

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Molekulare Maschinen E22a

Einzelmolekül- Fluoreszenzmessungen an der Proteintranslokase Toc34

Christina Lumme

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zaccharias

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Thorsten Hugel
2. Univ.-Prof. Dr. Katharina Krischer

Die Dissertation wurde am 20.02.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 03.04.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | xi |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Proteinimport in Chloroplasten | 1 |
| 1.2 Toc-Komplex | 3 |
| 1.3 GTPasen | 4 |
| 1.4 Toc GTPase Zyklus | 5 |
| 2 Theoretische Grundlagen | 7 |
| 2.1 Fluoreszenz | 8 |
| 2.1.1 Energieübergänge im Molekül | 8 |
| 2.1.2 Fluoreszenzfähige Moleküle - Fluorophore | 9 |
| 2.1.3 Absorption und Emission | 9 |
| 2.1.4 Quantenausbeute und Lebensdauer | 11 |
| 2.2 Fluoreszenzanisotropie | 11 |
| 2.2.1 Definition der Anisotropie | 11 |
| 2.2.2 Theorie der Anisotropie | 12 |
| 2.3 Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET) | 14 |
| 2.3.1 Theorie zum FRET | 14 |
| 2.3.2 Theorie zur Bestimmung der FRET-Effizienz aus Messdaten | 17 |
| 3 Material und Methoden | 19 |
| 3.1 Cysteinmutanten | 20 |
| 3.1.1 Lokale Proteinkonzentration des „Spacer-Zipper“ Konstrukts | 20 |
| 3.2 Farbstoffe | 21 |
| 3.3 Transitpeptid | 22 |
| 3.4 Aluminiumfluorid | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.5 | Biochemische Methoden | 23 |
| 3.5.1 | Verwendete Puffer | 23 |
| 3.5.2 | Expression und Zellaufschluss | 24 |
| 3.5.3 | Proteinaufreinigung | 25 |
| 3.5.4 | Konzentrationsbestimmung | 25 |
| 3.5.5 | Fluoreszenzmarkieren der Proteine | 26 |
| 3.5.6 | Oberflächenimmobilisierung | 26 |
| 3.6 | Herstellen der Flusskammern | 27 |
| 3.6.1 | Zuschneiden von Deckgläschen und Nescofilm | 27 |
| 3.6.2 | Reinigung der Deckgläschen | 28 |
| 3.6.3 | Silanisierung der Oberflächen | 29 |
| 3.6.4 | Funktionalisierung der Oberflächen | 29 |
| 3.6.5 | Zusammenbau der Flusskammer | 30 |
| 3.6.6 | Flusskammer im Versuchsaufbau | 30 |
| 3.7 | Fluoreszenzspektrometer | 31 |
| 3.8 | Cis-Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop - TIRFM | 33 |
| 3.8.1 | Anregungsstrahlengang | 34 |
| 3.8.2 | Detektionsstrahlengang | 36 |
| 3.8.3 | Durchführung der Einzelmolekülmessungen | 36 |
| 3.8.4 | Auswertung | 37 |
| 3.8.5 | Bestimmung des Gamma-Faktors | 38 |
| 3.9 | Berechnung von Assoziationsraten | 39 |
| 3.10 | Berechnung von Dissoziationskonstanten | 40 |
| 4 | Messergebnisse | 41 |
| 4.1 | Struktur des <i>psToc34</i> Homodimers | 41 |
| 4.1.1 | FRET-Messungen an den Cysteinmutanten des <i>psToc34</i> Homodimers | 42 |
| 4.1.2 | Einfluss des Argininfingers auf die Struktur des <i>psToc34</i> Homodimers | 47 |
| 4.2 | Einfluss der Nukleotide auf die Struktur des <i>psToc34</i> Homodimers | 50 |
| 4.3 | Einfluss des Transitpeptids auf die Struktur des <i>psToc34</i> Homodimers | 54 |
| 4.4 | Einfluss der Nukleotide auf die Bindung des Transitpeptids | 61 |
| 4.5 | Ensemble FRET-Messung am <i>psToc34</i> - <i>Toc159</i> Heterodimer | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 5 Diskussion | 67 |
| 5.1 Ein aktuelles Modell zum Proteinimport | 67 |
| 5.2 Monomer oder Dimer, das ist hier die Frage | 68 |
| 5.3 Einfluss der Nukleotide auf Toc34 Homodimere | 70 |
| 5.4 Nukleotidaustausch am Monomer oder Dimer? | 71 |
| 5.5 Binden des Transitpeptids mit anschließender Dissoziation des Toc34 Homodimers | 72 |
| 5.6 Heterodimer | 75 |
| 5.7 Zusammenfassung | 76 |
| 6 Ausblick | 81 |
| 6.1 Übergangszustand | 81 |
| 6.2 Heterodimer | 82 |
| 6.3 Magnetische Pinzette | 83 |
| Literaturverzeichnis | 85 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Übersicht über den Proteinimport in Chloroplasten | 2 |
| 2.1 | Jablonski Diagramm | 8 |
| 2.2 | Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips und der sich daraus ergebenden Spiegelregel | 10 |
| 2.3 | Schematische Darstellung der Photosелеktion. | 11 |
| 2.4 | Emissionsintensitäten eines einzelnen Fluorophors in einem Koordinatensystem. | 12 |
| 2.5 | Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor | 14 |
| 2.6 | Försterradius, Überlappintegral und Orientierung der Übergangsdipolmomente | 16 |
| 3.1 | Schematische Darstellung des Einzelmolekülversuches | 19 |
| 3.2 | Kristallstruktur des Toc34 Dimers | 21 |
| 3.3 | Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz | 22 |
| 3.4 | GDP•AlF _x imitiert die Phosphatgruppe im Übergangszustand. | 23 |
| 3.5 | Oberflächenimmobilisierung | 27 |
| 3.6 | Deckgläschen geschnitten mit Nescofilmschnittmuster | 28 |
| 3.7 | Illustration der Flusskammer im Versuchsaufbau | 31 |
| 3.8 | Schematischer Aufbau des Fluoreszenzspektrometers | 32 |
| 3.9 | Schematische Darstellung des Einzelmolekülversuchsaufbaus | 33 |
| 4.1 | Kristallstruktur des <i>ps</i> Toc34 Dimers | 42 |
| 4.2 | Beispiel eines typischen Fluoreszenzverlaufes eines Donor-Akzeptor-Paares an den Cysteinmutanten des <i>ps</i> Toc34 Homodimers | 43 |
| 4.3 | FRET-Messungen an den Cysteinmutanten des <i>ps</i> Toc34 Homodimers | 46 |
| 4.4 | FRET-Messungen an der Argininfingermutante <i>ps</i> Toc34V78C/R133A Homodimers | 47 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.5 | Beispiel eines typischen Fluoreszenzverlaufes eines Donor-Akzeptor-Paares an der Argininfingermutante des <i>psToc34</i> Homodimers | 48 |
| 4.6 | Fluoreszenzanisotropie von mantGMPPNP beim Binden an unterschiedliche Cysteinmutanten von <i>psToc34</i> | 49 |
| 4.7 | Fluoreszenzspektren des fluoreszenzmarkierten und Histogramme für unterschiedliche Nukleotid gebundene Zustände | 52 |
| 4.8 | Fluoreszenzspektren von Donor und Akzeptor des <i>psToc34</i> Homodimers vor und nach Zugabe von Transitpeptid bzw. Nukleotid | 55 |
| 4.9 | Fluoreszenzverlauf von Donor und Akzeptor des <i>psToc34</i> Homodimers vor und nach Zugabe von Transitpeptid bzw. Nukleotid | 57 |
| 4.10 | Histogramme der FRET-Effizienzen des GDP und GDP•AlF _x gebundenen <i>psToc34</i> _{SZ} V78C in Anwesenheit von Transitpeptid | 59 |
| 4.11 | Aufteilung der FRET-Effizienzen auf einzelne Zustände | 60 |
| 4.12 | Anisotropie des ungebundenen und gebundenen Transitpeptids | 61 |
| 4.13 | Titrationmessung zur Anisotropie des Transitpeptids | 63 |
| 4.14 | Ausbildung von Heterodimeren | 65 |
| 4.15 | Fluoreszenzspektren vor und nach Zugabe von GMPPNP zum heteromeren <i>psToc</i> Dimer | 66 |
| 5.1 | Vereinfachtes Modell des Toc34 GTPase klu | 68 |
| 5.2 | Dissoziation des Homodimers nach Binden des Transitpeptids und Konformationsänderung des Toc34 im Hydrolysezustand | 77 |
| 5.3 | Kompletter chemomechanischer Zyklus | 79 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 3.1 | Abstände der Cysteine der verschiedenen Toc34 Homodimere | 20 |
| 3.2 | Spektrale Eigenschaften der in der Arbeit verwendeten Fluorophore | 22 |
| 3.3 | Extinktionskoeffizienten der Proteine | 26 |
| 3.4 | optische Bauelemente | 34 |
| 4.1 | Abstände der Cysteine der verschiedenen <i>ps</i> Toc34 Homodimere mit den erwarteten und gemessenen FRET-Effizienzen und den in Ensemble-Experimenten gemessenen Änderung der Akzeptorfluoreszenzmaxima. | 45 |
| 4.2 | Assoziationsraten von mantGMPPNP | 50 |
| 4.3 | Änderungen der Akzeptorfluoreszenz für unterschiedlich gewählte Nukleotide; Anteile der FRET-Effizienz für die zwei gefundenen Populationen bei 0,86 und 0,95 an der gesamten FRET-Effizienz | 53 |
| 4.4 | Änderungen der Akzeptorfluoreszenz für unterschiedlich gewählte Nukleotid-Transitpeptid Kombinationen | 58 |
| 4.5 | Anteile der FRET-Effizienz für die drei (GDP) bzw vier (GDP•AlF _x) gefundenen Populationen bei 0,65, 0,74, 0,86 und 0,95 an der gesamten FRET-Effizienz | 60 |
| 4.6 | Anisotropie des Transitpeptids in Abhängigkeit vom Nukleotid | 62 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ddH ₂ O | zweifach destilliertes Wasser |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer |
| GAD | G proteins activated by nucleotide-dependent dimerization |
| GAP | GTPase aktivierendes Protein |
| GDI | GDP Dissoziationinhibitor |
| GDF | GDP Verdrängungsfaktor; GDP displacement factor |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GEF | GTP/GDP Austauschfaktor; GTP/GDP exchange factor |
| GMPPNP | Guanylyl-imidodiphosphat; nicht hydrolysierbares Analog des GTP |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| OEP | outer-envelop Protein, Protein der äußeren Hüllenmembran |
| Tic | Translocon on the inner envelope of chloroplasts |
| Toc | Translocon on the outer envelope of chloroplasts |
| w.E. | willkürliche Einheit |

Zusammenfassung

Der Transport von zytosolisch synthetisierten Proteinen zu dem Ort ihrer Bestimmung ist ein logistisch außerordentlich komplexer Vorgang. Etwa 50% aller Proteine müssen durch mindestens eine Membran transportiert werden, um an ihren „Arbeitsplatz“ zu gelangen. Um diesen Proteintransport durch Membranen besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit Messungen am Proteinimport-Komplex des Chloroplasten durchgeführt. Dieser ist endosymbiotischer Herkunft, weshalb die zu importierenden Proteine über zwei Membranen, die äußere und die innere Hülle transportiert werden müssen. In der äußeren Membran befindet sich der Toc-Komplex, der unter anderem die zwei GTPasen Toc34 und Toc159 beinhaltet. Beide Proteine sind am Import beteiligt. Das komplexe Zusammenspiel beider GTPasen in ihren GTPase Zyklen, d.h. das Binden von Transitpeptid, der Nukleotidaustausch oder eine mögliche Interaktion der Proteine untereinander, konnte jedoch noch nicht verifiziert werden. Toc34 wurde in einer 2002 veröffentlichten Kristallstruktur als Homodimer gefunden, weshalb spekuliert wird, dass das Dimer auch *in vivo* eine funktionale Bedeutung hat. Ebenso wurde auf eine hohe Homologie zwischen den G-Domänen beider GTPasen hingewiesen, welche der Dimerisierungsschnittstelle des Homodimers in der gefundenen Kristallstruktur entspricht. Es ist also auch denkbar, dass die Ausbildung eines Heterodimers im GTPase Zyklus auftritt und zur gegenseitigen Aktivierung der GTPasen führt.

Ziel dieser Arbeit war es, das Dimerisierungsverhalten des Toc34 mit Hilfe von FRET-Messungen zu charakterisieren und in den GTPase Zyklus einzuordnen. Hierfür wurde ein Cis-Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop (Objective-type TIRF Microscope) aufgebaut, mit welchem das Fluoreszenzverhalten einzelner Moleküle über die Zeit beobachtet werden kann. Für diese Arbeit wurden zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung verschiedene Mutanten hergestellt. Ein angefügtes Coiled-Coil-Motiv ermöglichte unter den Messbedingungen eine räumlich hohe Konzentration und damit die Fähigkeit, Dimere auszubilden.

Unter verschiedenen Nukleotidbedingungen konnte in Einzelmolekül-FRET-Messungen ge-

zeigt werden, dass Toc34 stets ein stabiles Dimer ausbildet. Außerdem weisen die durchgeführten Messungen darauf hin, dass das Binden von Transitpeptid sowohl zur Dissoziation des GDP-gebundenen psToc34 Homodimers als auch des GTP-gebundenen psToc34 Homodimers führt. Im Hydrolysezustand (induziert durch Zugabe von Aluminiumfluorid zu GDP-gebundenem Protein), konnten signifikante Unterschiede sowohl für das Binden von Transitpeptid als auch für das Dimerisierungsverhalten dieses GDP•AlF_x- und Transitpeptidgebundenen Toc34 Homodimers beobachtet werden. Diese Messdaten liefern erste Hinweise für eine Kopplung zwischen Mechanik und Chemie im GTPase Zyklus von Toc34. Schließlich erlauben die Fluoreszenzmessungen den Zeitpunkt der Heterodimerisierung von Toc34 mit Toc159 zu fixieren.

Kapitel 1

Einleitung

Plastiden entstanden durch Aufnahme eines freilebenden phototrophen Cyanobakteriums durch eine heterotrophe Zelle [1, 2]. Begründet durch ihre endosymbiotische Herkunft, besitzen die Chloroplasten eine doppelte Hüllmembran, die das Stroma und die darin liegenden Zellkompartimente umschließen. Während der Evolution dieser endosymbiotischen Beziehung, fand ein enormer Gentransfer von dem Endosymbionten, zu denen auch die Chloroplasten der Landpflanzen gehören, zur Wirtszelle statt [3, 4]. Bei dieser starken Anpassung wurden zum Beispiel die meisten ursprünglich vom Endosymbionten kodierten Gene in das Genom des Wirtes transferiert [4]. Wie in Abbildung 1.1a dargestellt, fand die Translation der für das Organell bestimmten Proteine nun also im Zytosol der Wirtszelle statt, was die Entwicklung eines Systems zum Rücktransport der Proteine in das Organell erforderte. Dies bedingte die Ausbildung von spezifischen Signalen für den gerichteten Transport zum Organell einerseits und einer Membran-eingelagerten Maschine zum post-translationalen Import der Proteine über das Doppelmembransystem andererseits [5].

1.1 Proteinimport in Chloroplasten

Abbildung 1.1 zeigt einen Überblick über den Proteinimport in Chloroplasten, die einzelnen Schritte von der Synthese bis zum Erreichen des „Zielortes“ werden im Folgenden beschrieben. Abbildung 1.1a veranschaulicht, dass Polypeptide, deren Genom im Nukleus verschlüsselt ist, im Zytosol am Ribosom translatiert werden und je nach Transitpeptid (in gelb dargestellt) zum entsprechenden Zellkompartiment transportiert werden - z.B. zum Mitochondrium, dem Peroxisom, der Plasmamembran oder dem Chloroplasten. Damit eine spezifische

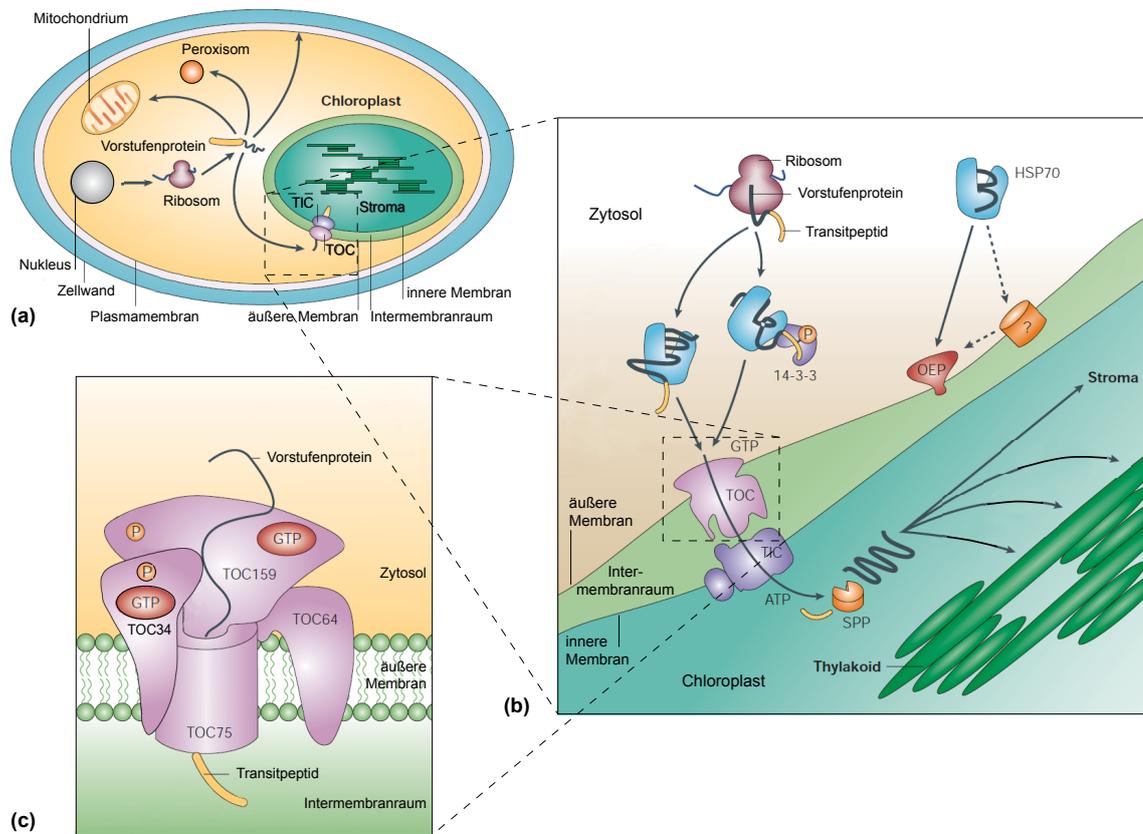


Abbildung 1.1 Proteinimport in Chloroplasten: **a)** pflanzliche Zelle mit schematisch dargestellten Transportwegen von cytosolisch translatierten Vorstufenproteinen zu verschiedenen Zellkompartimenten. **b)** Schema des Proteinimports durch die plastidäre Doppelmembran über die Proteinkomplexe Toc und Tic in den Chloroplasten, sowie über einen alternativen Weg mittels HSP70 und einem Protein der äußeren Hüllenmembran (OEP) **c)** Proteinimportkomplex der äußeren Chloroplastenmembran. Ausführliche Erläuterungen siehe Haupttext. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Abb. nach [6].

