösung auf ca. 0,2-0,4 ml aufkonzentriert. Im Fall von Cystein-Mutanten wurde Puffer S1 mit Argon untersprudelt, um O<sub>2</sub> aus der Lösung zu verdrängen und damit die Ausbildung von Disulfidbrücken während der Chromatographie zu verhindern. DTT wurde nicht zugegeben, da dies mit nachfolgender Farbstoffmodifikation interferieren würde.

Der Erfolg der Proteinexpression sowie Aufreinigung wurde über eine SDS-PAGE überprüft.

**Proteinmengenbestimmung und Lagerung.** Um in Experimenten exakte Proteinmengen einsetzen zu können, müssen diese nach der Aufreinigung bestimmt werden. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz, welches die Absorption eines Proteins in Relation zu seiner Konzentration in Lösung setzt, kann die Konzentration  $c$  über den Zusammenhang

$$c = \frac{OD_{280}}{d \cdot \epsilon} \quad (2)$$

unter Verwendung der Schichtdicke  $d$  in cm und dem molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins  $\epsilon$  in  $M^{-1}cm^{-1}$  bestimmt werden (Lakowicz 2006). Dafür wurde ein Nanophotometer (Nanophotometer Pearl, Implen GmbH) verwendet. Anschließend wurden Proteinaliquots in flüssigem Stickstoff

schockgefrostet und bei -20°C gelagert. Die BirA Ligase wurde mit PBS, pH 7,4 auf 1 mg/ml verdünnt, ebenfalls in Aliquots schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

## 2.5 Proteinmodifikationen

### **Farbstoffmodifikation.**

Puffer M1: 50 mM Phosphat, 200 mM IS(KCl), pH 7,5

Da das verwendete Hsp90-Protein aus der Hefe keine natürlichen Cysteine aufweist, ist eine selektive Markierung von Cystein-Mutanten über deren SH-Gruppe möglich. Alle für die Hsp90-Markierung verwendeten Farbstoffe wurden über reaktive Maleimid-Gruppen kovalent an die SH-Gruppe gekoppelt. Folgende Farbstoffe wurden als Maleimid- oder NHS-Derivate verwendet: Atto488 (Atto-Tec), Alexa532 (ThermoFisher), Atto532 (Atto-Tec), Atto542 (Atto-Tec), Atto590 (Atto-Tec), Atto643 (Atto-Tec), JaneliaFluor646 (JF646, Tocris), SeTau647 (Seta BioMedicals), Atto647N (Atto-Tec), DyLight650 (ThermoFisher), Seta650 (Seta BioMedicals), AttoOxa11 (Atto-Tec), CF660R (Sigma-Aldrich), CF680 (Sigma-Aldrich), Atto700 (Atto-Tec). Für die Markierungsreaktion wurden 14 nmol des Hsp90-Konstrukts mit 70-140 nmol Farbstoff, der zuvor in 5 µl Acetonitril (Sigma-Aldrich), wasserfreiem DMSO (D12345, Thermo Fisher) oder DMF (Sigma-Aldrich) gelöst wurde und 1 mM TCEP (Sigma-Aldrich) zusammengegeben und mit Puffer M1 auf 150 µl aufgefüllt. Die Reaktion lief für 2-2,5 h abgedunkelt in einem Schüttelinkubator bei 25 °C. Nach anschließendem Pelletieren wurde der Überstand über eine Entsalzungssäule analog zu einer SEC-Säule (Sephadex G25, GE Healthcare) mithilfe der Chromatographie-Anlage von freiem Farbstoff abgetrennt. Dafür wurde zusätzlich zu OD<sub>215</sub> und OD<sub>280</sub> das OD-Signal bei der farbstoffspezifischen Wellenlänge detektiert und es wurden 1-2 ml des markierten Proteins aufgefangen. Konstrukte für konventionelle Spektroskopie wurden mit Vivaspin Turbo4-Konzentratoren (10000 MWCO, Sartorius) auf ca. 100-200 µl aufkonzentriert, Konstrukte für die Einzelmolekülspektroskopie auf ca. 40-50 µl. Über die Absorption bei 280 nm (OD<sub>P</sub>), die Absorption am farbstoffspezifischen Maximum (OD<sub>F</sub>), den molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins (ε<sub>P</sub>) sowie des Farbstoffs (ε<sub>F</sub>), den Korrekturfaktor des Farbstoffs (CF) und die Schichtdicke d konnten die Markierungseffizienz (engl.: degree of labeling, DOL) über den Zusammenhang

$$DOL = \frac{OD_F * \epsilon_P * d}{(OD_P - CF * OD_F) * \epsilon_F * d} \quad (3)$$

sowie die farbstoffkorrigierte Proteinkonzentration  $c$  über den Zusammenhang

$$c = \frac{(OD_P - CF * OD_F)}{\epsilon_P * d} \quad (4)$$

bestimmt werden. Konstrukte für die konventionelle Spektroskopie wurden in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für Löschexperimente von freiem Farbstoff wurden NHS-Derivate für 30 min bei Raumtemperatur (RT) in 50-100 mM Natriumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich) und Maleimid-Derivate für 2 h bei RT mit einem 10-fach Überschuss Cysteamin (Sigma-Aldrich) in ddH<sub>2</sub>O abreagiert.

### **Biotinylierung.**

Puffer A: 0,5 M Bicin, pH 8,3 (Sigma-Aldrich)  
Puffer B: 100 mM ATP, 100 mM Magnesiumacetat, 500  $\mu\text{M}$  d-Biotin (Merck)  
d-Biotin: 500  $\mu\text{M}$  d-Biotin in ddH<sub>2</sub>O (B4501, Sigma-Aldrich)

Die BirA-Ligase aus *E.coli* erkennt eine 15 Aminosäuren lange Sequenz (GLNDIFEAQKIEWHE) – als AviTag bezeichnet – und kann hochspezifisch enzymatisch ein Biotin kovalent auf die Seitenkette des Lysins (unterstrichen) übertragen (Fairhead und Howarth 2015). Dafür wurde nach Herstellerprotokoll (Avidity) verfahren und folgender Ansatz pipettiert:

40-50  $\mu\text{l}$  Hsp90-Protein  
20  $\mu\text{l}$  Puffer A  
20  $\mu\text{l}$  Puffer B  
10  $\mu\text{l}$  BirA-Ligase (1 mg/ml)  
(20  $\mu\text{l}$  d-Biotin, falls über 40  $\mu\text{M}$  Hsp90 Protein)  
auf 200  $\mu\text{l}$  auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O.

Die Reaktion lief für 1 h abgedunkelt unter Schütteln (250 rpm) bei  $30^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde eine Dialyse gegen Puffer L1 bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, um freies Biotin aus der Lösung zu entfernen. Nach erneuter Bestimmung des DOLs und der Proteinmenge wurden Aliquots mittels flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es wurden ausschließlich farbstoffmarkierte Hsp90-Konstrukte biotinyliert.

## 2.6 Konventionelle Fluoreszenzspektroskopie

Puffer M1

Konventionelle Fluoreszenzspektroskopie wurde mit einem FP-6500-Fluoreszenzspektrometer der Firma Jasco mit einer Xenon-Lampe als Lichtquelle, einem Gitter als Monochromator und einem Photomultiplier als Detektor durchgeführt. Zur Temperaturkontrolle ist ein Peltier-Element (PCT-163T, Jasco) gekoppelt. Die Steuerung erfolgt über die Jasco-Software Spectra Manager, Langzeitaufnahmen wurden mit einer Integrationszeit von 1 s aufgezeichnet. Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden farbstoffspezifisch gewählt. 150 nM des farbstoffmarkierten Hsp90 Konstrukts wurden mit 5  $\mu$ M nicht markiertem Wildtyp-Hsp90 (WT) oder Mutanten-Hsp90 für 30 min bei RT bzw. 1 h bei 37°C im Falle von *coiled-coil*-Konstrukten vorinkubiert. Auf diese Weise wurde ein Untereinheitenaustausch forciert, um doppelt markierte Hsp90-Dimere zu vermeiden. Dafür wurde Puffer M1 zusätzlich mit 0,3 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich) und 0,05 % Tween20 (Sigma-Aldrich) versetzt, um unspezifische Proteininteraktionen mit der Glasoberfläche der für die Messung verwendeten Quartzglasküvette zu unterdrücken. Fluoreszenzintensitätszeitmessungen wurden bei 25°C vor und nach der Zugabe von 2 mM des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PNP (A2647, Sigma-Aldrich), das den Klammerschluss von Hsp90 bewirkt, aufgezeichnet. Die Fluoreszenzintensitätszeitspuren wurden mithilfe der Software OriginPro 2016G exponentiell angenähert. Für das Farbstoffscreening wurden Emissionsspektren des Farbstoffs ohne und mit Tryptophan-Überschuss unter farbstoffspezifischen Einstellungen aufgezeichnet. Dazu wurde 150 nM abreagierter Farbstoff in Puffer M1 mit 0,3 mg/ml BSA und 0,05 % Tween20 ohne und mit 25 mM Tryptophan (AppliChem) verwendet und die Emission auf die reine Farbstoffemission normiert.

## 2.7 ATPase-Assay

ATPase-Assay-Puffer: 40 mM HEPES, 200 mM IS (KCl), pH 7,5, 0,2 mM NADH, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 50 U/ml Pyruvatkinase, 50 U/ml Lactatdehydrogenase, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

Die ATPase-Aktivität von Hsp90-Konstrukten wurde mithilfe eines regenerierenden enzymgekoppelten ATPase-Assays durchgeführt (Panaretou et al. 1998). Das bei der ATP-Hydrolyse entstehende ADP wird von der Pyruvatkinase (P7768, Sigma-Aldrich) verwendet, um Phosphoenolpyruvat (P7127, Sigma-Aldrich) zu Pyruvat und ATP umzusetzen. Pyruvat wird dann unter NADH-Verbrauch (N8129, Sigma-Aldrich) durch die Lactatdehydrogenase (L2625,

Sigma-Aldrich) zu L-Lactat umgesetzt. Die Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm steht in direkter Stöchiometrie zur ADP-Freisetzung durch Hsp90 und wird während der Messung aufgezeichnet. Durch lineare Anpassung der Abnahme des Absorptionssignals und den Zusammenhang

$$\text{ATPase}[\text{min}^{-1}] = - \frac{\frac{dA_{340}[\text{OD}]}{dt}[\frac{\text{OD}}{\text{min}}]}{d \cdot \epsilon_{\text{NADH}} \cdot c_{\text{ATPase}}} \quad (5)$$

kann die ATPase-Aktivität bestimmt werden. Dabei entspricht  $\frac{dA_{340}}{dt}$  der Steigung der Absorptionsänderung,  $d$  der Schichtdicke des Lichtwegs,  $\epsilon_{\text{NADH}}$  dem molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und  $c_{\text{ATPase}}$  der molaren Konzentration der ATPase. ATPase-Assays wurden in Quartzglasküvetten bei 25°C bzw. 37°C an einem V-650 Spektrophotometer mit gekoppeltem Peltier-Element der Firma Jasco und der Software Spectra Manager durchgeführt. Es wurden 5-10  $\mu\text{M}$  Hsp90 in ATPase-Assay-Puffer eingesetzt und direkt vor Start der Messung 2 mM ATP (A6419, Sigma-Aldrich) zugegeben. Um die Hintergrundaktivität zu überprüfen, wurde Hsp90 mit Geldanamycin (Cayman Chemical) inhibiert und die Aktivität gemessen. Dazu wurden vor Messung 5-10  $\mu\text{M}$  Hsp90 mit 150  $\mu\text{M}$  Geldanamycin für 30 min bei RT inkubiert. Die Funktionalität des ATPase-Assays wurde durch Zugabe von 2 mM ADP (A2754, Sigma-Adlrich) und einem damit verbundenen sofortigen Abfall der Absorption durch Simulation eines vollständigen ATP-Verbrauchs überprüft.

## 2.8 Deckgläserpräparation und Flusskammeraufbau

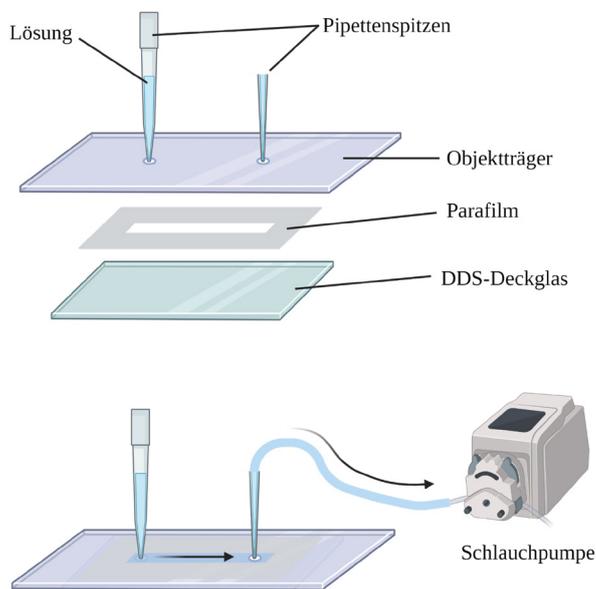
**Deckgläserpräparation.** Für Einzelmolekülmessungen sind saubere Oberflächen, die unspezifische Wechselwirkungen unterdrücken, von essenzieller Wichtigkeit, um das Einzelmolekülsignal spezifisch untersuchen zu können. Dafür wurde ein ursprünglich von Hua et al. 2014 entwickeltes und von Schulze 2017 verkürztes Protokoll zur Herstellung von DDS-Deckgläsern (Dichlordimethylsilan) angewandt.

Zunächst wurden die Präzisionsdeckgläser (High Precision, Marienfeld) in einem Ultraschallbad (S60H Elmasonic, Elma) gereinigt. Waschschritte wurden mit ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Durch Tauschen des Wassers im Ultraschallbad muss die Temperatur unter 50°C gehalten werden, um ein Springen des Färbetrogs zu verhindern. Für die Präparation wurden die Deckgläser in einen Färbetrog überführt, dieser wurde mit 2 % Hellmanex (Hellmanex III, Helma) gefüllt und für 15 min im Ultraschallbad sonifiziert. Im Anschluss wurden die Deckgläser im

Färbetrog dreimal gewaschen. Nach 15 min Sonifizieren in ddH<sub>2</sub>O und dreimaligem Waschen wurde für 15 min in Aceton sonifiziert, bevor einmal mit Ethanol (99,8 %, Sigma-Aldrich) und dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen wurde. Anschließend wurde für 1 h in 1-molarer KOH-Lösung sonifiziert, dreimal gewaschen, nochmals für 15 min in ddH<sub>2</sub>O sonifiziert und wiederum dreimal gewaschen. Danach wurden die Deckgläser mithilfe eines N<sub>2</sub>-Stroms getrocknet und in einen zweiten, zuvor zweimal mit Hexan ( $\geq 96$  %, Chemsolute) gespülten und ebenfalls mit N<sub>2</sub> getrockneten, Färbetrog überführt. Die Glasoberfläche war zu diesem Zeitpunkt angeätzt und verfügte über reaktive O<sup>-</sup>-Gruppen. Im Anschluss wurde die Glasoberfläche mittels Dichlordimethylsilan ( $\geq 98,5$  %, DDS, Sigma-Aldrich) silanisiert. Dabei reagieren die Silanreste mit den O<sup>-</sup>-Gruppen der Glasoberfläche und die Methylreste sorgen für eine hydrophobe, partikelabweisende Oberfläche. Dazu wurden die Deckgläser im frischen Färbetrog zunächst zweimal mit Hexan gewaschen und anschließend mit Hexan bedeckt. Dann wurden ca. 50-100  $\mu$ l Dichlordimethylsilan über eine Spritze mit Kanüle in die Lösung gegeben. Da DDS bei Luftfeuchtigkeit sehr reaktiv ist, musste zügig vorgegangen und die Kanüle in das Hexan eingetaucht werden. Die Deckgläser wurden im geschlossenen Färbetrog für 1,5 h unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, bevor die Lösung verworfen wurde und die Deckgläser zweimal in Hexan für jeweils 1 min sonifiziert wurden. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Deckgläser wurden im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet, einzeln in 50 ml Falcons verpackt, diese zusätzlich mit Parafilm verschlossen, in Tütchen vakuumiert und bei -20°C gelagert. Sobald die Qualität der Deckgläser nachließ, spätestens aber nach zwei Monaten, mussten diese ersetzt werden.

**Flusskammeraufbau.** Die Untersuchung der einzelnen Hsp90-Moleküle wurde mit Flusskammern und einer daran angeschlossenen Schlauchpumpe (MS-Reglo, Ismatec) ermöglicht. Die Flusskammern sind nach Joo und Ha 2012 bzw. Schulze 2017 aufgebaut und wurden vor jeder Messung neu assembliert. Im Wesentlichen bestehen sie aus einem Objektträger mit zwei im Abstand von 3 cm gebohrten Löchern. In diesen sind zwei Pipettenspitzen als Zu- und Abfluss befestigt, eine davon verfügt außerdem über einen Luerlock. Ein frisches DDS-Deckglas bildet den Boden der Kammer. Zwischen Objektträger und Deckglas wurde ein Stück Parafilm mit entsprechender Aussparung, die die beiden Löcher des Objektträgers verbindet, platziert. Die Kammer wurde anschließend für 1 min auf 70°C erhitzt (Leica, HI 1220), um den Parafilm leicht anzuschmelzen und so die Flusskammer zu versiegeln. Nach 10-minütigem Abkühlen konnten über Zu- und Abfluss sowie die am Luerlock angeschlossene Schlauchpumpe Lösungen in der Kammer

kontrolliert ausgetauscht werden. In Abbildung 2-2 ist der Aufbau der Flusskammer schematisch skizziert.



**Abbildung 2-2: Flusskammer-Schemazeichnung.** Oben: Gezeigt ist eine Explosionszeichnung der verwendeten Flusskammern. Der Objektträger ist blau dargestellt, das DDS-Deckglas grün und der dazwischenliegende Parafilm, dessen Aussparung die beiden Pipettenspitzen des Objektträgers verbindet und so die Flusskammer bildet, ist in grau dargestellt. Unten: Assemblierte Flusskammer mit durch die Schlauchpumpe erzeugter Flussrichtung. Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

## 2.9 Experimenteller Zweifarbeneinzelmolekül-Aufbau

Die Zweifarbeneinzelmolekül-Mikroskopie wurde an einem selbstgebauten Aufbau durchgeführt (Nerreter et al. 2019). Im Wesentlichen besteht der Aufbau aus einem inversen Weitfeldfluoreszenzmikroskop (IX-71, Olympus) mit einem Ölimmersionsobjektiv (Apo N 60x, 1,49 NA, Olympus) und einem Nosepiece (IX2, Olympus) zur Driftreduktion. Zur Anregung kamen Laser der Wellenlängen 488 nm (Diode iBeam smart, Toptica Photonics), 514 nm (Genesis, MX, Coherent), 561 nm (Genesis, MX, Coherent) sowie 640 nm (Genesis, MX, Coherent) mit passenden Cleanup-Filtern (CL1: HC 488/10, Semrock, CL2: ZET 514/10, Chroma, CL3: HC 561/14, Semrock, CL4: HC 642/10, Semrock) auf der optischen Achse aliniert und über flexible Strahlaufweiter auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert zum Einsatz, wodurch eine Weitfeldausleuchtung entsteht (EPI). Das flexible Strahlaufweisersystem erlaubt über dessen Verschiebung entlang der optischen Achse außerdem TIRF- und HILO-Anregungsmodi (engl.: total internal reflection fluorescence, highly inclined and laminated optical sheet). Das Anregungslicht wurde durch einen Dichroiten (zt405/514/635rpc, Chroma, ff410/504/582/559, Semrock, HC Tripleband 403/497/574, Semrock, HC Tripleband 425/532/565, Semrock) vom Emissionslicht getrennt, das Emissionslicht wurde im Inneren des Mikroskops zusätzlich durch einen Bandpass

Filter (Yokogawa 442/514/647, Semrock, ff01-433/517/613, Semrock) gefiltert. Der Emissionspfad war mit einem Dual-Kamera-Adapter (TuCam, Andor) ausgestattet, der die Emission mit einem Langpassfilter (ST, Edge Basic 635 longpass, Semrock) bzw. zwei Bandpassfiltern (DF 697/41, Semrock, DF 582/75, Semrock, ET 525/50, Chroma, ff01-607/70, Semrock, RazorEdge 647, Semrock) aufteilt. Das Emissionssignal wurde von zwei EMCCD-Kameras (iXON Ultra 897, Andor) detektiert. Der Aufbau verfügte außerdem über eine Master-Slave-Konfiguration, worüber die gleichzeitige Aufzeichnung beider Kameras getriggert werden konnte.

## 2.10 Ein- und Zweifarben-Einzelmolekül-Datenaufnahme

### **Probenvorbereitung.**

Puffer M2: 50 mM Phosphat, 200 mM IS (KCl), pH 7,5 + 10 mM MgCl<sub>2</sub>

In Vorbereitung der Ein- bzw. Zweifarben-Einzelmolekül-Messungen mussten zunächst heterodimere Hsp90-Moleküle generiert werden, um entweder nur eine farbstoffmarkierte Untereinheit (im Falle des Farbstoffscreenings) oder zwei unterschiedlich markierte Untereinheiten pro Hsp90-Dimer sicherzustellen. Für Einfarben-Untersuchungen wurden 100 pM, 500 pM bzw. 1 nM der A2C-fluoreszenzmarkierten Untereinheit mit jeweils 1 µM der nicht markierten Untereinheit (WZB1 oder WZA2) für 1 h bei 37°C abgedunkelt in Puffer M2 inkubiert. Durch das Design der Hsp90-Konstrukte tragen dabei die miteinander auszutauschenden Hsp90-Proteine jeweils entweder das WZB1- oder das WZA2-*coiled-coil*. Da die Ausbildung des WZB1A2-hetero-*coiled-coils* gegenüber den Homo-*coiled-coils* (WZB1, WZA2) bevorzugt ist (Arndt et al. 2002), wird auch der Austausch der markierten mit der nicht-markierten Untereinheit forciert. Für Zweifarben-Untersuchungen wurden zwei Ansätze mit je 100 nM der unterschiedlich markierten Untereinheiten inkubiert, wobei hier die gesamte Proteinmenge (auch nicht markierte Proteine) ausschlaggebend war. Je nach DOL der Konstrukte – dieser sollte mindestens bei 40-50 % liegen – wurden neben 1:1 auch 2:1 Verhältnisse gewählt, um in etwa die gleiche Menge rot-markierter und grün-markierter Moleküle zu erreichen. Im Fall der Konstrukte ohne *coiled-coil*-Motiv wurden je 1 µM miteinander inkubiert. Im Vergleich zu Einfarben-Messungen musste höhermolar inkubiert werden, da keine Untereinheit im Überschuss zugegeben werden konnte. Nach der Inkubation wurde zu einem der

beiden Ansätze die equimolare Menge Neutravidin (31000, ThermoFisher) zugegen und für 5 min abgedunkelt bei RT inkubiert.

### **Immobilisierung.**

Puffer T50: 20 mM Tris, pH 8,0

Puffer M2

Die unter Abschnitt 2.8 beschriebene Flusskammer wurde nach der Probeninkubation für die Immobilisierung nach einem Protokoll von Hua et al. 2014 verwendet. Dabei ist von einer Überlegenheit der Kombination aus DDS-Deckgläsern und Tween20 als Passivierungsschicht im Vergleich zur häufig verwendeten Methode über PEG (Polyethylenglykol) berichtet worden, bei gleichzeitig niedrigeren Kosten (Hua et al. 2014). Die eingespülten Probenvolumina entsprachen jeweils 250  $\mu$ l. Die Immobilisierung wurde bereits auf dem Mikroskopaufbau durchgeführt, um eine direkte optische Kontrolle zu ermöglichen. In einem ersten Schritt wurde nach Wässern der Kammer mit Puffer T50 0,2 mg/ml BSA-Biotin (A8549, Sigma-Aldrich) in Puffer T50 appliziert und für 5 min bei RT inkubiert, die BSA-Biotin-Moleküle adsorbierten dabei unspezifisch an die DDS-Glasoberfläche. Anschließend wurde mit Puffer T50 gewaschen, 0,2 % Tween20 in Puffer T50 appliziert und für 10 min bei RT inkubiert. Tween20 selbstassemblierte dabei zwischen die BSA-Biotin Moleküle auf der gereinigten DDS-Deckglasoberfläche und bildete eine effiziente Passivierungsschicht. Nach Waschen mit Puffer T50 wurde durch zwei- bis dreimaliges Waschen auf Puffer M2 gewechselt. Anschließend wurde ein Spezifitätstest der Oberfläche durchgeführt, indem eine 1 nM-Lösung farbstoffmarkierter Hsp90-Moleküle in die Flusskammer appliziert wurde. Bei Zweifarben-Experimenten war darauf zu achten, dass der Ansatz ohne Neutravidin verwendet wurde. Hierbei sollte keine wesentliche Bindung von Molekülen auf die Oberfläche erfolgen, da mit Neutravidin das spezifische Verankerungsprotein für die biotinylierten Hsp90-Konstrukte fehlt. Unspezifische Wechselwirkungen hingegen sollten durch die Passivierungsschicht unterdrückt werden (Hua et al. 2014). Nach Spülen mit Puffer M2 wurde bei Einfarben-Experimenten 0,2 mg/ml Neutravidin in Puffer M2 eingespült und für 5 min inkubiert, bevor nach erneutem Waschen mit Puffer M2 der 100 pM-Ansatz appliziert wurde. Die Dichte der Einzelmoleküloberfläche konnte anschließend über den 500 pM- und 1 nM-Ansatz erhöht werden. Bei Zweifarben-Experimenten wurde der Ansatz mit Neutravidin zunächst herunterverdünnt und 100 pM bis 500 pM appliziert. Anschließend wurden lediglich die noch freien BSA-Biotin-Moleküle über 0,2 mg/ml Neutravidin

in Puffer M2 abgesättigt (5 min RT). Damit war die Immobilisierung abgeschlossen und es konnte mit der Datenaufnahme begonnen werden.

**Datenaufnahme.** Für Einfarben-Experimente wurde Puffer M2 im Zuge des Farbstoffscreenings mit verschiedenen Zusätzen versetzt:

Puffer M2-glucox:	+ 1 % Glucose (Sigma-Aldrich)
Puffer M2-TX:	+ 2 mM Trolox
Puffer M2-glucox-TX:	+ 1 % Glucose + 2 mM Trolox

Dafür wurde im Vorfeld eine frische Trolox-Stammlösung in Puffer M1 angesetzt, dazu wurde eine 12 mM Trolox-Lösung (Sigma-Aldrich, TX) hergestellt, durch einen 0,2 µm Filter filtriert und für ca. 18 h unter Lichteinfluss drehend inkubiert. Alternativ wurde das frisch gelöste Trolox für 5-6 min auf einen UV-Transilluminator gelegt. Das Vitamin E-Derivat wird jeweils durch die UV-Strahlung teilweise in eine Chinon-Form (engl.: Quinone, TQ) umgewandelt und es entsteht ein ROXS-System aus TX und TQ, das photostabilisierende Eigenschaften gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen zeigen kann (Cordes et al. 2009; Vogelsang et al. 2008). Die Menge gebildeten TQs kann photometrisch über die Absorption bei 255 nm bestimmt werden und wurde auf 150-200 µM eingestellt, sodass eine ausreichende Menge Oxidationsmittel (TQ) vorhanden war, das Reduktionsmittel (TX) aber im Überschuss vorlag (Cordes et al. 2009).

Es wurden bis zu 10-minütige Zeitserien mit einer Größe von 512x512 Pixeln bei unterschiedlichen Anregungslaserleistungsdichten (ca. 0,003-0,020 kW/cm<sup>2</sup>, EPI) und Integrationszeiten (0,2-1 s) im TIRF-Anregungsmodus und Raumtemperatur aufgezeichnet. Für die verschiedenen Bedingungen wurden die entsprechenden Puffer, die zuvor mit 1 µM des in den Hsp90-Ansätzen im Überschuss zugegebenen Hsp90-Konstrukts versetzt wurden, appliziert. Damit wird sichergestellt, dass sich eventuell lösende Heterodimere schnell wieder ausbilden. Die Puffer M2-glucox und M2-glucox-TX wurden 5 min vor Applikation mit 2,5 U Glukose-Oxidase (G2133-50KU, Sigma-Aldrich) und 60 U Katalase (C100, Sigma-Aldrich) versetzt, um der Lösung den Sauerstoff zu entziehen (Benesch und Benesch 1953).

Für Zweifarben-Experimente mussten die beiden Kanäle zunächst aliniert werden. Dazu wurde analog zu Niekamp et al. 2019 eine wiederverwendbare Flusskammer mit Tetraspecks (0,1 µm, T7279, ThermoFisher) benutzt, diese wurde dazu mit 100 µg/ml Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich) für 1 h bei RT inkubiert und so beschichtet. Anschließend wurde sie trockengezogen und zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor eine 1:100-Verdünnung der Tetraspecks in PIPES-Puffer

(80 mM PIPES, pH 6,8, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) appliziert und 5 min bei RT inkubiert wurde. Nach Waschen mit PIPES-Puffer war die Tetraspeck-Flusskammer fertig. Mithilfe dieser Tetraspecks wurden dann die Kanäle aliniert. Dazu konnte die Position des Strahlteilers des Dual-Kamera-Adapters im Emissionspfad (vgl. Abschnitt 2.9) in x- und y-Richtung verändert werden, bis derselbe Tetraspeck in beiden Kameras an identischer Position abgebildet wurde.

Für Zweifarben-Experimente wurde Puffer M2-glucox-TX verwendet. Es wurden ebenfalls TIRF-Illumination, verschiedene Anregungslaserleistungsdichten (0,003-0,020 kW/cm<sup>2</sup>, EPI) und Integrationszeiten (0,2-0,5 s) verwendet und mehrminütige Zeitserien mit 512x512 Pixeln bei Raumtemperatur aufgezeichnet. Außerdem wurden beide Kameras verwendet und deren Aufnahme durch die Master-Slave-Konfiguration gleichzeitig ausgelöst, sodass durch Aufnahme start der Kamera im roten Kanal die Aufnahme der Kamera im grünen Kanal automatisch gestartet wurde. Messungen ohne ATP konnten nach Applikation von Puffer M2-glucox-TX, der analog zu Einfarben-Messungen 5 min zuvor mit Glukose-Oxidase und Katalase versetzt wurde, direkt gestartet werden. Zwischen den Messungen wurde der Bildausschnitt (engl.: field of view, FOV) über den Mikroskopisch gewechselt, um photogeblichte Hsp90-Moleküle nicht erneut aufzuzeichnen. Für Messungen mit ATP wurde Puffer M2-glucox-TX zusätzlich zu Glukose-Oxidase und Katalase mit 4 mM ATP versetzt. Hier wurde die Applikation schrittweise vor jeder Messung durchgeführt, um während der Aufnahme eine ausreichende Menge ATP in der Lösung sicherzustellen. Auch hier wurde das FOV nach jeder Aufnahme gewechselt. Bei allen Aufnahmen wurde darauf geachtet, das FOV durch die im Strahlengang platzierte Blende zu begrenzen, um ein Photobleichen der nicht aufzeichneten Bildausschnitte zu vermeiden.

**Tetraspeckaufnahme.** Für Zweifarben-Messungen ist es nötig, Referenzpunkte aufzunehmen, die in beiden Kanälen fluoreszieren. Damit können während der Datenanalyse optische Ungleichheiten in beiden Kanälen herausgerechnet werden. Werden die Tetraspecks in einer anderen Ebene aufgenommen als die Hsp90-Moleküle, kann die Überlagerung der beiden Kanäle während der Datenanalyse beeinträchtigt werden; um das zu verhindern, wurden die Tetraspecks nach der letzten Messung direkt in die Flusskammer appliziert. Tetraspecks sind mit verschiedenen Farbstoffen gefüllte Nanosphären, die dadurch in mehreren Kanälen fluoreszieren und gleichzeitig extrem hell sind, weshalb die Aufnahme derselben in der für die Messungen verwendeten Kammer problemlos möglich ist. Es wurden 3-10 Aufnahmen verschiedener FOVs bei einer passenden

Anregungslaserleistungsdichte und mit verkürzter Integrationszeit (0,02 s) aufgezeichnet.

## 2.11 Datenanalyse

Die aufgezeichneten Datensätze wurden auf verschiedene Arten analysiert. In einem ersten Schritt wurde die frei verfügbare Software *rapidSTORM* (Wolter et al. 2012) verwendet. In Einfarben-Datensätzen wurde das ausgegebene Textfile verwendet, um die Anzahl an Lokalisationen, die im Optimalfall der Anzahl immobilisierter Hsp90-Moleküle des aufgenommenen Bildausschnitts entspricht, über den zeitlichen Verlauf der Zeitserie zu extrahieren. Ein Schwellenwert (engl.: Threshold) von 400 ADC (engl.: AD counts) wurde verwendet, um Hintergrundsignale zu minimieren. In Zweifarben-Datensätzen wurden die rekonstruierten Bilder beider Kanäle für die weitere Analyse verwendet. Dabei wurde für rote Farbstoffe ein FWHM (engl.: full width half maximum) von 360 nm und für grüne Farbstoffe von 330 nm verwendet und die Bildauflösung auf 50 nm/px gesetzt. Es wurde der gleiche Schwellenwert wie für Einfarben-Daten verwendet, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Aufnahmen aus dem grünen Kanal werden zum roten Kanal horizontal gespiegelt aufgenommen, weshalb diese für die weitere Verarbeitung stets horizontal gespiegelt werden müssen.