Proteinausstattung der verschiedenen Zellorganellen erreicht werden kann, muss die Spezifität der Zielsteuerung zu den zellulären Strukturen hoch sein. Für den Transport von Proteinen zu den Chloroplasten sind diese meist mit amino-terminalen Zielsteuerungssequenzen (auch als Transitpeptid bezeichnet) ausgestattet, welches in Abbildung 1.1a gelb markiert ist. Proteine, die eine solche Zielsteuerungssequenz besitzen, werden als Vorstufenproteine bezeichnet. Für Vorstufenproteine mit „klassischem“ Transitpeptid wurden sogenannte Geleitkomplexe beschrieben (Abbildung 1.1b), wobei es sich bei den bisher bekannten Faktoren zumeist um Chaperone handelt. Derzeit wird auch die Existenz alternativer Zielsteuerungssequenzen (nicht abspaltbar / nicht amino-terminal) diskutiert. Die anfänglich propagierte hohe Zahl von Proteinen mit solchen Signalen ist inzwischen jedoch nach unten korrigiert [7]. Diese

Vorstufenproteine ohne abspaltbares Transitpeptid sind meist an das Chaperon HSP70 gebunden und werden von diesem zur äußeren Chloroplastenmembran geleitet. *In vitro* können sie spontan in die Membran eingelagert werden (OEP, outer-envelop Protein, Protein der äußeren Hüllenmembran), was *in vivo* wahrscheinlich durch ein noch nicht indentifiziertes Protein realisiert wird. Der Transport von Proteinen (unabhängig vom Vorhandensein eines Transitpeptids) durch das Cytosol zu den Chloroplasten ist bisher nur rudimentär verstanden. Es wird jedoch vermutet, dass diese Chaperone das Vorstufenprotein in einem import-kompetenten, entfalteten Zustand halten und nicht direkt für den gerichteten Transport durch das Cytosol zuständig sind [8]. Der Proteinimport in den Chloroplasten ist Nukleotid-abhängig und wird ermöglicht durch die Zusammenarbeit der Translokationsapparate der äußeren (TOC, translocon of the outer envelope of chloroplasts) und der inneren Chloroplastenmembran (TIC, translocon of the inner envelope of chloroplasts). Das Transitpeptid wird durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten. Reife Proteine falten nun entweder in ihre native Struktur oder assemblieren mit anderen Proteinen im Stroma oder werden über verschiedene Importwege in das Thylakoid transportiert.

1.2 Toc-Komplex

An der Oberfläche der Chloroplasten (Abbildung 1.1c) werden die Vorstufenproteine durch einen Proteinkomplex erkannt, der als Toc-Komplex bezeichnet wird. Bisher wurden fünf Komponenten des Komplexes identifiziert: Toc159, Toc75, Toc64, Toc34 und Toc12 (nicht eingezeichnet), die Zahl hinter dem Namen gibt das Molekulargewicht des Proteins in kDa an. Toc75 ist ein fassartiges Protein, bestehend aus 16-18 antiparallelen membrandurchspannenden β -Faltblattstrukturen und bildet die Translokationspore des Toc-Komplexes [9]. Toc34 und Toc159 sind GTP-bindende, membranständige Rezeptoren und in ihrer Aminosäuresequenz stark verwandt. Zusammen mit Toc75 stellen sie den sogenannten Toc-Kernkomplex dar. Das stöchiometrische Verhältnis dieser drei Kernkomplexproteine beträgt wahrscheinlich 1 (Toc159) : 4 (Toc75) : 4-5 (Toc34) [10]. Toc64 erkennt mit Vorstufenproteinen beladenes Hsp90, ohne jedoch direkt mit dem Vorstufenprotein zu wechselwirken, und leitet das Vorstufenprotein an Toc34 im Kernkomplex weiter [11]. Die kleinste Toc Komponente, Toc12, ist das einzige bisher bekannte Protein des Komplexes, welches seine gesamte aktive Region in den Intermembranraum exponiert hat. Toc12 wurde in einem im Intermembranraum agie-

renden Komplex, bestehend aus Toc64, Tic22 und einem weiteren, membranständigen Hsp70 gefunden.

1.3 GTPasen

GTP-bindende Proteine (oder auch GTPasen, G-Proteine genannt) sind molekulare Schalter für die Regulierung vieler zellulärer Prozesse. Sie können Informationen weiterleiten, dadurch dass sie entweder im GTP-gebundenen oder GDP-gebundenen Zustand vorliegen [12]. Diese „Umschaltung“, bzw. dieser Wechsel zwischen den beiden Zuständen wird im Allgemeinen durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) und sogenannte GDP/GTP Austauschfaktoren (GEFs; GDP/GTP exchange factors) kontrolliert [13–15]. GAPs können das katalytische Zentrum der GTPasen stabilisieren oder sogar vervollständigen und dadurch die Hydrolyserate von GTP um mehrere Größenordnungen erhöhen. GEFs wiederum können die Affinität der GTPase für das Nukleotid stark verringern und dadurch die Nukleotidaustauschrate erhöhen. In einigen Fällen wird die Dissoziation des Nukleotids auch durch GDP Dissoziationsinhibitoren (GDIs) und GDP Verdrängungsfaktoren (GDFs, GDP displacement factors) geregelt [16]. Die Eigenschaften der G-Protein-Effektoren variieren zwischen den verschiedenen biologischen Prozessen, in die sie involviert sind. Die hervorgerufene Änderung der Proteinstruktur zwischen dem GTP- und dem GDP-Zustand ermöglicht eine hoch affine Interaktion mit den Effektoren in der GTP-gebundenen Struktur, in der zwei dynamische Strukturelemente das γ -Phosphat des GTP binden, diese Strukturelemente werden auch Switch I und Switch II genannt. Diese „entspannen“ sich nach der GTP-Hydrolyse, was zur Freisetzung des organischen Phosphats (Pi) und zum inaktiven GDP-gebundenen Zustand führt [12].

Ursprünglich wurden G-Proteine abhängig von ihren strukturellen Eigenschaften in Gruppen eingeteilt [17], jedoch wurde diese Einteilung ersetzt durch die Gruppierung in Abhängigkeit von ihrer biologischen Funktion [12–15]. Die sogenannten GADs bezeichnen eine dieser zwei Gruppen. Dies sind G-Proteine, welche in Abhängigkeit vom gebundenen Nukleotid dimerisieren und dadurch aktiviert werden (G proteins activated by nucleotide-dependent dimerization). Dies ist eine sehr heterogene Gruppe von G-Proteinen, welche in der Lage sind, Homodimere auszubilden [12]. Im dimeren Zustand vervollständigen sie ihr katalytisches Zentrum gegenseitig, was bedeutet, dass kein zusätzliches GAP nötig ist. Des Weiteren sind diese Proteine durch ihre hohe Nukleotidaustauschrate und ihrer damit verbundenen niedrigen Nukleotidaffinität unabhängig von GEFs.

1.4 Toc GTPase Zyklus

Beispiele für dimerisierende GTPasen sind Toc34 und Toc159, welche Bestandteile des Proteinimport-Komplexes Toc sind [12, 18, 19]. Zusammen mit der Translokationspore Toc75 ermöglichen sie den Transport des zytosolisch synthetisierten Vorstufenproteins durch die äußere Membran des Chloroplasten in den Intermembranraum. Jedoch konnte bisher keine Aktivierung in Abhängigkeit vom Nukleotid-gebundenen Zustand festgestellt werden. Das Dimerisierungsverhalten scheint unabhängig vom Nukleotid zu sein, weshalb eine Zuordnung zu den GAD GTPasen bisher nicht nachgewiesen werden kann.

Ankommende Vorstufenproteine werden erkannt, gebunden und unter Energieaufwand in den Chloroplasten transportiert [19]. Die Homodimerisierung findet vorzugsweise im GDP gebundenen Zustand statt, wird aber auch für das GTP-gebundene Protein beobachtet. Da sich die Nukleotidbindetasche genau an der Dimerisierungsschnittstelle befindet, wird sie im dimeren Zustand durch das entgegengesetzte Protomer verdeckt [20–26]. Diese Dimerisierung wird durch das Binden von Vorstufenprotein zerstört [27]. In [28] konnte gezeigt werden, dass der Proteinimport mit einer geringeren Effizienz stattfindet, wenn für den Import Toc34 Mutanten verwendet werden, die eine geringere Affinität für Homodimerisierung aufweisen. Zusätzlich kann der Toc34 eine heterodimere Struktur zusammen mit der GTPase Toc159 einnehmen [29, 30]. In der Tat wird vermutet, dass genau dieser Heterodimer die gesuchte GTPase aktivierende Stimulanz im GTPase Zyklus des TOC ist [31]. Aufgrund der bemerkenswert hohen Ähnlichkeit der G-Domänen [26] kann vermutet werden, dass die Konformation des Heterodimers mit der des Homodimers verglichen werden kann. Die funktionelle Bedeutung der Ausbildung eines Heterodimers in diesem GTPase Zyklus wird kontrovers diskutiert. Wie oben bereits angedeutet, könnte es sich um eine gegenseitige „GAP“-Funktion handeln, indem der Argininfinger des einen Protomers in das katalytische Zentrum des jeweils anderen reicht und zwar bis zur Position des β -Phosphats des Nukleotids [26]. Es wird spekuliert, dass die Argininfinger ähnlich wie beim Ras/Rho GTPase Zyklus als GAPs funktionieren [32]. Da keine erhöhte GTP-Hydrolyserate des Toc34 Homodimers gezeigt werden konnte, wird das Vorhandensein weiterer co-Regulatoren (GCRs) bzw. co-GAPs postuliert [21], welche das katalytische Zentrum so vervollständigen, dass sich ein Wassermolekül in der Art positionieren kann, dass ein nukleophiler Angriff am γ -Phosphat des GTPs zur Hydrolyse führt [25]. Ein Transitpeptid könnte ein solcher co-Regulator sein. Durch die Anwesenheit bzw. das Binden dieses Transitpeptids wird die Dimerisierung noch komplexer.

In dieser Arbeit soll mit Hilfe von Einzelmolekülfluoreszenzmessungen die Abhängigkeit der Ausbildung eines Homodimers in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand, der Anwesenheit von Transitpeptid und die Abfolge der Ereignisse im GTPase Zyklus untersucht werden. Abschließend wird die Einordnung des Toc34 in die Gruppe der GADs (GTPasen, die in Abhängigkeit vom gebundenen Nukleotid dimerisieren und dadurch aktiviert werden) nach [12] diskutiert werden.

Generell besteht ein großes Interesse daran, den Proteinimport in Plastiden zu verstehen, welche sich wie auch Chloroplasten durch Doppelmembranen auszeichnen. So befinden sich zum Beispiel in einigen Parasiten Apicoplasten, die wahrscheinlich Überreste eines Plastiden (ohne Photosynthese) sind. Bekannte Beispiele solcher intrazellulären Parasiten sind Plasmodium falciparum und Toxoplasma gondii, welche Malaria und Toxoplasmose verursachen. Das Verständnis des Stoffwechsels dieser Parasiten wäre ein großer Fortschritt in der Bekämpfung dieser Krankheiten. Die folgende Charakterisierung des GTPase Zyklus des Toc34 ist ein wichtiger Baustein, diesem Ziel näher zu kommen.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

Emittiert ein elektronisch angeregtes Atom oder Molekül Licht, so wird diese Emission allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Abhängig von der Art der Anregung unterteilt man diese zum Beispiel in Thermolumineszenz, Chemolumineszenz oder Photolumineszenz, welche in dieser Arbeit betrachtet wird. Die Emission selbst kann als Fluoreszenz oder Phosphoreszenz auftreten. Da sich der Großteil meiner Arbeit mit der Erzeugung und Messung von Fluoreszenzlicht beschäftigt, soll das erste Unterkapitel einen kurzen Überblick über die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenz geben.

Das zweite Unterkapitel beschäftigt sich mit der Theorie zur Fluoreszenzanisotropie. Mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropiemessungen können Aussagen über die Beweglichkeit von Fluorophoren gemacht werden. So lässt sich beispielsweise die Bindung von fluoreszenzmarkierten Liganden an Proteine zeigen, wenn dadurch ihre Beweglichkeit eingeschränkt wird. [33]

Schließlich wird im dritten Unterkapitel der Prozess des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) näher beleuchtet. Die Messung der Effizienz dieser Energieübertragung stellt ein Mittel zur Beobachtung von Abstandsänderungen dar. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da Abstandsänderungen im Bereich einiger weniger Nanometer beobachtet werden können, also gerade solchen Distanzen, die bei biomolekularen Prozessen auftreten und die mit herkömmlichen Mikroskopen nicht beobachtbar sind, da sie weit unterhalb der Abbeschen Auflösungsgrenze liegen [34].

2.1 Fluoreszenz

2.1.1 Energieübergänge im Molekül

Energieübergänge in einem Molekül lassen sich vereinfacht in einem Jablonski-Diagramm diskutieren [35]. Ein solches Diagramm ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Zu sehen sind die ersten drei Singulett-Zustände S_0 , S_1 und S_2 sowie die ersten beiden Triplett-Zustände T_1 und T_2 mit ihren jeweiligen Schwingungszuständen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Rotationszustände nicht eingezeichnet. Wird ein Molekül durch Absorption (A) eines Pho-

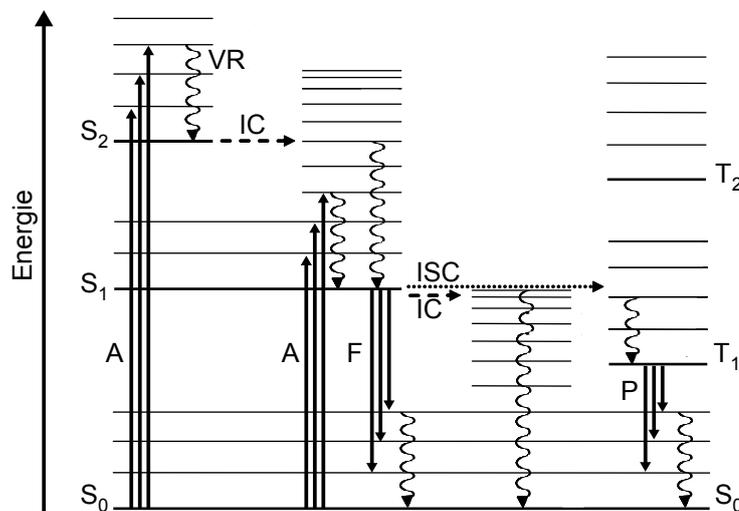


Abbildung 2.1 Jablonski Diagramm - Vertikale durchgezogene Pfeile: Strahlungsgekoppelte Übergänge zwischen verschiedenen Elektronenzuständen (Absorption A, Fluoreszenz F, Phosphoreszenz P); vertikal geschwängelte Pfeile: Vibrationsrelaxationen innerhalb desselben Elektronenzustands (VR); vertikale gestrichelte Pfeile: Isoenergetische strahlungslose Übergänge zwischen verschiedenen Elektronenzuständen (spinerlaubt: Internal conversion IC, spinverboten: Intersystem crossing ISC) nach [35].

tons elektronisch angeregt, so können die in Abbildung 2.1 dargestellten üblichen Folgeprozesse auftreten. Grundsätzlich lassen sich diese in strahlungslose und strahlungsgekoppelte Übergänge unterteilen. Zu den strahlungslosen Übergängen gehören: Vibrationsrelaxationen (VR) in die jeweiligen elektronischen Grundzustände und die isoenergetischen Übergänge Innere Umwandlungen (engl. internal conversion, IC) und Interkombination (engl. intersystem crossing, ISC). Beide beschreiben den Übergang zu einem hoch angeregten Schwingungszustand eines niedrigeren elektronischen Zustands, bei der IC bleibt die Multiplizität erhalten (spinerlaubter Übergang), wohingegen bei der ISC ein Multiplizitätswechsel stattfindet

(spinverbotener Übergang). Zu den strahlungsgekoppelten Übergängen gehören die Fluoreszenz (F) und die Phosphoreszenz (P). Fluoreszenz ist der (spinerlaubte) Übergang vom vibronischen Grundzustand des Singulett-Zustands S_1 in einen typischerweise höher angeregten Schwingungszustand des Singulett-Zustands S_0 . Phosphoreszenz ist der spinverbotene Übergang vom vibronischen Grundzustand des Triplett-Zustands T_1 in einen Schwingungszustand des Singulett-Zustands S_0 .

Die eigentliche Emission eines Photons findet sowohl bei der Fluoreszenz als auch bei der Phosphoreszenz innerhalb von 10^{-15} Sekunden statt, jedoch führen die unterschiedlichen Energieübergänge, die sich im Vorfeld beider Lumineszenzen ereignen, zu unterschiedlichen Verzögerungen. Diese beträgt für die Fluoreszenz etwa 10^{-8} Sekunden, das entspricht der mittleren Lebensdauer des vibronischen Grundzustands von S_1 . Bei der Phosphoreszenz ist diese Verzögerung zumeist erheblich größer und liegt typischerweise im Bereich von Millisekunden bis Sekunden, da der vorherige spinverbotene Energieübergang ISC etwa 10^6 mal unwahrscheinlicher ist als der sonst gleiche spinerlaubte Energieübergang IC. [35, 36]

2.1.2 Fluoreszenzfähige Moleküle - Fluorophore

Fluorophore sind typischerweise planare, polyaromatische Moleküle mit starren, konjugierten Doppelbindungen. Sie haben auf Grund ihrer Struktur nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten, Anregungsenergie in Schwingungsenergie umzuwandeln, was die Wahrscheinlichkeit für die Emission von Fluoreszenzlicht stark erhöht. Aufgrund der polyaromatischen Struktur wird die Energiedifferenz zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO) verringert, was zur Fluoreszenz im sichtbaren Bereich von 400 bis 700 nm führen kann. Die Fluorophore lassen sich charakterisieren durch ihre spektroskopischen Eigenschaften wie Absorptions- und Emissionsspektrum, ihre Quantenausbeute und Lebensdauer [37].