### 2.11.1 Elastische Transformation beider Kanäle und Auslesen der Intensitäten

Die Zeitserien der beiden Kanäle aus Zweifarben-Experimenten mussten zuerst überlagert werden, um kolokalisierende Fluoreszenzpunkte und damit heterodimer markierte Hsp90-Moleküle zu identifizieren. Dafür wurde wie in Schulze 2017 vorgegangen und es wurden die unter Abschnitt 2.11 rekonstruierten Bilder sowie die unter Abschnitt 2.10 beschriebenen Aufnahmen der Tetraspecks verwendet. Mithilfe der frei verfügbaren Bildbearbeitungssoftware ImageJ bzw. deren Distribution Fiji (Schindelin et al. 2012) und dem darin enthaltenen Plugin BUnwarpJ (Arganda-Carreras et al. 2006) wurde aus mit *rapidSTORM* errechneten Bildern der Tetraspecks (Threshold: 1000 ADC) aus beiden Kanälen eine elastische Transformationsmatrix erstellt. Wird die Matrix anschließend auf die rekonstruierten Bilder der Zweifarben-Hsp90-Aufnahmen angewandt, werden die Unterschiede in den optischen Systemen der beiden Kanäle herausgerechnet und die beiden rekonstruierten bzw. transformierten Bilder können überlagert werden.

Dabei wurde der Registrierungsmodus auf Mono gesetzt, sodass nur das *Source*-Bild auf das fixierte *Target*-Bild transformiert wird. Hierbei ist es essenziell, dass bei der Erstellung und Anwendung der Transformationsmatrix derselbe Kanal (rot/grün) als *Source* bzw. *Target* verwendet wird. Auf dem überlagerten Bild wurden anschließend kolokalisierende Fluoreszenzmoleküle über quadratische ROIs (engl.: region of interest) markiert und über den ROI-Manager in Fiji gespeichert. Da das rekonstruierte Bild keine Zeitserie mehr darstellt, mussten die ROIs in einem nächsten Schritt auf die Zeitserien übertragen werden. Im Fall des *Target*-Kanals konnte das .tiff-File dazu einfach auf die Größe des rekonstruierten Bildes vergrößert und die ROIs direkt übertragen werden, im *Source*-Kanal hingegen ist das wegen der durch die Transformation veränderten Größe des Kolokalisationsbildes im Vergleich zum .tiff-File nicht möglich. Hier musste das .tiff-File auf die Größe des untransformierten rekonstruierten Bildes vergrößert und die ROIs manuell unter Vorlage des Kolokalisationsbildes auf die entsprechenden Fluoreszenzpunkte verschoben werden. Dann konnten über das Multi-Measure-Werkzeug die minimalen und maximalen Grauwerte bzw. Intensitätswerte der einzelnen ROIs über die Zeitserie hinweg ausgelesen und anschließend als .tsv-File gespeichert werden. Aufgrund der mittels Master-Slave-Konfiguration gestarteten Aufnahmemodus (siehe Abschnitt 2.10) entsprach das erste Bild der Zeitserie im roten Kanal dem zweiten Bild der Zeitserie im grünen Kanal. Daher musste jeweils das erste Bild im grünen und das letzte Bild im roten Kanal entfernt werden.

### 2.11.2 Python Code

Die im .tsv-File gespeicherten Intensitätswerte mussten in einer geeigneten Weise verarbeitet und analysiert werden. Dafür wurde ein selbstgeschriebener Code mit der Bezeichnung *2CsmPET* (two-color single-molecule PET) in der Programmiersprache Python entwickelt und verwendet. Das Skript wurde in Python 3 geschrieben und wurde mit Python 3.8 ausgeführt. Unter anderem wurden numpy, matplotlib, scipy und das von Thomas Kahn entwickelte und auf Github veröffentlichte Modul step\_detect (thomasbkahn/step-detect) verwendet, eine genaue Beschreibung der Arbeitsweise des Python Skripts erfolgt unter Abschnitt 3.5. Um das Skript nutzen zu können, war es notwendig, die Intensitätswerte in einem Textfile mit einem Leerzeichen als Trennzeichen zu speichern, was mithilfe der OriginPro 2016G-Software bewerkstelligt wurde. Anschließend wurde das Skript gestartet und die beiden Textfiles, die die Intensitätszeitspuren aus rotem und grünem Kanal repräsentieren, wurden geladen.

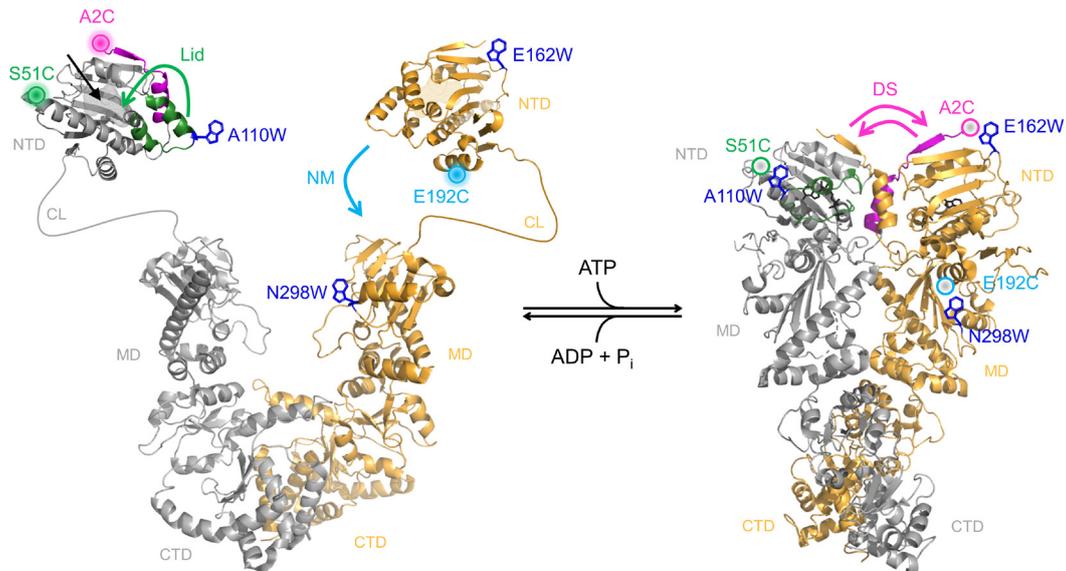
Während das Skript lief, wurden dem Nutzer die Intensitätsspektren und deren Analyse für die einzelnen heterodimeren Hsp90-Moleküle präsentiert und mussten von diesem bestätigt werden. Das Skript speicherte die analysierten Daten am Ende als .csv-File. Diese wurden anschließend mit Origin2016G weiter ausgewertet, indem die Kinetik-Daten (vgl. dazu Abschnitt 3) beider Kanäle über kumulative Summenplots dargestellt und über exponentielle Annäherung Zeitkonstanten ermittelt wurden (vgl. Abschnitt 3.6).

### **3 Ergebnisse**

Teile der Ergebnisse in diesem Kapitel sind in einem Manuskript enthalten, das zur Begutachtung eingereicht wurde. Abbildungen sind teilweise daraus übernommen oder abgeändert worden.

#### **3.1 Hsp90-PET-Fluoreszenzreporter-Konstrukte für die Einzelmolekülspektroskopie**

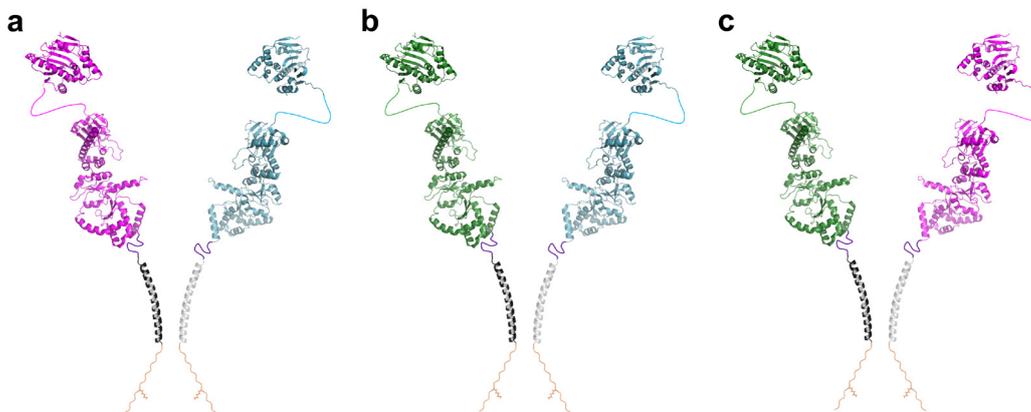
Die unter Abschnitt 2.4 gelisteten Hsp90-Proteinkonstrukte entsprechen zu Teilen denen aus Schulze 2017 und sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden. Dazu bilden die Hsp90-Punktmutanten mit eingebrachtem Tryptophan und Cystein, das mit einem Farbstoff markiert ist, die PET-Fluoreszenzreporter aus Schulze et al. 2016 aus. Das Reportersystem für den Domänenwechsel (DS) ist über beide Hsp90 Monomere verteilt und setzt sich aus der Cystein-Mutante A2C und der Tryptophan-Mutante E162W zusammen. Der Reporter für Lid-Schluss (Lid) und die Assoziation von NTD und MD (NM) ist jeweils in einer Untereinheit lokalisiert, sodass die Dynamiken über die Mutanten S51C-A110W bzw. E192C-N298W verfolgt werden (Schulze et al. 2016). Die Reportersysteme und die lokalen Konformationsdynamiken, die sie beobachtbar machen, sind in Abbildung 3-1 veranschaulicht.



**Abbildung 3-1: PET-Fluoreszenzreportersysteme des Hsp90-Chaperons.** Mithilfe kristallographischer Daten erstelltes Modell des Hsp90-Dimers in offener Konformation (*links*, PDB: 2cge & 1am1) und in durch ATP-Bindung eingenommenem geschlossenem Zustand (*rechts*, PDB: 2cg9), der unter ADP und  $P_i$ -Freisetzung nach ATP-Hydrolyse wieder in die offene Konformation übergeht. Die analog zu Schulze et al. 2016 verwendeten PET-Fluoreszenzreporter und die von ihnen wiedergegebenen lokalen Dynamiken sind farblich kodiert (magenta = DS, grün = Lid, cyan = NM). Im offenen Zustand fluoreszieren die Farbstoffe an ihren jeweiligen Positionen, geht das Chaperon hingegen in seinen geschlossenen Zustand über, wird die Farbstofffluoreszenz über das entsprechende Tryptophan über PET effektiv gelöscht. Die leere ATP-Bindetasche ist *links* durch einen Pfeil angezeigt, *rechts* ist das gebundene Nukleotid AMP-PNP in schwarz dargestellt. NTD, CL, MD sowie CTD sind ausgewiesen.

Auf die Einzelmolekülkonstrukte sind die PET-Reporter wie nachfolgend beschrieben angewandt: Durch die verwendeten *coiled-coil*-Motive am C-Terminus wird die Ausbildung von heterodimeren Hsp90-Molekülen forciert (vgl. Abschnitt 2.10), worüber die Bildung der Hsp90-Heterodimere gesteuert werden kann. Zwischen dem Hsp90-C-Terminus und dem *coiled-coil*-Motiv soll ein flexibler GS-reicher Linker für die Nichtbeeinflussung der nativen Dimerisierungsstelle des Chaperons sorgen. Die Konstrukte wurden so designt, dass sich auf jeder Untereinheit ein PET-Fluoreszenzreportersystem befindet. Die Konstrukte E162W-S51C-A110W-WZB1 Avi bzw. E162W-E192C-N298W-WZA2 Avi bilden zusammen mit A2C-WZA2 Avi bzw. A2C-WZB1 Avi den Domänenwechsel in Kombination mit dem Lid-Schluss (DS + Lid) bzw. mit Assoziation von NTD und MD (DS + NM) aus. Die Konstrukte

S51C-A110W-WZB1 Avi und E192C-N298W-WZA2 Avi bilden die Kombination aus Lid-Schluss und NTD-MD-Assoziation (Lid + NM) (Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Ausbildung verschiedener Heterodimere für die einzelmolekülspektroskopische Untersuchung zweier lokaler Konformationsdynamiken.** Die PET-Reporter zur Beobachtung der verschiedenen lokalen Dynamiken aus Abbildung 3-1 sind hier vereinfacht durch die Farbkodierung der Untereinheiten dargestellt (magenta = DS, grün = Lid, cyan = NM). Aus Übersichtlichkeit sind die Untereinheiten nicht-assoziiert dargestellt. Zusätzlich sind hier die einzelmolekülspezifischen Modifikationen gezeigt: GS-Linker (lila), daran anschließend entweder das *coiled-coil* WZB1 (schwarz) oder WZA2 (hellgrau), gefolgt von der Avitag-Sequenz (orange). Aus Übersichtlichkeitsgründen ist anstelle des übertragenen Biotins nur das Lysin, auf welches das Biotin übertragen wird, hervorgehoben. Über die Forcierung des Hetero-*coiled-coils* WZB1A2 kann die Ausbildung von Hsp90-Heterodimeren gesteuert werden und so können Kombinationen aus den PET-Reportern DS und NM (a), Lid und NM (b) sowie Lid und DS (c) gebildet werden.

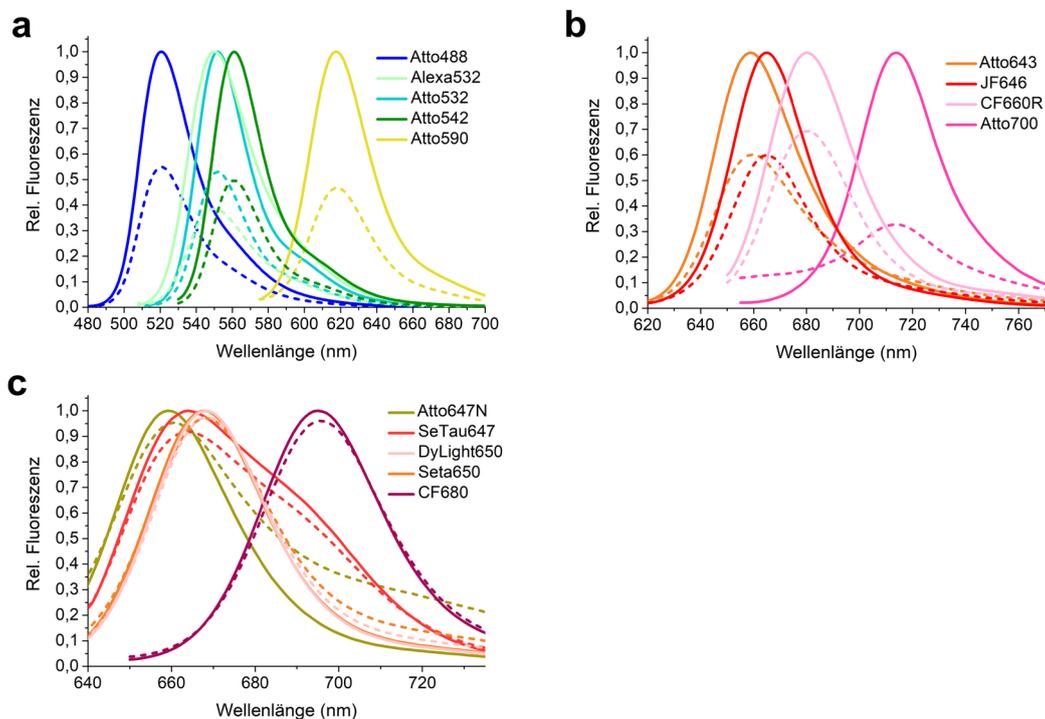
Darüber hinaus wurde das Konstrukt A2W-E192C-N298W-WZA2 Avi als Modifikation des NM-Assoziationskonstrukts verwendet. Die Konstrukte S51C-A110W Avi und E192C-N298W Avi stellen Einzelmolekülkonstrukte der jeweiligen Reporter dar, bei welchen das *coiled-coil*-Motiv entfernt wurde und stattdessen die permanente Dimerisierung über das Ausnutzen der Biotin-Neutravidin-Biochemie erreicht werden sollte (vgl. Abschnitt 3.4.1). Die Proteine S51C-WZB1 Avi und E192C-WZA2 Avi wurden zusammen mit A2C-WZA2 Avi bzw. A2C-WZB1 Avi als Kontrollkonstrukte der verschiedenen Reportersysteme verwendet, denen das zugehörige Tryptophan fehlt. Die Konstrukte WZB1 und WZA2 stellen nicht farbstoffmarkierte Hsp90-Moleküle dar, die für Einfarben-Experimente im Überschuss verwendet wurden. Sie sind nicht mit einem Biotin markiert.

### 3.2 Sukzessive Farbstoffselektion für Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Experimente

Zunächst wurde ein umfangreiches Farbstoffscreening durchgeführt, um zwei geeignete Fluoreszenzfarbstoffe für die bildgebende Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie zu finden. Dabei wurden der etablierte PET-Fluoreszenzfarbstoff AttoOxa11 (Neuweiler et al. 2009; Neuweiler et al. 2010; Ries et al. 2014; Schulze et al. 2016; Mercier et al. 2019; Heiby et al. 2019) und weitere kommerziell erhältliche Farbstoffe auf ihr Potential als PET-Fluoreszenzsonde vergleichend untersucht. Folgende Farbstoffe waren Gegenstand des Screenings: Atto488, Alexa532, Atto532, Atto542, Atto590, Atto643, JaneliaFluor646 (JF646), Atto647N, SeTau647, DyLight650, Seta650, AttoOxa11, CF660R, CF680, Atto700.

#### 3.2.1 Löschung durch Tryptophan via PET

Zuerst wurde die Löscharkeit der Farbstoffe durch Tryptophan über PET als unbedingte Voraussetzung der Methode untersucht. Die Löscheffizienzen sind in Abbildung 3-3 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 3-3: Löschung der Fluoreszenzfarbstoffe durch Tryptophan.** In (a) und (b) sind nach Wellenlänge sortiert Farbstoffe mit ausreichenden Löscheffizienzen gezeigt, in (c) hingegen Farbstoffe, deren Fluoreszenzemission durch Tryptophan kaum oder nicht

gelöscht ist. Kontinuierliche Linien repräsentieren die Fluoreszenzemission ohne, unterbrochene Linien mit 25 mM Tryptophan.

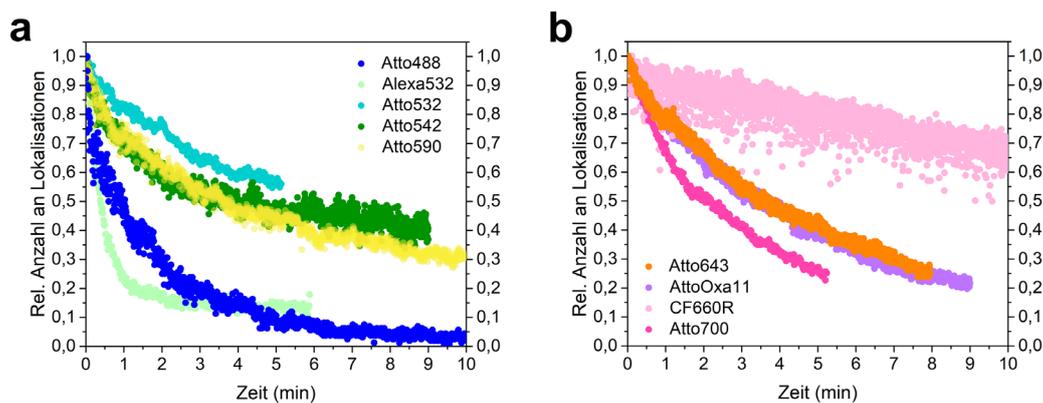
Es wurden Löscheffizienzen zwischen 3 % und 67 % beobachtet, AttoOxa11 wird durch Tryptophan zu ca. 80 % gelöscht (persönliche Unterredung mit Dr. Hannes Neuweiler). Die Farbstoffe in Abbildung 3-3 (c) zeigen sehr geringe bis keine Löschung durch Tryptophan. In den Löschexperimenten ist die Ausbildung des nicht-fluoreszierenden Grundzustandskomplexes aus Farbstoff und Tryptophan diffusionsgesteuert und von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Tryptophan abhängig (Doose et al. 2005, 2009). Im biologischen PET-Reporter wird die Ausbildung des Grundzustandskomplex hingegen durch Konformationsänderungen im Protein forciert, was zu effizienterem Löschen führen könnte. Vor diesem Hintergrund wurden nur diejenigen Farbstoffe verworfen, die sehr geringe Löscheffizienzen (< 10 %) zeigten. Darunter fielen Atto647N, SeTau647, DyLight650 und CF680.

### 3.2.2 Photobleichen unter verschiedenen Bedingungen

In einem nächsten Schritt wurden die Farbstoffe mit ausreichender Löschung durch Tryptophan zunächst auf einen Aspekt der Photostabilität, das Photobleichverhalten, hin untersucht. Anders als in Löschexperimenten muss diese Untersuchung unter realen Messbedingungen stattfinden, um eine Aussage über die Eignung der Farbstoffe treffen zu können. Durch die Kombination aus dem molaren Extinktionskoeffizienten sowie der Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe ergeben sich unterschiedliche Emissionsintensitäten bei gleichen Anregungsleistungsdichten. Daher wurde die Emissionsintensität bei allen Farbstoffen ähnlich (minimal) gehalten, um eine spätere Detektion von PET-vermittelten Fluoreszenzfluktuationen zu ermöglichen und im Gegenzug wurde die Anregungsleistungsdichte bzw. Integrationszeit farbstoffabhängig variiert. Durchgeführt wurden die Messungen mit A2C-Hsp90-Proteinen, die mit dem jeweiligen Farbstoff markiert und auf Glasoberflächen immobilisiert wurden. Außerdem wurden verschiedene Pufferbedingungen und deren Auswirkung auf die Bleicheigenschaften der Farbstoffe untersucht. Während der Durchführung zeigte sich, dass ausschließlich Bedingungen mit Sauerstoffentzug für die Aufnahme von Einzelmolekül-PET geeignet sind, weshalb nicht alle Farbstoffe unter allen Bedingungen untersucht wurden. Grund dafür ist das Phänomen DSPO (engl.: Dye-sensitized photo-oxidation, Nakagawa et al. 1977; García und Silva. E 1997;

Reid et al. 2016), durch welches Farbstoffe im Komplex mit Tryptophan dessen Oxidation durch Sauerstoff in der Lösung katalysieren können, als Konsequenz verliert Tryptophan seine Löscheigenschaft. Das Photobleichen der Farbstoffe wurde über die Lokalisationen über die Zeit charakterisiert. Dabei entspricht eine Lokalisation einem fluoreszierenden Molekül, sodass die Abnahme derselben das Photobleichen des Farbstoffs über die Zeit widerspiegelt. Um die Farbstoffe miteinander vergleichen zu können, wurden die Lokalisationen auf die Anfangszahl zum Zeitpunkt  $t=0$  normiert, sodass der Lokalisationsverlust direkt prozentual abgelesen werden kann.

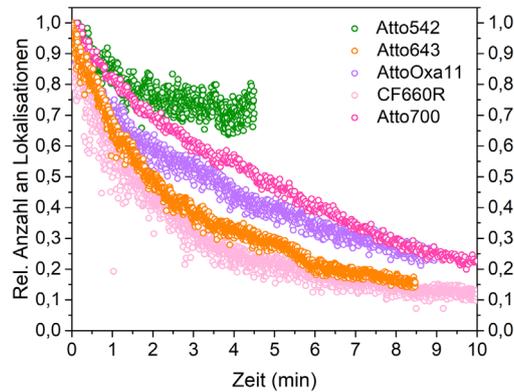
**Sauerstoffhaltiger Puffer.** In Abbildung 3-4 sind die Graphen der Lokalisationen über die Zeit für sauerstoffhaltigen Puffer gezeigt. Aufgrund der zeitlich späteren Untersuchung von JF646 wurde dieser durch Obsoleszenz der sauerstoffhaltigen Bedingung nicht in diesem Puffer gemessen.



**Abbildung 3-4: Lokalisationsverlust der einzelnen Farbstoffe am A2C-Hsp90-Protein über die Zeit unter sauerstoffhaltigen Bedingungen.** Aus Übersichtlichkeitsgründen sind die Farbstoffe dem grünen Kanal (a) und roten Kanal (b) zugeordnet. Es ist jeweils die relative Anzahl an Lokalisationen über die aufgezeichnete Zeitdauer gezeigt.

Die relativen Anzahlen an Lokalisationen zeigen deutliche Unterschiede der verschiedenen Farbstoffe. Bei den Farbstoffen Atto488, Alexa532, Atto643, AttoOxa11 und Atto700 sind innerhalb von  $\sim 3$  Minuten 50 % oder mehr der Moleküle bereits photozerstört, Atto532, Atto542 und Atto590 sind im Vergleich dazu stabiler und erst nach ca. 5 Minuten zur Hälfte gebleicht. CF660R hingegen bleicht innerhalb von 10 Minuten nur zu ca. 30 % und ist damit unter sauerstoffhaltigen Bedingungen unter den untersuchten Farbstoffen der photostabilste.

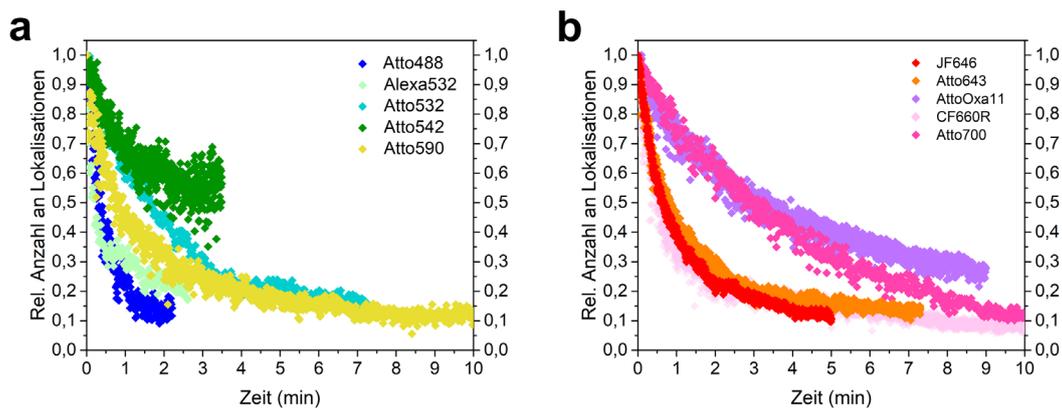
**Sauerstoffhaltiger Puffer mit Antioxidationsmittel (Trolox).** Im Folgenden wurden die Farbstoffe in sauerstoffhaltigem Puffer, der mit dem Antioxidationsmittel Trolox als möglichem Stabilisator versetzt wurde, gemessen (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-5: Lokalisationsverlust der einzelnen Farbstoffe am A2C-Hsp90-Protein über die Zeit in sauerstoffhaltigem Puffer, versetzt mit Trolox.** Es ist die relative Anzahl der Lokalisationen über die Zeitdauer der Aufzeichnung gezeigt.

Der Lokalisationsverlust in Sauerstoff- und Trolox-haltigem Puffer ist für die Farbstoffe Atto542 und Atto700 verringert. Trolox hat hier einen positiven Effekt auf die Photostabilität dieser Farbstoffe, wobei Atto700 dennoch stark bleicht (ca. 80 % nach ~10 min). Die Photostabilität von Atto643 verschlechtert sich in Trolox-haltigem Puffer geringfügig. CF660R zeigt einen deutlichen Unterschied im Vergleich zum sauerstoffhaltigen Puffer ohne Trolox, da hier die Hälfte der sichtbaren Moleküle bereits nach ungefähr einer Minute durch Photozerstörung verloren gehen. Die Photostabilität von AttoOxa11 wird durch Trolox im sauerstoffhaltigen Puffer nicht beeinflusst.

**Sauerstofffreier Puffer.** Da Sauerstoff in Lösung über Zerstörung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems zum Bleichen von Farbstoffen führen kann, wurde dieser in folgenden Messungen enzymatisch entfernt (Gust et al. 2014). Die relativen Anzahlen an Lokalisationen der verschiedenen Farbstoffe über die Zeit sind in Abbildung 3-6 angegeben.

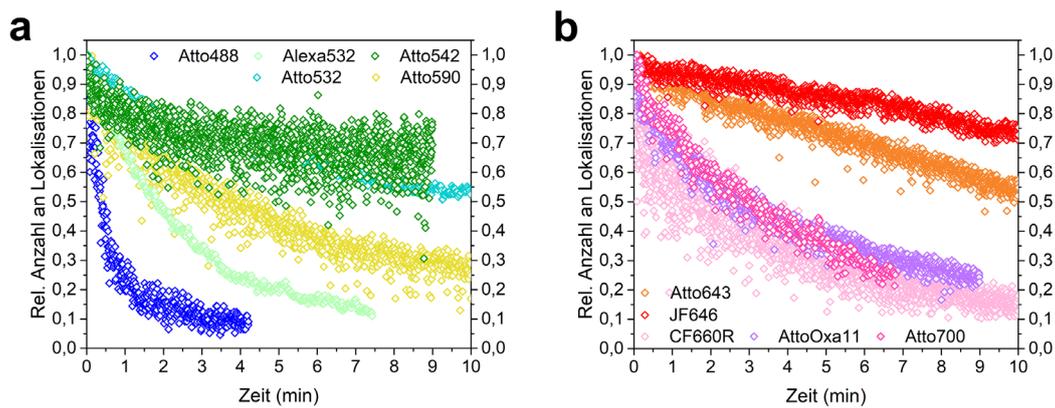


**Abbildung 3-6: Lokalisationsverlust der einzelnen Farbstoffe am A2C-Hsp90-Protein über die Zeit unter sauerstofffreien Bedingungen.** Aus Übersichtlichkeitsgründen sind Farbstoffe dem grünen Kanal (a) und roten Kanal (b) zugeordnet. Es ist jeweils die relative Anzahl an Lokalisationen über die aufgezeichnete Zeitdauer gezeigt.

Unter sauerstofffreien Pufferbedingungen nimmt die Photostabilität der Farbstoffe Atto488, Atto532, Atto590, Atto643 und CF660R im Vergleich zu sauerstoffhaltigen Bedingungen ohne Trolox ab. Eine drastische Verringerung ist für CF660R zu verzeichnen. Alexa532 ist in seiner Photostabilität hingegen kaum beeinflusst. Atto542, AttoOxa11 und Atto700 sind in ihrer Photostabilität geringfügig verbessert und zeigen weniger Bleichereignisse. JF646 zeigt mit mehr als 50 % gebleichten Molekülen nach ca. einer Minute eine geringe Photostabilität unter diesen Bedingungen.

Verglichen mit sauerstoffhaltigem Puffer, der mit Trolox versetzt wurde, ist die Photostabilität von AttoOxa11 geringfügig verbessert, die der Farbstoffe Atto542, Atto643, CF660R und Atto700 hingegen geringfügig verschlechtert.

**Sauerstofffreier Puffer mit Antioxidationsmittel (Trolox).** In einer letzten Bedingung wurde dem Puffer Sauerstoff entzogen und gleichzeitig das Antioxidationsmittel Trolox zugegeben. Diese Kombination soll in der Theorie einerseits Bleichereignisse durch reaktive Sauerstoffspezies mindern. Gleichzeitig soll Trolox die durch Sauerstoffentzug entstehenden transienten Aus-Zustände der Farbstoffe depopulieren (Gust et al. 2014). In Abbildung 3-7 sind die zugehörigen Lokalisationen der Farbstoffe über die Zeit dargestellt.



**Abbildung 3-7: Lokalisationsverlust der einzelnen Farbstoffe am Hsp90-Protein über die Zeit in sauerstofffreiem Puffer, versetzt mit Trolox.** Aus Übersichtlichkeitsgründen sind die Farbstoffe dem grünen Kanal (a) und roten Kanal (b) zugeordnet. Es ist jeweils die relative Anzahl an Lokalisationen über die aufgezeichnete Zeitdauer gezeigt. Der Farbstoff Atto542 wurde am NM-Reportersystem (+Lid) in Hsp90 im *apo*-Zustand aufgezeichnet. Alle anderen Farbstoffe sind gleichbleibend am A2C-Hsp90 gemessen.

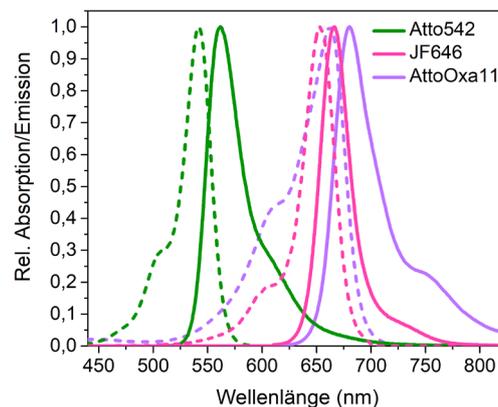
Im Vergleich zu sauerstofffreiem Puffer ohne Trolox-Zugabe ist die Photostabilität der Farbstoffe Alexa532, Atto532, Atto590 und Atto542 hinsichtlich Photozerstörung teilweise deutlich verbessert, wobei Atto542 verglichen mit den anderen Farbstoffen desselben Spektrums mit ca. 25 % nach ~9 Minuten am wenigsten Lokalisationen verliert. Auch Atto532 zeigt unter diesen Bedingungen mit einem Verlust an Lokalisationen von ca. 50 % nach 10 Minuten eine hohe Photostabilität. Die übrigen Farbstoffe verlieren mehr als 50 % ihrer Lokalisationen, Atto488 ist dabei unverändert. Im roten Spektrum wird die zunächst unter sauerstofffreien Bedingungen verschlechterte Stabilität der Farbstoffe Atto643 und CF660R durch Zugabe von Trolox wieder verbessert. Dieser Effekt ist bei Atto643 mit einem Verlust der Lokalisationen von nur ca. 50 % nach 10 Minuten stark ausgeprägt. AttoOxa11 und Atto700 zeigen keine Effekte durch das enthaltene Trolox hinsichtlich ihres Bleichverhaltens. JF646 hingegen steigert durch das Antioxidationsadditiv im Vergleich zum sauerstofffreien Puffer ohne Trolox seine Photostabilität deutlich und zeigt mit einem Lokalisationsverlust von weniger als 30 % das geringste Bleichverhalten aller Farbstoffe im roten Spektrum.