2.1.3 Absorption und Emission

Aus dem Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.1 wird ersichtlich, dass ein angeregtes Elektron auch strahlungslos durch Schwingungsrelaxation in niedrigere Energiezustände übergehen kann. Hieraus und aus der Energieerhaltung folgt, dass im Falle der Photolumineszenz das emittierte Licht eine Wellenlänge größer oder gleich der Wellenlänge des absorbierten Lichts besitzt. Dieser Zusammenhang wird als Stokessche Regel bezeichnet. Abbildung 2.2b zeigt

eine prinzipielle Gegenüberstellung von Absorptions- und Emissionsspektrum. Die Spiegelregel ergibt sich aus dem Franck-Condon Prinzip, welches besagt, dass beim Übergang in einen anderen Zustand solche Übergänge bevorzugt werden, bei denen die Vibrationswellenfunktionen den größten Überlapp aufweisen. Schematisch ist dies in Abbildung 2.2a dargestellt. Nur in Ausnahmefällen beobachtet man die Emission eines Photons, das kurzwelliger, also

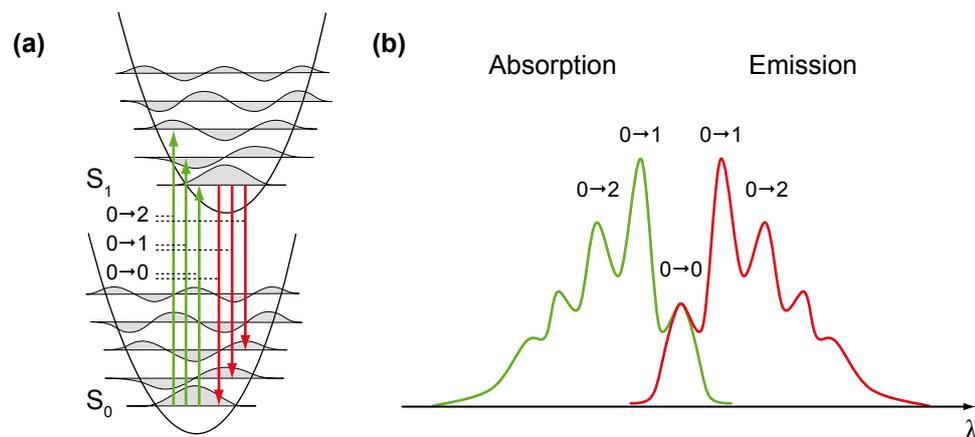


Abbildung 2.2 a) Schematische Darstellung von zwei elektronischen Zuständen. Grüne Pfeile stellen Absorptionsübergänge dar, rote Pfeile entsprechen möglichen Emissionsübergängen. Die Ziffern kennzeichnen den aus welchem vibronischen Zustand in welchen vibronischen Zustand das System übergeht. b) Prinzipielle Gegenüberstellung von Absorptions- und Emissionsspektrum zur Verdeutlichung der Stokes-Verschiebung des Emissionsspektrums zu größeren Wellenlängen und der Spiegelregel. Die Ziffern sollen den entsprechen Übergängen in a) entsprechen.

energiereicher ist, als das Photon, welches absorbiert wurde. Im Spektrum entspricht dies den sogenannten antistokeschen Linien. Die Zusatzenergie stammt entweder aus einem thermischen Energievorrat, das heißt, dass entsprechend der Boltzmann-Verteilung der besetzten Zustände Absorption aus höheren Schwingungsniveaus möglich ist, oder die vorangegangene Absorption des Photons löste einen Übergang höherer Energie aus, der sonst verboten gewesen wäre. Aufgrund der Boltzmann-Verteilung der Besetzung der Zustände verschmieren mit zunehmender Temperatur die einzelnen Fluoreszenzlinien zu einem kontinuierlichen Spektrum [36].

2.1.4 Quantenausbeute und Lebensdauer

Die Fluoreszenzquantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauer sind vielleicht die beiden bedeutendsten Kenngrößen eines Fluorophors [36]. Die Quantenausbeute

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.1)$$

beschreibt die Zahl der emittierten Photonen im Verhältnis zu den absorbierten Photonen mit Hilfe der Emissionsrate Γ und der Rate k_{nr} für alle strahlungslosen Übergänge in den Grundzustand S_0 .

Die Lebensdauer eines Fluorophors ist die mittlere Zeit τ , die dieses Molekül im angeregten Zustand verbleibt, bevor es in den Grundzustand S_0 zurückkehrt. Da dieser Übergang sowohl unter Emission eines Photons als auch strahlungslos stattfinden kann, ergibt sich für die Lebensdauer:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.2)$$

2.2 Fluoreszenzanisotropie

2.2.1 Definition der Anisotropie

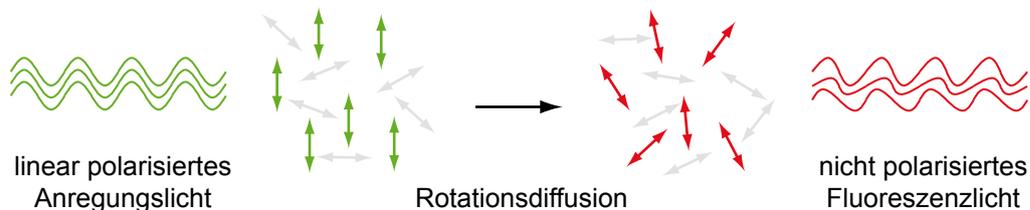


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Photoselektion.

Wird ein Ensemble von Fluorophoren, deren räumliche Orientierung statistisch verteilt ist, mit linear polarisiertem Licht angeregt, so werden aufgrund der Photoselektion hauptsächlich diejenigen Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmomente parallel zum Vektor des elektrischen Feldes stehen. Abhängig von der Rotationsdiffusionskonstante ändert sich die räumliche Orientierung der Moleküle während der Fluoreszenzlebensdauer, wodurch die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts beeinflusst wird, siehe hierzu Abbildung 2.3. Zur Beschreibung der Polarisationseffekte wird die Anisotropie r definiert. Sie gibt die Relation

zwischen der Differenz aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes und der Gesamtfluoreszenz an.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.3)$$

2.2.2 Theorie der Anisotropie

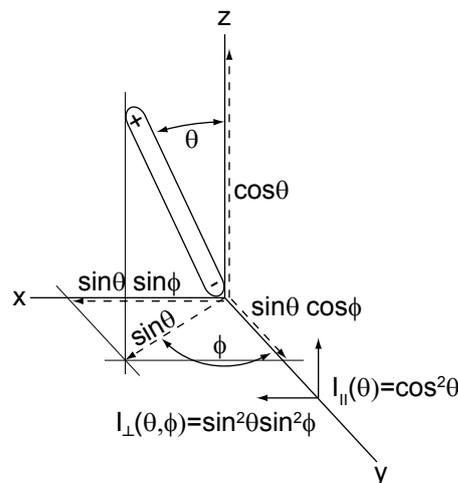


Abbildung 2.4 Emissionsintensitäten eines einzelnen Fluorophors in einem Koordinatensystem.

Zum Verständnis der Theorie zur Anisotropie betrachten wir zunächst ein einzelnes Molekül. Falls das Molekül keine Rotationsdiffusion erfährt, sind die Übergangsdipolmomente für die elektronischen Übergänge der Absorption und Fluoreszenz parallel zueinander angeordnet. Abbildung 2.4 zeigt die Orientierung eines solchen Fluorophors, vereinfacht dargestellt als elektrischen Dipol. Das Fluoreszenzlicht ist entlang des Übergangsdipolmomentes polarisiert. Des Weiteren ist die Fluoreszenzintensität proportional zum Quadrat seines elektrischen Feldvektors. Damit ergeben sich folgende Fluoreszenzintensitäten

$$I_{\parallel}(\theta) = \cos^2 \theta \quad (2.4)$$

und

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2 \theta \sin^2 \phi \quad (2.5)$$

parallel bzw. senkrecht zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes.

Ein Ensemble von Molekülen mit statistisch verteilter räumlicher Orientierung wird mit parallel zur z-Achse polarisiertem Licht angeregt (siehe Abbildung 2.4). Alle Moleküle, die den gleichen Winkel θ mit der z-Achse bilden, werden mit gleicher Wahrscheinlichkeit angeregt, das heißt die Besetzungswahrscheinlichkeit der angeregten Fluorophore ist rotationssymmetrisch um die z-Achse verteilt. Die ϕ -Abhängigkeit von I_{\perp} in Gleichung (2.5) entfällt somit und kann durch den Mittelwert $\langle \sin^2 \phi \rangle = \frac{1}{2}$ ersetzt werden. Mit Hilfe des Mittelwertes der Intensität $I_{\parallel}(\theta) = \langle \cos^2 \theta \rangle$ und der Gleichung $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$ erhält man aus Gleichung (2.3) die Anisotropie:

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2}. \quad (2.6)$$

Um den Mittelwert $\langle \cos^2 \theta \rangle$ zu bestimmen, müssen die Einflüsse der PhotoSelektion bei der Anregung und der Rotationsdiffusion zwischen Anregung und Fluoreszenz berücksichtigt werden. Betrachtet wird zunächst die PhotoSelektion. Die Wahrscheinlichkeit zur Absorption ist proportional zu $\cos^2 \theta$, wobei θ der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment und der z-Achse ist. Bei einer statistischen Verteilung der Orientierungen ist die Zahl der Moleküle mit einem Winkel zwischen θ und $\theta+d\theta$ proportional zur Größe einer Kugeloberfläche zwischen θ und $\theta+d\theta$, die wiederum proportional ist zu $\sin \theta d\theta$. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $f(\theta)$ für angeregte Moleküle kann also mit $f(\theta) d\theta = \cos^2 \theta \sin \theta d\theta$ beschrieben werden. Für den Mittelwert $\langle \cos^2 \theta \rangle$ ergibt sich damit ein Wert von $\frac{3}{5}$, mit dem mittels Gleichung (2.6) die maximal mögliche Anisotropie bestimmt werden kann.

$$r_{\max} = 0,4 = \frac{2}{5} \quad (2.7)$$

Unter Berücksichtigung der Rotationsdiffusion, also der Verkippung des Fluoreszenzdipolmoments gegenüber dem Absorptionsdipolmoment um den Winkel β wird die Anisotropie um einen weiteren Faktor verringert. Ähnlich zur Verringerung der Anisotropie um den Faktor $(3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1) / 2 = 2/5$ bei der Neigung des Dipols um den Winkel θ führt die durch Rotation verursachte Verkippung um den Winkel β zu einer Verringerung der Anisotropie um den Faktor $(3 \langle \cos^2 \beta \rangle - 1) / 2$. Für die Anisotropie r_0 , die in Abwesenheit aller anderen depolarisierenden Prozesse beobachtet wird, ergibt sich also:

$$r_0 = \frac{2}{5} \frac{3 \langle \cos^2 \beta \rangle - 1}{2} \quad (2.8)$$

Die Anisotropie kann also keinen Wert $> 0,4$ erreichen! [36]

2.3 Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET)

2.3.1 Theorie zum FRET

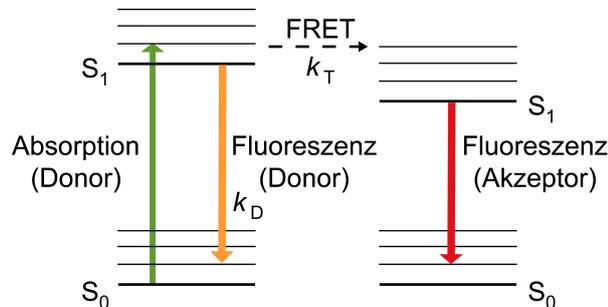


Abbildung 2.5 Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor; Fluorophor D absorbiert die Energie des einfallenden Lichtes (grün). Dieser kann die Energie entweder durch Emission von Fluoreszenzlicht abgeben (orange) oder durch Resonanzenergietransfer (schwarz, gestrichelt) auf Fluorophor A übertragen, was dann zur Emission von zu meist langwelligerer Fluoreszenz (rot) führen kann. Strahlungslose Deaktivierungsprozesse sind nicht eingezeichnet.

Der Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET), der zu Ehren seines Entdeckers Theodor Förster auch Förster Resonanzenergietransfer genannt wird, ist ein physikalischer Prozess der Energieübertragung zwischen zwei Fluorophoren [38, 39]. Wie in Abbildung 2.5 gezeigt, befindet sich ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül (im Folgenden Donor genannt) zunächst im angeregten Zustand (z.B. nach Absorption eines Photons). Anstelle der Emission eines Fluoreszenzphotons kann der Donor in den Grundzustand relaxieren, wenn er seine Energie strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkung an ein anderes Fluoreszenzfarbstoffmolekül (im Folgenden Akzeptor genannt) überträgt, welcher sich dann im angeregten Zustand befindet. Der Energietransfer kann also als zusätzlicher Deaktivierungsprozess des angeregten Donorzustandes betrachtet werden. Die FRET-Effizienz

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_f + k_{nr}} = \frac{k_T}{k_T + k_D} \quad (2.9)$$

ist definiert als das Verhältnis aus der Energietransferrate k_T und der Summe aus der Energietransferrate selbst, der Rate für die Donorfluoreszenz k_f und der Rate k_{nr} aller Übergänge, über die der angeregter Donor strahlungslos in seinen Grundzustand zurückkehren kann. Theodor Förster hat 1946 als erster die Energietransferrate mit Hilfe der klassischen Physik hergeleitet.

Hierbei betrachtete er die Fluorophore als Hertzsche Dipole, die über eine Entfernung R miteinander wechselwirken und konnte damit eine richtige Voraussage für die Abstandsabhängigkeit der Transferrate treffen. Nur zwei Jahre später veröffentlichte er eine quantenmechanische Herleitung, die zu der selben Abstandsabhängigkeit führte:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R}{R_0} \right)^6 \quad (2.10)$$

mit der Fluoreszenzlebensdauer τ_D des Donors, dem Abstand R und dem Försterradius R_0 . Durch Einsetzen von Gleichung (2.10) in Gleichung (2.9) ergibt sich die Transfereffizienz:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6}. \quad (2.11)$$

Der Försterradius entspricht genau dem Abstand, bei dem 50% der Energie auf den Akzeptor übertragen wird. Er liegt typischerweise im Bereich von 2 bis 6nm [36]. In Abbildung 2.6a ist die FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Abstand R dargestellt. Gerade im Bereich um den Försterradius führen Abstandsänderungen zu signifikanten Änderungen der FRET-Effizienz, da hier $E(R)$ die größte absolute Steigung aufweist. Der Försterradius

$$R_0^6 = \left(8.79 \times 10^{25} \right) \kappa^2 n^{-4} Q_D J_{DA} \quad (2.12)$$

mit dem Orientierungsfaktor κ^2 (siehe unten), dem Brechungsindex n , der Quantenausbeute Q_D des Donors und dem Überlappintegral J_{DA} , hängt von den spezifischen Eigenschaften der Farbstoffe und der Orientierung zueinander ab.

Abbildung 2.6b erklärt, das es einen spektralen Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors geben muss, damit der Resonanzenergietransfer stattfinden kann. Das Überlappintegral

$$J_{DA} = \int_0^\infty f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.13)$$

mit dem molaren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors $\epsilon_A(\lambda)$ und dem auf eins normierten Emissionsspektrum des Donors, beschreibt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass Donor und Akzeptor in Resonanz treten. Alle Parameter, die in Gleichung (2.12) verwendet werden, sind

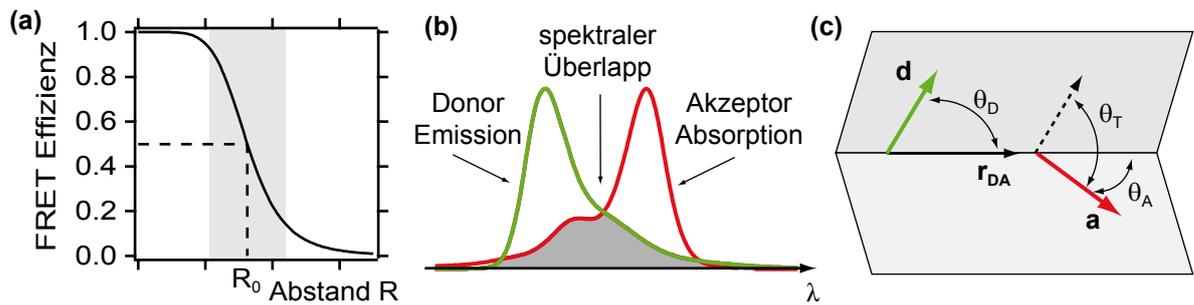


Abbildung 2.6 a) Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand R ; Försterradius R_0 , bei dem eine Effizienz von 50% erreicht wird. Die grau hinterlegte Fläche kennzeichnet den auf Abstandsänderungen sensitivsten Bereich. b) Beispiel eines spektralen Überlapps (grau hinterlegte Fläche) eines Donor-Emissionsspektrums (grün) und eines Akzeptor-Absorptionsspektrums (rot) c) schematische Darstellung der Orientierung der Übergangsdipolmomente \mathbf{d} (Donor) und \mathbf{a} (Akzeptor), dem normierten Verbindungsvektor \mathbf{r}_{DA} und den Winkeln θ_D , θ_A und θ_T zwischen diesen Vektoren.

experimentell zugänglich, abgesehen vom Orientierungsfaktor

$$\kappa^2 = [\mathbf{d} \cdot \mathbf{a} - 3(\mathbf{d} \cdot \mathbf{r}_{DA})(\mathbf{a} \cdot \mathbf{r}_{DA})]^2 \quad (2.14)$$

oder äquivalent

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (2.15)$$

mit den Übergangsdipolmomenten \mathbf{d} und \mathbf{a} des Donors bzw. Akzeptors, dem normierten Vektor \mathbf{r}_{DA} , der die Dipole miteinander verbindet, dem Winkel θ_T zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten und den Winkeln θ_D und θ_A , welche sich zwischen dem Übergangsdipolmoment des jeweiligen Dipols und dem Verbindungsvektor \mathbf{r}_{DA} befinden. Abhängig von der jeweiligen Orientierung der Dipole zueinander kann κ^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Ein Wert von 0 wird erreicht, wenn beide Übergangsdipolmomente senkrecht zueinander liegen. Der Maximalwert 4 entspricht dem Fall, dass sowohl die Dipolmomente als auch der Verbindungsvektor auf einer Geraden liegen. Und ein Wert von 1 wird erreicht, bei parallelen Dipolmomenten, die jedoch einen Winkel größer Null mit dem Verbindungsvektor bilden. Bei frei beweglichen Fluorophoren führt eine statistische Mittelung über alle möglichen Orientierungen zu $\kappa^2 = 2/3$.