Da aufgrund des DSPO-Phänomens ausschließlich sauerstofffreie Bedingungen für die Auswahl der zwei PET-Fluoreszenzfarbstoffe zu berücksichtigen sind, wird die Photostabilität der Farbstoffe unter sauerstofffreien Bedingungen mit und ohne Trolox betrachtet. Dabei treten die Farbstoffe Atto542 und JF646 als am besten

geeignet hervor. Da AttoOxa11 ein etablierter PET-Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Löscheffizienz ist (Neuweiler et al. 2009; Neuweiler et al. 2010; Ries et al. 2014; Schulze et al. 2016; Heiby et al. 2019; Mercier et al. 2019), wird dieser trotz seines vergleichsweise starken Photobleichens weiter untersucht.

### 3.2.3 Spektrale Eigenschaften

Die zu entwickelnde Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie beruht auf der simultanen Detektion zweier Farbstoffe, weshalb diese spektral unterscheidbar sein müssen. Eine einfach zu implementierende Möglichkeit ist dabei, die Farbstoffe so zu wählen, dass sie durch optische Elemente im Detektionspfad spektral voneinander getrennt werden können. Das wurde durch die Suche eines Farbstoffs im grünen und eines im roten Spektralbereich (roter und grüner Kanal) umgesetzt, deren Emissionsmaxima weit genug auseinanderliegen, um während der Detektion spektral separiert werden zu können. Des Weiteren müssen der Überlapp des Emissionsbereichs des grünen Farbstoffs mit dem Absorptionsbereich des roten Farbstoffs und der damit mögliche Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) berücksichtigt werden. Unter Verwendung der Farbstoffspektren der Hersteller wurden die spektralen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Atto542, JF646 und AttoOxa11 analysiert (Abbildung 3-8). AttoOxa11 stellt ein Derivat des Farbstoffs Atto655 dar, dessen Linker verkürzt ist und wird daher in Abbildung 3-8 durch diesen repräsentiert.

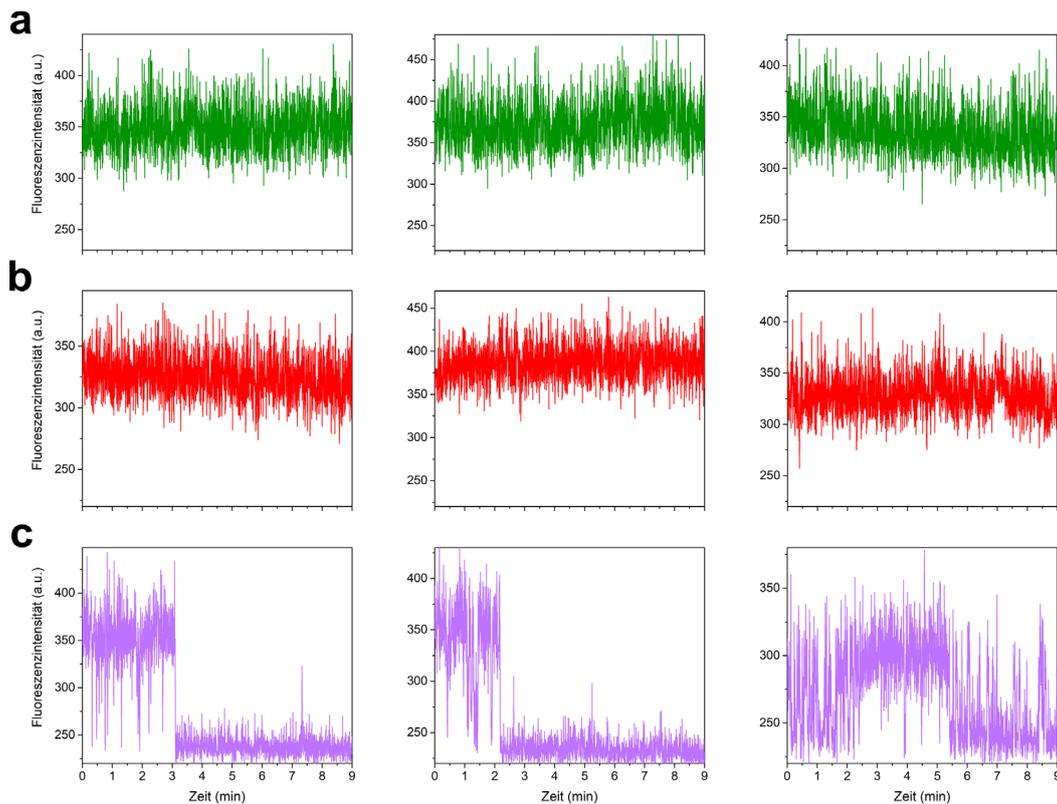


**Abbildung 3-8: Absorptions- und Emissionsspektren der Farbstoffe Atto542, JF646 und Atto655 (AttoOxa11).** Die Abbildung zeigt die Absorptions- (unterbrochene Linien) und Emissionsspektren (kontinuierliche Linien) der Hersteller von den Fluoreszenzfarbstoffen Atto542, JF646 und Atto655 (AttoOxa11).

Die Spektren der Farbstoffe zeigen, dass die jeweiligen Emissionsmaxima sowohl in der Kombination aus Atto542 und JF646 als auch aus Atto542 und AttoOxa11 spektral hinreichend separierbar sind, um durch optische Elemente im Strahlengang des Mikroskopaufbaus getrennt werden zu können. Eine Kombination aus den beiden roten Farbstoffen JF646 und AttoOxa11 lässt dies nicht ohne weiteres zu. Für einen effizienten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen zwei Farbstoffen muss neben anderen Faktoren der spektrale Überlapp von Emissions- und Absorptionsspektrum eines FRET-Paares größer 30 % sein (Bajar et al. 2016). Mit Hilfe des Open-Source-Tools aus Lambert 2019 wurde die spektrale Überlappung zwischen Atto542 als Donorfarbstoff und JF646 bzw. AttoOxa11 als Akzeptorfarbstoff auf ca. 5 % bzw. 12 % geschätzt und liegt damit in beiden Fällen deutlich unterhalb der Grenze für einen effizienten Energietransfer. Damit eignen sich beide Farbstoffpaare in ihren spektralen Eigenschaften zur Verwendung von Zweifarben-Einzelmolekül-PET, auch wenn FRET-Ereignisse nicht gänzlich ausgeschlossen werden können.

### 3.2.4 Analyse von Intensitätsfluktuationen

Neben den photostabilisierenden Effekten auf Fluoreszenzfarbstoffe durch Verminderung von Bleichereignissen kann Sauerstoffentzug auch zu verstärkten Blinkereignissen – einem anderen Aspekt der Photostabilität – führen. Dabei geht der Farbstoff transient in dunkle Aus-Zustände über. Die Zugabe von Trolox als ROXS System (engl.: reducing and oxidizing system) wiederum kann dieses Blinken verhindern (Gust et al. 2014). Für die Auswertung und Analyse von PET-fluoreszenzspektroskopischen Daten ist ein stabiles Emissionsverhalten nötig, weshalb das eventuelle Auftreten von Intensitätsfluktuationen für die Farbstoffe Atto542, JF646 und AttoOxa11 untersucht wurde. Dazu werden einzelne Fluoreszenzintensitätsspurten immobilisierter und markierter Hsp90-Moleküle unter sauerstofffreien Bedingungen, sowie mit Trolox versetzt, betrachtet. Repräsentative Intensitätsspurten der Farbstoffe sind in Abbildung 3-9 dargestellt.



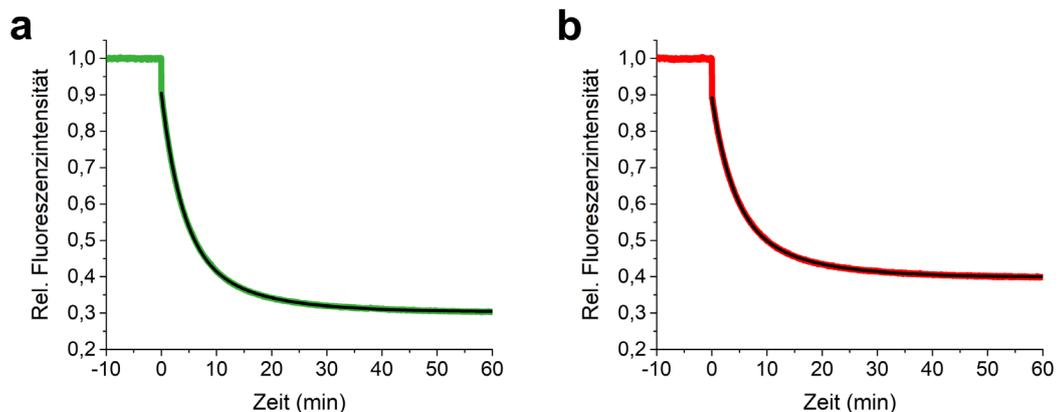
**Abbildung 3-9: Einzelmolekül-Fluoreszenzintensitätszeitspuren der Farbstoffe Atto542, JF646 und AttoOxa11.** Gezeigt sind repräsentative Fluoreszenzintensitätszeitspuren der Farbstoffe Atto542 (a), JF646 (b) und AttoOxa11 (c) an einzelnen, immobilisierten Hsp90-Molekülen. Dabei wurde für AttoOxa11 das A2C-Konstrukt in Kombination mit unmarkiertem Hsp90 und für Atto542 bzw. JF646 das Lid- in Kombination mit dem NM-Konstrukt unter *apo*-Bedingungen verwendet.

Die Farbstoffe Atto542 und JF646 zeigen durchweg eine stabile Fluoreszenzemission (Abbildung 3-9, (a) und (b)) ohne Auftreten von Blinkereignissen. Trolox ist bei diesen Farbstoffen als Additiv offenbar in der Lage, die Funktion des schnellen Depopulierens nichtfluoreszierender Zustände, die normalerweise durch molekularen Sauerstoff vermittelt wird, zu übernehmen. Die Ergebnisse decken sich mit dem beobachteten Effekt durch Trolox in Bezug auf Photobleichen (vgl. Abschnitt 3.2.2). AttoOxa11 hingegen zeigt unter der aufgezeichneten Bedingung deutliche Blinkereignisse. Seine nichtfluoreszierenden Zustände können durch Trolox also nicht effizient depopuliert werden. Auch hier passt das Ergebnis zu denen aus den Bleichexperimenten, da dort ebenfalls kein photostabilisierender Effekt durch Trolox zu beobachten war. Die Ergebnisse decken sich mit Cordes et al. 2009, wonach Trolox auf Oxazin-Farbstoffe, zu welchen AttoOxa11 gehört, keine Wirkung hat. Damit ist AttoOxa11 kein

optimaler Farbstoff für das PET-basierte System. Atto542 und JF646 bleiben als potenzielle Farbstoffe für die bildgebende Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie als vielversprechende Kandidaten übrig.

### 3.2.5 Atto542 und JF646 als geeignete PET-Fluoreszenzsonden

Die Farbstoffe Atto542 und JF646 sind durch Tryptophan effizient löschbar, durch optische Elemente im Detektionsstrahlengang gut trennbar und zeigen unter sauerstofffreien Bedingungen und Trolox-Zugabe ein stabiles zeitliches Emissionsverhalten. In einem letzten Schritt sollte überprüft werden, ob sie auch tatsächlich in der Lage sind, lokale Konformationsdynamiken im Hsp90-Protein über PET-Fluoreszenzlöschung wiederzugeben. Dafür wurde der etablierte NM-Assoziationsreporter aus Schulze et al. 2016 am sonst wildtypischen Hsp90-Protein verwendet und mit dem jeweiligen Farbstoff markiert. Anschließend wurden mittels konventioneller Fluoreszenzspektroskopie Intensitätszeitspuren aufgenommen (Abbildung 3-10) und die erhaltenen Zeitkonstanten der NM-Assoziation mit denen aus Schulze et al. 2016 verglichen.



**Abbildung 3-10: Machbarkeitsbeweis für die Verwendung von Atto542 und JF646 als PET-Fluoreszenzsonden.** Gezeigt sind konventionelle fluoreszenzspektroskopische Intensitätszeitspuren des NM-Assoziations-PET-Reporters in Hsp90, markiert mit Atto542 (a) bzw. JF646 (b). Zum Zeitpunkt  $t=0$  wird 2 mM AMP-PNP zugegeben und damit der irreversible Klammerschluss von Hsp90 ausgelöst. Bi-exponentielle Annäherungen an die Daten sind in schwarz gezeigt.

Die Messungen wurden jeweils dreimal durchgeführt und daraus wurde der Mittelwert errechnet, die Parameter dazu sind in Tabelle 3-1 gegeben.

**Tabelle 3-1: Parameter der Kinetiken des NM-Assoziationsreporters mit Atto542 bzw. JF646 als Fluoreszenzsonde.** Die Werte ergeben sich durch Mittelung von jeweils drei Datensätzen. Die mittlere Ratenkonstante  $k_{\text{mean}}$  ergibt sich durch die Summe der Zeitkonstanten ( $t_1$  bzw.  $t_2$ ), gewichtet mit ihrer jeweiligen relativen Amplitude ( $a_1$  bzw.  $a_2$ ).

Farbstoff	$a_1$	$t_1$ (s)	$a_2$	$t_2$ (s)	$k_{\text{mean}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>Atto542</b>	0,73 $\pm 0,03$	238 $\pm 11$	0,27 $\pm 0,02$	880 $\pm 116$	0,15 $\pm 0,01$
<b>JF646</b>	0,63 $\pm 0,03$	223 $\pm 8$	0,37 $\pm 0,03$	735 $\pm 41$	0,15 $\pm 0,01$

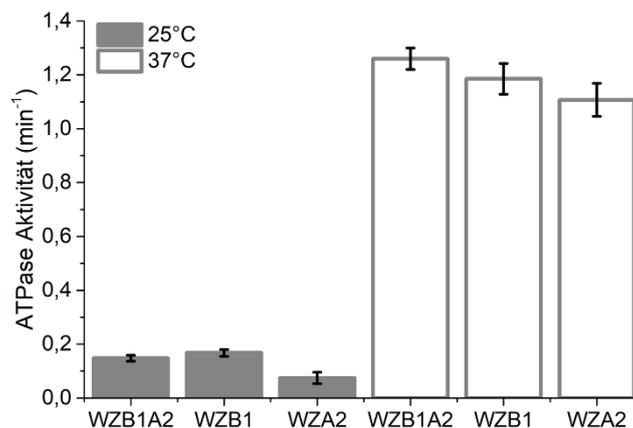
Die Graphen in Abbildung 3-10 zeigen deutliche Intensitätsabfälle nach AMP-PNP-Zugabe und dem damit verbundenen Klammerschluss von Hsp90 mit einhergehender NM-Assoziation. Verglichen mit den Löscheffizienzen aus den Experimenten in Abschnitt 3.2.1, bei denen freier Farbstoff und freies Tryptophan verwendet wurden, zeigt sich für beide Farbstoffe eine höhere Gesamtlöschung, was auf die forcierte Ausbildung des PET-Komplexes durch die Konformationsänderung verursacht sein könnte. Die unter Abschnitt 3.2.1 beobachtete stärkere Löschung durch Atto542 im Vergleich zu JF646 spiegelt sich dabei im NM-Reporter wider. Die mittlere Ratenkonstante für die NM-Assoziation beträgt sowohl für Atto542 als auch für JF646 als Fluoreszenzsonde  $0,15 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  und stimmt damit im Fehlerbereich (Standardabweichung) mit dem Literaturwert von  $0,18 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ , gemessen mit AttoOxa11 (Schulze et al. 2016), überein. Damit qualifizieren sich die Farbstoffe Atto542 und JF646 als PET-Fluoreszenzsonden und werden aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften für die weitere Entwicklung der bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekül-PET Fluoreszenzspektroskopie verwendet werden.

### 3.3 Funktionalitätskontrolle der Hsp90

#### Einzelmolekülkonstrukte mittels ATPase-Assay

In Einzelmoleküluntersuchungen von immobilisierten Proteinen sind häufig Modifikationen, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet werden, nötig, um entweder die Dissoziationskonstante von oligomeren Proteinen zu verringern oder die Immobilisierung zu ermöglichen. Dabei ist es wichtig, dass die Funktion des zu

beobachtenden Systems nicht in einer Weise beeinträchtigt oder verändert wird, die selbst Gegenstand der Untersuchung ist. Anhand einer unveränderten ATPase-Aktivität die Funktionalität von Hsp90 zu verifizieren ist dabei ein probates Mittel (Mickler et al. 2009; Ratzke et al. 2012; Wortmann et al. 2017). Dass der gekoppelte Farbstoff die Dynamiken im Chaperon nicht stört, konnte bereits gezeigt werden (Schulze et al. 2016). Um einen Effekt der C-terminalen Modifikationen auszuschließen, wurden ATPase-Assays zur Bestimmung der Aktivität des unmarkierten heterodimeren Einzelmolekülkonstrukts Hsp90-WZB1A2 (vgl. Abschnitt 3.1) bei 25 °C sowie bei 37°C durchgeführt. Trotz forcierter Ausbildung des heterodimeren *Coiled-coils* ( $K_D=4,5$  nM, Arndt et al. 2002) kann es durch die teils niedrigen  $K_D$ -Werte der homodimeren *coiled-coil*-Motive ( $K_D(\text{WZB1})=73$   $\mu\text{M}$ ,  $K_D(\text{WZA2})=17$  nM, Arndt et al. 2002) zu einem unvollständigen Austausch aller homodimeren zu heterodimeren Hsp90-Molekülen kommen (Schulze 2017), weshalb die ATPase-Aktivität der Konstrukte WZB1B1 (WZB1) und WZA2A2 (WZA2) ebenfalls bestimmt wurde. In Abbildung 3-11 sind alle gemessenen ATPase-Aktivitäten dargestellt.



**Abbildung 3-11: ATPase-Aktivitäten der Hsp90-Einzelmolekülkonstrukte.** ATPase-Aktivitäten des heterodimeren Hsp90-Einzelmolekülkonstrukts WZB1A2 sowie der homodimeren Konstrukte WZB1 und WZA2 bei 25°C (offene Balken) und 37°C (geschlossene Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte aus je drei Messungen und dessen Standardabweichung.

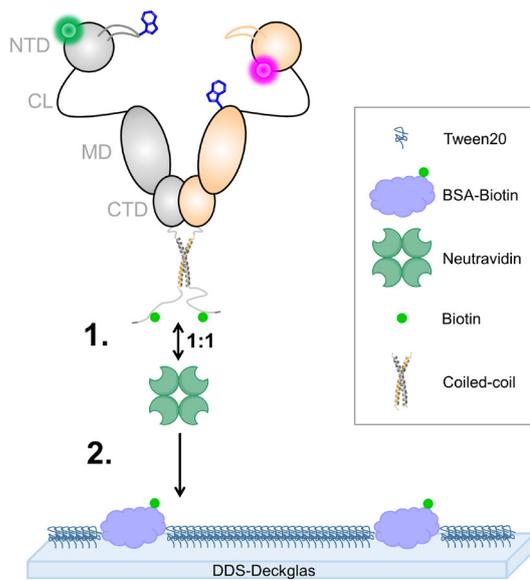
Die ATPase-Aktivitäten der Konstrukte bei 25°C betragen  $0,15 \pm 0,01$   $\text{min}^{-1}$  für das Heterodimer WZB1A2,  $0,17 \pm 0,01$   $\text{min}^{-1}$  für das Homodimer WZB1 und  $0,07 \pm 0,02$   $\text{min}^{-1}$  für WZA2. Bei 37°C ergeben sich Aktivitäten von  $1,26 \pm 0,04$   $\text{min}^{-1}$  für WZB1A2,  $1,19 \pm 0,07$   $\text{min}^{-1}$  für WZB1 und  $1,11 \pm 0,06$   $\text{min}^{-1}$  für WZA2. Die Literaturwerte für die ATPase-Aktivität von Hsp90 liegen für 37°C zwischen 0,5

und  $1,6 \text{ min}^{-1}$  (Ratzke et al. 2010; Schulze et al. 2016) und für  $25^\circ\text{C}$  bzw. Raumtemperatur bei  $0,2 \text{ min}^{-1}$  (Schulze et al. 2016; Daturpalli et al. 2017). Damit bestätigen die gemessenen Aktivitäten sowohl bei  $37^\circ\text{C}$  als auch bei  $25^\circ\text{C}$ , dass die für die bildgebende Einzelmolekülspektroskopie angewandten Modifikationen an Hsp90 die Funktionalität des Chaperons nicht beeinträchtigen. Außerdem zeigen die sehr ähnlichen Werte der hetero- und homodimeren Konstrukte, dass die unterschiedlichen *Coiled-coils* keine Auswirkung auf die Funktionalität des Chaperons haben und unterstreichen damit die Anwendbarkeit dieser gerichteten Heterodimerbildung.

### 3.4 Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie von Hsp90 mit Atto542 und JF646

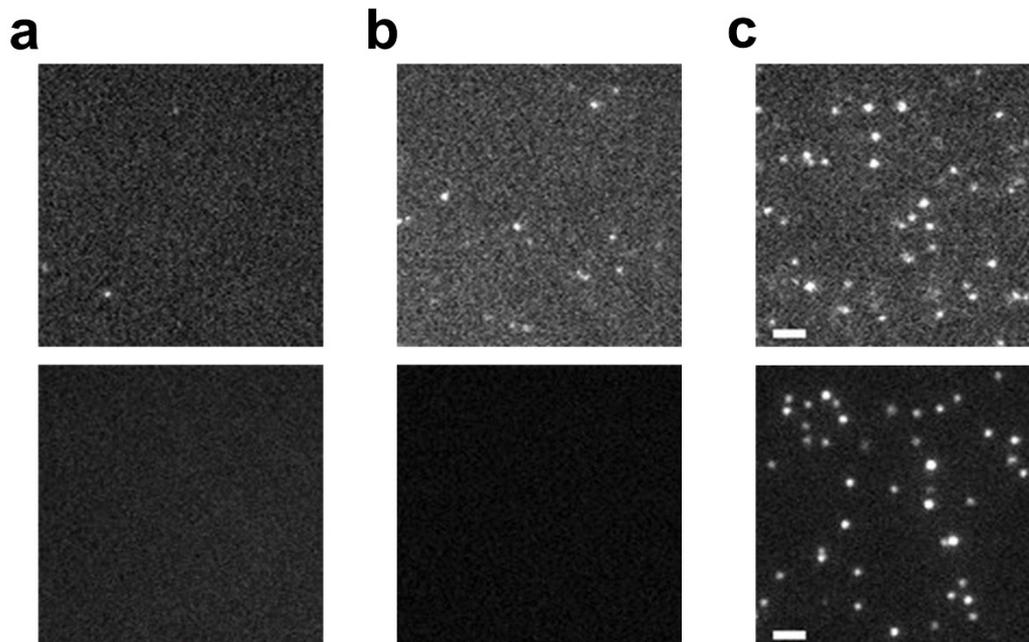
#### 3.4.1 Immobilisierung über Biotin/Neutravidin-Interaktion

Im Rahmen der spektroskopischen Untersuchung von einzelnen Hsp90-Molekülen müssen diese zunächst auf einer Glasoberfläche immobilisiert werden. In Anlehnung an Schulze 2017 und Hua et al. 2014 wurde dazu die starke biochemische Interaktion von Biotin und Neutravidin in Kombination mit DDS-Glasoberflächen und Tween20 als Passivierungsschicht ausgenutzt. Zwei mit Atto542 bzw. JF646 markierte Hsp90-PET-Reporterkonstrukte ( $\text{Hsp90}^{\text{Atto542}}$ ,  $\text{Hsp90}^{\text{JF646}}$ ) wurden nach Inkubation und der damit verbundenen Bildung des Heterodimers ( $\text{Hsp90}^{\text{Atto542, JF646}}$ ) direkt mit Neutravidin in einer 1:1 Stöchiometrie inkubiert. Die Idee dahinter ist, dass sich – durch kooperative Bindungseffekte (Nguyen et al. 2012) unterstützt – ein Komplex ausbildet, in dem ein Neutravidin-Molekül in zwei seiner vier Biotin-Bindetaschen jeweils ein an ein Biotin gekoppeltes Hsp90-Monomer des Heterodimers bindet (Abbildung 3-12). Über diese Präinkubation können beide Monomere des Hsp90-Dimers fest an einem Neutravidin-Protein verankert werden, bevor es durch die Verdünnung im Zuge der Immobilisierung dissoziieren kann. Gleichzeitig soll eine mögliche Dissoziation der Monomere durch die räumliche Nähe zu einer schnellen Re-Assoziation derselben führen.



**Abbildung 3-12: Präinkubation von doppelt markiertem Hsp90 mit Neutravidin und Immobilisierung.** (1.) Heterodimeres Hsp90-Protein, mit z.B. der Kombination aus Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup> Reporter, wird equimolar mit Neutravidin inkubiert. (2.) Der Komplex aus Neutravidin und zweifach markiertem Hsp90-Dimer wird verdünnt auf die mit Tween20 und BSA-Biotin präparierte DDS-Glasoberfläche gegeben und dabei immobilisiert. Durch die Präinkubation wird eine Dissoziation des Lid<sup>Atto542</sup>-NM<sup>JF646</sup>-Dimers während des Verdünnens verhindert.

Anschließend werden die Hsp90-Neutravidin-Komplexe über die Flusskammer auf den DDS-Glasoberflächen immobilisiert. Währenddessen werden über einen Test auf unspezifische Bindungen die Passivierungsfähigkeit der Oberfläche überprüft und die Spezifität der Einzelmoleküloberfläche verifiziert. Ausschnitte der Oberflächen zu verschiedenen Stadien der Immobilisierung sind in Abbildung 3-13 für grünen und roten Kanal gezeigt.



**Abbildung 3-13: Präparation und Spezifitätstest der Einzelmoleküloberfläche.** Ausschnitte einer DDS-Glasoberfläche vor Passivierung (a), bei einem Test auf

unspezifische Bindung durch Hsp90-Moleküle ohne Neutravidin nach Passivierung mit BSA-Biotin und Tween20 (b) sowie nach erfolgreicher spezifischer Immobilisierung von 100 pM Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup> (c). *Oben* ist der grüne Kanal gezeigt, *unten* der rote. Die Maßstabsleiste entspricht jeweils 2  $\mu\text{m}$ , die Kontraste innerhalb eines Kanals sind gleich gehalten.

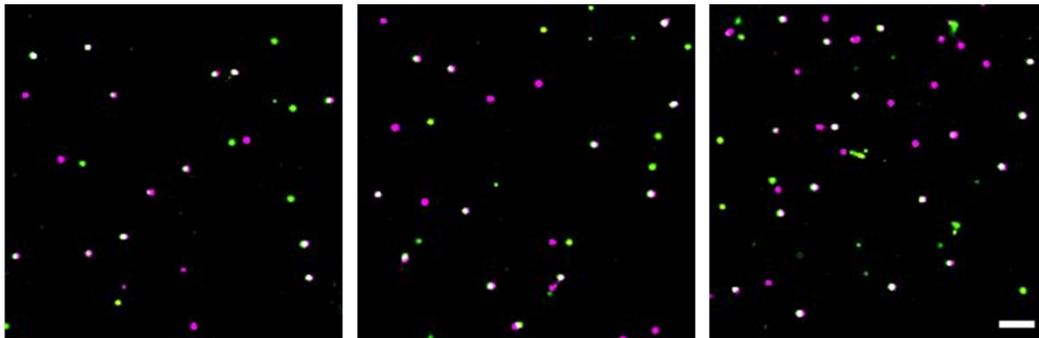
Die Oberflächen zeigen, dass durch die verwendete Art der Passivierung in beiden Kanälen eine spezifische Immobilisierung der Komplexe aus markiertem Hsp90 und Neutravidin erfolgt und zu einer gleichmäßigen Einzelmoleküloberfläche mit klar separierten Fluoreszenzpunkten führt. Im grünen Kanal tritt durchweg etwas mehr Hintergrundfluoreszenz auf.

Durch die Präinkubation mit Neutravidin ist es prinzipiell möglich, die künstliche Verringerung des  $K_D$ -Werts über *coiled-coil*-Motive obsolet werden zu lassen, da die equimolare Inkubation mit Neutravidin auch bei höhermolaren Konzentrationen möglich ist. Durch das feste Verankern der beiden Monomere eines Dimers an demselben Neutravidin-Molekül kann die Lösung anschließend auf einzelmolekülaugliche Konzentrationen verdünnt werden, ohne dass das Dimer dabei dauerhaft dissoziieren sollte. Um diesen Ansatz zu testen, wurde bei zwei Konstrukten das *coiled-coil*-Motiv entfernt.

### 3.4.2 Identifikation doppelt markierter Hsp90-Heterodimere

Im Rahmen der Auswertung der aufgezeichneten Einzelmolekülzeitspuren müssen zunächst heterodimere, doppelt markierte Hsp90-Moleküle (Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup>) identifiziert werden. Durch die separate Detektion der Fluoreszenzsignale über zwei Kameras kann die chromatische Aberration zwischen roter und grüner Fluoreszenz korrigiert werden. Aufgrund leicht unterschiedlicher Pixeldimensionen der beiden Kameras sind die aufgezeichneten Bildausschnitte nicht identisch in ihrer Größe, weshalb sie nachträglich angepasst werden müssen. Dafür werden Aufzeichnungen von Farbstoffmikrosphären (Tetraspecks) zu Hilfe genommen, die aufgrund ihrer Fluoreszenz in grünem und rotem Kanal als Referenzpunkte dienen. Durch die verschraubte Funktionsweise des zur Fokussierung verwendeten *Nosepiece* (manuelle Hochpräzisionsfokussierungshilfe) können Änderungen der Fokusebene zwischen den Hsp90- und Tetraspeck-Aufzeichnungen zu merkbaren Verschiebungen der roten bzw. grünen Fluoreszenzpunkte führen. Daher wurde dazu übergegangen,

anstelle von kommerziell erhältlichen eingebetteten Tetraspeck-Objektträgern nach der letzten Aufzeichnung von Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup> Tetraspecks direkt in die Flusskammer zu applizieren. Dadurch wird sichergestellt, dass nicht neu fokussiert werden muss. Durch die extreme Helligkeit der Tetraspecks interferiert immobilisiertes Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup> nicht mit deren Aufzeichnung. Nach Erstellen und Anwenden der Transformationsmatrix (vgl. Abschnitt 2.11.1) können grüne und rote Fluoreszenzbilder überlagert und kolokalisierende Farbstoffe, welche Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup> entsprechen, identifiziert werden (Abbildung 3-14).



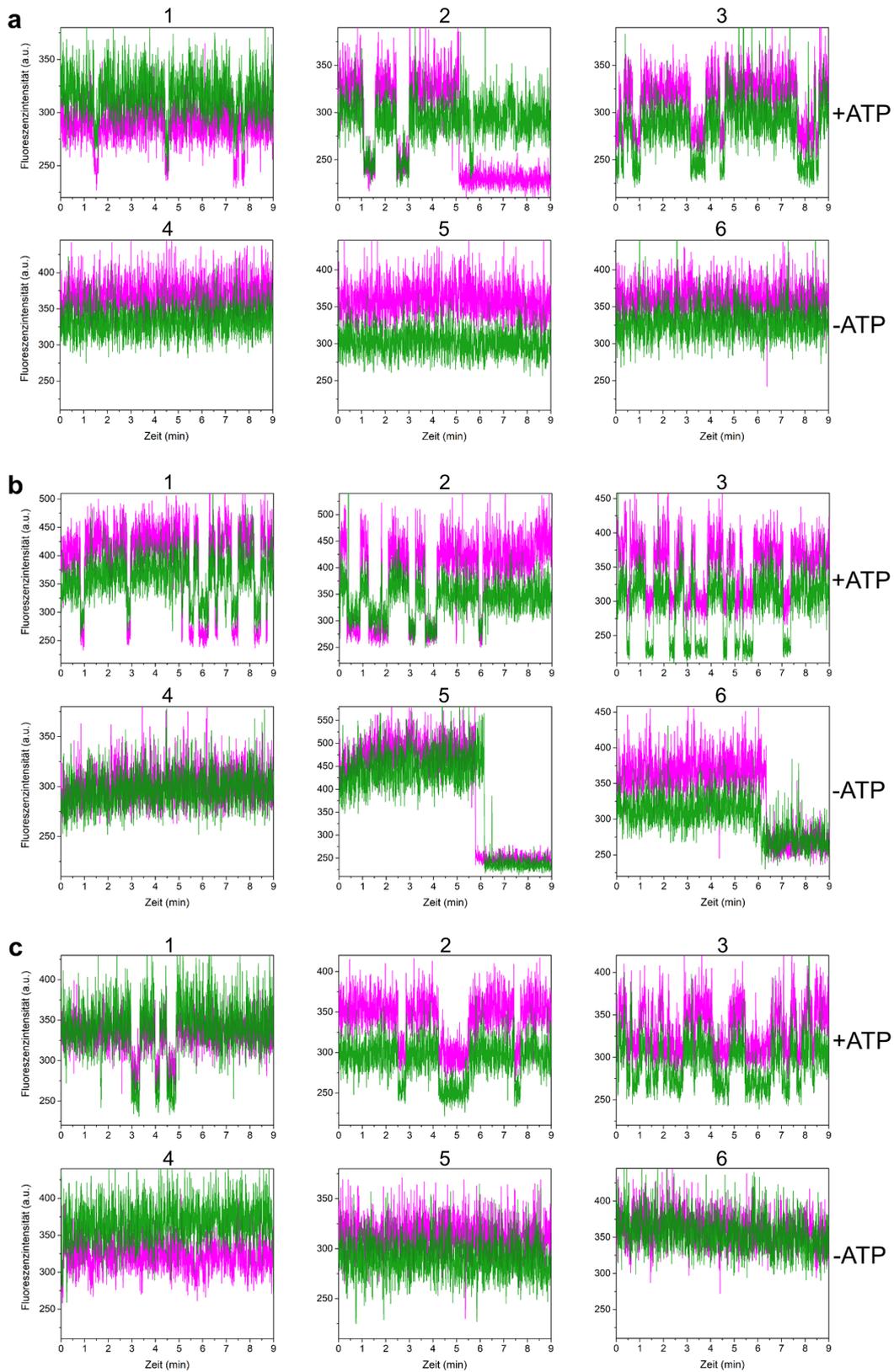
**Abbildung 3-14: Kolokalisation der Farbstoffe Atto542 und JF646 indiziert zweifach markiertes Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup>.** Ausschnitte der rekonstruierten Aufnahmen des grünen (Atto542, grün) und roten Kanals (JF646, magenta) nach Überlagerung. Kolokalisierende Fluoreszenzpunkte sind in weiß sichtbar und entsprechen einzelnen mit beiden Farbstoffen markierten Hsp90-Proteinen. Die Maßstabsleiste entspricht 1  $\mu\text{m}$ .