2.3.2 Theorie zur Bestimmung der FRET-Effizienz aus Messdaten

Experimentell zugängliche Größen zur Bestimmung der FRET-Effizienz sind sowohl Fluoreszenzintensitäten als auch Fluoreszenzlebensdauern. Um nun anhand dieser Daten die FRET-Effizienz bestimmen zu können, betrachten wir zunächst die Rate des Energietransfers k_t indem wir die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit eines Akzeptors $\tau_{DA} = 1/(k_f + k_{nr} + k_t)$ mit der Lebensdauer in Abwesenheit eines Akzeptors $\tau_D = 1/(k_f + k_{nr})$ vergleichen.¹

$$k_t = \frac{1}{\tau_{DA}} - \frac{1}{\tau_D} \quad (2.16)$$

Zusammen mit Gleichung (2.9) lautet die Effizienz des Energietransfers :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}. \quad (2.17)$$

Das bedeutet, dass durch die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors einmal in Anwesenheit (τ_{DA}) und einmal in Abwesenheit des Akzeptors (τ_D), die FRET-Effizienz E bestimmt werden kann. Desweiteren ist es möglich, diese Effizienz über gemessene Fluoreszenzintensitäten zu bestimmen. Die gesamte Fluoreszenzintensität I_x , die über die Zeit gemessen wird, entspricht der Fläche unter der Fluoreszenzabklingkurve

$$I_x = \int_0^{\infty} I_x^0 \exp(-t/\tau) \cdot dt = I_x^0 \tau \quad (2.18)$$

und ist deshalb direkt proportional zur Fluoreszenzlebensdauer τ und der Amplitude I_x^0 . Gleichung (2.17) kann daher umgeformt werden zu:

$$E = 1 - \frac{I_{DA}/I_{DA}^0}{I_D/I_D^0} \quad (2.19)$$

Unter der Voraussetzung, dass die Größen I_{DA}^0 und I_D^0 während der Messung als konstant betrachtet werden können, ergibt sich die vereinfachte Form:

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = \frac{I_D - I_{DA}}{I_D} \quad (2.20)$$

¹Es ist anzumerken, dass k_f und alle anderen Raten k_i unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Akzeptors sind, da der Energietransfer lediglich einen weiteren Deaktivierungskanal des angeregten Donorzustandes darstellt [40]

mit den Fluoreszenzintensitäten I_{DA} bzw. I_D in An- bzw. Abwesenheit des Akzeptorfarbstoffes. Bei Messungen an Molekülen, die sowohl mit einem Donor als auch mit einem Akzeptor markiert sind, ist eine weitere Modifizierung der Gleichung (2.20) nötig. Hierfür ist es allerdings unabdingbar, dass die Fluoreszenz beider Farbstoffe getrennt voneinander detektiert werden kann. Betrachten wir den Summanden $I_D - I_{DA}$ im Zähler der Gleichung (2.20) so entspricht dieser genau dem Verlust an Fluoreszenz, der durch die Anwesenheit des Akzeptors auf diesen übertragen wurde. Der Nenner hingegen entspricht der Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors. Folgende modifizierte Gleichung trägt dem Rechnung:

$$E = \frac{I_{AD}}{\gamma I_{DA} + I_{AD}}. \quad (2.21)$$

Hierbei ist I_{AD} (im Idealfall) die Akzeptorfluoreszenz bei Anwesenheit des Donors korrigiert um die direkte Anregung des Akzeptors und das Übersprechen der Donorfluoreszenz in den Akzeptordetektionskanal. Der Korrekturfaktor γ berücksichtigt die Quantenausbeuten Q_{AD} des Akzeptors und $Q_{DA} \approx Q_D$ des Donors und die unterschiedlichen Kollektionseffizienzen η_D und η_A der Detektionskanäle der Donor- und Akzeptorfluoreszenz. Er ergibt sich zu:

$$\gamma = \frac{Q_{AD}\eta_A}{Q_D\eta_D} \quad (2.22)$$

Hierzu jedoch mehr in Kapitel 3.8.5. [41–44]

Kapitel 3

Material und Methoden

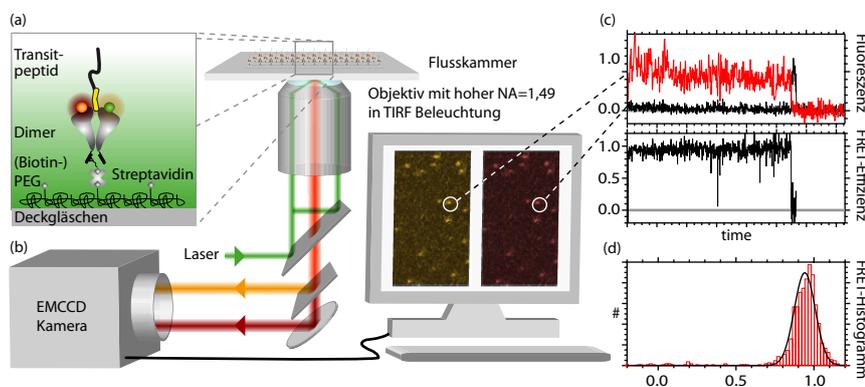


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Einzelmolekülversuchs. a) Immobilisierung des fluoreszenzmarkierten Proteins auf funktionalisierter Oberfläche; b) Fluoreszenzmessung an selbstgebaute Objective Type-TIRF Mikroskop; c) Detektion von Fluoreszenzintensitäten, gemessen über der Zeit; Zuordnung der Fluoreszenz zu jeweils einem Donor-Akzeptorpaar; d) Ermittlung der FRET-Effizienz anhand der gemessenen Daten.

In diesem Kapitel werden die Materialien und Methoden beschrieben, die im Verlauf dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Hierbei werden zunächst die Proteinkonstrukte beschrieben. Sowohl die Position der Fluoreszenzfarbstoffe an den hergestellten Konstrukten mit den anhand der Kristallstruktur erwarteten FRET-Effizienzen wird beschrieben als auch die Oberflächenimmobilisierung dieser Proteinkonstrukte, die für die in Abbildung 3.1 sehr vereinfacht dargestellten Einzelmolekülmessungen vonnöten ist (3.1a). Die biochemischen Methoden werden aufgeführt. Und schließlich werden die verschiedenen Messmethoden erklärt, wobei das selbstgebaute Einzelmolekülfluoreszenzmikroskop (3.1b,c) und die Auswertung der Daten (3.1d) hier im Fokus stehen sollen.

| Name | Abstände [Å] | farblich gekennzeichnet in |
|---------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| <i>psToc34_{SZ}</i> | 19 | grün |
| <i>psToc34_{SZ}D36C</i> | 88 | rot |
| <i>psToc34_{SZ}V78C</i> | 50 | blau |
| <i>psToc34_{SZ}V78C/R133A</i> | 50 | gelb |

Tabelle 3.1 Abstände der Cysteine der verschiedenen *psToc34_{SZ}* Dimere und deren farbliche Kennzeichnung aus Abbildung 3.2.

3.1 Cysteinmutanten

In Abbildung 3.2 ist die Kristallstruktur des *psToc34* in einer homodimeren Konformation gezeigt. Die grün markierten Aminosäuren kennzeichnen die Positionen des Cysteins 215 im Wildtyp. Für diese Arbeit wurden Cysteinmutanten hergestellt, um diese spezifisch fluoreszenzmarkieren zu können. Hierzu wird das nativ vorhandene Cystein durch ein Serin ersetzt und das in Abbildung 3.2 rot dargestellte Aspartat 36 bzw. das blau gekennzeichnete Valin 78 durch jeweils ein Cystein ersetzt. Von der V78C Mutante wird außerdem eine Argininfingermutante hergestellt, bei der Arginin 133, welches gelb gekennzeichnet ist, durch Valin ausgetauscht wurde. Da in dieser Arbeit das Dimerisierungsverhalten des Toc34 untersucht werden soll, für *psToc34* jedoch eine Dissoziationskonstante von 50 μM gefunden wurde [25], was für Einzelmolekülmessungen etwa 6 Größenordnungen zu hoch ist, wurden alle genannten Mutanten mit einem „Spacer-Zipper“ Konstrukt in räumliche Nähe gebracht. Die Aminosäuresequenz des Spacers beträgt: RAGETVKAEEQINMEDLMEA die des Zippers: QLQKAEWKRRYEKEKEKNARLKGKVEKLEIELARWRQ. Hierbei handelt es sich um die Sequenz der Halssuperhelix des Kinesins der *Drosophila melanogaster* Fruchtfliege [45, 46], welche unter den gegebenen Messbedingungen (Raumtemperatur) eine stabile Superhelix ausbildet [47]. Zusätzlich ist jeweils das GDP mit angegeben (violett dargestellt), um zu veranschaulichen, an welcher Position, bezüglich der Dimerisierungsschnittstelle die Nukleotidbindung stattfindet. Die hergestellten Mutanten sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

3.1.1 Lokale Proteinkonzentration des „Spacer-Zipper“ Konstrukts

Zur Abschätzung der lokalen Konzentration der *psToc34_{SZ}* wird das maximale Kugelvolumen bestimmt, in dem sich die beiden Protomere befinden können. Der Radius dieser Kugel

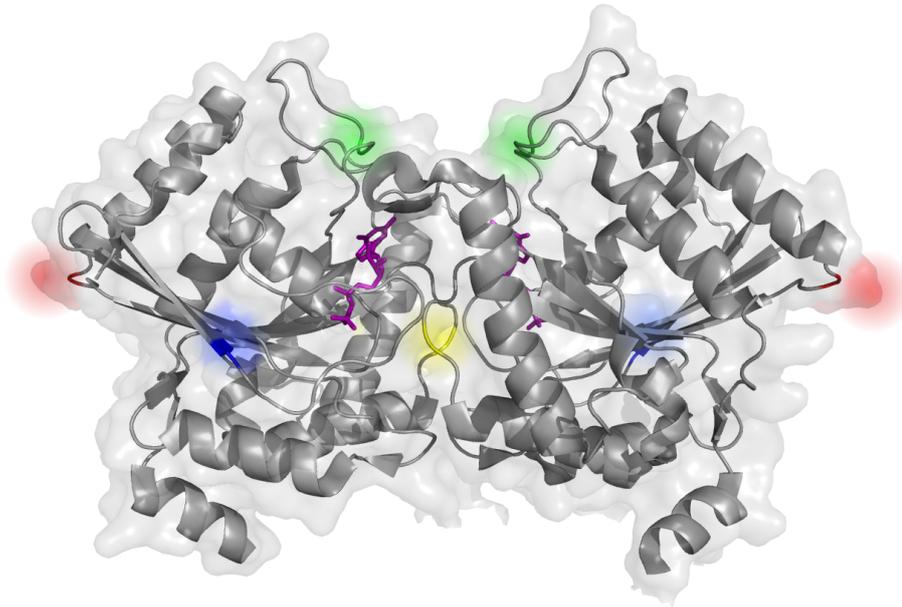


Abbildung 3.2 Kristallstruktur des Toc34 Dimers; gekennzeichnet sind: Die Positionen des nativen Cysteins 215 (grün) und die Positionen von Aspartat 36 (rot) bzw. Valin 78 (blau), welche jeweils durch ein Cystein ersetzt wurden; die Position des Arginins 133 (Gelb) im Argininfinger, welches durch Valin ersetzt wird; das Nukleotid GDP (violett), welches in der Kristallstruktur an der gezeigten Position gefunden wurde.

ergibt sich aus der Länge des langgestreckten 20 Aminosäure langen „Spacers“ und dem Abstand des N-terminalen Alanins zur am weitesten entfernten Aminosäure Aspartat 219 des *ps*Toc34. Mit einer Länge von 0,365 nm pro Aminosäure [48] und dem aus der Kristallstruktur ermittelten Aminosäureabstand von 5,45 nm ergibt sich ein größtmöglicher Kugelradius von $r_{\max} = 12,7$ nm mit einem größtmöglichen Volumen von $V_{\max} = 8,58 \cdot 10^{-24}$ l, welches beide Protomere einnehmen können. Die minimale molare Konzentration beträgt damit $c_{\min} = 388$ μM , die lokale Proteinkonzentration liegt somit stets über der Dissoziationskonstante von $K_D = 50$ μM des GDP gebundenen *ps*Toc34 Dimers ohne „Zipper“.

3.2 Farbstoffe

Die zumeist verwendeten Farbstoffen sind ATTO 550 und ATTO 647N (beides ATTO-Tec GmbH Siegen, Deutschland). Es handelt sich bei den Farbstoffen um Rhodaminderivate mit einer Maleimid-Gruppe, welche über eine Schwefelbrücke an das Cystein der jeweiligen Proteinmutante binden können. Der Försterradius zwischen diesen beiden Fluorophoren beträgt

| | ATTO 550 | ATTO 647N |
|---|----------|-----------|
| Absorptionsmaximum [nm] | 554 | 644 |
| Emissionsmaximum [nm] | 576 | 669 |
| max. Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$] | 120000 | 150000 |
| Quanteneffizienz | 0,80 | 0,65 |
| Fluoreszenzlebensdauer [s^{-1}] | 3,2 | 4,3 |

Tabelle 3.2 Spektrale Eigenschaften der in der Arbeit verwendeten Fluorophore. Die angegebenen Werte beziehen sich auf das in Wasser gelöste freie Fluorophor.

6,5 nm, womit sich die in Abbildung 3.3 gezeigte Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz ergibt. Zusätzlich sind noch die Abstände zwischen den Cysteinen der jeweiligen Mutante eingetragen, welche sich aus der Kristallstruktur ablesen lassen.

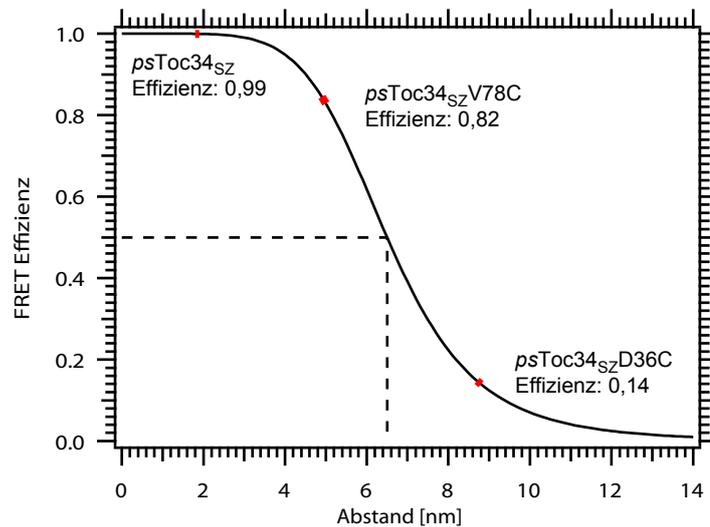


Abbildung 3.3 Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz für das Farbstoffpaar ATTO 550 (Donor) und ATTO 647N (Akzeptor) mit einem Försterradius bei 6,5 nm, bei dem 50% der Anregungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird. Die Abstände zwischen den Cysteinen (welche sich aus der Kristallstruktur ablesen lassen) der jeweiligen Mutante sind bei der jeweiligen FRET-Effizienz markiert.

3.3 Transitpeptid

Bei dem verwendeten Transitpeptid handelt es sich um eine C-terminale Teilsequenz des Proteins pSSU aus *Nicotiana tabacum* mit folgender Aminosäuresequenz:

VAPFTGLKSAAS(p)FPVSRKQNLDTSC. Serin 12 liegt hierbei phosphoryliert (p) vor und N-terminal ist ein Cystein (C) hinzugefügt, an welchem das Transitpeptid mit Maleimid Farbstoffen markiert werden kann.

3.4 Aluminiumfluorid

In Abbildung 3.4 ist schematisch dargestellt, wie Aluminiumfluorid als Imitat für die Phosphatgruppe des GTP's im Übergangszustand der Hydrolyse gesehen werden kann [49, 50]. Zunächst ist in a) der Übergangszustand während der Phosphoryl-Transferreaktion verdeutlicht, bei dem es sich um eine nukleophile Substitution zweiter Art handelt. Die gestrichelten Linien sollen verdeutlichen, dass es sich hierbei um Bindungen während des Übergangszustandes handelt. Dieser Zustand kann imitiert werden durch b) Aluminiumtetrafluorid und oder c) Aluminiumtrifluorid.

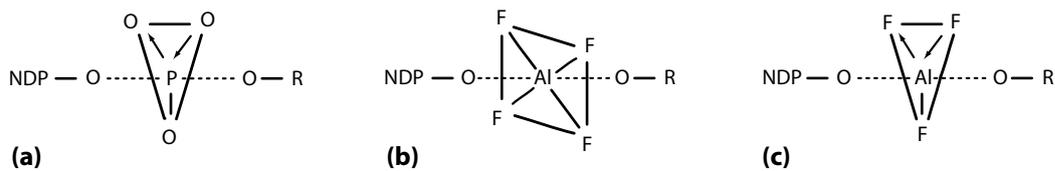


Abbildung 3.4 $\text{GDP} \bullet \text{AlF}_x$ imitiert Phosphatgruppe im Übergangszustand. Schematische Darstellung von a) Übergangszustand während der Phosphoryl-Transferreaktion, welche imitiert wird durch (b) Aluminiumtetrafluorid und (c) Aluminiumtrifluorid. Gestrichelte Linien kennzeichnen, dass es sich um eine Bindung während des Übergangszustandes handelt. Ladungsverteilungen sind nicht mit eingezeichnet. NDP... Nucleotiddiphosphat; R... organischer Rest; nach [49].

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Verwendete Puffer

Waschpuffer pH 8,0

10 mM Imidazol

50 mM Tris

300 mM NaCl

10 mM L-Arginin

1 mM MgCl_2

5% Glycerol

Elutionspuffer pH 8,0

500 mM Imidazol

20 mM Tris pH 8,5

50 mM NaCl

10 mM L-Arginin

1 mM MgCl₂

5% Glycerol

M-Puffer pH 7,5

20 mM Tris pH 8,5

150 mM NaCl

3 mM MgCl₂

3.5.2 Expression und Zellaufschluss

Die Expression des Toc34 beginnt mit dem Animpfen einer Übernachtskultur. Hierzu werden circa 40 ml LB₀-Medium in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit 50 µg/ml Carbenizillin versetzt und dies mit einem Teil einer 20% glycerinhaltigen Bakterienkultur angeimpft, welche bei –80°C gelagert ist. Anschließend wird der Kolben bei 37°C und 180 rpm über Nacht geschüttelt. Am Folgetag werden 500 ml LB₀-Medium mit 25 µg/ml Carbenizillin versetzt und in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Dieses wird mit 20 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm solange geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht ist (UV-Vis Spektrometer: Live Science UV/VIS Spectrophotometer DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornien USA). Nun wird die Expression durch Zugabe von 500 µl 1M IPTG induziert. Nach weiteren vier Stunden erfolgt das Ernten der Bakterien, wofür die Bakterienkultur für 20 min bei 4600 rpm mit maximaler Beschleunigung und bei 4°C zentrifugiert wird (Hettich Rotanta 460R, GMI, Ramsey, Minnesota USA). Der Überstand wird entsorgt und das Pellet in insgesamt 20 ml Waschpuffer resuspendiert. Diese Lösung kann bei –20°C gelagert werden. Die Zellen im gekühlten Zellpellet werden mittels einer French Press (Thermo IEC, er Scientific Company L.L.C. USA) bei einem Druck von 1200 bar aufgeschlossen

3.5.3 Proteinaufreinigung

Für die Proteinaufreinigung müssen die restlichen Zellbestandteile von der Proteinlösung abgetrennt werden. Dies geschieht zunächst durch 35 minütige Zentrifugation (Avanti J-E, Rotor JA17, Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornien USA) bei 17000 rpm und 4°C. Der Überstand enthält die exprimierten Proteine. Ein weiterer Aufreinigungsschritt erfolgt über die Ni-NTA Säule (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Fairfield, Connecticut USA), welche zuvor über folgendes Schema regeneriert wurde:

- 6 Säulenvolumen (SV) ddH₂O
- 2 SV Ni-NTA Säulenreiniger
- 2 SV 0,5 M EDTA
- 2 SV ddH₂O
- 2 SV 0,1 M NaOH
- 6 SV ddH₂O
- 2 SV 100 mM NiCl₃
- 1 SV ddH₂O
- 4 SV Waschpuffer

Der Überstand wird nach dem Regenerieren der Ni-NTA Säule über einen Filter (Filtropur S 0.2, Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) aufgebracht. Nachdem die beladene Säule mit 20 SV Waschpuffer gewaschen wird, werden sechs Elutionen mit Hilfe des Elutionspuffers entnommen. Dabei umfassten die Elutionen 1 bis 4 jeweils 0,5 ml und die Elutionen 5 und 6 jeweils 1,0 ml. Da Toc34 temperatursensibel ist, wird es während der weiteren Handhabung stets auf Eis gelagert. Zumeist enthielt Elution 3 die höchste Proteinkonzentration.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von Protein oder Farbstoff wird das NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA) verwendet, wofür jeweils 2 µl der Lösung gebraucht wurden. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten der Fluorophore laut Hersteller sind in Tabelle 3.2 beschrieben und die der Proteine stehen in Tabelle 3.3 aufgelistet, die Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm berechnen sich

| | Extinktionskoeffizienten bei 280 nm |
|------------------|--|
| <i>ps</i> Toc34 | 34950 M ⁻¹ cm ⁻¹ |
| <i>ps</i> Toc159 | 21555 M ⁻¹ cm ⁻¹ |
| GDP | 7705 M ⁻¹ cm ⁻¹ |

Tabelle 3.3 Extinktionskoeffizienten von Toc34, Toc159 und GDP.

nach

$$\epsilon_{\text{Protein}} = N_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + N_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + N_{\text{Cys}} \cdot \epsilon_{\text{Cys}} \quad (3.1)$$

mit N_x der Anzahl der Aminosäuren Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Cystein (Cys) und ihren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{Tyr}} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Trp}} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{Cys}} = 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [51].

3.5.5 Fluoreszenzmarkieren der Proteine

Die beiden verwendeten ATTO Farbstoffe werden in M-Puffer gelöst und nicht wie im üblichen Protokoll in DMSO, da festgestellt wurde, dass Toc34 in Anwesenheit von DMSO zur Aggregation neigt. Des weiteren wird ein Protein zu Fluorophor Verhältnis von 1:1 gewählt, da auch das Abtrennen des freien Fluorophors vom fluoreszenzmarkierten Protein mit einem hohen Proteinverlust verbunden war, der durch Aggregation des Proteins hervorgerufen wurde. Die Inkubation erfolgte über eine Zeit von 90 Minuten im Dunkeln auf Eis.

3.5.6 Oberflächenimmobilisierung

Um die einzelnen *ps*Toc34-Moleküle beobachten zu können, mussten diese an einer funktionalisierten Oberfläche fixiert werden. Die Funktionalisierung selbst ist in Unterkapitel 3.6.4 beschrieben, hier soll es lediglich um die Immobilisierung der Proteine gehen. Dies geschah mit Hilfe der Biotin-Streptavidin-Bindung, bei der es sich um die stärkste bekannte nicht-kovalente chemische Bindung handelt [52] und die sich in Einzelmolekülmessungen etabliert hat [53–55]. Wie in Abbildung 3.5 illustriert, bindet dieses tetramere Streptavidin (Iba GmbH, Göttingen), welches vier Bindetaschen für Biotin besitzt, zunächst an das auf der funktionalisierten Oberfläche befindliche Biotin-Peg. An dieses gebundene Streptavidin wird nun ein Biotin-X NTA (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) gebunden („X“ steht hierbei für einen 5-Aminopentansäure-Linker) welches zusammen mit Nickel und dem His-Tag

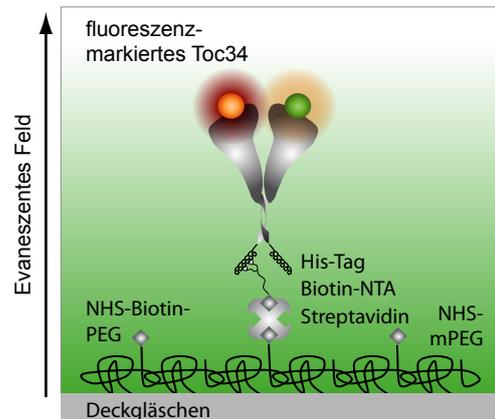


Abbildung 3.5 Illustration der Oberflächenimmobilisierung. An das PEG-Biotin der funktionalisierten Oberfläche kann Streptavidin binden und an dieses bindet Biotin-X NTA. Zusammen mit Nickel und dem His-Tag des Proteins bildet sich ein stabiler Chelatkomplex.

des Proteins einen stabilen Chelatkomplex bildet [56]. Nun ist das Protein startklar für die Messungen.

3.6 Herstellen der Flusskammern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Flusskammern benötigt, welche auf die in diesem Unterkapitel beschriebene Art hergestellt wurden.

3.6.1 Zuschneiden von Deckgläschen und Nescofilm

In das untere Deckgläschen (0,17 mm Stärke, 24×60 mm; Roth, Karlsruhe, Deutschland) müssen für die Verwendung als Teil einer Flusskammer zwei Löcher geschnitten werden. Das Zuschneiden erfolgt mit dem Lasercutter Speedy 100 (Trotec, München, Deutschland) nach der in Abbildung 3.6 schwarz dargestellten Vorlage. Desweiteren wird unten links eine leichte Markierung in die Deckgläschen geritzt, um die später funktionalisierte Seite identifizieren zu können. Das Zuschneiden des Nescofilms (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wird identisch durchgeführt, jedoch wird hier das in Abbildung 3.6 rot illustrierte Schnittmuster verwendet.

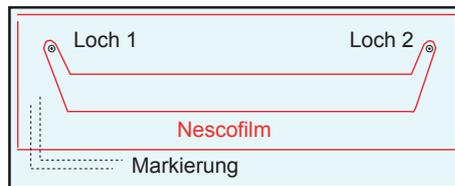


Abbildung 3.6 Illustration der mit dem Lasercutter geschnittenen Deckgläschen (schwarz) und einer aufgetragenen Nescofilmschicht (rot), welche ebenfalls zurechtgeschnitten wird.

3.6.2 Reinigung der Deckgläschen

Nachdem die Deckgläschen mit dem Lasercutter präpariert wurden, müssen sie noch gereinigt werden. Hierzu wird zunächst eine Reinigung mit Hilfe einer Piraña Lösung durchgeführt. Hierbei bildet sich Peroxomonoschwefelsäure, welche organische Verbindungen hauptsächlich zu Kohlenstoffdioxid und Wasser oxidiert: $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HSO}_3(\text{OOH}) + \text{H}_2\text{O}$. Bei der Reinigung wird folgendermaßen vorgegangen: Die Deckgläschen werden im Ultraschallbad in 2% Hellmanexlösung 10 min gewaschen, mit ddH₂O abgespült und zweimal in ddH₂O für 10 min gewaschen im Ultraschallbad. Dann werden die Deckgläschen für 2 Stunden bei 60°C (im Wärmebad) in Pirañalösung gereinigt (Piraña: 1 Teil H₂O₂ (50 ml, 30%ig) 3 Teile (150 ml) H₂SO₄, beides Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), wobei hier darauf zu achten ist, das Staining Jar zuvor auf 60°C zu temperieren, damit kein Glasbruch entsteht, aufgrund der sehr hohen Temperatur, die aufgrund der exothermen Reaktion bei der Bildung von Peroxomonoschwefelsäure entsteht. Anschließend werden die Deckgläschen mit ddH₂O gespült und im Ultraschallbad einmal in 2% Hellmanex 10 min gewaschen. Während des gesamten Umgangs mit Piraña ist auf das Tragen von Schutzkleidung und einer Schutzbrille zu achten gewesen.

Nach diesem Schritt erfolgt die Reinigung mittels RCA. Da Wasserstoffperoxid (Bestandteil dieser Lösung) stark oxidierend wirkt, beginnen Glasoberfläche und darauf befindliche Partikel zu oxidieren, das führt dazu, dass die Adhäsionskräfte zwischen Partikel und Glasoberfläche abnehmen und sich die Partikel dadurch lösen können. Das Ammoniumhydroxid ätzt die Glasoberfläche an und unterätzt somit die Partikel. Ebenso entsteht durch die Hydroxidionen eine negative Ladung der Glasoberfläche und der Partikel, was eine Abstoßung vorhandener Partikel bewirkt und zugleich einer erneuten Anlagerung der Partikel vorbeugt. Das Protokoll für diesen Reinigungsschritt lautet folgendermaßen: Die Deckgläschen im Ultraschallbad zweimal in 2% Hellmanex 10 min waschen (dieser Schritt kann eingespart werden, wenn die

Knabberwasser-Reinigung erst kurz zuvor beendet wurde) und zwischendurch mit ddH₂O spülen. Deckgläschen im Ultraschallbad zweimal in ddH₂O 10 min waschen und anschließend für 2 h bei 60°C (im Wärmebad) in RCA-Lösung reinigen (RCA: 1 Teil H₂O₂ (30 ml, 30%ig): 5 Teile ddH₂O (150ml) : 1 Teil NH₃ (30ml, 33% puriss.), beides Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Deckgläschen mit ddH₂O spülen und anschließend im Ultraschallbad in ddH₂O je 10 min waschen. Deckgläschen ddH₂O spülen und in ddH₂O über Nacht lagern. Anschließend folgt die Funktionalisierung.

3.6.3 Silanisierung der Oberflächen

Die gereinigten Deckgläschen werden erneut zweimal für je 10 min. in ddH₂O beschallt und zwischendurch mit ddH₂O gespült. Die nun gereinigten Deckgläschen werden mit Stickstoff aus einer Gasflasche getrocknet, bis sowohl die Deckgläschen selbst, als auch der Teflonhalter und das Stainig Jar vollständig getrocknet sind, denn je weniger Wasser während der Aminosilanisierung in der Umgebung der Deckgläschen ist, desto effektiver ist die Silanisierung. Die nun trockenen Deckgläschen werden zuerst 5 min in sauberem HPLC-Aceton (Sigma Aldrich, Taufkirchen) inkubiert und dann in eine Lösung von 200 ml HPLC-Aceton mit 1 ml Vectabond (Axxora, Lörrach) transferiert. Die Deckgläschen werden 10 min darin gebadet was zur Aminosilanisierung der Oberfläche führt, wodurch ein späteres Anbinden von NHS-PEG (N-Hydroxy-Succinimidyl-Polyethylenglycolester; Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland) ermöglicht wird. Anschließend werden die Deckgläschen einzeln in einem Becherglas mit 500 ml ddH₂O mit Hilfe einer Pinzette ausgeschwenkt, wobei das Wasser nach jedem zweiten Deckgläschen gewechselt wird. Hierbei wird das ungebundene Vectabond abgespült und zusätzlich kann die Hydrophobizität getestet werden. Anschließend folgt die Funktionalisierung.

3.6.4 Funktionalisierung der Oberflächen

Für die Beschichtung mit NHS-PEG bzw. NHS-PEG-Biotin in einem molaren Verhältnis von 1:16 werden 80 mg von 5 kDa NHS-mPeg (N-Hydroxy-Succinimidyl-Methoxy-Polyethylenglycolester) mit 3 mg von 3 kDa NHS-Biotin-PEG (N-Hydroxy-Succinimidyl-Biotin-Polyethylenglycolester, beide Rapp-Polymere, Tübingen, Deutschland) in 600 µl 100 mM NaHCO₃ (ph 9,5) gelöst. Diese Lösung wird eine Minute bei höchster Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und dann werden circa 50 µl auf die zu beschichtende (mit Lasercutter markierte) Oberfläche aufgebracht und mit einem zusätzlichen Deckgläschen (Roth, Karls-

ruhe, Deutschland) abgedeckt. Die nun folgende Oberflächenfunktionalisierung findet unter Lichtabschluss für mindestens vier Stunden und bei hoher Luftfeuchtigkeit statt, um sowohl dem photoinduzierten Zerfall des PEG's als auch der Austrocknung entgegenzuwirken. Danach werden die oberen Deckgläschen entfernt und überschüssiges PEG durch Schwenken in ddH₂O abgewaschen. Hier empfiehlt es sich das Wasser nach jedem Deckgläschen zu wechseln. Auch hier werden 500 ml Bechergläser verwendet. Abschließend werden die funktionalisierten Deckgläschen mit Stickstoff trocken geblasen und im Staining Jar trocken, dunkel und kühl gelagert.

3.6.5 Zusammenbau der Flusskammer

Auf einem Stück Aluminiumfolie werden folgende Materialien in angegebener Reihenfolge übereinandergelegt: Unten liegt das funktionalisierte Deckgläschen, mit der beschichteten Seite nach oben ausgerichtet, hierauf wird die aus Nesco-Film (Carl Roth, Karlsruhe) mit einem Laser-Cutter (Speedy 100 von Trotec, München, Deutschland) geschnittene Flusskanalstruktur, welche in Abbildung 3.6 rot dargestellt ist passend auf die funktionalisierte Oberfläche gelegt und abschließend mit einem mit 2% Hellmanexlösung gereinigtem Deckglas abgedeckt. Damit ein abgedichteter Flusskanal entstehen kann, muss der Nescofilm über seine Schmelztemperatur gebracht werden. Dies wird mittels einer Heizplatte, die auf 80°C vorgeheizt wurde ermöglicht. Um ein gleichmäßiges Schmelzresultat zu erzielen, wird sowohl unter als auch über das Deckgläschen-Nescofilm-Deckgläschen Paket ein Objekträger gelegt, so dass nun beim Zusammendrücken dieses Pakets ein gleichmäßiger Druck entstehen kann. Nach circa zwei Minuten war die Kammer zusammengeschmolzen, was an dem Wandel des Aussehens des Nescofilms von milchig-trüb zu durchsichtig erkennbar war.

3.6.6 Flusskammer im Versuchsaufbau

Die hergestellten Flusskammern werden wie in Abbildung 3.7 gezeigt in den Versuchsaufbau eingebaut. Der eingezeichnete Probenhalter enthält zwei Bohrlöcher mit Gewinde für den Zu- und den Ablauf der Probenlösung. Die Flusskammer muss passend hierauf gesetzt werden. Die Verbindung der Flusskammer zum Probenvolumen und zum Ablauf wird realisiert durch einen PE-Mikro-Schlauch (Außendurchmesser: 0,96 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm) welcher durch einen Hohlgewindestift gefädelt wird und einem Tygon-Schlauch (Außendurchmesser 2,4 mm, Innendurchmesser: 0,8 mm) als Steckverbindung (beide Neolab, Heidelberg),

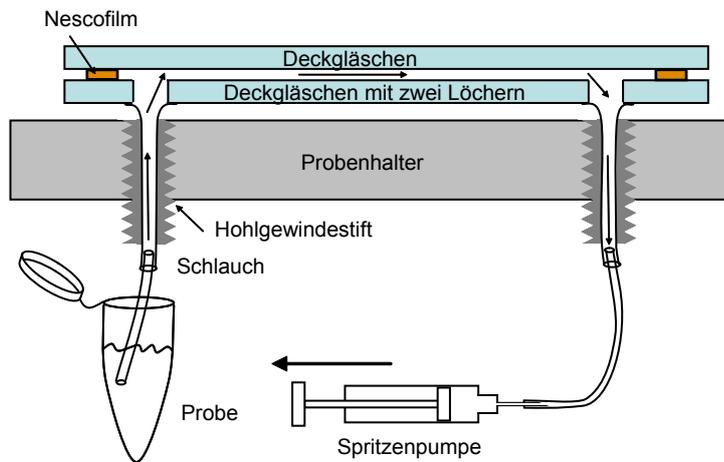


Abbildung 3.7 Illustration der Flusskammer im Versuchsaufbau.

was in Abbildung 3.7 illustriert ist. Die Probe selbst wird durch die Kammer gesogen, was durch die Spritzenpumpe PHD 2000 Advanced Syringe Pump (Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) erfolgt.

3.7 Fluoreszenzspektrometer

Die Fluoreszenz-Ensemblemessungen in dieser Arbeit werden am Fluoreszenzspektrometer FP-6500 durchgeführt (Jasco Deutschland GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland). Der Aufbau dieses Instruments ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.

Das emittierte Licht der 150 W Xenonlampe wird auf den Eintrittsschlitz des Anregungsmonochromators durch einen ellipsoiden Spiegel und einen Kugelspiegel gebündelt. Das Licht vom Eingangsschlitz wird vom Beugungsgitter gestreut und monochromatisches Licht tritt am Ausgangsschlitz des Anregungsmonochromators aus. Ein Teil des monochromatischen Lichtes wird zum Reverenz-Photomultiplier-Tube durch einen Strahlenteiler geführt, während das monochromatische Licht, das den Strahlenteiler durchlaufen hat, von einem Planspiegel und einem ellipsoiden Spiegel zum Probenvolumen geführt wird, wo es auf das Zentrum der Probenküvette trifft. Die Emission der Probe wird im rechten Winkel zur Anregung detektiert, der sogenannten L-Geometrie, um einen möglichst geringen Anteil an Streulicht zu bekommen, was im Gegensatz zur T-Geometrie steht, bei der auch das transmittierte Licht detektiert werden kann. Das Fluoreszenzlicht wird von einem ellipsoiden Spiegel und einem Planspiegel auf den Eintrittsschlitz des Emissionsmonochromators fokussiert. Der monochromatische Strahl

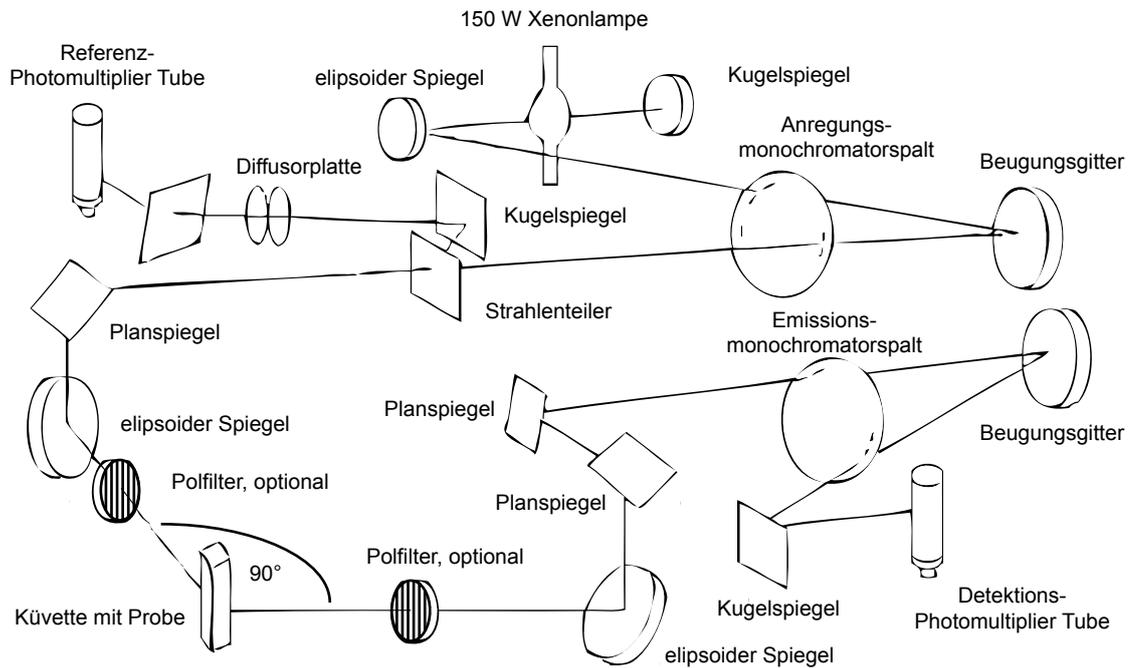


Abbildung 3.8 Schematischer Aufbau des Fluoreszenzspektrometers FP-6500 nach [57]; Anregungs- und Fluoreszenzlicht sind im rechten Winkel zueinander angeordnet. Das Fluoreszenzsignal setzt sich zusammen aus dem Signal des Detektions-Photomultipliers und dem des Referenz-PMT.

wird herausfiltriert und vom Beugungsgitter des Emmisionsmonochromators gestreut, nachdem es durch den Ausgangsschlitz auf die Photomultierröhre geführt wird. Für Anisotropiemessungen können in den Anregungs- und in den Detektionsstrahlengang Polarisationsfilter eingebaut werden, die unabhängig voneinander in Positionen senkrecht und parallel zur Anregungsebene eingestellt werden können.

Bei diesen Anisotropiemessungen muss die unterschiedliche Empfindlichkeit der Detektoren für senkrecht und horizontal polarisiertes Licht berücksichtigt werden, deren Verhältnis für jede „neue“ Wellenlänge separat vor der Messung bestimmt werden muss. Sie wird beschrieben durch den G-Faktor und berechnet sich nach:

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{\parallel}} \quad (3.2)$$

Dabei ist i_{\perp} die Intensität bei einer horizontalen Stellung des Anregungspolfilters und einer senkrechten Stellung des Detektionspolfilters und i_{\parallel} entsprechend die Intensität bei einer ho-

horizontalen Stellung beider Polfilter. Die Anisotropie selbst errechnet sich nach (2.3).

Gemessen wird stets in derselben Präzisionsküvette (TypNr. 105.254-QS, Hellma, Müllheim, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 0,3 cm.