Zusammen mit den extrem niedrigmolaren Lösungen markierter Hsp90-Moleküle, die zur Vereinzelnung der Moleküle auf der Oberfläche führen, ist eine verlässliche Identifikation genau zweifach markierter Hsp90-Proteine möglich. Die Positionen der Kolokalisationen werden dann auf die Rohdaten der Zeitserien des grünen bzw. roten Kanals übertragen und die Intensitäten über die Zeit ausgelesen. Neben kolokalisierenden Fluoreszenzpunkten sind auch Moleküle zu finden, die nur Atto542 oder nur JF646 tragen.

### 3.4.3 Einzelmolekülzeitspuren der PET-Reporterkombinationen

Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzzeitspuren wurden für verschiedene PET-Reporterkombinationen von Hsp90 aufgezeichnet, sodass jede Kombinatorik der drei verschiedenen lokalen Dynamiken abgedeckt war. Dazu wurden der Lid-Schluss mit der NM-Assoziation (Lid+NM) bzw. dem Domänenwechsel

(Lid+DS) kombiniert und die NM-Assoziation ebenfalls mit dem Domänenwechsel (NM+DS). Zudem wurde für jede Kombination die Farbstoffe der Reporter getauscht. Durch die Verwendung von ATP können die Hsp90-Moleküle den ATP-gekoppelten Konformationszyklus mehrfach durchlaufen und damit sowohl die Schließungsdynamiken als auch die Öffnungsdynamiken beobachtet werden. In Abbildung (3-15) sind einige repräsentative Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spuren der verschiedenen Kombinationen dargestellt, die das mehrfache Durchlaufen der einzelnen lokalen Konformationsänderungen eines Chaperons unter ATP-Bedingungen zeigen. Außerdem sind Spuren in Abwesenheit von ATP gezeigt.

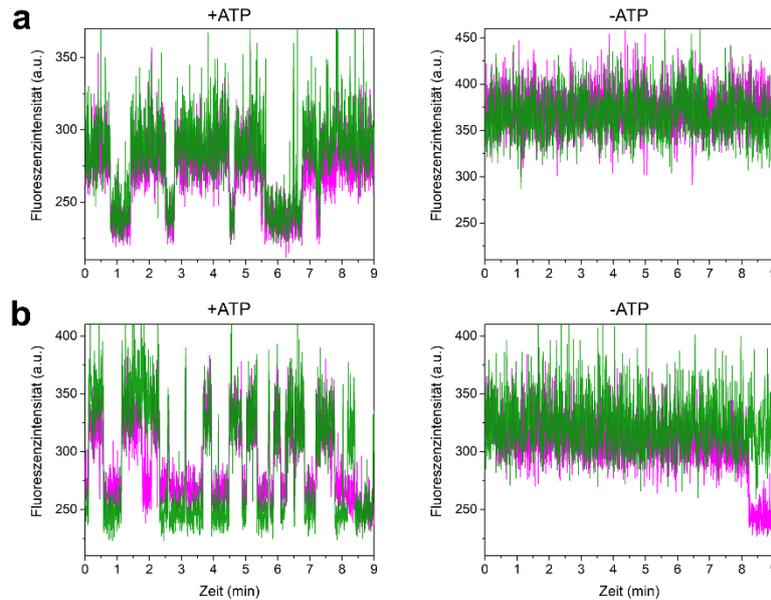


**Abbildung 3-15:** Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzzeitserien verschiedener Kombinationen aus Lid-, NM- und DS-Reportern in Hsp90. In (a) sind Spuren von Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup> (1,2,4,5) bzw. Lid<sup>JF646</sup>+NM<sup>Atto542</sup> (3,6), in (b) von

DS<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup> (1,2,4,5) bzw. DS<sup>JF646</sup>+NM<sup>Atto542</sup> (3,6) und in (c) von DS<sup>Atto542</sup>+Lid<sup>JF646</sup> (1,2,4,5) bzw. DS<sup>JF646</sup>+Lid<sup>Atto542</sup> (3,6) gezeigt. Reportersysteme mit dem Farbstoff Atto542 sind in grün, mit JF646 in magenta dargestellt. Spuren 1-3 zeigen jeweils ATP-Bedingungen, 4-6 ATP-freie Bedingungen.

Bei allen Reporterkombinationen sind in rotem und grünem Kanal deutliche An- und Aus-Zustände der Farbstoffe zu erkennen, wenn ATP vorhanden ist. Diese spiegeln den fluoreszierenden und den durch den PET-Komplex gelöschten Zustand der Fluorophore wider. Die fluoreszierenden Phasen repräsentieren den offenen Lid, die nicht assoziierte NTD und MD sowie den nicht vollzogenen Domänenwechsel, während die gelöschten Zustände den geschlossenen Lid, die assoziierte NTD und MD sowie den abgelaufenen Domänenwechsel anzeigen. Die Wechsel zwischen den beiden Zuständen sind als digitale Übergänge zu erkennen, in Spuren ohne ATP sind stabile Emissionen ohne alternierende An-Aus-Zustände der Farbstoffe zu beobachten. Sowohl in Spuren mit ATP als auch ohne sowie unabhängig von der Reporterkombination sind zusätzlich Bleichereignisse beider Farbstoffe zu sehen, die in der Intensität in etwa den Aus-Zuständen entsprechen. Die gezeigten Spuren bzw. Hsp90-Proteine unter ATP-Bedingungen sind danach ausgewählt, Dynamiken der mobilen Elemente zu zeigen, sind also für alle Proteine repräsentativ, die Fluktuationen in ihrer Fluoreszenzintensität zeigen und die für die spätere Analyse verwendet werden. Ähnlich wie in Ye et al. 2018 ist das die Minderheit der immobilisierten Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup>-Moleküle. Unter ATP-freien Bedingungen sind die Spuren hingegen für alle immobilisierten Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup>-Moleküle repräsentativ.

In Abbildung 3-16 sind entsprechende Spuren der Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup>- Kombination mit zusätzlicher A2W-Mutation sowie Spuren von Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup>-Hsp90, denen das *coiled-coil*-Motiv entfernt wurde, dargestellt.



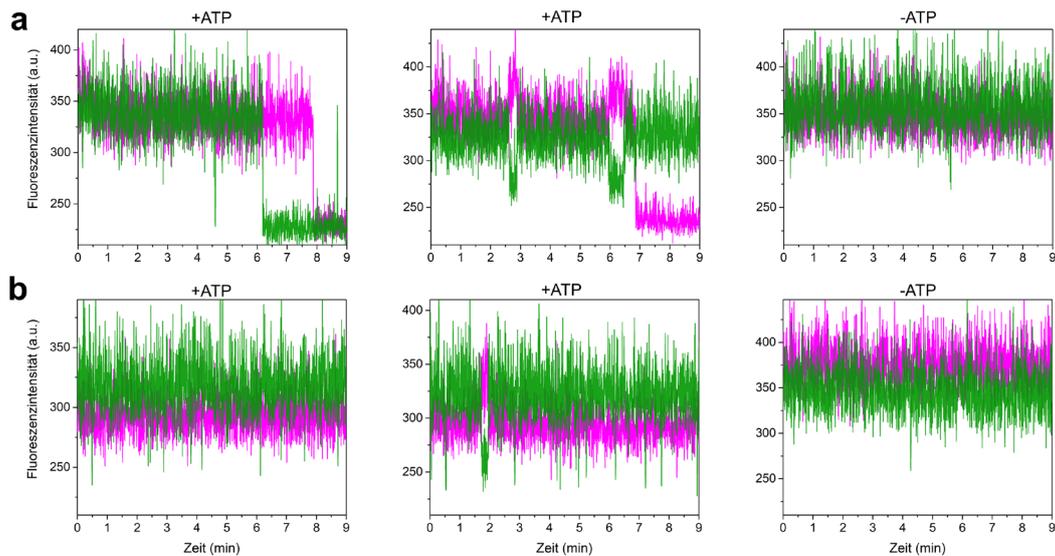
**Abbildung 3-16: Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzzeitserien der Kombination  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{A2W-NM}^{\text{JF646}}$  und  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$  ohne *coiled-coil*-Motiv.** In (a) sind die Intensitätszeitserien von  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{A2W-NM}^{\text{JF646}}$  mit und ohne ATP dargestellt. (b) zeigt Einzelmolekülspuren der  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$ -Kombination, denen das *coiled-coil*-Motiv entfernt wurde, ebenfalls mit und ohne ATP. PET-Fluoreszenzreporter, die Atto542 tragen, sind in grün dargestellt, Reporter, die JF646 tragen, in magenta.

Sowohl die Kombination aus Lid- und NM-Reporter mit zusätzlicher A2W-Mutation als auch Lid- und NM-Reporter, dessen Einzelmolekülkonstrukten das *coiled-coil*-Motiv entfernt wurde, zeigen die gleichen An- und Aus-Zustände in Abhängigkeit von ATP wie die Konstrukte in Abbildung 3-15.

Somit sind alle gebildeten Hsp90-Heterodimere in der Lage- jeweils zwei der drei lokalen Konformationsdynamiken des Chaperons gleichzeitig wiederzugeben.

### 3.4.4 Einzelmolekülzeitserien von Kontrollkonstrukten

Neben den Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzzeitserien der Reporterkombinationen wurden deren Kontrollkonstrukte untersucht, denen das jeweilige Tryptophan der PET-Reporter fehlte. So sollten photophysikalische Effekte der einzelnen Farbstoffe untersucht bzw. ausgeschlossen werden. In Abbildung 3-17 sind Spuren der Kontrollkonstrukte  $\text{A2C}^{\text{Atto542}}+\text{E192C}^{\text{JF646}}$  (DS+NM Kontrolle) und  $\text{A2C}^{\text{Atto542}}+\text{S51C}^{\text{JF646}}$  (DS+Lid Kontrolle) dargestellt.



**Abbildung 3-17: Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzzeitserien der Kontrollkonstrukte.** In (a) sind Spuren des Kontrollkonstrukts von DS+NM, also  $A2C^{Atto542}+E192C^{JF646}$ , mit und ohne ATP, zu sehen. (b) zeigt Spuren des DS+Lid Kontrollkonstrukts  $A2C^{Atto542}+S51C^{JF646}$  mit und ohne ATP. Die Fluoreszenzspuren von Atto542 sind in grün, die von JF646 in magenta dargestellt.

Bei der Kombination aus  $A2C^{Atto542}+E192C^{JF646}$ , welche die Kontrolle zum DS+NM Reporter darstellt, konnten repräsentativ keine An-Aus-Zustände beobachtet werden wie sie für die vollständigen Reportersysteme charakteristisch sind. Damit sind die unter Abschnitt 3.4.3 beobachteten Aus-Zustände eindeutig PET-Komplexen zuzuordnen. Unter Zugabe von ATP treten vereinzelt FRET-Ereignisse auf, die durch die Abwesenheit von PET-kompetenten Komplexen die Schließungs- bzw. Öffnungsdynamiken der molekularen Klammer anzeigen könnten, da die Farbstoffe auf beide Hsp90-Monomere verteilt sind. Die Tatsache, dass diese nur unter ATP-Bedingungen auftreten, unterstützt diese Hypothese. Die Kombination aus  $A2C^{Atto542}+S51C^{JF646}$ , welche der Kontrolle zu DS+Lid entspricht, verhält sich ähnlich. Auch hier treten in Anwesenheit von ATP vereinzelt FRET-Ereignisse auf, unter ATP-freien Bedingungen zeigen sich wiederum keine FRET-Ereignisse. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Farbstoffe bis auf wenige Ausnahmen (FRET-Ereignisse) nicht miteinander interagieren. Dass in den Doppelkontrollen vereinzelt Förster-Resonanzenergietransfer beobachtet werden kann, was in den PET-Reportersystemen nicht der Fall war, könnte daran liegen, dass in den Kontrollkonstrukten kein PET als Konkurrenzreaktion auftreten kann. Eine andere Möglichkeit hingegen ist, dass vereinzelte FRET-Ereignisse in den fluktuationsreichen PET-Spuren nicht weiter aufgefallen sind.

### 3.4.5 Datensatzgröße

Anders als in der konventionellen Spektroskopie, bei der Millionen von Molekülen gleichzeitig gemessen werden, ist eine Analyse von Einzelmolekülmessungen nicht per se quantitativ. Stattdessen muss hier eine ausreichend hohe Statistik aus Datenpunkten einzelner aufgezeichneter Moleküle erstellt werden, die nachfolgend quantitativ analysiert werden können. Daher soll in diesem Abschnitt untersucht werden, welche Größe dieser Datenpool im vorliegenden System haben sollte, damit eine quantitative Aussage über die Kinetik der lokalen Dynamiken von Hsp90 getroffen werden kann. Hierfür wurde ein vergleichsweise umfangreicher Datensatz von Lid<sup>Atto542</sup>+DS<sup>JF646</sup>-Hsp90 (Datenpunkte pro untersuchter Kinetik: N=>270) verwendet und dieser einmal in seiner Gänze und zweimal mit unterschiedlich großen Bruchteilen von 50 bzw. 100 Datenpunkten pro zu untersuchender Kinetik ausgewertet (vgl. dazu Abschnitt 3.5 bzw. 3.6). Die erhaltenen Zeitkonstanten aus den Analysen wurden dann miteinander verglichen. Im Vergleich zum gesamten Datensatz veränderten sich die Werte bei Verwendung von nur 50 Datenpunkten um maximal 12 %. Wurden hingegen 100 Datenpunkte pro Kinetik untersucht, wurde eine Abweichung von maximal 7 % im Vergleich zum gesamten Datensatz beobachtet. Das legt nahe, dass eine Statistik aus 100 Datenpunkten pro zu untersuchender Kinetik ausreichend ist, um die lokalen Dynamiken in Hsp90 quantitativ gut beschreiben zu können. Auch eine Statistik aus 50 Datenpunkten beschreibt die Daten ausreichend, es treten jedoch stärkere Abweichungen auf, weshalb diese Anzahl nicht unterschritten werden sollte. Bei den unter Abschnitt 3.6 analysierten Datensätzen wurde sich an der Größe des Datensatzes von ca. 100 Datenpunkten pro Kinetik orientiert.

### 3.5 Datenanalyse mittels Python Routine *2CsmPET*

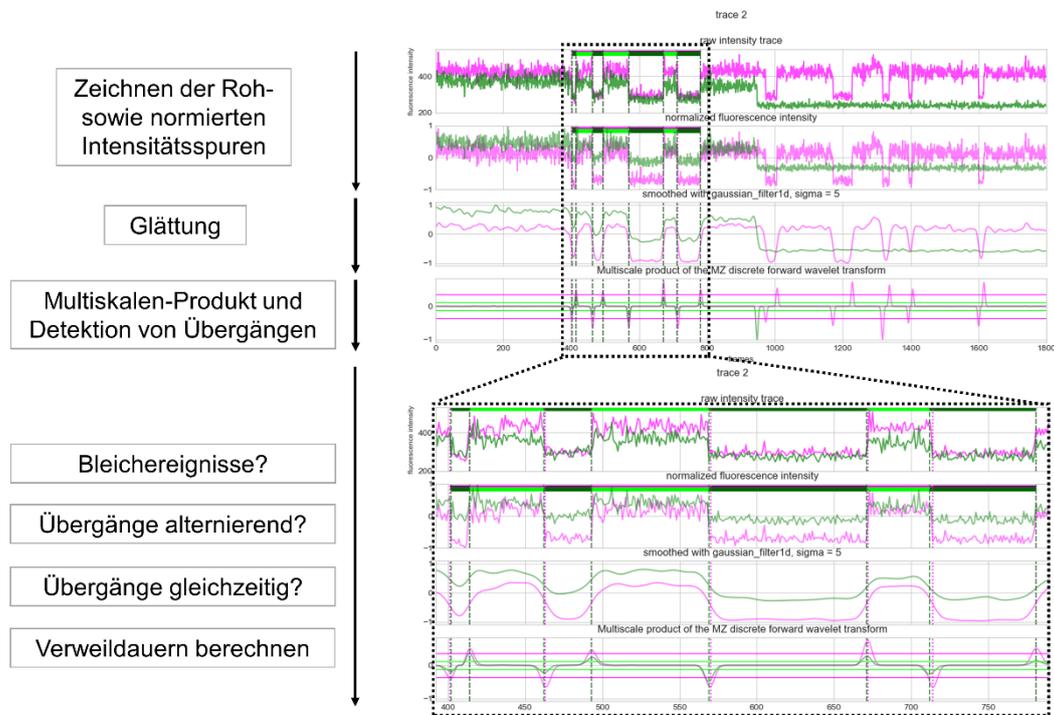
Die Zweifarben-PET-Fluoreszenzspuren einzelner Hsp90-Moleküle, wie sie unter Abschnitt 3.4.3 gezeigt sind, müssen auf Übergänge zwischen fluoreszierendem An- und PET-gelöschtem Aus-Zustand analysiert werden. Durch den Umfang der Datensätze an (auch von nicht funktionalen Hsp90-Molekülen stammenden) Einzelmolekülpuren ist eine händische Auswertung nicht realisierbar und darüber hinaus anfällig für eine subjektive Auswahl. Da die bildgebende Einzelmolekül-PET-Methode erst im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, gibt es nach derzeitigem Kenntnisstand keine frei verfügbare Software, welche den nötigen Bedürfnissen entspreche. Daher wurde eine eigene Routine in der

Programmiersprache Python entwickelt, die unter Zuhilfenahme verschiedener Signalverarbeitungsroutinen und Filtermechanismen in der Lage ist, PET-Ereignisse und deren Übergänge in Intensitätszeitspuren zu identifizieren und zu analysieren. Auch im gut etablierten Feld der Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen sind benutzerdefinierte Skripte zur Visualisierung und Prozessierung der Daten noch immer verbreitet (Lerner et al. 2021). Im Folgenden wird die grundsätzliche Arbeitsweise des entwickelten Python-Codes *2CsmPET* vorgestellt, dabei werden alle Schritte der Routine iterativ für jede Einzelmolekülspur jeweils für den roten und grünen Kanal durchgeführt. Im Wesentlichen werden die Intensitätsspur zunächst geglättet, um Rauschen zu minimieren. Anschließend werden über ein Multiskalen-Produkt, wie von Mallat und Zhong 1992 beschrieben und von (Brian M. Sadler, Ananthram Swami 1998; Sadler und Swami 1999) implementiert, spontane Intensitätsstufen detektiert und lokalisiert. Diese Übergänge bzw. die Verweildauern in An- und Aus-Zuständen werden dann über verschiedene Filter analysiert und in rotem und grünem Kanal miteinander abgeglichen.

Zuerst wird ein datenspezifischer Schwellenwert für die spätere Detektion von Intensitätsstufen ermittelt, was ein sogenanntes hartes Kriterium darstellt (Lerner et al. 2021) und schon viele Schritte der Routine beansprucht, die anschließend zur tatsächlichen Datenanalyse verwendet werden. Dabei wird über alle Spuren des roten und grünen Kanals separat iteriert. Nach verschiedenen Signalverarbeitungsschritten, wie Normalisierung der Intensitätsspur auf eins und Abzug der mittleren Intensität, wird das Signal über einen 1-D Gauß-Filter (`gaussian_filter1d`) der Programmierbibliothek NumPy geglättet (Harris et al. 2020). Anschließend wird eine Modulfunktion (`mz_fwt` aus `step_detect`), die von Thomas Kahn entwickelt wurde, auf die Intensitätsspur angewandt, wobei ein Multiskalen-Produkt gebildet wird. Dieses führt zu einer scharfen Detektion abrupter Intensitätsstufen bei gleichzeitiger Unterdrückung gradueller Intensitätsänderungen. Anschließend wird über Anlegen eines initialen, niedrigen Schwellenwerts (0,01) mithilfe einer weiteren Funktion des Moduls von Thomas Kahn (`find_steps` aus `step_detect`) annähernd jegliche abrupte Intensitätsänderung als Stufe erkannt und gesammelt. Dabei wird auch die Höhe der Stufe ausgelesen. Nachdem alle Stufen aus allen Spuren des Kanals gesammelt wurden, wird daraus über Mittelung der Stufenhöhen der datenspezifische Schwellenwert berechnet. Der Mittelwert zeigte sich dabei empirisch als gut geeignet, um als Schwellenwert nachfolgend die meisten PET-Ereignisse zu erkennen, ohne zu viele falsch positive Ereignisse zu detektieren.

Anschließend wurden die beschriebenen Schritte bis hin zur Detektion der Stufen identisch durchlaufen, wobei nun anstelle des initialen Schwellenwerts der ermittelte datenspezifische Schwellenwert verwendet wurde. Außerdem wird diesmal gleichzeitig über roten und grünen Kanal iteriert. Sind gefundene Stufen detektiert worden, werden diese Übergänge und die zugehörigen Verweildauern in den jeweiligen Zuständen Spur für Spur gefiltert und analysiert. Dies geschieht über mehrere Kriterien, deren Umsetzung durch selbst geschriebene Funktionen erreicht wurde. Zunächst muss in jedem Kanal mindestens eine Verweildauer im An- und Aus-Zustand vorhanden sein. Darüber soll nach funktionalen Hsp90-Molekülen gefiltert werden. Des Weiteren sind nur alternierende Übergänge erlaubt, also keine An-An- oder Aus-Aus-Ereignisse, da diese nicht von PET-Fluoreszenzsonden verursacht sind. Darüber hinaus wurde eine Funktion erstellt, die nach Bleichereignissen in den Intensitätsspuren sucht, was ein gängiges Kriterium im Filterungsprozess von Einzelmolekülintensitätsspuren ist (Lerner et al. 2021). Ist das der Fall, werden Übergänge in beiden Kanälen, die zeitlich gesehen nach dem Bleichereignis stattfinden, nicht berücksichtigt, da dadurch eine Verzerrung der Auswertung bezüglich Gleichzeitigkeit beider Kanäle entstehen würde. Letzten Endes werden die Verweildauern im jeweiligen An- bzw. Aus-Zustand ausgelesen und die zugehörigen Übergänge in beiden Kanälen auf Gleichzeitigkeit hin untersucht. Dabei wurde ein Zeitfenster von 1,8 s für eine bestehende Gleichzeitigkeit verwendet, was 6 Einzelbildern der Zeitserie entspricht. Diese Anzahl kann theoretisch im Skript manuell werden. Die beschriebenen Schritte werden für jede Spur, die von einem Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup>-Molekül stammt, iterativ durchgeführt. Dabei werden dem Anwender jede Spur und die darin gefundenen Übergänge, wie in Abbildung 3-18 exemplarisch dargestellt, gezeigt. Erst durch manuelle Bestätigung der Ergebnisse werden die Werte gespeichert bzw. bei Nichtbestätigen verworfen und es wird zur nächsten Spur übergegangen. Außerdem ist es möglich, verschiedene Parameter – wie den Glättungsgrad durch den Gauß-Filter, den angewendeten Schwellenwert oder die Anzahl an Skalen des Multiskalen-Produkts – der Intensitätsspur manuell für die jeweilige Spur zu verändern. Darüber hinaus ist es möglich, einzelne fälschlicherweise erkannte Übergänge manuell nicht zu berücksichtigen, z.B. Übergänge nach nicht detektiertem Bleichereignis. Nach jeder Änderung eines Parameters wird die entsprechende Spur erneut ausgewertet und dem Anwender zur Bestätigung präsentiert. Ist das Skript durch alle Spuren iteriert, werden die absoluten Verweildauern im An- und Aus-Zustand für roten und grünen Kanal in der Einheit Einzelbild (engl.: frames) sowie die Anzahl an gleichzeitigen und nicht

gleichzeitigen Übergängen des Datensatzes als Datei abgespeichert. Die exemplarische Analyse einer Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzspur während der Analyse mithilfe des Python Codes ist in Abbildung 3-18 dargestellt.



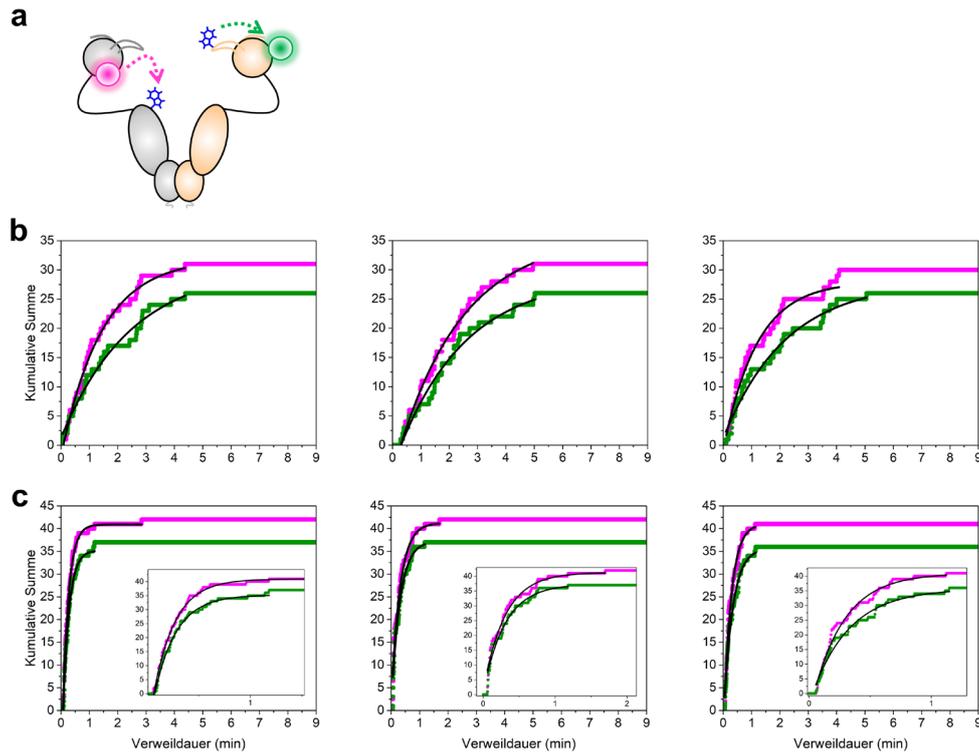
**Abbildung 3-18: Exemplarische Auswertung einer Zweifarben-Einzelmolekülspur während der Analyse mithilfe der entwickelten Python-Routine.** Gezeigt sind eine exemplarische Auswertung einer Zweifarben-Zeitspur und die gleichzeitig ablaufenden Signalverarbeitungs-, Prozessierungs- und Analyseroutinen. *Rechts oben* ist eine Zweifarben-Spur dargestellt, wie sie dem Anwender während der Auswertung präsentiert wird, *rechts unten* ist ein Zoom-In gezeigt. Der grüne Kanal ist in grün, der rote in magenta dargestellt. Panel 1 und 2 zeigen die Roh- bzw. normierten Intensitätsspuren, Panel 3 zeigt die geglätteten Spuren und Panel 4 das gebildete Multiskalenprodukt und die datenspezifischen Schwellenwerte beider Kanäle als horizontale Linien. Die gefundenen Übergänge sind als gestrichelte vertikale Linie in jedes Paneel gezeichnet, um die Bestätigung der Ergebnisse zu erleichtern. In Panel 1 sind zudem die An- und Aus-Zustände durch horizontale Balken in dunklen bzw. hellen Farbvarianten dargestellt. *Links* sind die jeweilig zugrundeliegenden Routinen des Codes, die während der verschiedenen Schritte der Spuren-Analyse durchgeführt werden, aufgelistet. Dabei wird z.B. ein Bleichereignis im grünen Kanal nach nicht ganz 1000 Einzelbildern erkannt und die nachfolgenden Übergänge im roten Kanal verworfen. Die Übergänge vor diesem Zeitpunkt werden in beiden Kanälen erkannt und auf Alternation hin geprüft sowie auf Gleichzeitigkeit hin analysiert.

### 3.6 Kinetik am einzelnen Molekül

Die mittels *2CsmPET* erhaltenen Daten zu Verweildauern der Hsp90-PET-Fluoreszenzreporter in fluoreszierendem und PET-gelöschtem Zustand wurden anschließend weiter analysiert. Die Zeitdauern, die das Hsp90-Protein im jeweiligen Zustand (z.B. offener Lid, geschlossener Lid) verbringt (Verweildauern), können Aufschluss über die Raten- bzw. Zeitkonstanten des Konformationszyklus geben (Mickler et al. 2009). Dafür wurde anstelle der einfachen die integrierte Verteilung der Verweildauern zur mathematischen Näherung verwendet, da diese unabhängig von der Klasseneinteilung der Daten ist und damit eine geeignete – weil robuste – Analyse ermöglicht (Mickler et al. 2009; Gebhardt et al. 2006). Eine Möglichkeit besteht darin, alle Datenpunkte eines Datensatzes zusammenzuführen und deren integrierte Verteilung mathematisch anzunähern, wie es in (Mickler et al. 2009; Ratzke et al. 2010; Ratzke et al. 2012) realisiert wurde. Dabei wird zwar ein – zumeist sehr kleiner – Annäherungsfehler erreicht, dieser beinhaltet jedoch keinerlei Fehlerquellen wie Aufzeichnung der Messung bzw. Probenvorbereitung. Deshalb wurde sich dazu entschieden, den Datenpool für jede untersuchte Kinetik in drei Subdatenpools zu unterteilen. Diese werden ausgewertet und daraus wird die mittlere Zeitkonstante mit Fehler (Standardabweichung) berechnet. Der so erhaltene Fehler ist zwar meist größer als der Annäherungsfehler, berücksichtigt dafür aber experimentelle Ungenauigkeiten und wurde daher präferiert.

#### 3.6.1 NM- und Lid-Dynamik

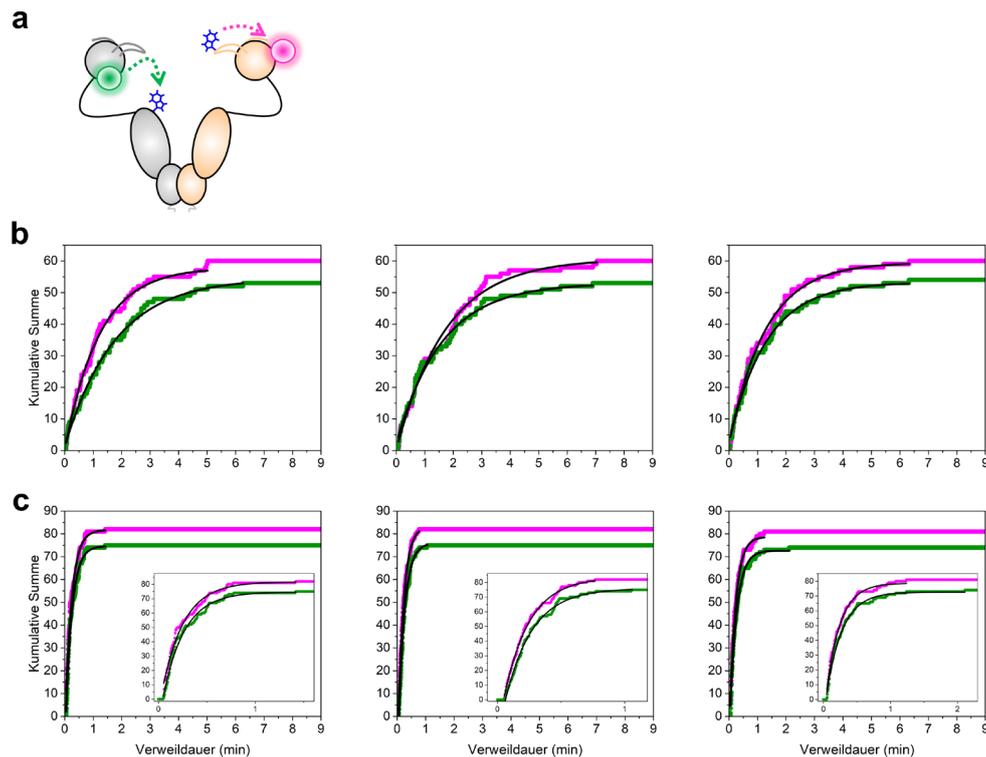
Die kinetische Datenanalyse der Kombination aus NM-Assoziation und Lid-Schluss bzw. NM-Dissoziation und Lid-Öffnung ( $\text{Lid}^{\text{Atto542}} + \text{NM}^{\text{JF646}}$ ) ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Über die Analyse der Verweildauern im fluoreszierenden Zustand kann die Zeitkonstante der NM-Assoziation bzw. des Lid-Schlusses ermittelt werden, über die Verweildauern im PET-gelöschten Zustand hingegen die NM-Dissoziation bzw. Lid-Öffnung.