3.8 Cis-Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop - TIRFM

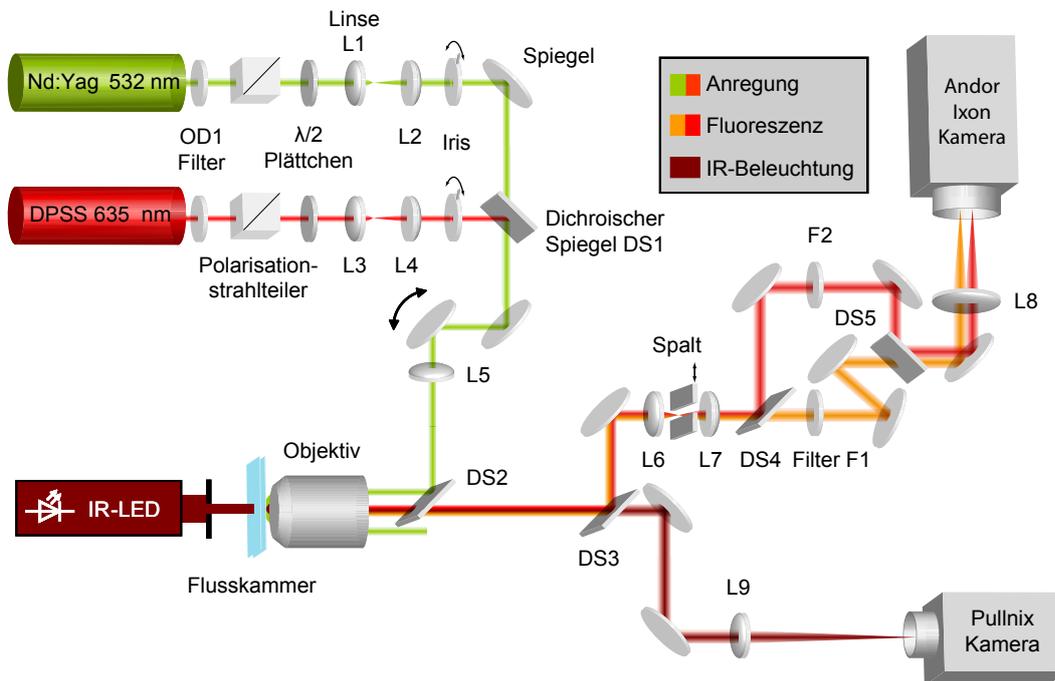


Abbildung 3.9 Schematische Abbildung des Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskops. Die Anregung erfolgte mit einem grünen/roten Laser. Das Fluoreszenzlicht wird spektral aufgetrennt in den Donorkanal (orange) und den Akzeptorkanal (rot) und dann nebeneinander auf den Chip der Andor Ixon Kammera (Stemmer Imaging GmbH, Puchheim, Deutschland) abgebildet. Das durch Hellfeldbeleuchtung erzeugte Bild der magnetischen Kugeln gelangt zur Pullnixkammera (Edmund Industrie Optik GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Beide Signale werden computergesteuert detektiert.

Ein Großteil dieser Doktorarbeit bestand im Aufbau eines Einzelmolekül-Cis-Totalreflexionsfluoreszenzmikroskops (englisch: objective type total internal reflection fluorescence microscope - TIRFM), welches noch zusätzlich kombiniert wird mit einer magnetischen Pinzette, welche jedoch nicht für die hier vorgestellten Ergebnisse verwendet wurde, abgesehen von einer finalen Kalibrierung durch die Feinjustage der Magnete, ist diese jedoch fertig justiert. Als

| Abkürzung | Bezeichnung | Hersteller |
|-------------|------------------------------------|---------------------|
| L1, L3 | Plan Konvex Linse 25 mm | Thorlabs |
| L2, L4 | Plan Konvex Linse 500 mm | Thorlabs |
| L5, L9 | Plan Konvex Linse 250 mm | Thorlabs |
| L6, L7 | Achromatische Linse 50 mm | Thorlabs |
| L8 | chromatische Linse 200 mm; 2“ | Thorlabs |
| Spiegel | Spiegel | Thorlabs |
| OD1 | Absorptionsfilter | Thorlabs |
| PBS | Polarisationsstrahlenteiler | Thorlabs |
| Iris | Iris | Thorlabs |
| $\lambda/2$ | $\lambda/2$ Plättchen | Thorlabs |
| DS1 | Dichroischer Spiegel 633 nm | AHF Analysentechnik |
| DS2 | Dichroischer Spiegel 532 nm, 633nm | AHF Analysentechnik |
| DS3 | Dichroischer Spiegel 660 nm | AHF Analysentechnik |
| DS4, DS5 | Dichroischer Spiegel 700nm | AHF Analysentechnik |
| F1 | Sperrfilter 700/75 | AHF Analysentechnik |
| F2 | Sperrfilter 590/70 | AHF Analysentechnik |
| Spalt | Spalt | Newport |

Tabelle 3.4 Liste der optischen Bauelemente, Thorlabs, Karlsfeld, Deutschland; AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland; Newport, Irvine, USA.

Basis des Aufbaus, der schematisch in Abbildung 3.9 abgebildet ist, dient ein schwingungsgedämpfter Tisch (Stabilizer I-2000 series, Newport, Irvine, USA). Die optischen Elemente sind in Tabelle 3.4 zusammengetragen. Das Objektiv ist feinfokussierbar mit einem Piezo-verstellelement Pifoc (Physik Instrumente GmbH Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland). Der Laser kann mit einem Shutter (nicht eingezeichnet) verschlossen werden, der über einen elektromechanischen Aktuator ausgelöst wird (Thorlabs, Karlsfeld, Deutschland). Dieser lässt sich über das TTL-Signal, welches die Andor Ixon EMCCD-Kamera (Stemmer Imaging, Puchheim, Deutschland) aussendet, auslösen. Die Messkammer ist auf einem x-y-Verschiebetisch (Newport, Irvine, CA, USA) montiert und kann in der Fokusebene verfahren werden. In x-Richtung geschieht dies mit Hilfe einer piezoangetriebenen Mikrometerschraube (NanoPZ Ultra-High Resolution Actuator, Newport, Irvine, CA, USA).

3.8.1 Anregungsstrahlengang

Um den Einfall von Streulicht zu minimieren, ist nahezu der gesamte Einzelmolekülfluoreszenzaufbau innerhalb einer Kiste aus schwarzem Karton (Thorlabs, Karlsfeld). Als Licht-

quellen dienen ein frequenzverdoppelter NdYAG-Laser der Wellenlänge 532 nm (75 mW, Compass 215M Coherent Inc., Santa Clara CA, USA) und ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm (30 mW, Lasiris, Stocker Yale, Quebec, Kanada). Im Anregungsstrahlengang war für beide Laser über die Kombination eines $\lambda/2$ Plättchens, mit dem die Polarisationssebene gedreht werden kann, und einem Polarisationsstrahlenteiler die Möglichkeit gegeben, die Intensität des Laserstrahls stufenlos zu regulieren. Beide Laserstrahlen werden anschließend aufgeweitet, und der für die Messung/Justage benötigte Strahlquerschnitt lässt sich über eine Iris einstellen. Zum Bleichen der Flusskammeroberflächen beträgt die Strahlungsleistung hinter dieser Iris noch 7 mW (grün) für die Messungen selbst wird diese mittels $\lambda/2$ Plättchen auf 0,3 mW reduziert. Die Laser lassen sich parallel zur Anregung verwenden, indem sie durch den dichroischen Spiegel DS1 (AHF Analystechnik AG, Tübingen) auf einander aliniert werden. Dieser Strahl wird nun mit der Linse L5 auf die Fokusebene des Öl-Immersionsobjektivs CFI Apo TIRF 60 \times oil, NA 1.49 (Nikon Instruments, Japan, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) fokussiert, wobei dies in TIRF-Beleuchtung geschieht, was bedeutet, dass der Anregungsstrahlengang genau soweit entfernt von der optischen Achse des Objektivs liegt, dass an der Glas-Wasser-Grenzfläche eine Totalreflexion stattfindet. Dies passiert genau dann, wenn beim Übergang von einem optisch dichten Medium (z.B. Glas, Brechungsindex: $n_1 = 1,46$) zu einem optisch dünneren Medium (z.B. Wasser, Brechungsindex: $n_2 = 1,33$) der einfallende Strahl einen Einfallswinkel einnimmt, der kleiner oder gleich dem Grenzwinkel (z.B. $\Theta_c = 65,6^\circ$) ist, der sich mit dem Snelliusschen Gesetz aus den Brechungsindizes wie folgt berechnen lässt:

$$\Theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (3.3)$$

Das hierdurch erzeugte evaneszente Feld, welches sich im optisch dünneren Medium ausbreitet, fällt exponentiell ab. Die Eindringtiefe d ist abhängig von der Wellenlänge λ_0 und dem Einfallswinkel Θ_I und kann mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_2^2 \sin^2 \Theta_I - n_1^2)^{-1/2}. \quad (3.4)$$

Bei der verwendeten Wellenlänge von 532 nm und einem geschätzten Einfallswinkel von 70° ergibt sich eine Eindringtiefe von $d = 87,5$ nm, bei der die Intensität des evaneszenten Feldes auf $1/e$ der ursprünglichen Intensität abgefallen ist. Dieses evaneszente und exponentiell abklingende Feld kann nun die an der Oberfläche der Flusskammer immobilisierten und fluoreszenzmarkierten Proteine zur Fluoreszenz anregen. Durch diese Art der Anregung kann das

Hintergrundsignal minimiert werden, da jegliche im Puffer schwimmende Verunreinigung ab einer ausreichenden Entfernung von der Oberfläche nicht mehr detektiert wird und außerdem die durch Ramanstreuung verursachten Störsignale bei 550 nm und 610 nm minimiert werden [36, 58–61].

3.8.2 Detektionsstrahlengang

Der Detektionsstrahlengang wird zunächst fokussiert um mit Hilfe eines in der Breite verstellbaren Spaltes den Bildbereich auf die halbe Breite des Chips der EMCCD Andor Ixon Kamera einstellen zu können. Anschließend folgt eine zweite Linse mit identischer Brennweite f , welche im Abstand $2f$ zur ersten Linse positioniert ist. Diese Kombination von zwei Linsen ermöglicht nicht nur eine scharfe Abgrenzung von Donor und Akzeptorsignal auf dem CCD Chip, sondern dient zusätzlich dem Zweck, die Strahlen, die von Punkten der Fokusebene des Objektivs ausgehen und abseits der optischen Achse liegen, nicht zu stark divergieren zu lassen. Nun wird der Strahl durch einen dichroischen Spiegel spektral bei 660 nm in den Donor- und den Akzeptorkanal aufgetrennt. Aus beiden Kanälen wird mit Hilfe zweier Sperrfilter jeweils ein spektrales Fenster ausgeschnitten. Beide Kanäle werden nun mit einem weiteren dichroischen Spiegel wieder aliniert und durch eine 2 Zoll Linse auf den Chip der EMCCD-Kamera (Andor IXon DV887, Andor, Belfast, Nord Irland) fokussiert. Die EM-Verstärkung ist auf 222 eingestellt und das Kamerabild wird mit einem 2×2 binning aufgenommen. Wenn nicht anders beschrieben, werden alle Experimente mit 100 ms Belichtungszeit durchgeführt.

3.8.3 Durchführung der Einzelmolekülmessungen

Die Flusskammer wird wie in Abbildung 3.7 gezeigt in den Versuchsaufbau eingebaut und sowohl an die Spritzenpumpe als auch an ein Flüssigkeitsreservoir angeschlossen. Zunächst wird die Kammer mit 1 ml des Messpuffers äquillibriert. Dann wird die funktionalisierte Oberfläche fokussiert, was besonders gut am Rand der Flusskammern durchführbar ist, da hier die Nescofilm-Puffer Grenzfläche zu einem guten Kontrast führt. Nun können die einzelnen Lösungen zur Herstellung einer proteinbindenden Oberfläche nacheinander durchgespült werden. Um die in Abbildung 3.5 schematisch dargestellte Proteinimmobilisierung zu erhalten, wird zunächst Streptavidin (2 mg/ml) an die Biotinoberfläche gebunden. Anschließend wird Biotin-NTA (20 mg/ml) an das immobilisierte Streptavidin gebunden und abschließend NiCl_2 durchgespült. Die Injektionsgeschwindigkeit beträgt dabei 0,5 ml/min und das Volumen aller

durchgespülten Lösungen liegt bei 350 μ l. Zwischen jedem durchgeführten Schritt wird die Flusskammer mit Messpuffer gespült. Nun besitzt die Kammer eine Oberfläche, welche in der Lage ist, die Proteine zu binden. Es muss beachtet werden, dass keine Luftblasen in den Zuflussschlauch gelangen, damit die Funktionalität der Oberfläche erhalten bleibt. Bevor Protein hinzugegeben wird, werden die in der Kammer befindlichen fluoreszierenden Verunreinigungen geblichen. Hierzu wird die Intensität des Laserlichts bei der Wellenlänge von 532 nm (grün) über das $\lambda/2$ -Plättchen auf 7 mW erhöht, und die Kammer über dem Objektiv von einem Rand der Flusskammer zum anderen Rand verfahren.

Da die Anbindung der Proteine nicht bei jeder Probe gleich gut funktioniert, wird zuerst eine relativ geringe Protein-Konzentration (5 pM) in die Kammer gespült. Die Konzentration wird so lange erhöht, bis eine genügend hohe Anzahl von markiertem Protein auf der Oberfläche erkennbar ist. Die Konzentration wird sukzessive erhöht, meist wird mit 50-100 pM gearbeitet. Die Software der Andor Kamera zeigt den roten (Akzeptor) und grünen (Donor) Kanal parallel an. Die Messung wird so durchgeführt, dass eine vielversprechende Position in der Kammer gesucht wird, welche sich durch Signale im grünen Kanal und besonders einigen Signalen im roten Kanal der Kamera auszeichnet. Hier sollten FRET-Signale vorliegen. Wird eine solche Position gefunden, wird die Messung gestartet. Die Bilder werden mit einer Bildrate von 8,3 Hz und einer Bildwiederholrate von 600 Bildern bei einer Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen. Ob ausreichend Akzeptor vorhanden ist, wird mit Hilfe der direkten Fluoreszenzanregung bei 633 nm getestet.

3.8.4 Auswertung

Die Auswertung der von der EMCCD-Kamera aufgezeichneten Filme erfolgt mit Hilfe einer von Moritz Mickler an diesem Lehrstuhl geschriebenen Auswertesoftware für IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA). Hierzu wird der aufgenommene Film in das Programm eingelesen und in den Donor- und den Akzeptorkanal getrennt. Die Software mittelt über die ab einem bestimmten Zeitpunkt gewählten nächsten zehn Bilder und bestimmt die zehn hellsten Punkte des jeweiligen Kanals und zeichnet den zeitlichen Verlauf der Signalintensität an diesen zehn Punkten auf. Je nach gewählter Einstellung werden die nächsten Nachbarpixel zum Signal hinzugerechnet. Diese ermittelten zeitlichen Fluoreszenzintensitätsverläufe werden mit den entsprechenden Intensitätsverläufen des anderen Kanals verglichen. Die meist genutzte Vorgehensweise war jene, bei der man zunächst die zehn hellsten Akzeptorflu-

reszenzen sucht und sich dann die entsprechenden Donorintensitäten anzeigen lässt. Sowohl die spektral getrennten Detektionskanäle als auch die Verwendung nur einer einzigen fokussierenden finalen Linse führen zu optischen Verzerrungen zwischen den beiden Kanälen, die mittels eines zweidimensionalen Polynom-Fits herausgerechnet werden können. Hierzu muss vor den eigentlichen Messungen eine Kalibrationsmessung durchgeführt werden, bei der fluoreszierende Polystyrol-Kugeln (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), welche in beiden Kanälen zu erkennen sind, in die Flusskammer gegeben und die Position der Kugel in den beiden Kanälen verglichen werden. Hierbei werden circa 30 Positionen miteinander verglichen, und für die sich ergebenden Differenzen in x- und y- Richtung (Δx und Δy) folgender Polynomfit mit den Fitparametern K_0 bis K_5 durchgeführt:

$$\frac{\Delta x(x,y)}{\Delta y(x,y)} = K_0 + K_1 \cdot x + K_2 \cdot y + K_3 \cdot x^2 + K_4 \cdot xy + K_5 \cdot y^2. \quad (3.5)$$

Mit Hilfe dieses Fits können die Kanäle nun verglichen und die sich entsprechenden Positionen gefunden werden. Näheres hierzu in der Doktorarbeit von Moritz Mickler [62]. Bei der Justage der einzelnen optischen Bauelemente wurde natürlich verstärkt darauf geachtet, diese optischen Verzerrungen zu minimieren, um möglichst den gesamten Chip der EMCCD-Kamera auszuleuchten und um ohne hohe Verluste das Licht einzelner Fluorophore auf dem EMCCD-Chip abbilden zu können.

3.8.5 Bestimmung des Gamma-Faktors

Wie in 2.3.2 bereits erwähnt, muss für die Bestimmung der FRET-Effizienz noch eine Korrektur der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach (2.22) durchgeführt werden, bei der nicht nur die Quantenausbeuten $Q_{DA} \approx Q_D$ des Donors und Q_{AD} des Akzeptors berücksichtigt werden, sondern auch die unterschiedlichen Kollektionseffizienzen η_D und η_A der Detektionskanäle der Donor- und Akzeptorfluoreszenz. Tatsächlich ist es so, dass für jedes einzelne Kurvenpaar von Donorfluoreszenz und Akzeptorfluoreszenz (gemessen über der Zeit) ein γ -Faktor bestimmt werden muss, da aufgrund der optischen Verzerrungen für jeden Pixel eine eigene Kollektionseffizienz vorhanden ist und sich allein durch eine veränderte Positionierung der Flusskammer selbst für die einzelnen Pixel ein neuer γ -Faktor ergeben kann. Bei der Ermittlung wird so verfahren, dass nur solche Kurvenpaare ausgewertet werden, bei denen die Fluorophore geblichen sind, so dass die Festlegung einer Fluoreszenzintensität von „Null“ möglich ist. Da im Rahmen meiner durchgeführten Messungen keine deutlichen Sprünge zwi-

schen verschiedenen FRET-Effizienzen auftreten, wurden nur solche Kurvenpaare ausgewählt, bei denen zunächst ein Bleichen des Akzeptors stattfindet, so dass der dadurch hervorgerufene Anstieg der Donorfluoreszenz ΔI_D mit dem Abfall der Akzeptorfluoreszenz ΔI_A verglichen werden kann. Genau aus diesem Verhältnis wird der γ -Faktor berechnet.

$$\gamma = \frac{Q_{AD}\eta_A}{Q_D\eta_D} = \frac{\Delta I_D}{\Delta I_A}. \quad (3.6)$$

3.9 Berechnung von Assoziationsraten

Für die Berechnung der Assoziationsraten k_{on} in Kapitel 4.1.2 wird vereinfacht angenommen, dass es sich um eine irreversible Reaktion zweiter Ordnung handelt. Sei $[C]$ die Konzentration der nukleotidgebundenen Proteine, $[G]$ die Konzentration der Nukleotide und $[P]$ die Konzentration der Proteine. Im 1. Fall liegen die Nukleotid- und Proteinkonzentrationen innerhalb der gleichen Größenordnung, das heißt beide Konzentrationsveränderungen müssen zur Berechnung von k_{on} berücksichtigt werden. Für die Ratengleichung ergibt sich daher mit den jeweiligen Anfangskonzentrationen $[G]_0$ und $[P]_0$:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_{on}([G]_0 - [C])([P]_0 - [C]). \quad (3.7)$$

Nach dem Lösen dieser Differentialgleichung erhält man

$$[C] = \frac{[G]_0[P]_0(1-a)}{[G]_0 - [P]_0a} \quad (3.8)$$

mit

$$a = e^{([P]_0 - [G]_0)k_{ont}}. \quad (3.9)$$

Im 2. Fall ist das Protein im Überschuss vorhanden, deshalb kann die Proteinkonzentration $[P]$ als konstant angenommen werden. Die Ratengleichung ergibt sich hier zu:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_{on}([G]_0 - [C])[P]_0 \quad (3.10)$$

und als Lösung:

$$[C] = [G]_0(1 - e^{-k_{ont}}). \quad (3.11)$$

3.10 Berechnung von Dissoziationskonstanten

Für die Dissoziationskonstanten K_D beim Binden von Transitpeptid an $psToc34_{SZ}$, bei den in Kapitel 4.4 Abbildung 4.13 vorgestellten Messungen gilt:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (3.12)$$

mit der Proteinkonzentration $[P]$, der Transitpeptidkonzentration $[L]$ und der Konzentration der Komplexe $[PL]$. Für $[P]$ und $[L]$ gilt $[P] = [P]_T - [PL]$ und $[L] = [L]_T - [PL]$ mit den totalen Konzentrationen $[P]_T$ und $[L]_T$. Durch Einsetzen in Gleichung (3.12) ergibt sich:

$$K_D = \frac{([P]_T - [PL])([L]_T - [PL])}{[PL]} \quad (3.13)$$

$$= \frac{[P]_T[L]_T - ([L]_T + [P]_T)[PL] + [PL]^2}{[PL]} \quad (3.14)$$

was umgeformt werden kann zu:

$$0 = [PL]^2 - ([L]_T + [P]_T + K_D)[PL] * [P]_T[L]_T. \quad (3.15)$$

Die Konzentration der Komplexe ergibt sich somit zu:

$$[PL] = \frac{([P] + [L] + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([P] + [L] + K_D)^2}{4} - [P][L]}. \quad (3.16)$$

Sei r_u die Anisotropie des Fluorophors am ungebundenen Transitpeptid und r_g die am gebundenen Transitpeptid. So ergibt sich die Gesamtanisotropie r als Summe dieser beiden gewichteten Anisotropien und unter Berücksichtigung der Beziehung $[L] = [L]_T - [PL]$ zu:

$$r = \frac{[L]}{[L]_T} r_u + \frac{[PL]}{[L]_T} r_g = r_u - \frac{[PL]}{[L]_T} r_u + \frac{[PL]}{[L]_T} r_g \quad (3.17)$$

Einsetzen von Gleichung (3.16) in Gleichung (3.17) liefert die Fitfunktion mit den drei Parametern r_u , r_g , und K_D .

Kapitel 4

Messergebnisse

4.1 Struktur des *psToc34* Homodimers

In Sun *et al.* [26] wurde erstmals die in Abbildung 4.1 gezeigte Kristallstruktur von *psToc34* veröffentlicht. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, liegt *psToc34* hierbei als Homodimer vor. In Koenig *et al.* [25] konnte die Dissoziationskonstante für das Homodimer auf $50 \pm 20 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Für Einzelmoleküluntersuchungen ist dies eine zu hohe Konzentration, deshalb wurden künstliche Dimere konstruiert. Hierbei wurde eine „Spacer-Zipper-Kombination“ gewählt, die gleichzeitig eine ausreichende Beweglichkeit und eine lokal hohe Konzentration der Proteine gewährleisten soll, siehe hierzu Kapitel 3.1.

Um die physiologische Rolle der homodimeren Struktur des *psToc34* mittels FRET-Messungen zu untersuchen, werden die Farbstoffe ATTO 550 (Donor) und ATTO 647N (Akzeptor) kovalent an Cysteine gebunden. Die in Abbildung 4.1 grün gekennzeichneten Aminosäuren sind die nativen Cysteine 215 des *psToc34_{SZ}*, je eines pro Protomer (der Index „SZ“ kennzeichnet das „Spacer-Zipper“-Konstrukt). Der Abstand zwischen den reaktiven Thiolgruppen dieser Cysteine ist eingezeichnet und beträgt circa 19 \AA . Würden sich die Farbstoffe exakt an diesen Positionen befinden, so könnte unter idealen Bedingungen bei Anregung des Donors ein FRET auf den Akzeptor mit einer Effizienz von 0,99 stattfinden. Die Berechnung dieser Effizienz erfolgt mit Gleichung (2.11) und einem Försterradius von $R_0 = 65 \text{ \AA}$. Jedoch sind die Farbstoffe über einen Linker mit einer Länge von circa 10 \AA an diese reaktive Gruppe gebunden, was eine genaue Vorhersage der Positionen der Farbstoffe verhindert. Das heißt, der angegebene Wert für die Transfereffizienz soll lediglich als Richtwert dienen. Des Weiteren wurden die Cysteinmutanten *psToc34_{SZ}D36C* und *psToc34_{SZ}V78C* hergestellt, deren Cystein-

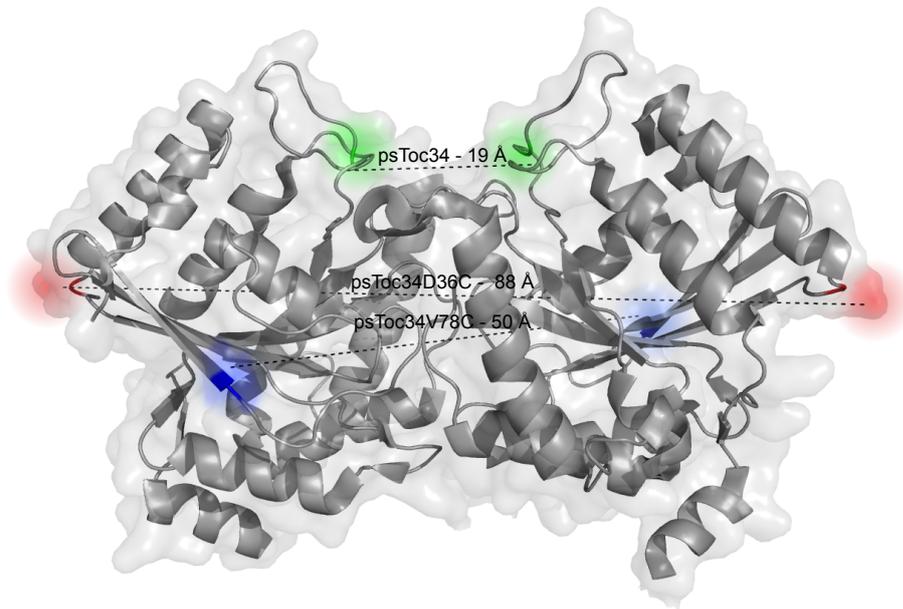


Abbildung 4.1 Kristallstruktur des *psToc34* Dimers; eingezeichnet sind die Abstände zwischen den Thiolgruppen der nativen Cysteine (grün, 19 Å) und den C_{β} Atomen der Aminosäuren Aspartat 36 (rot, 88 Å) und Valin 78 (blau, 50 Å).

positionen in Abbildung 4.1 in rot (*psToc34_{SZ}D36C*) und in blau (*psToc34_{SZ}V78C*) gekennzeichnet sind. Hierbei wurde jeweils zusätzlich das nativ vorhandene Cystein 215 durch ein Serin ersetzt. Die Abstände dieser Cysteine zueinander betragen circa 87 Å mit einer theoretischen FRET-Effizienz von 0,14 als Richtwert für die Mutante D36C und circa 50 Å für die Mutante V78C mit einer entsprechenden FRET-Effizienz von 0,82. Mit diesen drei artifiziellen Dimeren soll überprüft werden, ob der künstliche Dimer ähnlich wie in der Kristallstruktur gezeigt dimerisiert. Sowohl die Abstände als auch die daraus berechneten Werte für die FRET-Effizienz sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

4.1.1 FRET-Messungen an den Cysteinmutanten des *psToc34* Homodimers

An den vorgestellten drei *psToc34* Dimeren werden zunächst Messungen durchgeführt, die überprüfen sollen, ob die künstlichen Dimere wie in der Kristallstruktur (Abbildung 4.1) gezeigt dimerisieren. Hierzu werden sowohl Ensemblemessungen als auch Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Die Ensemblemessungen werden an einem Fluoreszenzspektrometer (Jasco GmbH Deutschland) realisiert, die Einzelmolekülmessungen an einem selbst gebau-

ten TIRF-Mikroskop, welches in Kapitel 3.8 näher beschrieben wird. Da die Kristallstruktur am GDP gebundenen *psToc34* gemessen wurde, werden auch die nachfolgend beschriebenen Fluoreszenzmessungen am GDP gebundenen *psToc34* durchgeführt.

Ein typisches Fluoreszenzverhalten von einem Donor-Akzeptor Paar in einer Einzelmolekülmessung ist in Abbildung 4.2 gezeigt. In 4.2a ist die Fluoreszenz eines einzelnen Donors (schwarz) und Akzeptors (rot) in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt. Während der ersten 96 Sekunden ist nahezu keine Fluoreszenz des Donors zu erkennen, während der Akzeptor bei einer Fluoreszenzintensität von etwa 500 w.E. fluoresziert; in dieser Zeit findet ein Energieübertrag auf den Akzeptor statt. Nach 96 Sekunden bleicht der Akzeptor und die Akzeptorfluoreszenzintensität fällt auf Null. Der Donor kann seine Energie nun nicht mehr auf den Akzeptor übertragen und fluoresziert selbst mit einer Fluoreszenzintensität von etwa 500 w.E., bis bei etwa 100 Sekunden auch der Donor bleicht. Die zu dieser Messung gehörige FRET-Effizienz ist nach Gleichung (2.21) berechnet und in 4.2b dargestellt.

Wenn nicht anders erwähnt, lag bei allen Messungen eine über die Zeit nahezu konstante FRET-Effizienz vor.

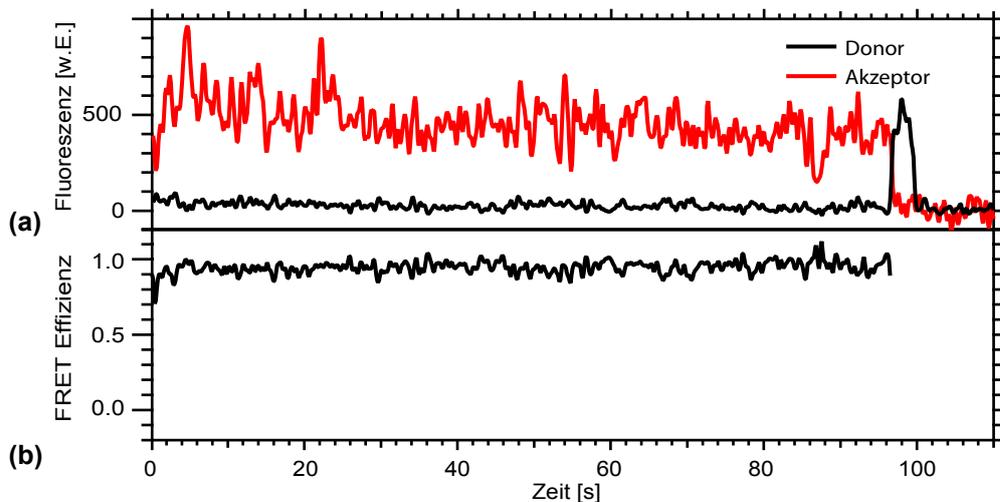


Abbildung 4.2 a) Gezeigt sind die in einer Einzelmolekülmessung ermittelten Fluoreszenzintensitäten [w.E.] eines Donor-Akzeptor Paares (ATTO 550 und ATTO 647N); Zwischen Null und 96 s findet ein FRET vom Donor auf den Akzeptor statt, bei 96 s bleicht der Akzeptor, der Donor fluoresziert selbst bis zu einer Zeit von 100 s, bei der ein Bleichen des Donors beobachtet wird. **b)** FRET-Effizienz, berechnet mit Gleichung (2.21) aus den oben gezeigten Fluoreszenzintensitäten.

Abbildung 4.3a zeigt das im Fluoreszenzspektrometer gemessene Fluoreszenzspektrum der in Lösung befindlichen Farbstoffe ATTO 550 (Donor) und ATTO 647N (Akzeptor) jeweils bei

einer Konzentration von 2,5 μM (schwarze, durchgezogene Linie). Die Anregungswellenlänge liegt bei 532 nm. Das Maximum des Donors liegt bei 575 nm und ist auf Eins normiert. Ein zweites lokales Maximum ist bei einer Wellenlänge von 665 nm erkennbar, welches durch die direkte Anregung des Akzeptors hervorgerufen wird. Nach Zugabe des Dimers *psToc34_{SZ}* (5 μM) wird die Fluoreszenzintensität dieser Maxima solange beobachtet, bis sich konstante Fluoreszenzintensitäten eingestellt haben und die Fluoreszenzmarkierung der Proteine damit stattgefunden hat. Zumeist ist dies nach 20 min erreicht und ein zweites Spektrum kann im Anschluss gemessen werden (rote, gestrichelte Linie). Zur besseren Vergleichbarkeit wird auch dieses Spektrum im Fluoreszenzmaximum des Donors auf Eins normiert. Es ist deutlich erkennbar, dass nach der Proteinzugabe eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz von 0,15 w.E. auf 0,48 w.E. stattgefunden hat, was auf den RET zurückgeführt werden kann.

In Abbildung 4.3b ist das Histogramm aller FRET-Effizienzen gezeigt, welche mittels Einzelmolekülfluoreszenzmessungen am fluoreszenzmarkierten *psToc34_{SZ}* ermittelt werden. Hierzu wird die Fluoreszenzintensität zweier Fluorophore, die sich an ein und demselben Dimer befinden, über die Zeit gemessen und für jeden einzelnen Zeitpunkt die FRET-Effizienz nach Gleichung (2.21) bestimmt. Die ermittelten Effizienzen sind mit einer Gaußkurve angepasst, deren Maximum bei einer FRET-Effizienz von 0,92 liegt.

Analog zu den Messungen am *psToc34_{SZ}* werden Fluoreszenzmessungen an der Cysteinmutante *psToc34_{SZ}V78C* durchgeführt. Die Messergebnisse der Ensemblemessungen sind in 4.3c dargestellt. Die aufgenommenen Spektren weisen eine Steigung des Akzeptormaximums von 0,14 w.E. vor Zugabe des Proteins (schwarze, durchgezogene Linie) auf 0,66 w.E. nach Zugabe des Proteins auf (rote, gestrichelte Linie). Auch bei dieser Cysteinmutante kann ein Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor beobachtet werden. Die aus den Einzelmolekülfluoreszenzmessungen ermittelten FRET-Effizienzen sind im Histogramm 4.3d gezeigt. Sie zeigen zwei Zustände, jeweils mit einem Gauß gefittet. Ihre Maxima liegen bei 0,86 und 0,95 FRET-Effizienz.

Schließlich werden dieselben Experimente an der Cysteinmutante *psToc34_{SZ}D36C* durchgeführt. In Abbildung 4.3e sind die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe vor (schwarze, durchgezogene Linie) und nach Proteinzugabe (rote, gestrichelte Linie) dargestellt, ein leichter Anstieg des Akzeptormaximums von 0,21 w.E. auf 0,24 w.E. ist zu erkennen. Bei einem geschätzten Fehlerbereich von $\pm 0,02$ w.E. ist dieser Anstieg jedoch nicht stark ausgeprägt. Einzelmolekülmessungen liefern keine detektierbaren FRET-Effizienzen. Hierzu ist anzumerken, dass aufgrund des Signal- zu Rauschverhältnisses, eine Detektion von geringen FRET-Effizienzen erschwert ist.

| Dimer | Abstände [Å] | Akzeptor- fluoreszenz [w.E.] | FRET-Effizienz vorhergesagt | FRET-Effizienz gemessen |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| <i>psToc34_{SZ}</i> | 19 | 0,15 → 0,48 | 0,99 | 0,92 |
| <i>psToc34_{SZ}V78C</i> | 50 | 0,14 → 0,66 | 0,82 | 0,86 und 0,95 |
| <i>psToc34_{SZ}D36C</i> | 88 | 0,21 → 0,24 | 0,14 | nicht detektierbar |

Tabelle 4.1 Abstände der Cysteine der verschiedenen *psToc34_{SZ}* Dimere (Spalte 2) mit den in Ensemble-Experimenten gemessenen Änderung der Akzeptorfluoreszenzmaxima (Spalte 3) und den erwarteten (Spalte 4) und gemessenen FRET-Effizienzen (Spalte 5).

Alle in diesem Kapitel genannten Abstände, FRET-Effizienzen und Akzeptorintensitäten sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen der Messgenauigkeit die gemessenen FRET-Effizienzen mit denen übereinstimmen, die anhand der aus der Kristallstruktur (siehe Abbildung 4.1) ermittelten Abständen berechnet werden. Der systematische Fehler der FRET-Effizienz wird mit 0,1 abgeschätzt. Die artifiziellen Dimere können also für weitere Experimente verwendet werden, die das Dimerisierungsverhalten der *psToc34* Dimere untersuchen sollen. Wie in Abbildung 3.3 gut zu erkennen ist, liegt der Abstand zwischen den Cysteinen der *psToc34_{SZ}V78C* Mutante im dimeren Zustand an der unteren Grenze des Abstandsbereiches, bei dem die FRET-Effizienz am sensitivsten auf Abstandsänderungen reagiert. Sie ist also hervorragend geeignet, das Dissoziieren dieses Dimers, also die Vergrößerung des Abstandes zwischen den Cysteinen, zu beobachten.