**Abbildung 3-19: Verweildaueranalyse von Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup>-Hsp90.** In (a) sind die verschiedenen markierten PET-Reporter schematisch dargestellt. (b) zeigt die kumulativen Summen der drei Datensätze für Lid-Schluss (b, grün) und NM-Assoziation (b, magenta). (c) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für Lid-Öffnung (c, grün) und NM-Dissoziation (c, magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. In (c) sind aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern Vergrößerungen gegeben.

Die monoexponentielle Näherung wurde nur auf die tatsächlichen Datenpunkte (für  $x > 0$  bis  $x = \max$ ) angewandt und beschreibt alle Graphen gut. Anhand der Graphen kann man erkennen, dass die Verweildauern für die jeweilige Öffnungskinetik verglichen mit den Schließungskinetiken zu kürzeren Zeiten verschoben sind. Das zeigt sich nach Mittelung der Zeitkonstanten aus den drei Teildatensätzen mit den Werten von  $141 \pm 8$  s bzw.  $16 \pm 3$  s für NM-Assoziation bzw. -Dissoziation und den Werten  $98 \pm 35$  s bzw.  $15 \pm 3$  s für Lid-Schluss bzw. Lid-Öffnung deutlich, Öffnungs- und Schließungsdynamiken für NM und Lid liegen damit im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung). Der NM-Assoziation liegen insgesamt 92 Übergänge ( $N=92$ ) zugrunde, der Dissoziation  $N=125$ , dem Lid-Schluss  $N=78$  sowie der Lid-Öffnung  $N=110$ .

In Abbildung 3-20 ist die gleiche Reporterkombination mit vertauschten Farbstoffen als Fluoreszenzsonden (NM<sup>Atto542</sup>+Lid<sup>JF646</sup>) gezeigt.

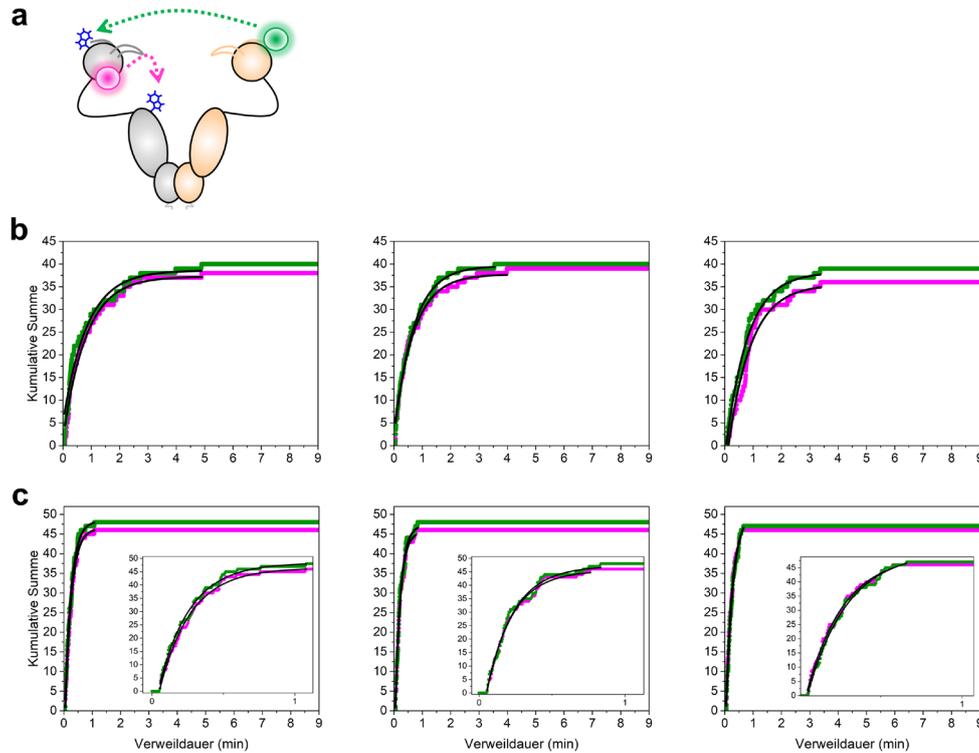


**Abbildung 3-20: Verweildaueranalyse von  $NM^{Atto542}+Lid^{JF646}$ -Hsp90.** In (a) sind die verschiedenen markierten PET-Reporter schematisch dargestellt. (b) zeigt die kumulativen Summen der drei Datensätze für NM-Assoziation (b, grün) und Lid-Schluss (b, magenta). (c) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für NM-Dissoziation (c, grün) und Lid-Öffnung (c, magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. In (c) sind aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern Vergrößerungen gegeben.

Auch hier sind die monoexponentiellen Annäherungen nur auf die tatsächlichen Datenpunkte angewandt und beschreiben alle Graphen gut. Es ergeben sich folgende Werte für die Schließungs- bzw. Öffnungskinetiken: Die NM-Assoziation findet nach  $94 \pm 14$  s und die Dissoziation nach  $13 \pm 1$  s statt. Der Lid schließt sich nach  $85 \pm 17$  s und öffnet sich ebenfalls nach  $13 \pm 1$  s. Auch hier liegen die Öffnungs- bzw. Schließungskinetiken beider Reporter im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung). Die Anzahl der insgesamt zugrundeliegenden Übergänge beträgt  $N=160$  für die NM-Assoziation und  $N=224$  für die -Dissoziation. Dem Lid-Schluss liegen  $N=180$  und der Lid-Öffnung  $N=245$  Übergänge zugrunde.

## 3.6.2 DS- und NM-Dynamik

Die integrierte Verteilung der Verweildauern der Kombination aus Domänenwechsel- und NM-Assoziationsreporter mittels DS<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup>-Hsp90 ist in Abbildung 3-21 dargestellt.

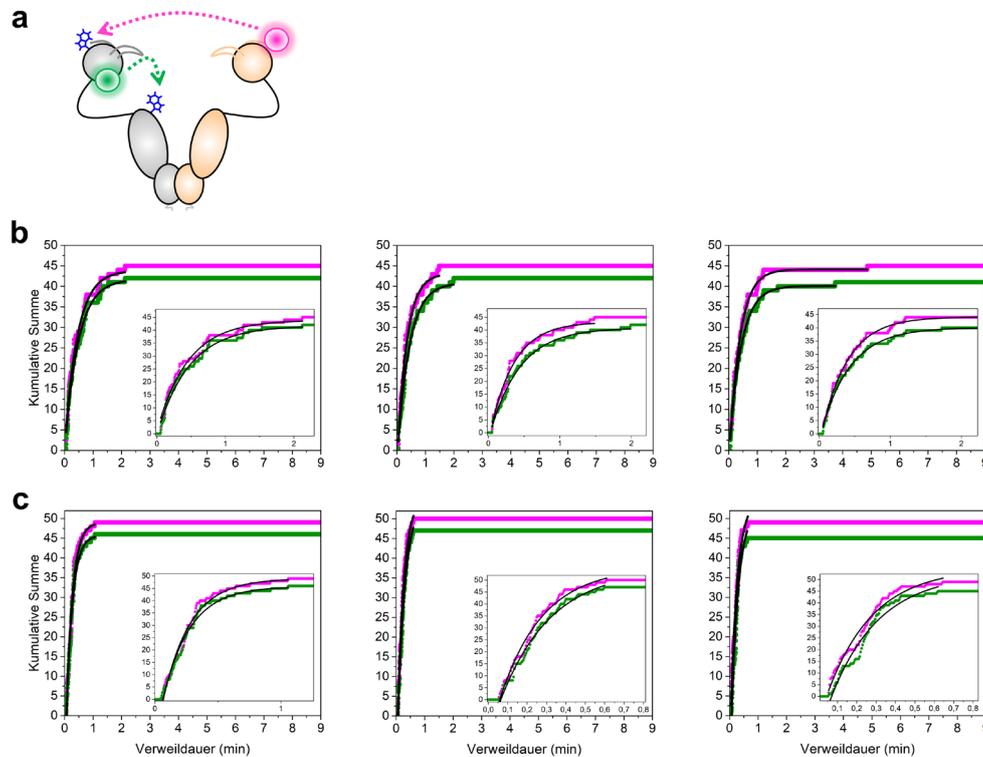


**Abbildung 3-21: Verweildaueranalyse von DS<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup>-Hsp90.** In (a) sind die verschiedenen markierten PET-Reporter schematisch dargestellt. (b) zeigt die kumulativen Summen der drei Datensätze für Domänenwechsel (b, grün) und NM-Assoziation (b, magenta). (c) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für rückwärtigen Domänenwechsel (c, grün) und NM-Dissoziation (c, magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. In (c) sind aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern Vergrößerungen gegeben.

Die monoexponentielle Näherung der tatsächlichen Datenpunkte beschreibt alle Graphen gut und führt zu mittleren Zeitkonstanten von  $46 \pm 5$  s für den Domänenwechsel und  $13 \pm 2$  s für seinen rückwärtigen Wechsel. Für die NM-Assoziation ergibt sich eine mittlere Zeitkonstante von  $46 \pm 4$  s und  $12 \pm 2$  s für deren Dissoziation, womit die Kinetiken von Domänenwechsel- und NM-Reporter im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung) liegen. Zugrunde liegen Übergangszahlen von  $N=119$  und  $N=143$  für den

Domänenwechsel bzw. rückwärtigen Wechsel und  $N=113$  und  $N=138$  für NM-Assoziation und -Dissoziation.

Die Verweildauerverteilung derselben Reporterkombination, aber mit vertauschten Farbstoffsonden ( $NM^{Atto542}+DS^{JF646}$ ), ist in Abbildung 3-22 dargestellt.

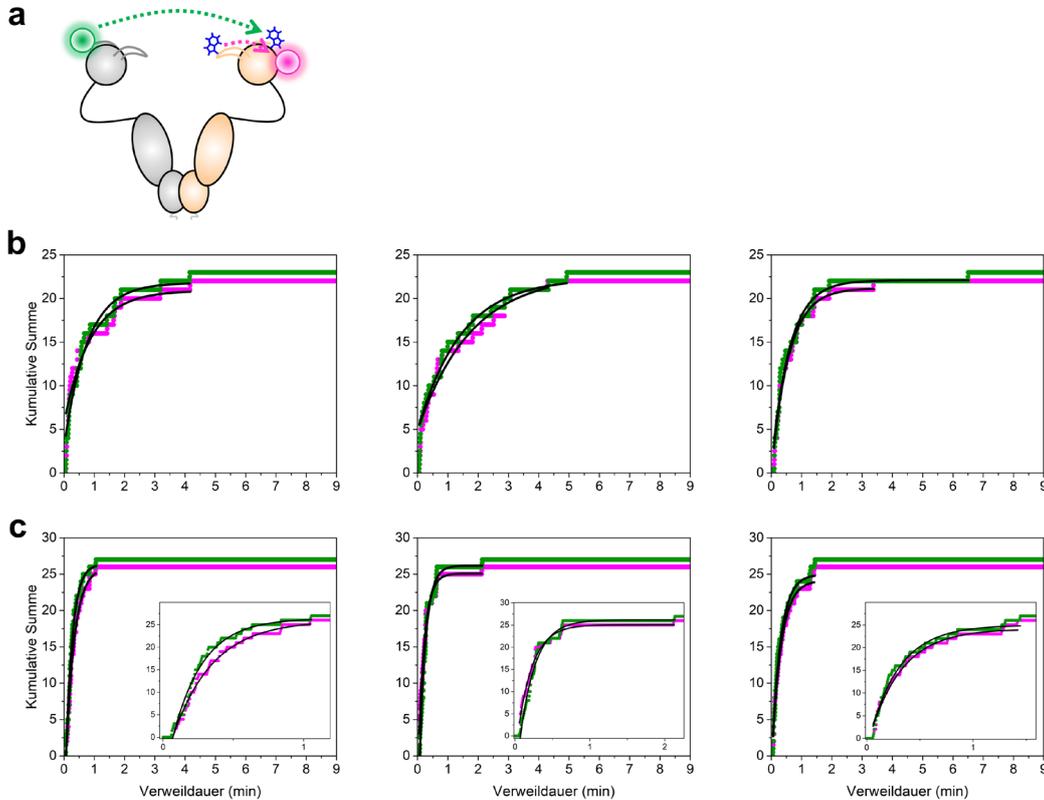


**Abbildung 3-22: Verweildaueranalyse von  $NM^{Atto542}+DS^{JF646}$ -Hsp90.** In (a) sind die verschiedenen markierten PET-Reporter schematisch dargestellt. (b) zeigt die kumulativen Summen der drei Datensätze für NM-Assoziation (b, grün) und Domänenwechsel (b, magenta). (c) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für NM-Dissoziation (c, grün) und rückwärtigen Domänenwechsel (c, magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. Aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern sind jeweils Vergrößerungen gegeben.

Die tatsächlichen Datenpunkte lassen sich jeweils durch monoexponentielle Näherungen beschreiben. Dabei ergeben sich für die NM-Assoziation und -Dissoziation mittlere Zeitkonstanten von  $26 \pm 2$  s bzw.  $14 \pm 1$  s und für den Domänenwechsel und rückwärtigen Wechsel  $23 \pm 4$  s bzw.  $13 \pm 2$  s. Damit liegen die Kinetiken der Dynamiken bei Klammerschluss und Öffnung von Hsp90 jeweils im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung). Die zugrundeliegenden Verweildauerzahlen betragen  $N=125$  und  $N=138$  für NM-Assoziation und -Dissoziation sowie  $N=135$  und  $N=148$  für Domänenwechsel und rückwärtigen Domänenwechsel.

## 3.6.3 DS- und Lid-Dynamik

Die Verweildauern der letzten Kombination der drei PET-Fluoreszenzreporter aus DS und Lid sind zunächst für DS<sup>Atto542</sup>+Lid<sup>JF646</sup> in Abbildung 3-23 dargestellt.

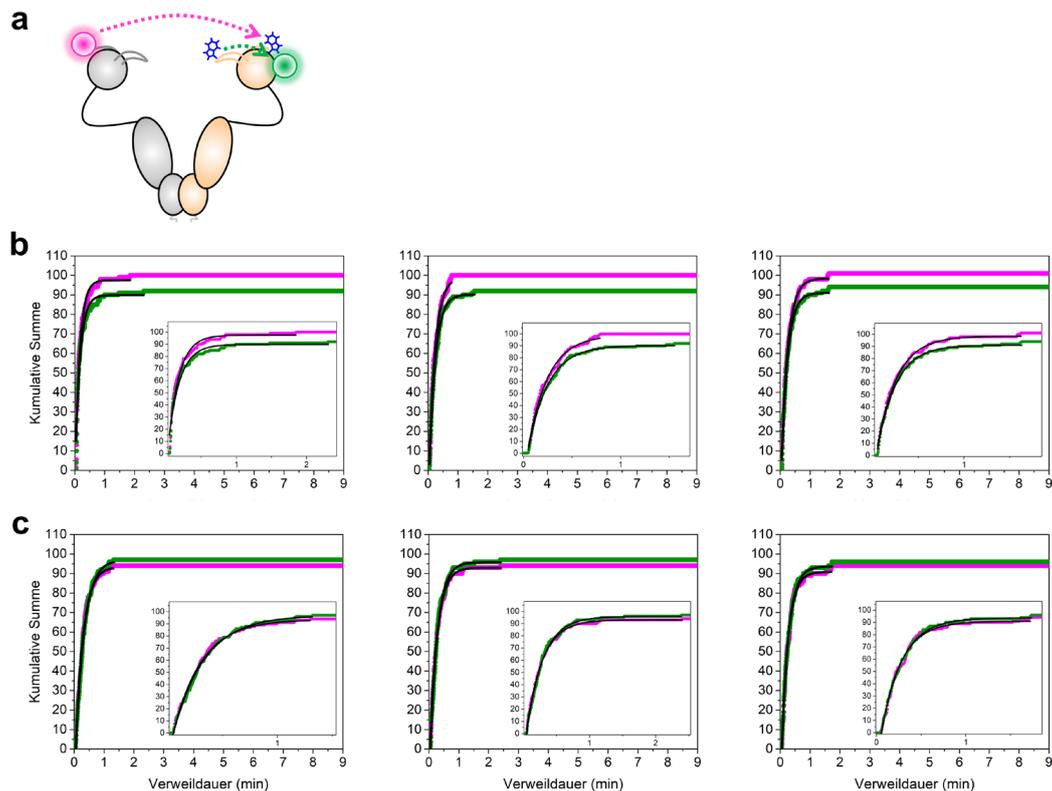


**Abbildung 3-23: Verweildaueranalyse von DS<sup>Atto542</sup>+Lid<sup>JF646</sup>-Hsp90.** In (a) sind die verschiedenen markierten PET-Reporter schematisch dargestellt. (b) zeigt die kumulativen Summen der drei Datensätze für den Domänenwechsel (b, grün) und Lid-Schluss (b, magenta). (c) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für den rückwärtigen Domänenwechsel (c, grün) und die Lid-Öffnung (c, magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. In (c) sind aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern Vergrößerungen gegeben.

Die Anzahl analysierter Verweildauern fällt bei dieser Kombination mit  $N=69$  für Domänenwechsel,  $N=81$  für rückwärtigen Wechsel,  $N=66$  für Lid-Schluss und  $N=78$  für dessen Öffnung geringer aus, was sich in teilweise etwas ungenaueren Näherungen zeigt. Dennoch ist die minimale Datensatzgröße deutlich überschritten (vgl. Abschnitt 3.4.5) und alle Graphen lassen sich unter Verwendung der tatsächlichen Datenpunkte durch monoexponentielle Annäherung beschreiben. Es werden mittlere Zeitkonstanten von  $56 \pm 27$  s für den Domänenwechsel und  $14 \pm 3$  s für den rückwärtigen Wechsel sowie  $64 \pm 37$  s und  $16 \pm 3$  s für Lid-Schluss

und -Öffnung ermittelt. Domänenwechsel und Lid-Schluss bzw. rückwärtiger Domänenwechsel und Lid-Öffnung liegen damit in ihren Zeitkonstanten im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung).

Dieselbe Reporterkombination mit vertauschten Farbstoffpositionen ( $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{DS}^{\text{JF646}}$ ) bzw. deren Verweildaueranalyse ist in Abbildung 3-24 dargestellt.



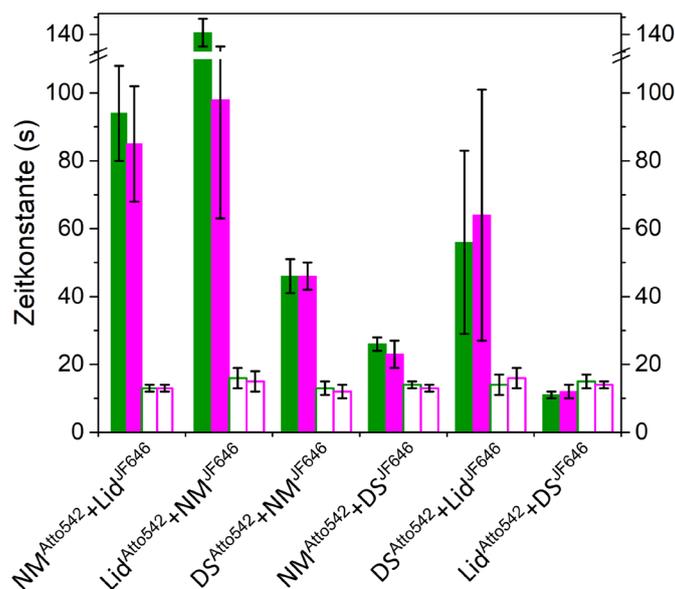
**Abbildung 3-24: Verweildaueranalyse von  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{DS}^{\text{JF646}}$ -Hsp90.** In (a) sind die verschiedenen markierten PET-Reporter schematisch dargestellt. (b) zeigt die kumulativen Summen der drei Datensätze für den Lid-Schluss (b, grün) und Domänenwechsel (b, magenta). (c) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für die Lid-Öffnung (c, grün) und den rückwärtigen Domänenwechsel (c, magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. Aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern sind jeweils Vergrößerungen gegeben.

Alle Graphen lassen sich unter Verwendung der tatsächlichen Datenpunkte gut durch monoexponentielle Näherungen beschreiben. Dabei ergeben sich mittlere Zeitkonstanten von  $11 \pm 1$  s und  $15 \pm 2$  s für Lid-Schluss und -Öffnung sowie  $12 \pm 2$  s und  $14 \pm 1$  s für den Domänenwechsel und rückwärtigen Wechsel. Lid-Schluss- und Domänenwechselkinetik sowie Lid-Öffnungs- und rückwärtige Domänenwechselkinetik liegen innerhalb der Fehlertoleranz

(Standardabweichung). Es wurden N=278 bzw. N=290 Verweildauern für Lid-Schluss bzw. -Öffnung untersucht und N=301 bzw. N=282 für Domänenwechsel bzw. rückwärtigen Wechsel.

### 3.6.4 Ähnliche Zeitkonstanten der Dynamiken

Die einzelnen lokalen Dynamiken wurden redundant aufgezeichnet, um jedes der drei mobilen Elemente mit jedem anderen mobilen Element gleichzeitig an einem Molekül zu untersuchen, was eine eindeutigere Aussage über deren wechselseitige Kooperation ermöglichen soll. Darüber hinaus sollte durch die zusätzliche Aufzeichnung derselben Reporterkombination mit vertauschten Farbstoffsonden ein möglicher Einfluss der Farbstoffe selbst auf die mobilen Elemente von Hsp90 untersucht werden. Dazu sind die Zeitkonstanten aus Abschnitt 3.6.1 - 3.6.3 in Abbildung 3-25 vergleichend dargestellt.



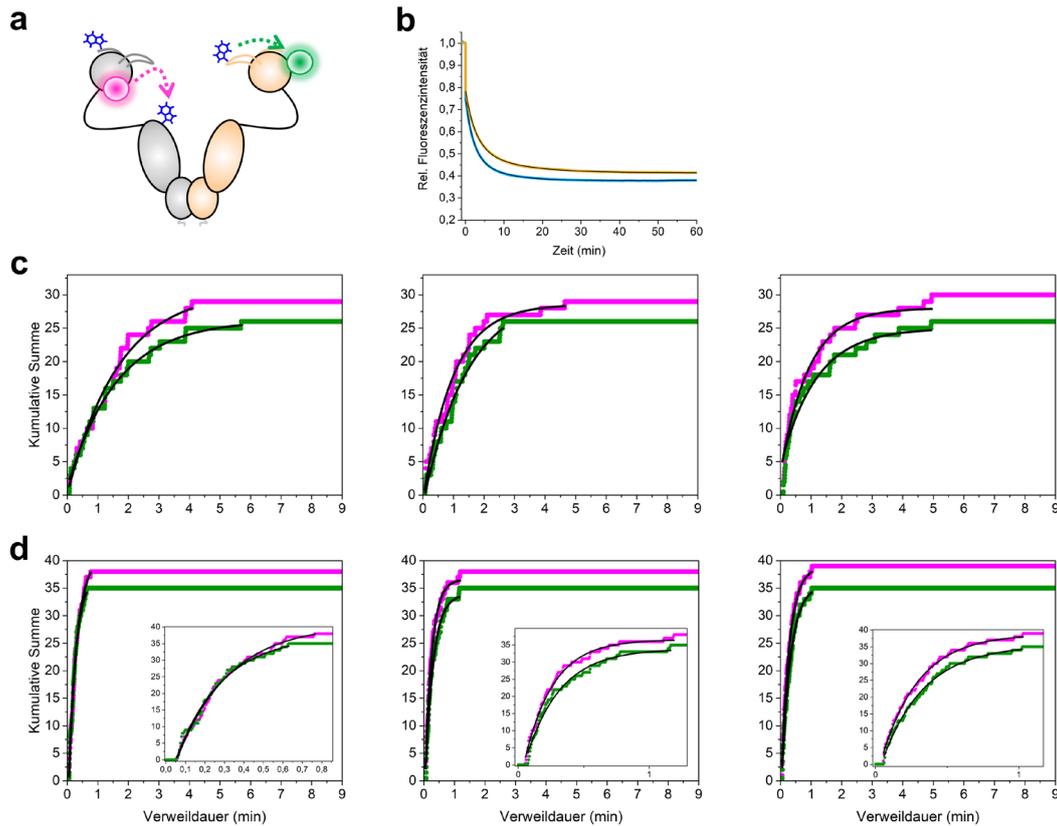
**Abbildung 3-25: Zeitkonstanten der verschiedenen PET-Fluoreszenzreporterkombinationen in Hsp90.** Zeitkonstanten der unter Abschnitt 3.6.1-3.6.3 beschriebenen Reporterkombinationen und deren Fehlerbereiche (Standardabweichung). Zeitkonstanten des jeweiligen Reporters sind für Atto542 in grün, für JF646 in magenta dargestellt. Dynamiken, die den globalen Klammerschluss von Hsp90 begleiten, sind als offene Säulen, diejenigen, die die Klammeröffnung begleiten, als geschlossene Säulen gezeigt.

Die mittleren Zeitkonstanten der die Klammeröffnung von Hsp90 begleitenden Dynamiken (NM-Dissoziation, Lid-Öffnung und rückwärtiger Domänenwechsel)

liegen zwischen 12 s und 16 s und für alle Kombinationspaare innerhalb der gegenseitigen Fehlerbereiche (Standardabweichung). Hier ist weder eine Beeinflussung durch den jeweiligen Farbstoff noch durch die Kombination der Reporter zu beobachten. Die mittleren Zeitkonstanten der den Klammerschluss begleitenden Dynamiken (NM-Assoziation, Lid-Schluss und Domänenwechsel) zeigen eine größere Variation. Die Kombination aus NM und Lid zeigt unabhängig von der Farbstoffposition eine Zeitkonstante im Bereich von ca. 90 s. Der Lid weicht in der Kombination Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup> mit einer höheren Zeitkonstante etwas ab, liegt dabei aber innerhalb des Fehlers des begleitenden NM-Reporters. Die Farbstoffposition hat hier keinen übergeordneten Einfluss auf die Dynamik der mobilen Elemente. In den übrigen Reporterkombinationen, die jeweils den Domänenwechsel beinhalten, zeigt sich eine etwas kürzere Zeitkonstante von ca. 50 - 55 s, wenn Atto542 den Domänenwechsel anzeigt. Gibt hingegen JF646 den Domänenwechsel wieder, liegt die Zeitkonstante bei ca. 10-20 s. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Modifikation des N-terminalen  $\beta$ -Faltblatts an der Stelle A2C, wie sie beim DS-Reporter verwendet wird, die lokalen Konformationsdynamiken, die den Klammerschluss begleiten, beschleunigt. Die Beschleunigung zeigt sich dabei ebenfalls bei der jeweils mitaufgezeichneten zweiten Dynamik. Der Farbstoff Atto542 hat dabei an der Position A2C einen geringeren Einfluss, der Effekt durch JF646 ist hingegen ausgeprägt. Berücksichtigt man folglich die Reporterkombinationen aus Lid+NM, sowie DS+NM und DS+Lid, wobei der DS stets durch den weniger stark beeinflussenden Farbstoff Atto542 wiedergegeben wird, erhält man für alle mobilen Elemente ähnliche Zeitkonstanten im Bereich von ca. 50-90 s für die Schließungsdynamiken und ca. 15 s für die Öffnungsdynamiken. Die meisten davon liegen im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung).

### 3.6.5 Einfluss der A2W Mutation auf die NM + Lid-Reporterkombination

Der beobachtete Beschleunigungseffekt durch die Modifikation des terminalen  $\beta$ -Faltblatts sollte genauer untersucht werden. Dafür wurde in der Kombination aus Lid+NM an der Position des Farbstoffs im DS-Reporter (A2C) ein Tryptophan eingebracht und der Effekt sowohl auf Einzelmolekülebene in Lid<sup>Atto542</sup>+A2W-NM<sup>JF646</sup>-Hsp90 als auch mittels konventioneller Spektroskopie an A2W-NM<sup>JF646</sup>-Hsp90 untersucht (Abbildung 3-26).



**Abbildung 3-26: Effekt durch A2W-Mutation auf Lid<sup>Atto542</sup>+NM<sup>JF646</sup> und NM<sup>JF646</sup>.** In (a) sind die verschieden markierten PET-Reporter und die A2W-Mutation schematisch dargestellt. (b) zeigt konventionelle fluoreszenzspektroskopische Intensitätszeitspuren von NM<sup>JF646</sup>-Hsp90 (orange) und A2W-NM<sup>JF646</sup>-Hsp90 (blau). Zum Zeitpunkt t=0 wurden 2 mM AMP-PNP zugegeben. (c) und (d) zeigen die Verweildaueranalyse des Lid<sup>Atto542</sup>+A2W-NM<sup>JF646</sup> Einzelmolekülkonstrukts. Der Lid- ist in grün (Atto542), der NM-Reporter in magenta (JF646) dargestellt. In (d) sind aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern Vergrößerungen gegeben. Schwarze Linien stellen exponentielle Näherungen an die Daten dar.

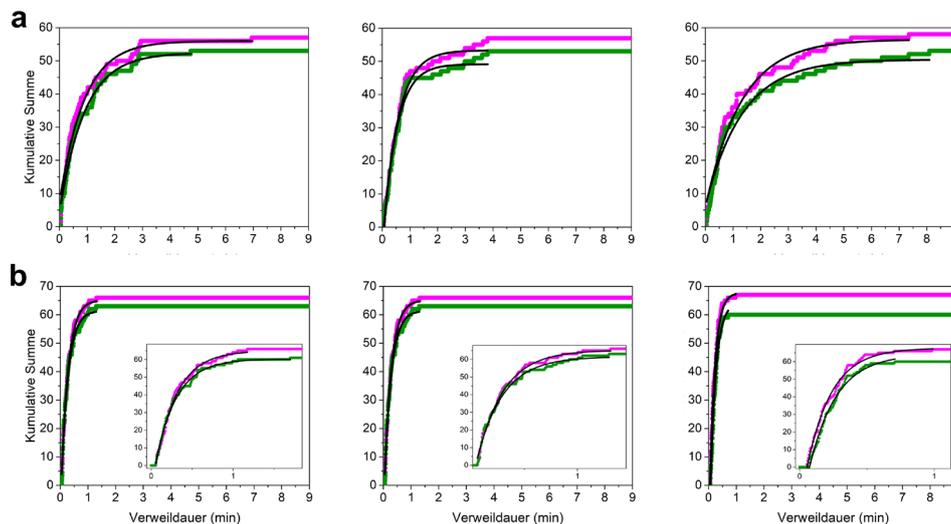
Die integrierten Verweildauern können unter Verwendung der tatsächlichen Datenpunkte jeweils gut durch eine monoexponentielle Näherung beschrieben werden. Dabei ergeben sich mittlere Zeitkonstanten von  $85 \pm 14$  s bzw.  $16 \pm 2$  s für Lid-Schluss bzw. -Öffnung und  $72 \pm 26$  s bzw.  $15 \pm 2$  s für NM-Assoziation bzw. -Dissoziation. Zugrunde liegen Verweildaueranzahlen von N=78 und N=105 für Lid-Schluss und -Öffnung bzw. N=88 und N=115 für NM-Assoziation und -Dissoziation. Die Schließungs- bzw. Öffnungsdynamiken beider Reporter liegen im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung). Die konventionellen fluoreszenzspektroskopischen Intensitätszeitspuren des wildtypischen NM-Reporters und A2W-NM-Reporters lassen sich gut bi-exponentiell annähern.

Aus jeweils drei Wiederholungsmessungen wurden mittlere Zeitkonstanten von  $0,18 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  für  $\text{NM}^{\text{JF646}}$ -Hsp90 und  $0,29 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$  für  $\text{A2W-NM}^{\text{JF646}}$ -Hsp90 ermittelt.

Die unter Abschnitt 3.6.4 vermutete Beschleunigung der lokalen Konformationsdynamiken während des Klammerschlusses von Hsp90 durch die Modifikation am N-Terminus kann durch die Mutation A2W erfolgreich imitiert werden. Dabei verringert sich die Zeitkonstante der NM+Lid-Kombination von ungefähr 90 s auf ca. 75 s (vgl. Abschnitt 3.6.4), wodurch der Bereich, in dem die Zeitkonstanten aller Reporterkombinationen liegen, sich nochmals auf ca. 50-80 s verdichtet. Der Effekt der N-terminalen Modifikation kann außerdem mittels etablierter konventioneller Spektroskopie-Messungen an nicht für die Einzelmolekülspektroskopie modifiziertem Hsp90 reproduziert werden (Schulze et al. 2016).

### 3.6.6 NM- und Lid-Dynamik ohne *coiled-coil*-Motiv

Bei der Pilotmessung eines Konstruktes ( $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$ ), dem das *coiled-coil*-Motiv entfernt wurde und stattdessen die Biotin-Neutravidin-Biochemie zur Dimerisierung verwendet wurde, (vgl. Abschnitt 3.4.1) konnten die in Abbildung 3-27 dargestellten Verweildauern aufgezeichnet werden.



**Abbildung 3-27: Verweildaueranalyse von  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$ -Hsp90 ohne *coiled-coil*-Motiv.** Gezeigt sind die kumulativen Summen der drei Datensätze für Lid-Schluss ((a), grün, Atto542) und NM-Assoziation ((a), magenta, JF646). (b) zeigt analog dazu die kumulativen Summen für Lid-Öffnung ((b), grün) und NM-Dissoziation ((b), magenta). Die schwarzen Linien stellen monoexponentielle Annäherungen an die Daten dar. In (b) sind aufgrund der Häufung kurzer Verweildauern Vergrößerungen gegeben.

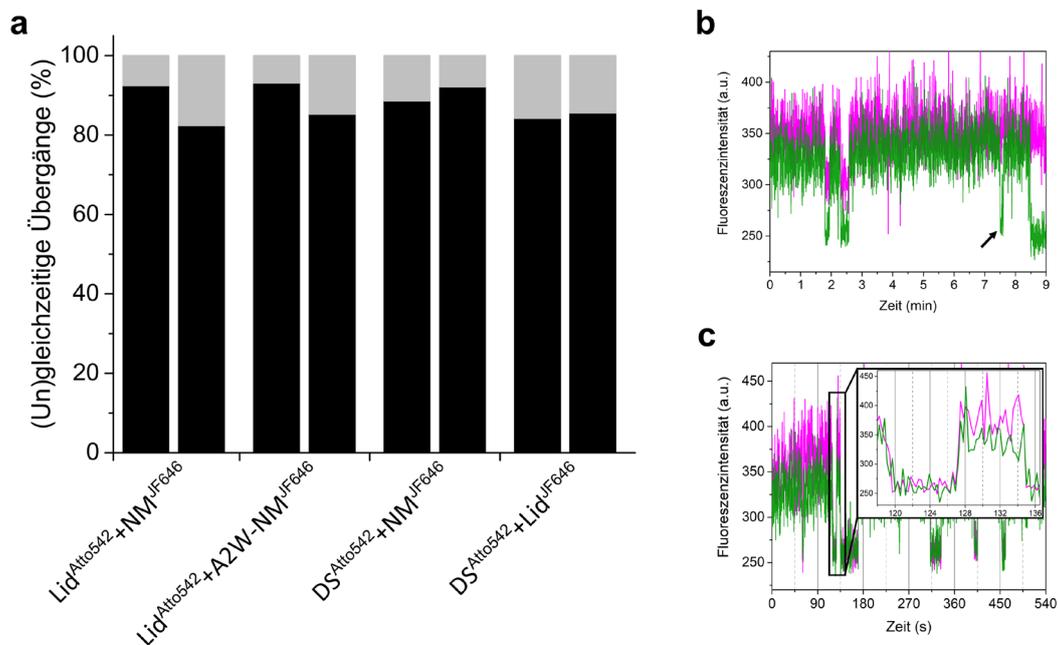
Die integrierten Verweildauern lassen sich unter Verwendung der tatsächlichen Datenpunkte durch eine monoexponentielle Näherung beschreiben. Die ermittelte mittlere Zeitkonstante beträgt für den Lid-Schluss  $55 \pm 25$  s und für dessen Öffnung  $14 \pm 2$  s. Die Zeitkonstante der NM-Assoziation bzw. -Dissoziation beträgt  $54 \pm 23$  s bzw.  $14 \pm 3$  s. Die zugrundeliegenden Verweildauern betragen für Lid-Schluss und -Öffnung  $N=159$  bzw.  $N=184$  und für NM-Assoziation und -Dissoziation  $N=172$  bzw.  $N=199$ . Die Zeitkonstanten für die Lid- und NM-Dynamiken liegen dabei im gegenseitigen Fehlerbereich (Standardabweichung).

Sowohl die Klammeröffnungs- als auch die Klammerschließungsdynamiken liegen im Bereich der Zeitkonstanten, die für die Konstrukte mit *Coiled-coil* gemessen wurden (Klammerschluss: ca. 50-80 s, Klammeröffnung: ca. 14 s). Damit war es möglich, funktionale Hsp90<sup>Atto542, JF646</sup>-Moleküle ohne *Coiled-coil* und stattdessen durch die Biotin-Neutravidin-Biochemie vermittelt zu immobilisieren.

### 3.7 Synchronität dominiert lokale Konformationsänderungen in Hsp90

Die kinetische Analyse der PET-Fluoreszenzreporterpaare unter Abschnitt 3.6 zeichnet ein Bild von entfernten lokalen Konformationsdynamiken in Hsp90, die mit ähnlichen Übergangszeiten stattfinden. Dabei zeigten sich jeweils für beide PET-Reporter eines Reporterpaares im Fehlerbereich gleiche Zeitkonstanten, bei verschiedener Kombinatorik der einzelnen Paare ergeben sich außerdem sehr ähnliche Zeitkonstanten der Zustandsübergänge. Zusammengenommen deutet das auf kooperative Umlagerungen der mobilen Elemente in Hsp90 hin, wie sie in konventioneller spektroskopischer Untersuchung bereits beobachtet werden konnten (Schulze et al. 2016). Allerdings ist die zeitliche Auflösung (Variation der Zeitkonstanten bei Klammerschluss ca. 20-30 s) nicht ausreichend, um darüber eine Gleichzeitigkeit der entfernten lokalen Umlagerungen eindeutig festzustellen. So kann auch das Modell des intermediatbasierten Konformationszyklus (vgl. Abschnitt 1.2.3) zutreffend sein. Das gilt zumindest für die den Klammerschluss begleitenden Umlagerungen, die die Klammeröffnung begleitenden Umlagerungen zeigen bereits innerhalb weniger Sekunden dieselbe Kinetik. Um die Frage nach Synchronität der lokalen Umlagerungen beantworten zu können, ist eine höhere Zeitauflösung notwendig. Dies wurde durch ein Analysemerkmal der Python-Routine (vgl. Abschnitt 3.5) ermöglicht, die bei jeder Zweifarben-Einzelmolekül-Fluoreszenzzeitspur die zeitliche Koinzidenz der

Übergänge zwischen PET-gelöschtem und nicht gelöschtem Zustand zwischen beiden Kanälen überprüft. Das Zeitfenster, um einen Übergang als gleichzeitig einzustufen, ist mit  $\sim 2$  s für ein auf Minuten-Skala aktives Protein ausreichend klein gewählt. Durch die Gegenüberstellung der prozentualen Anteile an gleichzeitigen und nicht gleichzeitigen Übergängen im jeweiligen Kanal und damit der jeweiligen lokalen Konformationsänderung soll ermittelt werden, inwiefern Synchronität der mobilen Elemente eine Rolle im Konformationszyklus des Chaperons spielt. Außerdem sind damit Zustandsübergänge, die gelegentlich nur in einem Kanal auftreten (Abbildung 3-28, (b)), ebenfalls in der Analyse berücksichtigt. In Abbildung 3-28 sind dazu die Analyse der synchronen und nicht synchronen Übergänge für die Reporterpaare  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$ , bzw.  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{A2W-NM}^{\text{JF646}}$ ,  $\text{DS}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$  und  $\text{DS}^{\text{Atto542}}+\text{Lid}^{\text{JF646}}$ , sowie eine beispielhafte Vergrößerung mehrerer Übergänge (Abbildung 3-28, (c)) dargestellt.



**Abbildung 3-28: Analyse der Gleichzeitigkeit der simultan aufgezeichneten PET-Fluoreszenzreporter.** In (a) sind die prozentualen Anteile der innerhalb von  $\sim 2$  s gleichzeitig bzw. ungleichzeitig ablaufenden Zustandsübergänge von PET-gelöscht zu nicht gelöscht und umgekehrt für die Reporterkombinationen  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$ ,  $\text{Lid}^{\text{Atto542}}+\text{A2W-NM}^{\text{JF646}}$ ,  $\text{DS}^{\text{Atto542}}+\text{NM}^{\text{JF646}}$  und  $\text{DS}^{\text{Atto542}}+\text{Lid}^{\text{JF646}}$  dargestellt. Der jeweils erste Balken repräsentiert den Atto542-markierten Reporter, der zweite den JF646-markierten. In schwarz ist der Anteil als gleichzeitig eingestufte Übergänge, in grau der Anteil als nicht gleichzeitig eingestufte Übergänge dargestellt. (b) zeigt eine exemplarische Zweifarben-Einzelmolekülspur, in welcher ein Reporter in einen Aus-Zustand übergeht, ohne dass ein Pendant im anderen Kanal vorhanden wäre (Pfeil). In

(c) sind mehrere Übergänge in Vergrößerung dargestellt, sodass die Koinzidenz beider Kanäle sichtbar wird.

Bei allen Reporterpaaren ist die überwiegende Mehrheit aller aufgezeichneten Übergänge zwischen den beiden Zuständen fluoreszierend – und damit die offene Konformation von Hsp90 widerspiegelnd – und PET-gelöscht – dabei die geschlossene Konformation widerspiegelnd – synchron. Die jeweiligen Anteile der dabei gleichzeitig ablaufenden Übergänge liegen im Durchschnitt bei etwa 12 % mit minimal 7 % und maximal 18 %. Hierbei wird nicht unterschieden, ob die Übergänge sequenziell und dabei in einem Abstand  $> 1,8$  s ablaufen oder ob nur in einem Kanal ein Übergang zu verzeichnen ist. Des Weiteren ist keine Häufung bei einem der beiden Farbstoffe oder einem bestimmten PET-Reporter zu beobachten. So treten bei den Kombinationen aus Lid- und NM-Reporter beim Farbstoff JF646 und bei den Kombinationen aus DS- und NM- bzw. Lid-Reporter beim Farbstoff Atto542 etwas mehr ungleichzeitige Übergänge auf. Auch das Konstrukt mit der A2W-Modifikation zeigt keine Veränderung der Anteile an gleichzeitigen und nicht gleichzeitigen Übergängen, was dafürspricht, dass die Modifikation am N-Terminus das wechselseitige Zusammenspiel der mobilen Elemente nicht beeinflusst.

Die Analyse ist nicht eindeutig in Bezug auf die Ursache der ungleichzeitigen Übergänge. Auf diese entfällt im Schnitt mit 12 % aber nur ein sehr kleiner Teil der im Chaperon ablaufenden Konformationsdynamiken. Die überwiegende Mehrheit der Dynamiken der drei mobilen Elemente (ca. 88 %) laufen im angewendeten Zeitfenster gleichzeitig ab. Damit zeichnet sich unter hoher zeitlicher Auflösung eine übergeordnete Synchronität und wechselseitige Abhängigkeit der Dynamiken von Lid, N-terminalem  $\beta$ -Faltblatt und Interaktion von NTD und MD ab, die in den Zeitkonstanten schon unter niedrigerer Zeitauflösung beobachtet worden war. Die lokalen Konformationsdynamiken, die Klammerschluss und –Öffnung des molekularen Chaperons begleiten, sind also stark von Synchronität dominiert.

## **4 Diskussion**

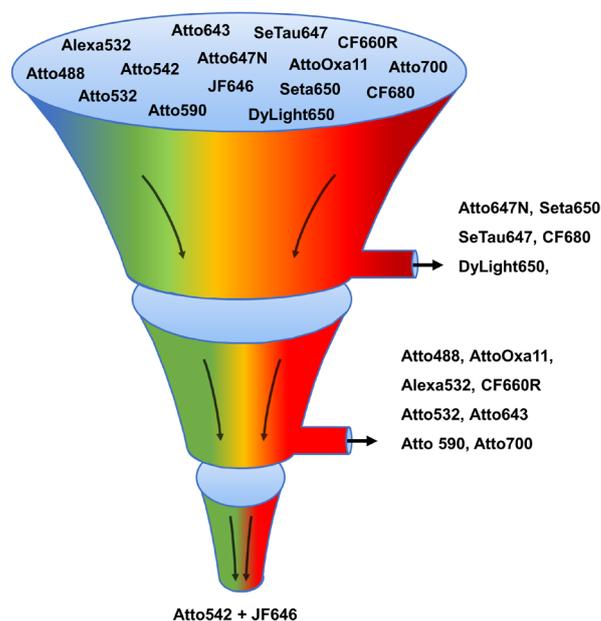
### **4.1 Atto542 und JF646 ermöglichen robuste bildgebende Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie**

Vor dem Ziel, lokale Konformationsdynamiken in einzelnen Proteinen über Reportersysteme aufzuzeichnen, die auf dem Phänomen des photoinduzierten Elektronentransfers beruhen (PET), liegen mehrere Hürden. Eine davon wurde vor wenigen Jahren mit der Entwicklung von PET-Fluoreszenzreportern für das Chaperon Hsp90 genommen. Diese zeigen Konformationsänderungen von drei mobilen Elementen während des Schlusses der molekularen Klammer an, als die Hsp90 verstanden werden kann (Schulze et al. 2016). Das System des Chaperons ist daher gut geeignet, um die Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie zu etablieren, gleichzeitig einen tieferen Einblick in das biologische System zu erhalten und so das Potenzial der Methode zu evaluieren. Dazu wurde ein bildgebender Ansatz verfolgt, der an einem Weitfeldmikroskop durchgeführt werden kann.

Anders als in konventioneller Spektroskopie gibt es bei der fluoreszenzbasierten Einzelmolekülspektroskopie eine Reihe von Anforderungen an die Fluoreszenzsonden, aufgrund derer in anderem Kontext häufig verwendete fluoreszierende Proteine als Sonden ausscheiden. Stattdessen rücken organische Farbstoffe mit ihrer geringen Größe und guten photophysikalischen Eigenschaften in den Fokus (Gust et al. 2014). In der Literatur finden sich Untersuchungen zu organischen Farbstoffen und deren Charakterisierung u.a. nach Photostabilität, Redoxpotentialen oder Wasserlöslichkeit (Doose et al. 2009; Gust et al. 2014). Darauf aufbauend wurde eine Auswahl an potenziellen Farbstoffen erstellt, die sich über das gesamte sichtbare Spektrum erstreckt. Die Farbstoffe wurden mittels sukzessivem Screening auf ihre photophysikalische Eignung zur bildgebenden Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie hin überprüft, wobei sich zeigte, dass über den gesamten sichtbaren Spektralbereich organische Farbstoffe zu finden sind, die sich effizient durch Tryptophan löschen lassen. Diese Eigenschaft ist die Grundlage für die zu etablierende Methode. Andererseits wurden Farbstoffe wie Atto647N oder SeTau647 identifiziert, die sich zwar laut Herstellerinformation durch hohe Quantenausbeuten ( $> 60\%$ ) und Extinktionskoeffizienten ( $\geq 150000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) auszeichnen, durch Tryptophan aber nicht oder nur schwach in ihrer Fluoreszenz gelöscht werden (Abbildung 3-3). Die

genaue Ursache dafür wurde nicht weiter untersucht, kann aber z.B. in ungeeigneten Redoxpotenzialen begründet sein (Doose et al. 2009). Bei weiterer Untersuchung der löslichen Farbstoffe hinsichtlich Photostabilität mit Blick auf das Bleichverhalten wurde ein Großteil der Farbstoffe verworfen (Abbildung 4-1). Im Falle von z.B. Atto488 und Alexa532 lag das an einer generell geringen Photostabilität, was unter anderem in Zusammenhang mit dem energiereichen, kurzwelligen Absorptionsbereich stehen könnte. Zum anderen waren farbstoffspezifisch unterschiedliche Puffer-Bedingungen ausschlaggebend für deren Ausschluss, z.B. zeigte CF660R geringe Photozerstörung unter sauerstoffreichen, nicht aber unter sauerstofffreien Bedingungen. Aufgrund des Phänomens DSPO (engl.: dye-sensitized-photo-oxidation) können bei ATP-Verwendung nur sauerstofffreie Bedingungen berücksichtigt werden, da molekularer Sauerstoff das Tryptophan im PET-Komplex über DSPO leicht oxidieren kann und damit dessen Fähigkeit, die Fluoreszenz der Farbstoffsonde über PET zu löschen, irreversibel verloren geht (Nakagawa et al. 1977; García und Silva. E 1997; Reid et al. 2016). Dieser Effekt kann für Einfarben-Experimente mit dem ATP-Analogen AMP-PNP auch gezielt ausgenutzt werden (Schulze 2017). Molekularem Sauerstoff in der Pufferlösung kommt darüber hinaus eine ambivalente Rolle zu, denn einerseits führen reaktive Sauerstoffspezies häufig zur Zerstörung des  $\pi$ -Elektronensystems von Fluorophoren und damit verbunden zu schnellen Bleichereignissen, gleichzeitig werden allerdings von organischen Farbstoffen transient eingenommene Dunkelzustände, wie z.B. der Triplettzustand, durch Sauerstoff in der Lösung sehr effektiv depopuliert, sodass Photoblinken unterdrückt wird (Gust et al. 2014). Deshalb wurde dem sauerstofffreien Puffer das Vitamin E-Derivat Trolox (TX) zugesetzt, das photostabilisierende Effekte gegenüber Fluorophoren zeigt, indem es zusammen mit seiner Quinonform (TQ) ein ROXS-System ausbildet und ähnlich wie Sauerstoff ebendiese Dunkelzustände effizient depopuliert (Cordes et al. 2009). Die vielversprechendsten Kandidaten des Farbstoffscreenings Atto542 und JF646, die außerdem einfach spektral zu separieren sind, wurden zunächst um den für PET-Experimente etablierten Oxazin-Farbstoff AttoOxa11 (Neuweiler et al. 2009; Neuweiler et al. 2010; Ries et al. 2014; Schulze et al. 2016; Mercier et al. 2019; Heiby et al. 2019) ergänzt. Nachdem dieser im zweiten Aspekt der Photostabilität, dem Photoblinken, starke Fluoreszenzfluktuationen zeigte (Abbildung 3-9), welche bei Atto542 und JF646 nicht zu beobachten waren, kristallisierten sich letztere als geeignetes Farbstoffpaar heraus. Der photostabilisierende Effekt, den das Vitamin E-Derivat Trolox auf Fluoreszenzfarbstoffe zeigen kann, konnte für AttoOxa11 nicht beobachtet werden.

Das deckt sich mit Beobachtungen von Cordes et al. 2009, wonach Oxazin-Farbstoffe nicht von stabilisierenden Effekten durch Trolox profitieren. Mittels konventioneller Spektroskopie am etablierten NM-PET-Reportersystem in Hsp90 (Schulze et al. 2016) unter Verwendung von Atto542 bzw. JF646 als Farbstoffsonden wurde die Fähigkeit der beiden Farbstoffe, lokale Konformationsdynamiken in Proteinen über PET-vermittelte Fluoreszenzlöschung wiederzugeben, bestätigt. Die erhaltenen mittleren Zeitkonstanten stimmen für beide Farbstoffe mit dem Literaturwert überein.



**Abbildung 4-1: Farbstoffscreening.** Der sukzessive Ablauf des Farbstoffscreenings ist als Trichter skizziert dargestellt. Von insgesamt 15 getesteten kommerziellen organischen Farbstoffen, die über das gesamte sichtbare Lichtspektrum verteilt sind, kristallisiert sich durch Untersuchung verschiedener Kriterien, die zum Ausschluss von ungeeigneten Farbstoffen führen, das Farbstoffpaar aus Atto542 und JF646 als zur Verwendung in der bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie geeignet heraus.

Die aufgezeichneten Fluoreszenzintensitätszeitspuren einzelner Hsp90-Moleküle unter Abschnitt 3.4.3-3.4.4 bestätigen den Erfolg des Screenings sowie der Tests am NM-Hsp90-Reporter und zeigen klar identifizierbare ATP-induzierte Fluoreszenzfluktuationen. Experimente mit Kontrollkonstrukten ohne Tryptophan haben in konventioneller Spektroskopie bereits gezeigt, dass die beobachtete Fluoreszenzlöschung durch das eingebrachte Tryptophan verursacht wird (Schulze et al. 2016). Das ist auch auf Einzelmolekülebene zutreffend, wie die Intensitätszeitspuren der Kontrollkonstrukte (Abbildung 3-17) deutlich machen, denen das entsprechende Tryptophan des Reportersystems fehlt. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht mit vollkommener Sicherheit ausgeschlossen werden, dass sowohl Atto542 als auch JF646 unter Messbedingungen in geringem Maße photophysikalische Fluktuationen zeigen (vgl. dazu 4.2). Mit ca. 10 % aller

Zustandsübergänge würden diese aber nur eine untergeordnete Rolle spielen und beeinflussen damit die Analyse nicht merklich. Die beiden Farbstoffe Atto542 und JF646 sind also für die zu etablierende Methode geeignet.

Für die Durchführung der Zweifarben-Einzelmolekülmessungen wurden weitere Protokolle entwickelt und verifiziert. Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von Hsp90 zeigte, dass die verschiedenen Modifikationen am C-Terminus des Chaperons, die zur Untersuchung einzelner immobilisierter Moleküle notwendig waren, die Aktivität nicht maßgeblich beeinflussen. Da das Chaperon von seiner ATPase-Funktion abhängig ist, kann daraus geschlossen werden, dass auch die grundsätzliche Funktion von Hsp90 durch die Modifikationen nicht beeinträchtigt ist (Pearl und Prodromou 2006). ATPase-Raten von farbstoffmarkiertem Hsp90 wurden bereits an anderer Stelle bestimmt, weshalb in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde (Schulze 2017). Darüber hinaus wurden die PET-Fluoreszenzreporter aus Schulze et al. 2016 verwendet. Dort zeigte sich, dass die mittels konventioneller Spektroskopie gemessenen Ratenkonstanten der PET-Fluoreszenzreporter mit der ATPase-Rate übereinstimmen, was eine indirekte Kontrolle darstellt. Der bildgebende Ansatz der Methode und die damit gekoppelte Beobachtung immobilisierter Moleküle erlaubt im Vergleich zu diffusionsbasierten Einzelmoleküluntersuchungen eine lange Beobachtungszeit einzelner Proteine (Deniz et al. 2008). Damit wird es möglich, auch langsame Konformationsdynamiken aufzuzeichnen, die im Hinblick auf die geringe ATPase-Rate des Chaperons von  $0,2 \text{ min}^{-1}$  (Schulze et al. 2016; Daturpalli et al. 2017), an die die Dynamiken gekoppelt sind (Pearl und Prodromou 2006), wahrscheinlich werden. Die Ausbildung zweifach-markierter Hsp90-Moleküle konnte über Forcierung eines begünstigten Hetero-*coiled-coil*-Motivs erreicht werden. Das gebildete Heterodimer wurde anschließend direkt mit dem Adaptermolekül Neutravidin inkubiert, um es darüber fest zu verankern und so vor erneuter Dissoziation zu schützen bzw. um auf ein Dissoziationseignis direkt eine Re-Assoziation mit derselben Untereinheit folgen zu lassen. Zusammen mit der so ermöglichten Verwendung hochverdünnter Lösungen des fluoreszierenden Hsp90-Konstrukts (100-500 pM) konnten einzelmolekülaugliche Oberflächen präpariert werden, auf denen zweifach-markierte Hsp90-Moleküle separiert immobilisiert sind (Abbildung 3-14). Diese können durch Farbstoffmikrosphären als Referenzpunkte, die direkt in der Probenflusskammer aufgezeichnet werden, im Zuge der Datenanalyse zuverlässig identifiziert werden. Mit der Untersuchung der notwendigen Datensatzgröße konnte ein weiterer Aspekt der Methodenetablierung, nämlich die Reproduzierbarkeit, adressiert und umgesetzt werden, was die

Bedeutung der mittels der neuen Methode aufgezeichneten Ergebnisse untermauert. Sollen Einzelmoleküldaten quantitativ analysiert werden, sind damit oftmals große Datenmengen assoziiert, die eine händische Auswertung erschweren. Obwohl die Analyse von PET-induzierter Fluoreszenzfluktuation aufgrund der starken kontaktinduzierten Löschung durch ein Zwei-Zustandssystem beschrieben werden kann (Doose et al. 2005), gibt es aufgrund der Neuheit der Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Methode nach aktuellem Stand kein geeignetes verfügbares Auswerteprogramm. Um diesen Aspekt dennoch zu berücksichtigen, wurde eine Routine in der Programmiersprache Python entwickelt, die iterativ jede Zweifarben-Einzelmolekülspur auf Fluoreszenzfluktuationen und deren gleichzeitiges Auftreten in beiden Kanälen hin analysiert. Die halbautomatisierte Analyse lässt zwar eine potenzielle Beeinflussung durch den Benutzer zu, bietet durch Verwendung sogenannter „harter Kriterien“, wie z.B. einem intensitätsbasierten Schwellenwert aber Möglichkeiten, dem entgegenzuwirken (Lerner et al. 2021). Etwaige Ungenauigkeiten sind in der weiteren Analyse durch Verwenden eines experimentellen Fehlers zudem berücksichtigt und erlauben daher insgesamt eine robuste Datenanalyse. Alle angewandten Aspekte zusammen ermöglichen eine robuste qualitative sowie quantitative Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzsonden Atto542 und JF646.

## 4.2 Analyse der Synchronität lokaler Konformationsänderungen in Hsp90

Mit der Beobachtung, dass Hsp90 in Reaktion auf ATP-Bindung eine Konformationsänderung erfährt, begannen die Dynamiken des Chaperons große Aufmerksamkeit zu erregen (Csermely et al. 1993). Infolgedessen wurden mehr Details des ATP-abhängigen Konformationszyklus sowohl auf globaler als auch auf lokaler Ebene bekannt (Richter und Buchner 2006; Krukenberg et al. 2011; Schulze et al. 2016)(vgl. Abschnitt 1.2, 3.1). Mit der Entwicklung von sub-Nanometer-sensitiven PET-Fluoreszenzreportern für das Hsp90-Protein wurde die PET-Fluoreszenzmethode erfolgreich dazu verwendet, die lokalen mobilen Elemente der Lidstruktur, der NM-Assoziation sowie des Domänenwechsels über Minuten hinweg zu beobachten (Schulze et al. 2016). Dabei zeigten sich für die drei – jeweils separat untersuchten – den globalen Klammerschluss begleitenden Dynamiken ähnliche Ratenkonstanten. An diesem Punkt knüpfen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an. Die gleichzeitige Aufzeichnung jeweils

zwei der drei mobilen Elemente an einzelnen Hsp90-Molekülen ermöglicht die Untersuchung einer zur Diskussion stehenden Synchronität zwischen diesen durch direkte Beobachtung. Durch die Verwendung des nativen Nukleotids ATP werden darüber hinaus neben den Schließungsdynamiken auch die jeweiligen Öffnungsdynamiken zugänglich. Für jede Kombinatorik aus Lid-Schluss bzw. -Öffnung, NM-Assoziation bzw. -Dissoziation und Domänenwechsel bzw. rückwärtigen Wechsel zeichnen sich jeweils zwei Zeitkonstanten ab, die im gegenseitigen Fehlerbereich gleich sind. Eine zeitliche Koinzidenz lässt sich aufgrund dessen aber nicht mit vollkommener Sicherheit feststellen, da gleiche Zeitkonstanten einen sequentiellen Ablauf der Dynamiken nicht per se ausschließen. Anders ausgedrückt, bedeuten gleich lang eingenommene Zustände nicht automatisch gleichzeitig eingenommene Zustände. Deshalb wurde bei der Analyse der Einzelmolekülzeitspuren das Gleichzeitigkeitskriterium berücksichtigt und als  $\sim 2$  s-Zeitfenster realisiert, in welchem die jeweils aufgezeichneten mobilen Elemente beide ihren Zustand wechseln müssen, um den Übergang als synchron einzustufen. Vor dem Hintergrund von ATPase-Raten und ratenlimitierenden Konformationsänderungen im Minutenbereich (Krukenberg et al. 2011; Schulze et al. 2016; Daturpalli et al. 2017; Reidy und Masison 2020) ist die zeitliche Auflösung von 2 s ausreichend, um eine Aussage über Synchronität treffen zu können. Die Synchronitätsanalyse (Abbildung 3-28) gibt Aufschluss über gleich mehrere Aspekte. Zunächst zeichnet sich weder eine Abhängigkeit vom Farbstoff noch vom untersuchten Reportersystem ab. Des Weiteren ist mit im Mittel 88 % die überwiegende Mehrheit der Zustandsübergänge zwischen den Reportern als gleichzeitig eingestuft, was dafür spricht, dass Synchronität im Hsp90-Chaperonsystem eine dominierende Rolle spielt. Beobachtungen, dass der Domänenwechsel weniger eng an die anderen beiden Dynamiken gekoppelt ist, spiegeln sich hier nicht wider, was mit Beobachtungen in Zusammenhang stehen könnte, die unter Abschnitt 4.3 genauer behandelt werden (Schulze et al. 2016). Kurz zusammengefasst, zeichnet sich eine Beschleunigung des Domänenwechsels durch die implizierte Modifikation am N-Terminus ab, die, wenn wie in Schulze et al. 2016 separat gemessen, zu einer im Vergleich zu den anderen Dynamiken veränderten Ratenkonstante führen könnte. Die Ursache der ca. 12 % ungleichzeitigen Übergänge ist bisher nicht umfassend geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass die Farbstoffe in geringem Maße photophysikalische Effekte zeigen, die fälschlicherweise als PET-gelöschte Zustände identifiziert werden (vgl. Abschnitt 4.1). Eine weitere Ursache könnten transient nur von einem Reporter eingegangene Konformationsänderungen sein. Erklärt werden könnte das durch die Beobachtung

von Ratzke et al. 2012, wonach Hsp90 auch ohne ATP die verschiedenen Konformationen einnehmen kann. In diesem Fall würde das jedoch eher einer zufälligen Bewegung der betreffenden Struktur – begründet in der hohen Flexibilität des gesamten Chaperons – entsprechen als einem koordinierten globalen Klammerschluss. Auch die mehrfache Beobachtung von Asymmetrie im Chaperon, vor allem in Bezug auf die ATP-Hydrolyse in beiden Untereinheiten (Sima und Richter 2018; Huang et al. 2019), könnte als Grundlage für eine Erklärung von Konformationsänderungen nur eines Reporters dienen. Außerdem kann momentan nicht unterschieden werden, ob ein nur in einem Reporter vollzogener Zustandsübergang für den ungleichzeitigen Übergang verantwortlich ist oder ob beide Reporter ihren Zustand gewechselt haben, dies aber außerhalb des 2 s-Zeitfensters ablief. Möglich ist auch, dass sich mehrere der genannten Effekte addieren. In jedem Fall sind die jeweiligen Anteile mit im Mittel nur ~12 % gering und spielen, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle. Für die ratenlimitierenden Konformationsdynamiken in Form des Lid-Schlusses bzw. -Öffnung, der NM-Assoziation bzw. -Dissoziation und des Domänenwechsels bzw. rückwärtigen Wechsels konnten im Bereich einer zeitlichen Auflösung von 2 s keine Belege für einen vorherrschend sequenziellen Ablauf gefunden werden. Stattdessen findet eine dominierende Mehrheit der lokalen Konformationsänderungen synchron statt.

### 4.3 Aromatische Gruppen im DS-Reporter beschleunigen die Dynamiken

Die Zeitkonstanten der drei mobilen Elemente liegen für die Klammeröffnung alle im Bereich von 15 s, ohne dabei größere Abweichungen zu zeigen. Beim Betrachten der entsprechenden Zeitkonstanten während des Klammerschlusses von Hsp90 wird eine größere Variation erkennbar. Während die Kombination aus Lid-Schluss und NM-Assoziation mittlere Zeitkonstanten von ca. 90-100 s zeigt, ergeben sich für Reporterpaare, die den Domänenwechsel und damit impliziert eine Modifikation des N-Terminus beinhalten, Zeitkonstanten von ca. 15-60 s. Der Effekt ist mit JF646 als Modifikation am N-Terminus stärker ausgeprägt (15 s) als für Atto542, der die Dynamiken mit Zeitkonstanten von 50-60 s nur moderat beschleunigt im Vergleich zur Kombination aus Lid-Schluss und NM-Assoziation. Werden die einzelnen mobilen Elemente separat betrachtet, liegt der Schluss nahe, dass der Domänenwechsel nicht so eng an die Lid- und NM-Dynamiken gekoppelt ist wie diese untereinander, was Ergebnissen aus Schulze et al. 2016 entspricht. Bei

der simultanen Beobachtung von jeweils zwei der drei Elementen zeigt sich hingegen, dass alle Elemente ähnlich synchron zueinander sind (vgl. 4.2), was theoretisch in gleichen (oder zumindest ähnlichen) Zeitkonstanten resultieren sollte. Die N-terminalen Aminosäuren des Chaperons sind in die Regulation der ATPase-Aktivität involviert, wie anhand einer Mutante, welcher die ersten 24 Aminosäuren entfernt wurden und die infolgedessen keine ATPase-Aktivität mehr zeigt, beobachtet wurde (Richter et al. 2006; Richter et al. 2002). Bei Immobilisierung des  $\beta$ -Faltblatts über einen TrpZip konnte ebenfalls eine verringerte ATPase-Aktivität beobachtet werden (Schulze et al. 2016). Eine ähnliche Veränderung der Schließungsdynamiken durch die vorliegende Modifikation des N-Terminus könnte die hier gemachte Beobachtung erklären. Dazu passen würde auch die Beobachtung, dass abhängig vom Farbstoff, der für das Verfolgen des Domänenwechsels gewählt wird, unterschiedliche Zeitkonstanten gemessen werden. Um die Hypothese zu testen, wurde an der Stelle, an die im DS-Reporter der Farbstoff gekoppelt wird (A2C), stattdessen ein Tryptophan eingebracht (A2W), das ebenfalls eine aromatische Gruppe trägt. Tatsächlich zeigt das Tryptophan an zweiter Stelle der Polypeptidkette sowohl in Einzelmolekülmessungen als auch in konventionellen spektroskopischen Aufzeichnungen einen ähnlich beschleunigenden Effekt wie der Farbstoff. Somit kann ein Aromat am N-Terminus von Hsp90, kongruent mit den Beobachtungen von Richter et al. 2006, die Schließungsdynamik des Chaperons modulieren. Eine Modulierung, die ausschließlich auf die sterisch anspruchsvolle Struktur (wie Farbstoff oder Tryptophan) zurückzuführen ist, ist unwahrscheinlich, da alle heterodimeren Hsp90-Konstrukte in gleicher Weise N-terminal mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehen sind, der dann einen noch größeren Effekt zeigen sollte. Modulierende Eigenschaften durch diesen Tag sind bisher nicht bekannt (Schulze et al. 2016; Hessling et al. 2009; Mercier et al. 2019). Auch der Grund für die unterschiedlich stark ausgeprägten Effekte der beiden Farbstoffe ist aktuell nicht geklärt, könnte aber z.B. durch Elektrostatik, Polarität oder Größe des Chromophors – im Fall von Atto542 gibt es keine frei zugängliche Struktur, die eine Abschätzung erlauben würde – verursacht sein. Die Modulierung der Schließungsdynamiken der drei lokalen mobilen Elemente durch eine aromatische Gruppe am N-Terminus ist durch direkte Beobachtung mittels der A2W-Mutante gezeigt worden. Über die enge Kopplung von lokalen Dynamiken und ATPase-Rate, wie sie in Schulze et al. 2016 beobachtet wurde, kann gefolgert werden, dass die veränderten Schließungsdynamiken im Umkehrschluss auch eine veränderte ATPase-Rate widerspiegeln. Die Diskrepanz der Kopplungsstärke von DS- im Vergleich zu Lid-

und NM-Dynamik zwischen den Beobachtungen hier und in konventioneller Spektroskopie (Schulze et al. 2016) konnte nicht abschließend geklärt werden.

#### 4.4 Einblicke in den Mechanismus des ATPase-getriebenen Konformationszyklus von Hsp90

Durch Einzelmoleküluntersuchungen ist es möglich, Zustandsübergänge in biologischen Systemen direkt zu beobachten. In konventioneller Spektroskopie müssen solche Übergänge durch mathematische Modelle extrahiert werden. Dabei sind unterschiedliche Interpretationen möglich. Im Fall von Hsp90 und dessen Klammerschluss bzw. den den Klammerschluss begleitenden lokalen Konformationsdynamiken resultieren daraus zwei Modelle. Während eines Intermediate und damit einen sequenziellen Klammerschluss impliziert, beruht das andere auf heterogenen *apo*-Konformationen des Chaperons und Kooperativität zwischen den mobilen Elementen (Hessling et al. 2009; Schulze et al. 2016)(vgl. Abschnitt 1.2.3).

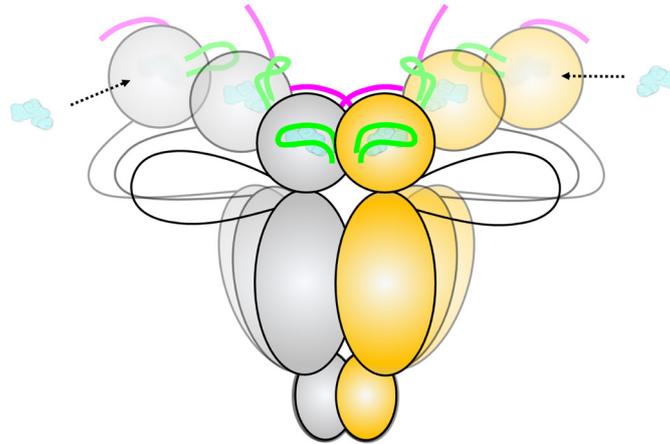
Mit Anwenden der bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie auf die Reportersysteme zur Verfolgung der lokalen Dynamiken, die den globalen Klammerschluss des Hsp90 Chaperons begleiten, war die Untersuchung des Ablaufs im Detail möglich.

Die unabhängig voneinander ermittelten Zeitkonstanten für die relevanten Reporterpaare aus  $\text{Lid}^{\text{Atto542}+\text{NM}^{\text{JF646}}}$  bzw.  $\text{Lid}^{\text{Atto542}+\text{A2W-NM}^{\text{JF646}}}$ ,  $\text{NM}^{\text{JF646}+\text{DS}^{\text{Atto542}}}$  und  $\text{Lid}^{\text{JF646}+\text{DS}^{\text{Atto542}}}$  sprechen klar für eine wechselseitige Abhängigkeit der drei mobilen Elemente, sowohl bei Klammerschluss als auch bei -öffnung. Verglichen mit Zeitkonstanten für die lokalen Bewegungen während des Klammerschlusses von ca. 5-6 min aus Untersuchungen mittels konventionellen Spektroskopiemethoden (Schulze et al. 2016) sind die hier beobachteten Dynamiken mit ca. 1-2 min jedoch schneller. Auch in Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen kommt es zu verkürzten Zeitkonstanten im Vergleich zur Entsprechung aus konventioneller Spektroskopie, womit die hier mittels Einzelmolekül-PET ermittelten Daten im Einklang mit Einzelmolekül-FRET Daten sind (Mickler et al. 2009). Dass die Photostabilität der verwendeten Farbstoffe die Hauptursache für die Verkürzung der Zeitkonstanten darstellt, ist angesichts einer ermittelten ungefähren mittleren Bleichhalbwertszeit von 8 Minuten unwahrscheinlich, damit allein kann die Abweichung der aus Einzelmolekül-PET ermittelten Kinetiken nicht erklärt werden. Jedoch kann man sich die

Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie wie eine Lupe vorstellen, die den Bereich der ersten 8-9 Minuten der Strukturumlagerungen aus Schulze et al. 2016 vergrößert. Auf diesen Bereich entfällt in Schulze et al. 2016 die Hauptkinetik mit ca. 2-3 min, eine weitere Teilkinetik zeichnet sich durch Zeitkonstanten von 10 Minuten oder länger aus. Letztere kann mittels der Einzelmolekülmethode nur unzureichend aufgelöst werden und führt zu einer Verschiebung der ermittelten Zeitkonstanten zu kürzeren Bereichen, derselbe Effekt sollte auch in Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen zu beobachten sein. Die unter Berücksichtigung dessen nunmehr noch leicht verkürzten Schließungszeiten könnten in Zusammenhang mit der extremen Variabilität der Offen-Zustände von Hsp90 stehen (Southworth und Agard 2008; Krukenberg et al. 2008). Die Immobilisierung könnte dabei die Einnahme von *apo*-Konformationen einschränken, was zu beschleunigtem Übergang in die geschlossene Klammer führen könnte. In jedem Fall wird mit der vorgestellten Einzelmolekül-PET-Methode die Hauptkinetik eingefangen und ermöglicht daher mechanistischen Einblick in den Konformationszyklus. In diesem Kontext ist auch zu erklären, dass die Verweildauern der den Klammerschluss begleitenden Dynamiken durchweg monoexponentiell angenähert werden konnten, in konventioneller Spektroskopie hingegen Näherungen mit mehreren Exponenten notwendig waren, um die Daten zu beschreiben. Das wiederum stützt die Annahme durch Schulze et al. 2016, dass die mehrfachen Exponenten von heterogenen *apo*-Konformationen des Chaperons herrühren, die zu unterschiedlichen Energiebarrieren und damit Schlusszeiten führen. Die Einzelmolekülmethode würde dann eine langsam schließende Subpopulation unzureichend aufzeichnen, was sich in dem fehlenden Exponenten widerspiegeln würde. Das Modell von Hessling et al. 2009 ist in diesem Kontext hingegen schwerer vorstellbar, da das Wegfallen eines Exponenten durch das engere Zeitfenster bei der Einzelmolekülmethode dabei einem Intermediatzustand entspräche. Anders als in Mickler et al. 2009 können die Verweildauern der die Klammeröffnung begleitenden Kinetiken ebenfalls monoexponentiell angenähert werden. Die zugehörigen niedrigen Zeitkonstanten von ~15 s deuten darauf hin, dass hier anders als bei den Schließungsdynamiken alle Übergänge aufgezeichnet werden können. Unterstützt wird das durch Daten aus konventioneller Spektroskopie im Rahmen von Untersuchungen des NM-Reporters während der Klammeröffnung, bei denen die über 30 Minuten aufgezeichneten Dynamiken ebenfalls ein monoexponentielles Verhalten zeigen (Reidy und Masison 2020). Der Unterschied in der Anzahl an verwendeten Exponenten im Vergleich zu Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen von Mickler et al. 2009 ist nicht eindeutig

zu klären. Zusammengenommen könnten die Erkenntnisse für nur einen geschlossenen Zustand sprechen, aus dem heraus alle Hsp90-Moleküle gleichermaßen über dieselbe Energiebarriere wieder in den offenen Zustand übergehen. Darüber hinaus zeigen Daten aus konventioneller Spektroskopie (Reidy und Masison 2020) und die mittels Einzelmolekülspektroskopie aufgezeichneten Daten qualitativ die gleichen Kinetikverhältnisse eines langsamen Klammerschlusses und ca. 3-4-fach schnellerer Klammeröffnung. Die schnelle initiale Umlagerung der Lid-Struktur in Reaktion auf ATP-Bindung, wie sie in Schulze et al. 2016 mittels schneller Mischungstechniken aufgelöst wurde, konnte hier nicht beobachtet werden, was einerseits an der Zeitauflösung von 0,3 s und andererseits an der nicht durch PET vermittelten Fluoreszenzänderung liegt.

Zusammen mit der unter Abschnitt 4.2 im Detail beschriebenen Beobachtung dominierender Synchronität zwischen Lid-Struktur, NM-Interaktion und Domänenwechsel verdichten sich die Erkenntnisse zu einem kooperativen Mechanismus zwischen den lokalen Umstrukturierungen, die im wechselseitigen Zusammenspiel den ratenlimitierenden Klammerschluss von Hsp90 bewerkstelligen. Die Tatsache, dass auch unter beschleunigenden Modifikationen des N-Terminus durch aromatische Gruppen mit unterschiedlich starken Effekten die jeweils zweite Dynamik in gleichem Maße beschleunigt ist, unterstreicht die wechselseitige Abhängigkeit. Die mittels der entwickelten bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie ermittelten Zeitkonstanten unterstützen deutlich einen kooperativen Zyklus, innerhalb welchem der Lid-Schluss, die NM-Assoziation und der Domänenwechsel (sowie deren Entsprechung bei Klammeröffnung) innerhalb von 2 s synchron ablaufen (Abbildung 4-2). Nichtsdestotrotz ist theoretisch ein sequentieller Ablauf innerhalb des 2 s-Zeitfensters denkbar, was durch bisher ermittelte Ratenkonstanten (Hessling et al. 2009; Mickler et al. 2009) aber eher unwahrscheinlich ist.



**Abbildung 4-2: Lokale Schließungs- und Öffnungsdynamiken in Hsp90 laufen synchron ab.** Die durch ATP-Bindung (cyan, Pfeil) induzierten lokalen Umstrukturierungen in Form des Lid-Segments (grün), des N-terminalen  $\beta$ -Faltblatts (magenta) und der Interaktion von NTD und MD laufen sowohl beim globalen Klammerschluss des Chaperons als auch bei dessen Öffnung innerhalb von  $\sim 2$  s synchron ab.

#### 4.5 Etablierte Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie als Komplement zu Einzelmolekül-FRET

FRET-basierte Einzelmolekülstudien mit einer räumlichen Auflösung  $\geq 2,5$  nm (Lerner et al. 2021) eignen sich gut für Untersuchungen makromolekularer Konformationsänderungen wie den globalen Klammerschluss von Hsp90 (Ratzke et al. 2012). Durch Implementieren weiterer Farbstoffe konnten zusätzliche, bisher unbekannte Einblicke in die Bindung von Nukleotid (Ratzke et al. 2012) und Co-Chaperonen (Ratzke et al. 2014; Wortmann et al. 2017) gewährt und die Stärken von Einzelmolekül-FRET gezeigt werden. Gleichzeitig ist es schwer, damit Umstrukturierungen lokaler Elemente innerhalb von Proteindomänen oder kleiner Proteine zu untersuchen, sobald diese in einen Bereich kleiner als zwei Nanometer fallen (Lerner et al. 2021). Das kann schnell der Fall sein, denkt man etwa an die Gesamtgröße eines Immunglobulins von ca. 15 nm oder Hämoglobins von ca. 5 nm (Hsp90: ca. 10 nm). Im Vergleich dazu sind PET-Fluoreszenzreporter mit einer räumlichen Sensitivität von  $< 1$  nm bestens geeignet, um kleine Moleküle oder Konformationsdynamiken von Strukturelementen innerhalb von Proteinen aufzulösen (Doose et al. 2005).

Das konnte am Beispiel des homodimeren Chaperons Hsp90 gezeigt werden. Der vertiefende Einblick in das Zusammenspiel lokal mobiler Elemente während der

globalen Klammerdynamiken durch gleichzeitige direkte Beobachtung mehrerer Konformationskoordinaten demonstriert das Potenzial der entwickelten Methode. Gleichzeitig erlaubt die Reproduktion von Daten aus konventioneller Spektroskopie (Schulze et al. 2016) eine Evaluation der Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie und macht deutlich, dass PET-Fluoreszenzreporter für konventionelle Spektroskopie designt und anschließend auf die Einzelmolekülebene übertragen werden können.

Die Mehrfarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie ist dabei generell anwendbar und bietet großes Potenzial, komplexe Proteinmaschinerien auf zeitliche Abläufe oder Kooperativität von mehreren lokalen Strukturelementen hin zu untersuchen. Dabei erlaubt die Technik die Untersuchung einer räumlichen Koordinate pro Fluoreszenzfarbstoff. Zusammengenommen wird die bildgebende Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie komplementär zur bereits etablierten Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie eingesetzt, um anstelle globaler nun lokale Konformationsdynamiken an einzelnen Molekülen zu untersuchen. Ein experimenteller Einzelmolekül-FRET-Aufbau kann dazu einfach zu einem Mehrfarben-Einzelmolekül-PET-Aufbau umfunktioniert werden, indem spektral separierbare Farbstoffe und eine zweite Anregungswellenlänge verwendet werden. Mit Etablierung für die breite Anwendung bieten sich damit neue Möglichkeiten für die multidimensionale Erforschung von Proteindynamiken.

## **5 Fazit und Ausblick**

Mit der Etablierung einer bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie wird eine Brücke zwischen den zeitlichen Auflösungsvermögen bereits existierender PET-fluoreszenzbasierter Methoden geschlagen. Im Kontext der Methodenentwicklung durch Neuweiler et al. 2002 zur Auflösung von Konformationsänderungen  $< 1$  nm mittels photoinduziertem Elektronentransfer zwischen der Aminosäure Tryptophan und organischen Farbstoffen bei Van-der-Waals-Kontakt standen Zeitskalen von Nanosekunden bis Millisekunden im Mittelpunkt. Vor einigen Jahren konnte die Technik darüber hinaus auch zur Untersuchung von Dynamiken etabliert werden, die über einige Minuten hinweg andauerten. Durch den Ansatz, der auf konventioneller Spektroskopie beruht, ist der zeitliche Bereich von wenigen Sekunden aber nur begrenzt auflösbar. Hinzu kommt, dass die zu ziehenden Rückschlüsse aus konventioneller Spektroskopie zwar robust, aber auch begrenzt sind. Beide Lücken können nun mithilfe der entwickelten Einzelmolekül-PET-Spektroskopie geschlossen werden. Damit ist es möglich, durch sorgfältig konzipierte PET-Fluoreszenzreporter und verschiedenen Spektroskopie-Arten zusammen Zeitskalen von Nanosekunden bis hin zu Minuten, wie in vorliegender Arbeit, an einzelnen Molekülen aufzuzeichnen. Diese große Zeitspanne zur Untersuchung struktureller Dynamiken an einzelnen Molekülen war bisher nur mit FRET-basierten Reportersystemen möglich, die in einer räumlichen Auflösung von 2-10 nm aktiv sind. Mit dem Verständnis von Proteinen als hochdynamische Strukturen wird es zunehmend wichtig, auch intramolekulare Dynamiken und deren zeitliche Komponenten zu verstehen, weshalb die sub-Nanometer-sensitive kontaktinduzierte PET-Fluoreszenzspektroskopie ein wichtiges Komplement zu FRET darstellt. Der bildgebende Ansatz erlaubt die Aufzeichnung mit einem Einzelmolekül-FRET-Mikroskop-Aufbau mit nur marginalen Änderungen.

Den verschiedenen Herausforderungen einer bildgebenden Zweifarben-Einzelmolekülmethode wurde auf unterschiedliche Weise begegnet. Für die vergleichsweise lange Beobachtungszeit lieferte ein sukzessives Farbstoffscreening ein Farbstoffpaar, das unter bestimmten Messbedingungen geeignet ist, PET-induzierte Fluoreszenzfluktuationen auf zwei Koordinaten gleichzeitig wiederzugeben. Am Protein selbst wurden verschiedene Modifikationen

vorgenommen, um eine Immobilisierung einzelner zweifach markierter Hsp90-Moleküle zu gewährleisten und über Kontrollexperimente dabei die unveränderte Funktionalität des Chaperons festgestellt. Ein abgeändertes Protokoll aus der Literatur zur Reinigung der verwendeten Deckgläser und Oberflächenpassivierung führte zur gleichmäßigen Immobilisierung einzelner Moleküle und ermöglichte deren Identifizierung vor reduziertem Hintergrundsignal. Über eine angepasste Art der Aufzeichnung von Referenzpunkten in beiden Aufnahmekanälen konnten doppelt-markierte Chaperone akkurat identifiziert werden. Die literaturbekannten PET-Fluoreszenzreportersysteme ermöglichen die Zuordnung zwischen PET-vermitteltem Farbstoffzustand (an/aus) und lokaler Konformation des Strukturelements in Hsp90 über Aufbrechen/Ausbilden des Tryptophan-Farbstoff-Kontakts und damit verbundener Fluoreszenz/Fluoreszenzlöschung (Schulze et al. 2016). Die Überlagerung der Fluoreszenzintensitätszeitpuren beider Kanäle eines Moleküls zeigt qualitativ den Erfolg der Methode, indem deutliche Fluktuationen der Intensität zu beobachten sind, wenn ATP als Auslöseimpuls der aufzuzeichnenden Konformationsänderungen zugegeben wird. Ohne das Nukleotid bleiben die Fluktuationen aus. Kontrollkonstrukte bestätigen, dass Aus-Zustände der Fluoreszenz auch auf Einzelmolekülebene maßgeblich durch über Tryptophan vermittelten PET verursacht sind. Die Entwicklung einer halbautomatisierten Python-Routine ermöglicht darüber hinaus eine quantitative Auswertung und Analyse der Fluoreszenzzustände und der damit verbundenen Konformationsdynamiken im Chaperon bei gleichzeitig quantitativer Evaluation der Methode.

Die Pilotmessung eines Reporterpaarkonstrukts ohne *coiled-coil*-Strukturmotiv, über das die Dissoziationskonstante des Hsp90-Homodimers künstlich herabgesetzt wird, zeigt, dass auf das Verwenden von artifiziellen Motiven zur Dimerisierung in Zukunft verzichtet werden kann. Stattdessen werden die beiden Untereinheiten über das in jedem Fall zur Immobilisierung verwendete Bindeprotein Neutravidin in enger räumlicher Nähe gehalten, was zur direkten Assoziation der Untereinheiten nach möglicher Dissoziation führen soll. Dabei macht man sich die bemerkenswert starke, nicht kovalente Interaktion von Biotin und Neutravidin zu Nutze. Über das Fehlen der obsolet gewordenen artifiziellen Dimerisierungsstelle kann in Zukunft ein schnellerer und besserer Untereinheitenaustausch im Vorfeld der Immobilisierung durchgeführt werden. Außerdem gleicht das untersuchte Proteinkonstrukt etwas mehr der nativ vorkommenden Form, auch wenn die Funktionalität der Einzelmolekülkonstrukte sichergestellt wurde. Der Ansatz ohne

*coiled-coil*-Motiv sollte jedoch auch für die noch nicht gemessenen Reporterkombinationen durchgeführt und evaluiert werden, um einen Effekt auf die aufzeichnenden Dynamiken weiter auszuschließen. Außerdem wäre eine quantitative Untersuchung des jeweiligen Untereinheiten austauschs zwischen Konstrukten mit und ohne *coiled-coil*-Motiven denkbar, um den Unterschied benennen zu können, hierzu können etwa literaturbekannte FRET-Reporter in Kombination mit konventioneller Spektroskopie verwendet werden (Ratzke et al. 2010). Des Weiteren sollte die halbautomatisierte Auswertung der Daten mithilfe der Python-Routine in Zukunft zu einer vollautomatisierten weiterentwickelt werden, um eine nutzerbedingte Einflussnahme weiter zu minimieren. Daraus könnte durch Umgehen einer Fehlerquelle außerdem ein geringerer Fehlerbereich der erhaltenen Zeitkonstanten resultieren. Dazu könnten weitere Routinen der Signalverarbeitung implementiert werden, aber auch eine Einbeziehung von künstlicher Intelligenz, wie kürzlich für Einzelmolekül-FRET-Daten umgesetzt (Thomsen et al. 2020), ist denkbar. Insgesamt würde die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse so weiter verstärkt werden.

Bei der Anwendung der neuen Spektroskopie-Technik auf die Umstrukturierungen lokaler Elemente im Hsp90-Chaperon, die zusammengenommen ratenlimitierend für seine Aktivität sind und deren zeitliche Abfolge in der Literatur diskutiert wird, konnte eine dominierende Synchronität zwischen den einzelnen Umlagerungen direkt beobachtet werden. Diese laufen innerhalb eines 2 s-Zeitfensters mit überwiegender Mehrheit gleichzeitig ab, was im Hinblick auf ATPase-Raten im Minutenbereich auf einen generellen Mechanismus hindeutet. Modifikationen, die eine veränderte Zeitkonstante einzelner Elemente nach sich ziehen, führten zu gleichermaßen veränderten Konstanten des jeweiligen zweiten Reporters, was die wechselseitige Abhängigkeit der mobilen Strukturen untermauert. Die durch direkte Beobachtung erhaltenen Ergebnisse stützen bzw. stärken damit ein Modell des Konformationszyklus, das auf Kooperativität und Gleichzeitigkeit der mobilen Elemente basiert (Schulze et al. 2016), während ein sequenzieller Ablauf der Ereignisse wie in Hessling et al. 2009 nicht beobachtet werden konnte.

Trotz der überwiegenden Mehrheit synchroner Zustandsübergänge, sollte die Ursache der ca. 12 % ungleichzeitigen Übergänge untersucht werden, um eine biologische Relevanz nicht unentdeckt zu lassen, wenngleich das nicht dem vorrangigen Mechanismus entspräche. Zunächst sollte innerhalb der Python-Routine eine Möglichkeit implementiert werden, zu unterscheiden, ob ein asynchroner Übergang auf nur in einem Kanal auftretende Zustandswechsel oder auf Zustandswechsel, die zwar in beiden Kanälen, aber mehr als 2 s nacheinander

stattfinden, zurückzuführen ist. In ersterem Fall sollte untersucht werden, ob diese Fluktuationen durch photophysikalische Effekte der Farbstoffe verursacht sind. Dazu könnte, z.B. durch geeignete Implementierung im Python-Code, die mittlere Zeitkonstante ausschließlich der asynchronen Übergänge ermittelt und mit denen der Reporter abgeglichen werden. Falls sich ähnliche Zeitkonstanten abzeichnen, könnte untersucht werden, ob die in der Literatur teils berichtete Asymmetrie im Chaperon dafür verantwortlich sein könnte. Dazu könnte derselbe Reporter in beiden Untereinheiten gleichzeitig aufgezeichnet werden, um eine Asymmetrie des gleichen Strukturelements zwischen den Untereinheiten zu ermitteln.

Angestoßen durch die Beobachtung, dass ein Farbstoff am N-terminalen  $\beta$ -Faltblatt eine Beschleunigung der Schließungsdynamiken nach sich zieht, wurden Effekte der N-terminalen Modifikation genauer betrachtet. Dabei zeigte sich mithilfe der Aminosäure Tryptophan, dass eine aromatische Gruppe an der zweiten Position der Aminosäurekette für die Beschleunigung verantwortlich ist. Der Effekt konnte durch konventionelle Spektroskopie reproduziert werden, was Beobachtungen stützt, dass die N-terminalen Aminosäuren in die Modulation der ATPase-Aktivität involviert sind, wobei bisher vornehmlich verringerte Aktivität beobachtet worden ist. Interessanterweise blieb die wechselseitige Abhängigkeit der Reportersysteme dennoch bestehen und unterstreicht abermals deren Kooperativität.

Die Modulierung über das N-terminale  $\beta$ -Faltblatt könnte über Messung der ATPase-Aktivität des entsprechenden A2W-Konstrukts weiter untermauert werden. Darüber hinaus wäre eine weitere Klärung für die unterschiedlich starken Einflüsse der beiden Farbstoffe Atto542 und JF646 interessant. Da der Effekt auch in konventioneller Spektroskopie sichtbar ist, könnte darüber ein Einfluss der Größe des aromatischen Systems untersucht werden. Denkbar wäre es, dazu ein möglichst kleines aromatisches System, wie den Farbstoff Atto495, zu verwenden und mit dem Einfluss durch JF646 zu vergleichen.

Die aus der Analyse der Verweildauern aus der Einzelmolekülspektroskopie erhaltenen Zeitkonstanten und zugrundeliegenden Näherungen sind unter Berücksichtigung der jeweiligen Zeitfenster der Aufzeichnungen mit denen aus konventioneller Spektroskopie vereinbar und können einen heterogenen *apo*-Zustand des Chaperons unterstützen. Bei der schneller ablaufenden Klammeröffnung lassen sich Hinweise auf eine einheitliche, geschlossene Konformation finden, aus der heraus Hsp90 wieder in die verschiedenen *apo*-Konformationen übergeht. Zusammen mit den dominant synchron ablaufenden Dynamiken wird der folgende Mechanismus favorisiert: Hsp90 geht aus

verschiedenen *apo*-Konformationen, die mit unterschiedlichen Energiebarrieren verbunden sind, heraus über ratenlimitierende, in wechselseitiger Abhängigkeit verlaufende, lokale Umstrukturierungen in die geschlossene Konformation über. Nach erfolgter ATP-Hydrolyse nimmt das Chaperon wiederum über synchron verlaufende Öffnungsdynamiken seine verschiedenen *apo*-Konformationen ein.

Die enge Kopplung der ratenlimitierenden Bewegungen könnte einen Angriffspunkt für die Regulation des Chaperons oder dessen Inhibition darstellen. Dazu könnte in Zukunft untersucht werden, welche Effekte Co-Chaperone auf das Zusammenspiel der lokalen Elemente haben. In einem ersten Experiment könnte das entsprechende Co-Chaperon dazu leicht im Überschuss zugegeben werden, wenn es nicht selbst mit einem Farbstoff markiert ist, dabei muss allerdings berücksichtigt werden, inwiefern das Co-Chaperon die aufzuzeichnenden Dynamiken beeinflusst. Es ist beispielsweise denkbar, dass für das die ATPase-Raten und -Dynamiken, beschleunigende Co-Chaperon Aha1 (Schulze et al. 2016) die Integrationszeit verringert und die Laserleistung erhöht werden müssen. In diesem Kontext muss wiederum die Fluktuation der Farbstoffe überprüft werden. In weitergehenden Experimenten könnten dann auch Umlagerungen zwischen verschiedenen Proteinen eines Komplexes untersucht werden, in diesem Kontext könnte die vermutete Umlagerung des Cdc37 Co-Chaperons im Hsp90-Cdc37-Komplex von der Hsp90-NTD zur MD von Interesse sein (Verba und Agard 2017). Eine andere Vermutung ist, dass die Konformationsänderungen in Hsp90 in Wechselbeziehung mit der Interaktion von Klientenproteinen steht, also sowohl Hsp90 in Klienten Veränderungen induziert als auch umgekehrt (Krukenberg et al. 2011). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Auswirkung auf die drei Konformationsänderungen in Hsp90 durch Bindung und Umsetzung eines bekannten Klienten zu untersuchen. Die enge Kopplung der lokalen Umstrukturierungen könnte in Zukunft auch eine Chance sein, medizinisch aktive Stoffe zu entwickeln, die nicht mehr nur über Inhibition der ATPase-Aktivität des essenziellen Chaperons laufen, stattdessen könnte eine Feinregulierung über Beeinflussung der lokalen Elemente möglich werden.

Daneben ist eine Weiterentwicklung hin zu einer Kombination aus Einzelmolekül-FRET und -PET denkbar, um globale und lokale Konformationsdynamiken simultan aufzuzeichnen. Ein erster Ansatz dazu wurde von Haenni et al. 2013 gemacht, indem die gleichzeitige Aufzeichnung einer Kombination aus FRET- und PET-Signalen anhand von Peptiden und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie als prinzipiell möglich demonstriert wurde.

Die Zweifarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie ist durch die einfache Implementierung sowohl in Bezug auf Reporterdesign als auch auf den experimentellen Aufbau gut geeignet, die mehrdimensionale Untersuchung von Proteindynamiken in Zukunft weiter voranzutreiben. Die im Vergleich zu Einzelmolekül-FRET einfache Auswertung der Daten unterstützt dabei den Weg hin zur breiten Anwendung.

Ein Kernaspekt, der die Anwendung für Proteine limitieren kann und überwunden werden muss, ist die ortsspezifische Farbstoffmarkierung. Das Hsp90-Protein aus der Hefe hat die Eigenschaft, frei von nativen Cysteinen zu sein, daher ist hier eine vergleichsweise einfache Markierung mit zwei Farbstoffen – ein Farbstoff pro Monomer – möglich. Für Proteine, die über (mehrere) native Cysteine verfügen, welche zudem oberflächenexponiert sind, müssen alternative Markierungsstrategien hinzugezogen werden. Eine Möglichkeit dies zu bewerkstelligen ist die Verwendung von unnatürlichen Aminosäuren in Kombination mit Klick-Chemie. Über die Erweiterung des genetischen Codes kann diese Technik den Einbau einzigartiger chemischer Seitengruppen in Polypeptide ermöglichen und stellt in Kombination mit Klick-Chemie eine elegante Lösung dar, um Farbstoffe ortsspezifisch, effizient und unter minimaler Perturbation des biologischen Systems an Proteine zu koppeln. Die Methode wurde bisher in eukaryotischem Kontext erfolgreich bei verschiedenen zu untersuchenden Proteinen etabliert (Lemke 2014; Kozma et al. 2017; Neubert et al. 2018; Beliu et al. 2019). Auch für *E.coli*-Zellen gibt es bereits Ergebnisse, die zeigen, dass die heterologe Proteinexpression mit unnatürlichen Aminosäuren prinzipiell möglich ist (Kaya et al. 2012). Neben der ortsspezifischen Markierung von Proteinen, die nicht über reaktive Schwefelgruppen gekoppelt werden können, könnten in Zukunft mehrere Markierungsmethoden kombiniert werden, um Proteine mit mehreren Farbstoffen zu koppeln. In diesem Kontext wäre wiederum Hsp90 ein geeignetes Evaluationsmodell für eine Mehrfarben-Einzelmolekül-PET-Spektroskopie mit drei oder mehr PET-Fluoreszenzreportern. Die Datenanalyse erfolgt hierbei analog, da jede Farbe getrennt ausgewertet werden kann.

Ein weiterer zukünftig relevanter Aspekt ist die Temperaturkontrolle bei der bildgebenden Einzelmolekülspektroskopie, denn nur bei akkurater Kontrolle kann die Methode zu einer standardisierten Anwendung werden. Damit können nicht nur Temperaturabhängigkeiten von Proteindynamiken untersucht, sondern auch Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchungen adäquat verglichen und in den Kontext konventioneller Spektroskopie gesetzt werden. Dazu gibt es bereits on-chip Lösungen, die mit TIRF-Mikroskopie kombiniert werden können, um eine

umständliche Temperierung des experimentellen Aufbaus zu vermeiden (Wang et al. 2011). Solche Implementierungen standardmäßig in Einzelmolekül-Aufbauten zu integrieren ist ein wichtiger Schritt, um die Einzelmolekülspektroskopie so ubiquitär einsetzbar zu machen wie konventionelle Spektroskopie.

Die Einzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie kann so zu einem universellen und standardisierten Werkzeug der multidimensionalen Untersuchung von Proteindynamiken werden.

## Literaturverzeichnis

Ali, Maruf M. U.; Roe, S. Mark; Vaughan, Cara K.; Meyer, Phillipe; Panaretou, Barry; Piper, Peter W. et al. (2006): Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. In: *Nature* 440 (7087), S. 1013–1017. DOI: 10.1038/nature04716.

Arganda-Carreras, Ignacio; Sorzano, Carlos O. S.; Marabini, Roberto; Carazo, José María; Ortiz-de-Solorzano, Carlos; Kybic, Jan (2006): Consistent and Elastic Registration of Histological Sections Using Vector-Spline Regularization. In: David Hutchison, Takeo Kanade, Josef Kittler, Jon M. Kleinberg, Friedemann Mattern, John C. Mitchell et al. (Hg.): *Computer Vision Approaches to Medical Image Analysis*, Bd. 4241. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Lecture Notes in Computer Science), S. 85–95.

Arndt, Katja M.; Pelletier, Joelle N.; Müller, Kristian M.; Plückthun, Andreas; Alber, Tom (2002): Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils. In: *Structure* 10 (9), S. 1235–1248. DOI: 10.1016/S0969-2126(02)00838-9.

Bajar, Bryce T.; Wang, Emily S.; Zhang, Shu; Lin, Michael Z.; Chu, Jun (2016): A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 16 (9). DOI: 10.3390/s16091488.

Balchin, D.; Hayer-Hartl, M.; Hartl, F. U. (2016): In vivo aspects of protein folding and quality control. In: *Science* 353 (6294), aac4354-aac4354. DOI: 10.1126/science.aac4354.

Beliu, Gerti; Kurz, Andreas J.; Kuhlemann, Alexander C.; Behringer-Pliess, Lisa; Meub, Mara; Wolf, Natalia et al. (2019): Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy. In: *Communications biology* 2, S. 261. DOI: 10.1038/s42003-019-0518-z.

Benesch, R. E.; Benesch, R. (1953): Enzymatic Removal of Oxygen for Polarography and Related Methods. In: *Science* 118 (3068), S. 447–448. DOI: 10.1126/science.118.3068.447.

Brian M. Sadler, Ananthram Swami (1998): Analysis of wavelet transform multiscale products for step detection and estimation. In: *Army Research Laboratory Tech. Rep.* ARL-TR-1664.

Bron, Patrick; Giudice, Emmanuel; Rolland, Jean-Paul; Buey, Rubén M.; Barbier, Pascale; Díaz, J. Fernando et al. (2008): Apo-Hsp90 coexists in two open conformational states in solution. In: *Biology of the Cell* 100 (7), S. 413–425. DOI: 10.1042/BC20070149.

- Campanella, Claudia; Pace, Andrea; Caruso Bavisotto, Celeste; Marzullo, Paola; Marino Gammazza, Antonella; Buscemi, Silvestre; Palumbo Piccionello, Antonio (2018): Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting. In: *International journal of molecular sciences* 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092603.
- Cheng, Yifan (2015): Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution. In: *Cell* 161 (3), S. 450–457. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.049.
- Cordes, Thorben; Vogelsang, Jan; Tinnefeld, Philip (2009): On the mechanism of Trolox as antiblinking and antibleaching reagent. In: *Journal of the American Chemical Society* 131 (14), S. 5018–5019. DOI: 10.1021/ja809117z.
- Csermely, P.; Kajtár, J.; Hollósi, M.; Jalsovszky, G.; Holly, S.; Kahn, C. R. et al. (1993): ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). In: *Journal of Biological Chemistry* 268 (3), S. 1901–1907. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)53939-9.
- Dahiya, Vinay; Buchner, Johannes (2019): Functional principles and regulation of molecular chaperones. In: *Advances in protein chemistry and structural biology* 114, S. 1–60. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2018.10.001.
- Daturpalli, Soumya; Knieß, Robert A.; Lee, Chung-Tien; Mayer, Matthias P. (2017): Large Rotation of the N-terminal Domain of Hsp90 Is Important for Interaction with Some but Not All Client Proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 429 (9), S. 1406–1423. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.025.
- Deniz, Ashok A.; Mukhopadhyay, Samrat; Lemke, Edward A. (2008): Single-molecule biophysics: at the interface of biology, physics and chemistry. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 5 (18), S. 15–45. DOI: 10.1098/rsif.2007.1021.
- Doose, Sören; Neuweiler, Hannes; Sauer, Markus (2005): A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 6 (11), S. 2277–2285. DOI: 10.1002/cphc.200500191.
- Doose, Sören; Neuweiler, Hannes; Sauer, Markus (2009): Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer. A reporter for conformational dynamics of macromolecules. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 10 (9-10), S. 1389–1398. DOI: 10.1002/cphc.200900238.
- Dubochet, J.; Chang, J. J.; Freeman, R.; Lepault, J.; McDowell, A. W. (1982): Frozen aqueous suspensions. In: *Ultramicroscopy* (10), S. 55–62.
- Fairhead, Michael; Howarth, Mark (2015): Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1266, S. 171–184. DOI: 10.1007/978-1-4939-2272-7\_12.

Fersht, Alan R. (2008): From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (8), S. 650–654. DOI: 10.1038/nrm2446.

Frank, Joachim (2006): Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. Visualization of biological molecules in their native state. 2. ed. Oxford: Oxford Univ. Press.

García, J.; Silva, E (1997): Flavin-sensitized photooxidation of amino acids present in a parenteral nutrition infusate: Protection by ascorbic acid. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* (8), S. 341–345.

Gebhardt, J. Christof M.; Clemen, Anabel E-M; Jaud, Johann; Rief, Matthias (2006): Myosin-V is a mechanical ratchet;. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (103), S. 8680–8685. Online verfügbar unter [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510191103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510191103).

Girstmair, Hannah; Tippel, Franziska; Lopez, Abraham; Tych, Katarzyna; Stein, Frank; Haberkant, Per et al. (2019): The Hsp90 isoforms from *S. cerevisiae* differ in structure, function and client range. In: *Nature Communications* 10 (1), S. 3626. DOI: 10.1038/s41467-019-11518-w.

Götz, M.; Wortmann, P.; Schmid, S.; Hugel, T. (2016): A Multicolor Single-Molecule FRET Approach to Study Protein Dynamics and Interactions Simultaneously. In: *Methods in enzymology* 581, S. 487–516. DOI: 10.1016/bs.mie.2016.08.024.

Gust, Alexander; Zander, Adrian; Gietl, Andreas; Holzmeister, Phil; Schulz, Sarah; Lalkens, Birka et al. (2014): A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (10), S. 15824–15865. DOI: 10.3390/molecules191015824.

Ha, T. (2001): Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (1), S. 78–86. DOI: 10.1006/meth.2001.1217.

Ha, Taekjip; Tinnefeld, Philip (2012): Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 63, S. 595–617. DOI: 10.1146/annurev-physchem-032210-103340.

Haenni, Dominik; Zosel, Franziska; Reymond, Luc; Nettels, Daniel; Schuler, Benjamin (2013): Intramolecular distances and dynamics from the combined photon statistics of single-molecule FRET and photoinduced electron transfer. In: *The journal of physical chemistry. B* 117 (42), S. 13015–13028. DOI: 10.1021/jp402352s.

Harris, Charles R.; Millman, K. Jarrod; van der Walt, Stéfan J.; Gommers, Ralf; Virtanen, Pauli; Cournapeau, David et al. (2020): Array programming with NumPy. In: *Nature* 585 (7825), S. 357–362. DOI: 10.1038/s41586-020-2649-2.

- Hartl, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. In: *Nature* 381.
- Heiby, Julia C.; Goretzki, Benedikt; Johnson, Christopher M.; Hellmich, Ute A.; Neuweiler, Hannes (2019): Methionine in a protein hydrophobic core drives tight interactions required for assembly of spider silk. In: *Nature Communications* 10 (1), S. 4378. DOI: 10.1038/s41467-019-12365-5.
- Hessling, Martin; Richter, Klaus; Buchner, Johannes (2009): Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (3), S. 287–293. DOI: 10.1038/nsmb.1565.
- Hua, Boyang; Han, Kyu Young; Zhou, Ruobo; Kim, Hajin; Shi, Xinghua; Abeyirigunawardena, Sanjaya C. et al. (2014): An improved surface passivation method for single-molecule studies. In: *Nature Methods* 11 (12), S. 1233–1236. DOI: 10.1038/nmeth.3143.
- Huang, Bin; Friedman, Larry J.; Sun, Ming; Gelles, Jeff; Street, Timothy O. (2019): Conformational Cycling within the Closed State of Grp94, an Hsp90-Family Chaperone. In: *Journal of Molecular Biology*. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.06.004.
- Jahn, Markus; Rehn, Alexandra; Pelz, Benjamin; Hellenkamp, Björn; Richter, Klaus; Rief, Matthias et al. (2014): The charged linker of the molecular chaperone Hsp90 modulates domain contacts and biological function. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (50), S. 17881–17886. DOI: 10.1073/pnas.1414073111.
- Jones, Guilford; Lu, Lily N.; Vullev, Valentine (1995): Photoinduced Electron Transfer for Pyrenesulfonamide Conjugates of Tryptophan-Containing Peptides. Mitigation of Fluorophore Behavior in N-terminal Labeling Experiments. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, S. 2385–2390.
- Joo, Chirlmin; Ha, Taekjip (2012): Preparing sample chambers for single-molecule FRET. In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2012 (10), S. 1104–1108. DOI: 10.1101/pdb.prot071530.
- Kaya, Emine; Vrabel, Milan; Deiml, Christian; Prill, Stefan; Fluxa, Viviana S.; Carell, Thomas (2012): A genetically encoded norbornene amino acid for the mild and selective modification of proteins in a copper-free click reaction. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51 (18), S. 4466–4469. DOI: 10.1002/anie.201109252.
- Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. (1958): A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. In: *Nature* (181), S. 662–666.
- Kim, Yujin E.; Hipp, Mark S.; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit; Hartl, F. Ulrich (2013): Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. In: *Annual review of biochemistry* 82, S. 323–355. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.

- Kliment A. Verba; Ray Yu-Ruei Wang; Akihiko Arakawa; Yanxin Liu; Mikako Shirouzu; Shigeyuki Yokoyama; David A. Agard (2016): Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase. In: *Science (New York, N.Y.)* 352 (6293), S. 1535–1542. DOI: 10.1126/science.aaf7419.
- Kozma, Eszter; Demeter, Orsolya; Kele, Péter (2017): Bio-orthogonal Fluorescent Labelling of Biopolymers through Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 18 (6), S. 486–501. DOI: 10.1002/cbic.201600607.
- Krukenberg, Kristin A.; Förster, Friedrich; Rice, Luke M.; Sali, Andrej; Agard, David A. (2008): Multiple conformations of E. coli Hsp90 in solution. Insights into the conformational dynamics of Hsp90. In: *Structure (London, England : 1993)* 16 (5), S. 755–765. DOI: 10.1016/j.str.2008.01.021.
- Krukenberg, Kristin A.; Street, Timothy O.; Lavery, Laura A.; Agard, David A. (2011): Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 44 (2), S. 229–255. DOI: 10.1017/S0033583510000314.
- Lakowicz, Joseph R. (2006): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. In: (New York: Springer).
- Lambert, Talley J. (2019): FPbase: a community-editable fluorescent protein database. In: *Nature Methods* 16 (4), S. 277–278. DOI: 10.1038/s41592-019-0352-8.
- Lee, Brian L.; Rashid, Suad; Wajda, Benjamin; Wolmarans, Annemarie; LaPointe, Paul; Spyrapoulos, Leo (2019): The Hsp90 Chaperone: 1H and 19F Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Reveals a Perfect Enzyme. In: *Biochemistry*. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00144.
- Lemke, Edward A. (2014): The exploding genetic code. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 15 (12), S. 1691–1694. DOI: 10.1002/cbic.201402362.
- Lerner, Eitan; Barth, Anders; Hendrix, Jelle; Ambrose, Benjamin; Birkedal, Victoria; Blanchard, Scott C. et al. (2021): FRET-based dynamic structural biology: Challenges, perspectives and an appeal for open-science practices. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.60416.
- Liu, Huanting; Naismith, James H. (2008): An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. In: *BMC biotechnology* 8, S. 91. DOI: 10.1186/1472-6750-8-91.
- López, Abraham; Elimelech, Annika R.; Klimm, Karolin; Sattler, Michael (2020): The charged linker modulates conformations and molecular interactions of Hsp90. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. DOI: 10.1002/cbic.202000699.

- Mader, Sophie L.; Lopez, Abraham; Lawatscheck, Jannis; Luo, Qi; Rutz, Daniel A.; Gamiz-Hernandez, Ana P. et al. (2020): Conformational dynamics modulate the catalytic activity of the molecular chaperone Hsp90. In: *Nat Commun* 11 (1). DOI: 10.1038/s41467-020-15050-0.
- Mallat, Stephane; Zhong, Sifen (1992): Characterization of signals from multiscale edges. In: *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence* (14).
- Mashaghi, Alireza; Kramer, Günter; Lamb, Don C.; Mayer, Matthias P.; Tans, Sander J. (2014): Chaperone action at the single-molecule level. In: *Chemical reviews* 114 (1), S. 660–676. DOI: 10.1021/cr400326k.
- Mazal, Hisham; Haran, Gilad (2019): Single-molecule FRET methods to study the dynamics of proteins at work. In: *Current opinion in biomedical engineering* 12, S. 8–17. DOI: 10.1016/j.cobme.2019.08.007.
- Mercier, Rebecca; Wolmarans, Annemarie; Schubert, Jonathan; Neuweiler, Hannes; Johnson, Jill L.; LaPointe, Paul (2019): The conserved NxNNWHW motif in Aha-type co-chaperones modulates the kinetics of Hsp90 ATPase stimulation. In: *Nature Communications* 10 (1), S. 1273. DOI: 10.1038/s41467-019-09299-3.
- Mickler, Moritz; Hessling, Martin; Ratzke, Christoph; Buchner, Johannes; Hugel, Thorsten (2009): The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (3), S. 281–286. DOI: 10.1038/nsmb.1557.
- Monachino, Enrico; Spenkelnik, Lisanne M.; van Oijen, Antoine M. (2017): Watching cellular machinery in action, one molecule at a time. In: *The Journal of cell biology* 216 (1), S. 41–51. DOI: 10.1083/jcb.201610025.
- Nakagawa, M.; Watanabe, H.; Kodato, S.; Okajima, H.; Hino, T.; Flippen, Judith H.; Witkop, B. (1977): A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine - 25 years later; Nakagawa et al. 1977. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74.
- Nerreter, Thomas; Letschert, Sebastian; Götz, Ralph; Doose, Sören; Danhof, Sophia; Einsele, Hermann et al. (2019): Super-resolution microscopy reveals ultra-low CD19 expression on myeloma cells that triggers elimination by CD19 CAR-T. In: *Nature Communications* 10 (1), S. 3137. DOI: 10.1038/s41467-019-10948-w.
- Neubert, Franziska; Beliu, Gerti; Terpitz, Ulrich; Werner, Christian; Geis, Christian; Sauer, Markus; Doose, Sören (2018): Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 57 (50), S. 16364–16369. DOI: 10.1002/anie.201808951.

- Neuweiler, H.; Sauer, M. (2004): Using Photoinduced Charge Transfer Reactions to Study Conformational Dynamics of Biopolymers at the Single-Molecule Level. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* 5 (3), S. 285–298. DOI: 10.2174/1389201043376896.
- Neuweiler, Hannes; Banachewicz, Wiktor; Fersht, Alan R. (2010): Kinetics of chain motions within a protein-folding intermediate. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (51), S. 22106–22110. DOI: 10.1073/pnas.1011666107.
- Neuweiler, Hannes; Johnson, Christopher M.; Fersht, Alan R. (2009): Direct observation of ultrafast folding and denatured state dynamics in single protein molecules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44), S. 18569–18574. DOI: 10.1073/pnas.0910860106.
- Neuweiler, Hannes; Schulz, Andreas; Böhmer, Martin; Enderlein, Jörg; Sauer, Markus (2003): Measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in peptides at the single-molecule level. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (18), S. 5324–5330. DOI: 10.1021/ja034040p.
- Neuweiler, Hannes; Schulz, Andreas; Vaiana, Andrea C.; Smith, Jeremy C.; Kaul, Sepp; Wolfrum, Jürgen; Sauer, Markus (2002): Detection of individual p53-autoantibodies by using quenched peptide-based molecular probes. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 41 (24), S. 4769–4773. DOI: 10.1002/anie.200290044.
- Nguyen, Trang T.; Sly, Krystal L.; Conboy, John C. (2012): Comparison of the energetics of avidin, streptavidin, neutrAvidin, and anti-biotin antibody binding to biotinylated lipid bilayer examined by second-harmonic generation. In: *Analytical chemistry* 84 (1), S. 201–208. DOI: 10.1021/ac202375n.
- Niekamp, Stefan; Sung, Jongmin; Huynh, Walter; Bhabha, Gira; Vale, Ronald D.; Stuurman, Nico (2019): Nanometer-accuracy distance measurements between fluorophores at the single-molecule level. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. DOI: 10.1073/pnas.1815826116.
- Obermann, Wolfgang M. J.; Sondermann, Holger; Russo, Alicia A.; Pavletich, Nikola P.; Hartl, F. Ulrich (1998): In vivo function of Hsp90 is dependant on ATP binding and ATP hydrolysis. In: *The Journal of cell biology* 143 (4).
- Panaretou, B.; Prodromou, C.; Roe, S. M.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H. (1998): ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. In: *The EMBO journal* 17 (16), S. 4829–4836. DOI: 10.1093/emboj/17.16.4829.
- Park, Hye-Kyung; Yoon, Nam Gu; Lee, Ji-Eun; Hu, Sung; Yoon, Sora; Kim, So Yeon et al. (2020): Unleashing the full potential of Hsp90 inhibitors as cancer therapeutics through simultaneous inactivation of Hsp90, Grp94, and TRAP1. In:

*Experimental & molecular medicine* 52 (1), S. 79–91. DOI: 10.1038/s12276-019-0360-x.

Pearl, Laurence H.; Prodromou, Chrisostomos (2006): Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. In: *Annual review of biochemistry* 75, S. 271–294. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738.

Prodromou, Chrisostomos (2012): The 'active life' of Hsp90 complexes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (3), S. 614–623. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.07.020.

Prodromou, Chrisostomos; Roe, S.Mark; O'Brien, Ronan; Ladbury, John E.; Piper, Peter W.; Pearl, Laurence H. (1997): Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. In: *Cell* 90 (1), S. 65–75. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80314-1.

Radli, Martina; Rüdiger, Stefan G. D. (2018): Dancing with the Diva: Hsp90-Client Interactions. In: *Journal of Molecular Biology* 430 (18 Pt B), S. 3029–3040. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.05.026.

Ratzke, C.; Hellenkamp, B.; Hugel, T. (2014): Four-colour FRET reveals directionality in the Hsp90 multicomponent machinery. In: *Nature Communications* 5, S. 4192. DOI: 10.1038/ncomms5192.

Ratzke, C.; Mickler, M.; Hellenkamp, B.; Buchner, J.; Hugel, T. (2010): Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (37), S. 16101–16106. DOI: 10.1073/pnas.1000916107.

Ratzke, Christoph; Berkemeier, Felix; Hugel, Thorsten (2012): Heat shock protein 90's mechanochemical cycle is dominated by thermal fluctuations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (1), S. 161–166. DOI: 10.1073/pnas.1107930108.

Reid, Lara O.; Roman, Ernesto A.; Thomas, Andrés H.; Dántola, M. Laura (2016): Photooxidation of Tryptophan and Tyrosine Residues in Human Serum Albumin Sensitized by Pterin: A Model for Globular Protein Photodamage in Skin. In: *Biochemistry* 55 (34), S. 4777–4786. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00420.

Reidy, Michael; Masison, Daniel C. (2020): Mutations in the Hsp90 N domain identify a site that controls dimer opening, and expand human Hsp90 $\alpha$  function in yeast. In: *Journal of Molecular Biology*. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.06.015.

Richter, K.; Muschler, P.; Hainzl, O.; Buchner, J. (2001): Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (36), S. 33689–33696. DOI: 10.1074/jbc.M103832200.

Richter, Klaus; Buchner, Johannes (2006): hsp90. Twist and fold. In: *Cell* 127 (2), S. 251–253. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.004.

- Richter, Klaus; Moser, Sandra; Hagn, Franz; Friedrich, Rainer; Hainzl, Otmar; Heller, Markus et al. (2006): Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase activity. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (16), S. 11301–11311. DOI: 10.1074/jbc.M510142200.
- Richter, Klaus; Reinstein, Jochen; Buchner, Johannes (2002): N-terminal residues regulate the catalytic efficiency of the Hsp90 ATPase cycle. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (47), S. 44905–44910. DOI: 10.1074/jbc.M208457200.
- Ries, Julia; Schwarze, Simone; Johnson, Christopher M.; Neuweiler, Hannes (2014): Microsecond folding and domain motions of a spider silk protein structural switch. In: *Journal of the American Chemical Society* 136 (49), S. 17136–17144. DOI: 10.1021/ja508760a.
- Rogers, Julie M. G.; Polishchuk, Alexei L.; Guo, Lin; Wang, Jun; DeGrado, William F.; Gai, Feng (2011): Photoinduced electron transfer and fluorophore motion as a probe of the conformational dynamics of membrane proteins: application to the influenza A M2 proton channel. In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27 (7), S. 3815–3821. DOI: 10.1021/la200480d.
- Roy, Rahul; Hohng, Sungchul; Ha, Taekjip (2008): A practical guide to single-molecule FRET. In: *Nature Methods* 5 (6), S. 507–516. DOI: 10.1038/nmeth.1208.
- S. Lindquist and E. A. Craig (1988): The heat-shock proteins. In: *Annual Reviews of Genetics* 22, S. 631–677. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>.
- Sadler, B. M.; Swami, A. (1999): Analysis of multiscale products for step detection and estimation. In: *IEEE Trans. Inform. Theory* 45 (3), S. 1043–1051. DOI: 10.1109/18.761341.
- Saibil, Helen (2013): Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (10), S. 630–642. DOI: 10.1038/nrm3658.
- Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature Methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schmid, Sonja; Götz, Markus; Hugel, Thorsten (2016): Single-Molecule Analysis beyond Dwell Times. Demonstration and Assessment in and out of Equilibrium. In: *Biophysical Journal* 111 (7), S. 1375–1384. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.08.023.
- Schmid, Sonja; Götz, Markus; Hugel, Thorsten (2018): Effects of Inhibitors on Hsp90's Conformational Dynamics, Cochaperone and Client Interactions. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*. DOI: 10.1002/cphc.201800342.

- Schmid, Sonja; Hugel, Thorsten (2020): Controlling protein function by fine-tuning conformational flexibility. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.57180.
- Schuler, Benjamin; Hofmann, Hagen (2013): Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics--expanding scope and timescales. In: *Current opinion in structural biology* 23 (1), S. 36–47. DOI: 10.1016/j.sbi.2012.10.008.
- Schulze, Andrea (2017): Dissertation: Untersuchungen zum Mechanismus des molekularen Chaperons Hsp90 mittels photoinduzierter Elektronentransfer-Fluoreszenzlöschung.
- Schulze, Andrea; Beliu, Gerti; Helmerich, Dominic A.; Schubert, Jonathan; Pearl, Laurence H.; Prodromou, Chrisostomos; Neuweiler, Hannes (2016): Cooperation of local motions in the Hsp90 molecular chaperone ATPase mechanism. In: *Nature Chemical Biology* 12 (8), S. 628–635. DOI: 10.1038/nchembio.2111.
- Shiau, Andrew K.; Harris, Seth F.; Southworth, Daniel R.; Agard, David A. (2006): Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. In: *Cell* 127 (2), S. 329–340. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.027.
- Sima, Siyuan; Richter, Klaus (2018): Regulation of the Hsp90 system. In: *Biochimica et biophysica acta*. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.03.008.
- Southworth, Daniel R.; Agard, David A. (2008): Species-dependent ensembles of conserved conformational states define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. In: *Molecular Cell* 32 (5), S. 631–640. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.10.024.
- Sturzenegger, Flurin; Zosel, Franziska; Holmstrom, Erik D.; Buholzer, Karin J.; Makarov, Dmitrii E.; Nettels, Daniel; Schuler, Benjamin (2018): Transition path times of coupled folding and binding reveal the formation of an encounter complex. In: *Nature Communications* 9 (1), S. 4708. DOI: 10.1038/s41467-018-07043-x.
- Taipale, Mikko; Jarosz, Daniel F.; Lindquist, Susan (2010): HSP90 at the hub of protein homeostasis. Emerging mechanistic insights. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (7), S. 515–528. DOI: 10.1038/nrm2918.
- Taipale, Mikko; Krykbaeva, Irina; Koeva, Martina; Kayatekin, Can; Westover, Kenneth D.; Karras, Georgios I.; Lindquist, Susan (2012): Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. In: *Cell* 150 (5), S. 987–1001. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.047.
- Thomsen, Johannes; Sletfjerding, Magnus Berg; Jensen, Simon Bo; Stella, Stefano; Paul, Bijoya; Malle, Mette Galsgaard et al. (2020): DeepFRET, a software for rapid and automated single-molecule FRET data classification using deep learning. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.60404.
- Tinnefeld, Philip; Cordes, Thorben (2012): 'Self-healing' dyes: intramolecular stabilization of organic fluorophores. In: *Nature Methods* 9 (5), 426-7; author reply 427-8. DOI: 10.1038/nmeth.1977.

- Tsunoyama, Taka A.; Watanabe, Yusuke; Goto, Junri; Naito, Kazuma; Kasai, Rinshi S.; Suzuki, Kenichi G. N. et al. (2018): Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. In: *Nature Chemical Biology* 14 (5), S. 497–506. DOI: 10.1038/s41589-018-0032-5.
- Vaiana, Andrea C.; Neuweiler, Hannes; Schulz, Andreas; Wolfrum, Jürgen; Sauer, Markus; Smith, Jeremy C. (2003): Fluorescence quenching of dyes by tryptophan. Interactions at atomic detail from combination of experiment and computer simulation. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (47), S. 14564–14572. DOI: 10.1021/ja036082j.
- van Oijen, Antoine M. (2011): Single-molecule approaches to characterizing kinetics of biomolecular interactions. In: *Current opinion in biotechnology* 22 (1), S. 75–80. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.10.002.
- Verba, Kliment A.; Agard, David A. (2017): How Hsp90 and Cdc37 Lubricate Kinase Molecular Switches. In: *Trends in Biochemical Sciences* 42 (10), S. 799–811. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.07.002.
- Vogelsang, Jan; Kasper, Robert; Steinhauer, Christian; Person, Britta; Heilemann, Mike; Sauer, Markus; Tinnefeld, Philip (2008): A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 47 (29), S. 5465–5469. DOI: 10.1002/anie.200801518.
- Wandinger, Sebastian Karl; Richter, Klaus; Buchner, Johannes (2008): The Hsp90 chaperone machinery. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (27), S. 18473–18477. DOI: 10.1074/jbc.R800007200.
- Wang, Bin; Ho, Joseph; Fei, Jingyi; Gonzalez, Ruben L.; Lin, Qiao (2011): A microfluidic approach for investigating the temperature dependence of biomolecular activity with single-molecule resolution. In: *Lab on a chip* 11 (2), S. 274–281. DOI: 10.1039/c0lc00157k.
- Wang, Lei; Zhang, Qiuyue; You, Qidong (2021): Targeting the HSP90-CDC37-kinase chaperone cycle: A promising therapeutic strategy for cancer. In: *Medicinal research reviews*. DOI: 10.1002/med.21807.
- Wazawa, Tetsuichi; Ueda, Masahiro (2005): Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 95, S. 77–106. DOI: 10.1007/b102211.
- Whitesell, Luke; Lindquist, Susan L. (2005): HSP90 and the chaperoning of cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (10), S. 761–772. DOI: 10.1038/nrc1716.
- Wolter, Steve; Löschberger, Anna; Holm, Thorge; Aufmkolk, Sarah; Dabauvalle, Marie-Christine; van de Linde, Sebastian; Sauer, Markus (2012): rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. In: *Nature Methods* 9 (11), S. 1040–1041. DOI: 10.1038/nmeth.2224.

Wortmann, Philipp; Götz, Markus; Hugel, Thorsten (2017): Cooperative Nucleotide Binding in Hsp90 and Its Regulation by Aha1. In: *Biophysical Journal* 113 (8), S. 1711–1718. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.08.032.

Wu, Jianming; Liu, Tuoen; Rios, Zechary; Mei, Qibing; Lin, Xiukun; Cao, Shousong (2017): Heat Shock Proteins and Cancer. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (3), S. 226–256. DOI: 10.1016/j.tips.2016.11.009.

Ye, Weixiang; Götz, Markus; Celiksoy, Sirin; Tüting, Laura; Ratzke, Christoph; Prasad, Janak et al. (2018): Conformational Dynamics of a Single Protein Monitored for 24 h at Video Rate. In: *Nano letters*. DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b03342.

Zierer, Bettina K.; Rübhelke, Martin; Toppel, Franziska; Madl, Tobias; Schopf, Florian H.; Rutz, Daniel A. et al. (2016): Importance of cycle timing for the function of the molecular chaperone Hsp90. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (11), S. 1020–1028. DOI: 10.1038/nsmb.3305.

## Publikationsliste

Diese Dissertation basiert auf folgender Publikation:

**Jonathan Schubert**, Andrea Schulze, Chrisostomos Prodromou & Hannes Neuweiler. (2021). *Two-color single-molecule photoinduced electron transfer fluorescence imaging microscopy of chaperone dynamics*.

Unter Begutachtung (engl.: under review)

Folgende Publikationen sind nicht in direktem Zusammenhang mit der Dissertation entstanden:

Andrea Schulze, Gerti Beliu, Dominic A. Helmerich, **Jonathan Schubert**, Laurence H. Pearl, Chrisostomos Prodromou & Hannes Neuweiler. (2016). *Cooperation of local motions in the Hsp90 molecular chaperone ATPase mechanism*. Nature chemical biology 12 (8), 628-635.

Rebecca Mercier, Annemarie Wolmarans, **Jonathan Schubert**, Hannes Neuweiler, Jill L. Johnson & Paul LaPointe. (2019). *The conserved NxNNWHW motif in Aha-type co-chaperones modulates the kinetics of Hsp90 ATPase stimulation*. Nature communications 10 (1273)

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Hannes Neuweiler, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Danke für die interessanten Diskussionen, deine umfassende Unterstützung und nicht zuletzt für deinen großen Enthusiasmus für die Forschung, der mich immer wieder motiviert hat. Die Zeit in deiner Arbeitsgruppe hat mir viel Freude bereitet.

Mein Dank geht auch an Ingrid Tessmer, für die Zweitbetreuung, die konstruktive Kritik und wertvollen Diskussionen, die eine Bereicherung für meine Arbeit waren.

Außerdem möchte ich mich bei Markus Sauer für die Drittbetreuung und seine wertvollen Ideen bedanken. Vielen Dank für die tolle Atmosphäre, die du an deinem Lehrstuhl geschaffen hast.

Bei Chrisostomos Prodromou möchte ich mich für die gute Kollaboration bedanken (University of Sussex, UK).

Bei Thomas Müller möchte ich mich für das Überlassen der BirA Ligase bedanken.

Danke an das „Hannes-Lab“, Suhaila, Charlotte, Andrea, Julia und Marco für die tollen und unterhaltsamen Stunden im Labor.

Durch die enge Zusammenarbeit wurden aus Kollegen auch gute Freunde. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Gerti Beliu, Dominic Helmerich, Teresa Klein, Patrick Eiring, Alexander Kuhleemann sowie Andreas Kurz und Fabian Zwettler bedanken.

Mein Dank geht an alle Kollegen und Freunde am Lehrstuhl für die abwechslungsreichen und interessanten Gespräche bei Kaffeepausen und Arbeitsgruppenseminaren. Die Skiseminare waren durch euch unvergessliche Erlebnisse. Danke Nora, Jan und Franzi für eure geduldige und spaßige Einführung in das Skiseminar.

## *Danksagung*

---

Danke an meine Freunde Maximilian, Laura, Julia, Judith und Janina für all die tollen Erlebnisse und den gemeinsamen Sport, der zu einem regelmäßigen Ritual wurde.

Vielen Dank an meine ganze Familie, die mich immer unterstützt und motiviert hat. Allen voran danke ich meiner Mutter Diemut, neben vielen anderen Dingen auch für das biologische Vorbild. Danke an meine Geschwister Carmelita, Julian, Samuel und Hannah, für all die tollen und lustigen Unternehmungen während Studium und Promotion. Es ist toll euch alle zu haben.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei Suhaila für die Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken, sowohl moralischer als auch wissenschaftlicher Natur und dafür, dass du mich dazu bringst dabei das Beste aus mir herauszuholen. Danke, dass du immer für mich da bist.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Bildgebende Zweifarbeneinzelmolekül-PET-Fluoreszenzspektroskopie am molekularen Chaperon Hsp90**“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

### **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled: „**Two-color single-molecule PET fluorescence imaging spectroscopy on the molecular chaperone Hsp90**“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Signature PhD-student

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Jonathan Tobias Schubert  
Geburtstag: 28.05.1993  
Geburtsort: Gräfelding  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

2000 - 2004 Josef-Guggenmos Grundschule Altötting  
2004 - 2012 Maria-Ward-Gymnasium Altötting  
Juni 2012 Allgemeine Hochschulreife

### **Hochschulbildung**

2012 - 2015 Studium Biologie B.Sc.  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
(Untersuchung lokaler Konformationsdynamik  
innerhalb der N-terminalen Domäne des  
Volllängen-Chaperons Hsp90 mittels  
Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie)  
Betreuer: PD Dr. Hannes Neuweiler

2015 - 2017 Studium Biologie M.Sc.  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
(Einzelmoleküldetektion lokaler  
Konformationsdynamik im molekularen Chaperon  
Hsp90)  
Betreuer: PD Dr. Hannes Neuweiler

Seit 2017 Doktorarbeit bei PD Dr. Hannes Neuweiler  
Lehrstuhl für Biotechnologie & Biophysik  
Universität Würzburg

Würzburg, den \_\_\_\_\_

Jonathan Schubert