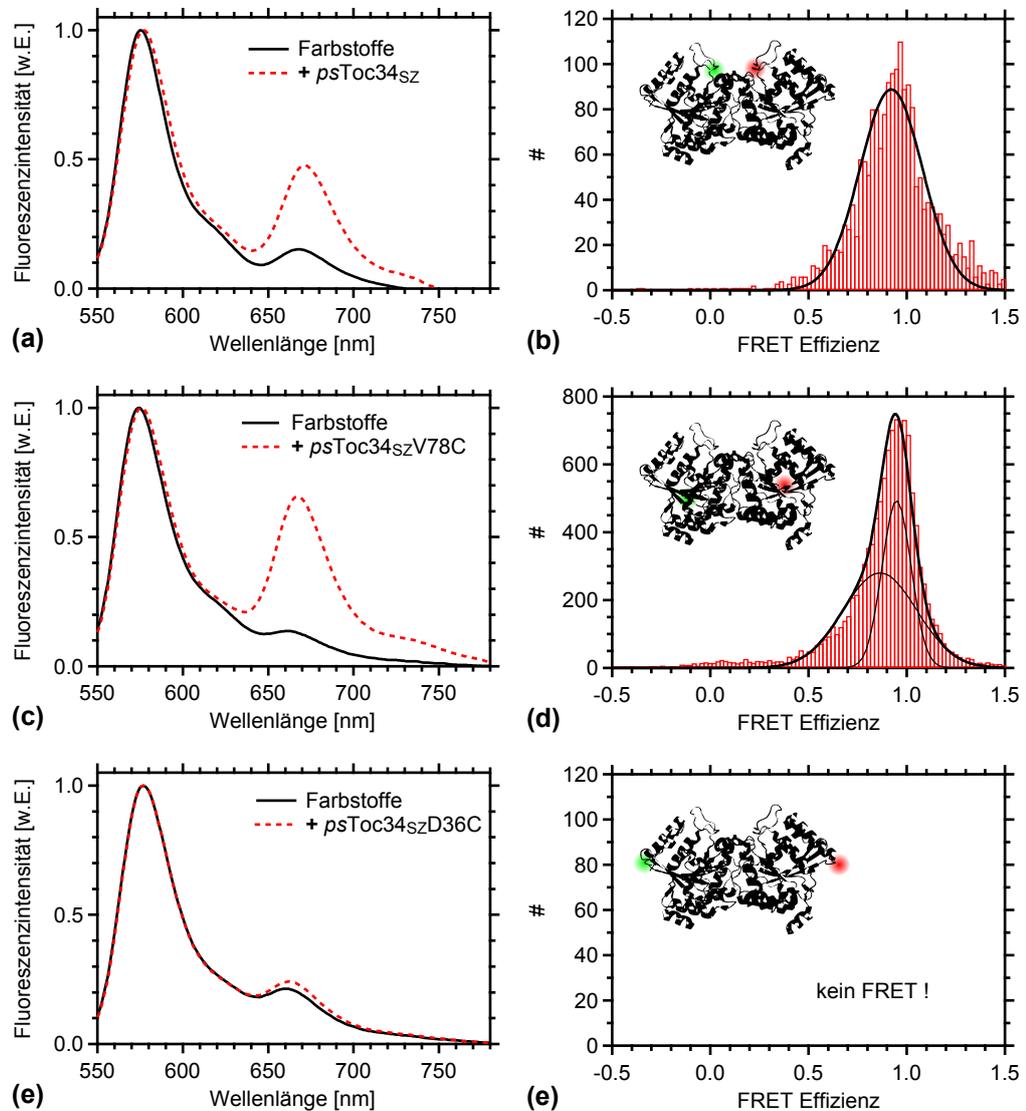


Abbildung 4.3 a), c) und e) Spektren der Farbstoffe ATTO 550 und ATTO 647N (je $2,5 \mu\text{M}$) vor der Proteinzugabe (schwarze, durchgezogene Linie) und nach der Zugabe von $5 \mu\text{M}$ a) *psToc34_{SZ}* c) *psToc34_{SZ}V78C* und e) *psToc34_{SZ}D36C* (rote, gestrichelte Linie); b) und d) Histogramme der gemessenen FRET-Effizienzen der Proteine b) *psToc34_{SZ}* und d) *psToc34_{SZ}V78C*; schematische Kristallstrukturen mit eingezeichneten Donor- (grün) und Akzeptorpositionen (rot).

4.1.2 Einfluss des Argininfingers auf die Struktur des *psToc34* Homodimers

In Koenig *et al.* [21] konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation des Argininfingers die Bildung von Homodimeren verhindert. Um zu testen, ob dies auch an unseren artifiziellen Dimeren beobachtbar ist, oder ob die „Spacer-Zipper“ Konstruktion eine untypische dauerhafte Dimerisierung verursacht, werden sowohl Ensemble- als auch Einzelmolekülmessungen an der Argininfingermutante *psToc34_{SZ}V78C/R133A* durchgeführt.

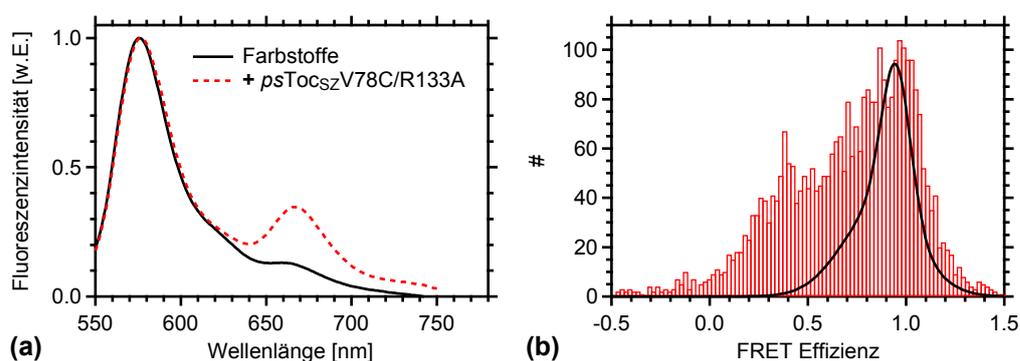


Abbildung 4.4 a) Spektren der Farbstoffe ATTO 550 und ATTO 647N (je $2,5 \mu\text{M}$, nach Anregung bei 532 nm) vor (schwarze, durchgezogene Linie) und nach (rote, gestrichelte Linie) der Zugabe von $5 \mu\text{M}$ *psToc34_{SZ}V78C/R133A* **b)** Histogramm der gemessenen FRET-Effizienzen der Argininfingermutante; Zum Vergleich ist der Fit der Messungen an *psToc34_{SZ}V78C* aus Abbildung 4.3d mit eingezeichnet (schwarze, durchgezogene Linie).

In Abbildung 4.4a sind die Spektren der freien Fluorophore (schwarze, durchgezogene Linie) und der gebundenen Fluorophore nach Zugabe der Argininfingermutante gezeigt (rote, gestrichelte Linie). Ein Anstieg des Akzeptormaximums von 0,13 w.E. auf 0,35 w.E. ist beobachtbar. Im Vergleich zur Cysteinmutante *psToc34_{SZ}V78C*, bei der ein Anstieg von 0,14 w.E. auf 0,66 w.E. beobachtet wird (siehe Abbildung 4.3 c), ist der Anstieg um den Faktor 2,4 gemindert. Abbildung 4.4b zeigt das FRET-Histogramm der aus Einzelmolekülmessungen ermittelten FRET-Effizienzen der Argininfingermutante. Zum Vergleich ist der Fit der Messungen an *psToc34_{SZ}V78C* aus Abbildung 4.3d mit eingezeichnet (schwarze, durchgezogene Linie). Es ist deutlich zu erkennen, dass das Histogramm zu geringeren FRET-Effizienzen hin verbreitert ist.

Anders als bei anderen Mutanten ist hier eine Dynamik zu sehen, da die FRET-Effizienz über die Zeit nicht konstant ist. Beispielhaft für die hier gemessenen Einzelmolekülfluoreszenzkurven ist in Abbildung 4.5a die Fluoreszenz eines Donor-Akzeptor Paares mit der dazu-

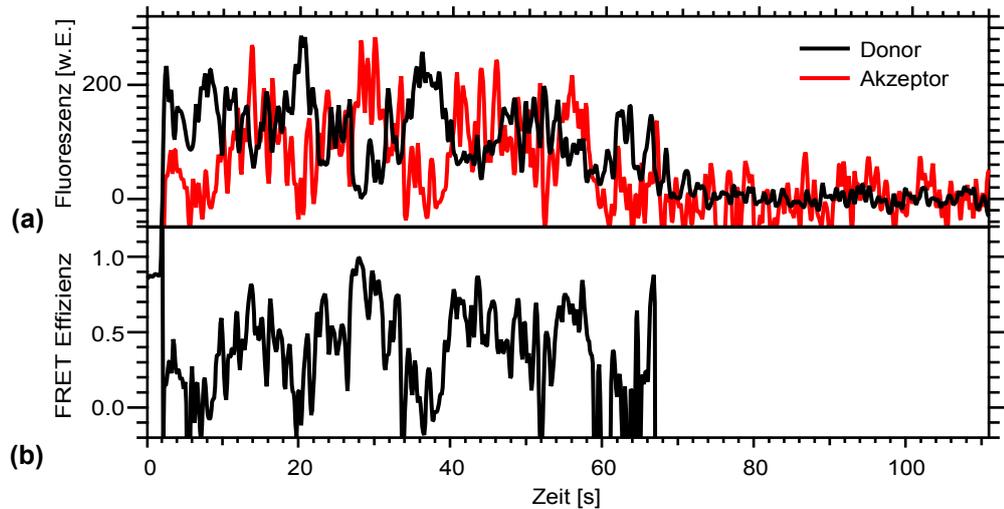


Abbildung 4.5 a) Fluoreszenzintensitäten [w.E.] eines einzelnen Donor-Akzeptor Paares (ATTO 550 und ATTO 647N) an der Argininfingermutante des *psToc34* Homodimers; zwischen Null und 68 s findet ein FRET vom Donor auf den Akzeptor statt, wobei die Effizienz des Transfers über den gesamten Zeitraum schwankt. Nach 68 s bleicht der Donor, weshalb beide Fluoreszenzintensitäten auf Null fallen. b) FRET-Effizienz, berechnet mit Gleichung (2.21) aus den oben gezeigten Fluoreszenzintensitäten.

gehörigen FRET-Effizienz in ihrer Zeitabhängigkeit gezeigt. Zwischen Null und 68 s findet ein FRET vom Donor auf den Akzeptor statt, wobei die Effizienz des Transfers über den gesamten Zeitraum schwankt. Nach 68 s bleicht der Donor, weshalb beide Fluoreszenzintensitäten auf Null fallen. Die hierzu berechnete FRET-Effizienz ist in Abbildung 4.5b dargestellt. Die FRET-Effizienzen sind aus den oben gezeigten Fluoreszenzintensitäten mit Gleichung (2.21) berechnet.

Oreb *et al.* [27] konnte zeigen, dass die Dimerisierung des *psToc34* die Nukleotidaustauschrate verringert. Mit Hilfe von Anisotropiemessungen soll gezeigt werden, ob dieser Zusammenhang auch für die *psToc34_{SZ}* Dimere gefunden werden kann. Hierzu wird das fluoreszenzmarkierte Nukleotid GMPPNP (mantGMPPNP) verwendet, welches einem nicht hydrolysierbaren Analog zu GTP entspricht. Es wird die Anisotropie dieses ungebundenen Nukleotids in Lösung und nach Zugabe von verschiedenen *psToc34* Mutanten gemessen. In Abbildung 4.6 sind die ermittelten Anisotropien in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt. Zu erkennen ist der Anstieg der Anisotropie von 1 μ M mantGMPPNP beim Binden an jeweils 5 μ M (Abbildung 4.6a) bzw. 100 μ M (Abbildung 4.6b) monomeren *psToc34V78C* (rot), artifizialen Dimer *psToc34_{SZ}V78C* (schwarz) und an die Argininfingermutante *psToc34_{SZ}V78C/R133A*

(grün). Die Dissoziationskonstante des *psToc34* liegt bei $50 \mu\text{M}$ [25], die gewählten Proteinkonzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ liegen also sowohl unterhalb als auch oberhalb der Dissoziationskonstante. Abbildung 4.6 zeigt in den ersten circa 15 Sekunden die Anisotropie des ungebundenen Nukleotids mantGMPPNP. In den nächsten circa 15 Sekunden sind keine Messdaten zu sehen, da hier die Zugabe des jeweiligen Peptids stattfindet und hierfür die Küvette aus dem Fluoreszenzspektrometer entnommen werden muss. Im Anschluss ist in beiden Graphen ein Anstieg der jeweiligen Anisotropien zu beobachten. Ein jeweiliger Fit des Anstiegs mit Gleichung (3.8) für a) die nahezu äquimolare Protein-Liganden Konzentration bzw. mit Gleichung (3.11) für den Fall in b), dass das Protein deutlich höher konzentriert ist als das Nukleotid wird durchgeführt. Die hieraus ermittelten Assoziationskonstanten des mantGMPPNP sind für das jeweilige Protein in der entsprechenden Konzentration in Tabelle 4.2 zusammengefasst dargestellt.

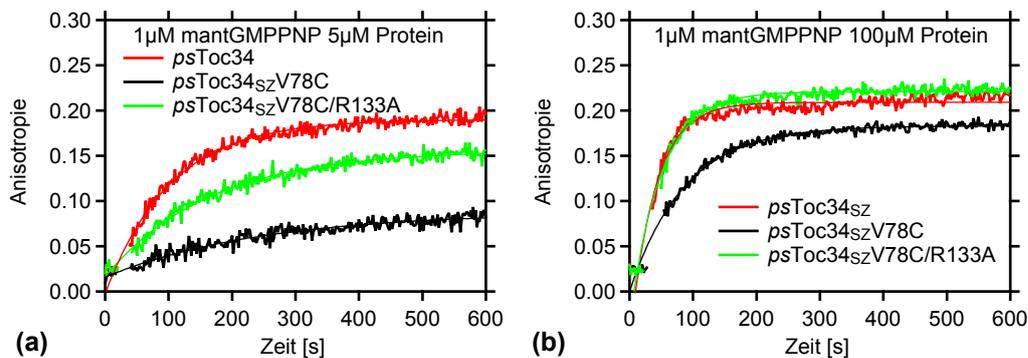


Abbildung 4.6 Anisotropie des fluoreszenzmarkierten mantGMPPNP ($1 \mu\text{M}$) vor dem Binden an Protein (während der ersten circa 15 s) und während des Bindens (nach circa 30 s) an monomeres *psToc34V78C* (rot), das artifizielle Dimer *psToc34_{sz}V78C* (schwarz) und an die Argininfingermutante *psToc34_{sz}V78C/R133A* (grün) bei Proteinkonzentrationen von a) $5 \mu\text{M}$ und b) $100 \mu\text{M}$. Die durchgezogenen Linien stellen die a) nach Gleichung (3.8) und b) nach Gleichung (3.11) ermittelten Fits dar.

In Abbildung 4.6a ist gut zu erkennen, dass das Binden von Nukleotid an das künstlichen Dimer *psToc34_{sz}V78C* im Vergleich zum Binden an das Monomer *psToc34* deutlich verlangsamt ist. Für die Argininfingermutante *psToc34_{sz}V78C/R133A* liegt die Assoziationskonstante zwischen der des Dimers und der des Monomers. In Abbildung 4.6b liegt die Assoziationsrate der Argininfingermutante höher als beim Monomer, was im Einklang damit steht, dass die Proteinkonzentration von $100 \mu\text{M}$ bereits oberhalb seiner Dissoziationskonstante von $50 \mu\text{M}$ liegt, weshalb bereits mehr als die Hälfte dieser Proteine als Dimer vorliegen sollte (circa $40 \mu\text{M}$ Monomer, circa $30 \mu\text{M}$ Dimer) und damit eine Bindung oder Freisetzung von Nukleo-

| Protein | Assoziationsraten bei 5 μM Protein [$\text{nM}^{-1}\text{s}^{-1}$] | Assoziationsraten bei 100 μM Protein [$\text{nM}^{-1}\text{s}^{-1}$] |
|---------------------------------------|--|--|
| <i>psToc34</i> | 13 ± 1 | 28 ± 1 |
| <i>psToc34_{SZ}V78C</i> | $8,3 \pm 6$ | 14 ± 1 |
| <i>psToc34_{SZ}D78V/R133A</i> | 10 ± 3 | 29 ± 1 |

Tabelle 4.2 Assoziationsraten von mantGMPPNP (1 μM) beim Binden an die Proteine *psToc34*, *psToc34_{SZ}D78V* und *psToc34_{SZ}D78V/R133A* in Konzentrationen von 5 μM und 100 μM .

tid erschwert ist. Nicht nur für den *atToc33* sondern auch für *psToc34* ist der Argininfinger also nötig, um Homodimerisieren zu können.

4.2 Einfluss der Nukleotide auf die Struktur des *psToc34* Homodimers

Da bisher noch nicht bekannt ist, an welcher Stelle des Zyklusses der Nukleotidaustausch stattfindet, soll im Folgenden untersucht werden, ob verschiedene Nukleotide zu Änderungen in der Proteinkonformation führen. Hierfür wird der artifizielle Dimer *psToc34_{SZ}V78C* genutzt, da die Positionen der Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass die FRET-Effizienz sehr sensitiv auf Abstandsänderungen reagiert.

In den Ensemblemessungen, welche in Abbildung 4.7 auf der linken Seite dargestellt sind, werden zunächst die Fluoreszenzspektren des markierten Proteins (5 μM) gemessen (schwarze, durchgezogene Linie). Das Protein befindet sich zu diesem Zeitpunkt größtenteils im GDP-gebundenen Zustand. Nach Zugabe unterschiedlicher Nukleotide werden die Fluoreszenzspektren erneut gemessen (rote, gestrichelte Linie).

Bei Zugabe von 2 mM GDP (Abbildung 4.7a) kann ein leichter Anstieg des Maximums der Akzeptorfluoreszenz von 0,34 w.E. auf 0,39 w.E. beobachtet werden. Der leicht erhöhte Energietransfer könnte dadurch erklärt werden, dass vor der Nukleotidzugabe nicht alle Proteine im GDP-gebundenen Zustand waren, und durch die Zugabe der Nukleotide im 400fachen molaren Überschuss der Anteil an Nukleotid-gebundenem Protein erhöht wird. Dies würde bedeuten, dass das Dimer im GDP-gebundenen Zustand eine eher geschlossene Konformation annimmt und im nukleotidfreien Zustand entweder dissoziiert vorliegt, oder eine andere Konformation annimmt, die zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen den Fluorophoren

führt oder es im zeitlichen Mittel weniger oft zur Dimerisierung führt. Desweiteren ist der Anstieg des Akzeptormaximums nicht sehr prägnant und liegt nicht weit über dem geschätzten Fehlerbereich von $\pm 0,02$ w.E..

Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei der Zugabe von 2 mM GMPPNP (Abbildung 4.7c). Das Maximum der Akzeptorfluoreszenz steigt geringfügig von 0,51 w.E. auf 0,54 w.E., das Binden des GTP-Analogen GMPPNP scheint demnach ebenfalls eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine dimerisierte Konformation hervorzurufen.

In Abbildung 4.7e ist das rot gestrichelte Fluoreszenzspektrum aufgenommen, nachdem zum Protein Aluminiumfluorid in einer finalen Konzentration von 10 mM gegeben ist. Aluminiumfluorid kann mit GDP einen Komplex eingehen, der strukturell einem Zustand während der Hydrolyse von GTP ähnelt (siehe hierzu Kapitel 3.4) [49]. Die FRET-Effizienz nimmt ab, denn das Akzeptormaximum fällt von 0,37 w.E. auf 0,33 w.E.. Die relativen Änderungen der Akzeptormaxima sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Um genauere Aussagen treffen zu können, werden Einzelmolekülfluoreszenzmessungen am markierten Protein in unterschiedlichen nukleotidgeladenen Zuständen durchgeführt. Die aus den Fluoreszenzintensitäten ermittelten FRET-Effizienzen sind in Abbildung 4.7 rechts jeweils in einem Histogramm dargestellt.

Für das GDP-gebundene Toc Homodimer aus Abbildung 4.7 ergibt sich das schon in in Abbildung 4.3b gezeigte FRET-Histogramm das sich mit zwei Gaußverteilungen anpassen lässt (schwarze, gestrichelte Linien), deren Maxima bei einer FRET-Effizienz von 0,86 und 0,95 liegen und deren Summe als schwarze, durchgezogene Linie dargestellt ist. Die jeweiligen prozentualen Anteile an der gesamten FRET-Effizienz liegen bei 59% für die Population bei 0,86 und bei 41% für die bei einer Effizienz von 0,95 gefundene Population.

Abbildung 4.7d zeigt das Histogramm, welches bei FRET-Messungen am GMPPNP-gebundenen Dimer ermittelt wird. Um einen quantitativen Vergleich zur Messung am GDP-gebundenen Dimer durchführen zu können, wird die Veränderung der Populationen bei den FRET-Effizienzen 0,86 und 0,95 ermittelt. Hierzu wird das Histogramm mit zwei Gaußfunktionen angepasst, deren Maxima bei eben diesen FRET-Effizienzen liegen. Sie sind als gestrichelte schwarze Linien dargestellt, und es zeigt sich, dass ihre Summe (schwarze, durchgezogene Linie) die gesamte Effizienz sehr gut beschreibt. Für die Population bei 0,86 ergibt sich ein Anteil von 67% während die Population bei einer FRET-Effizienz von 0,95 einen Anteil von 33% einnimmt.

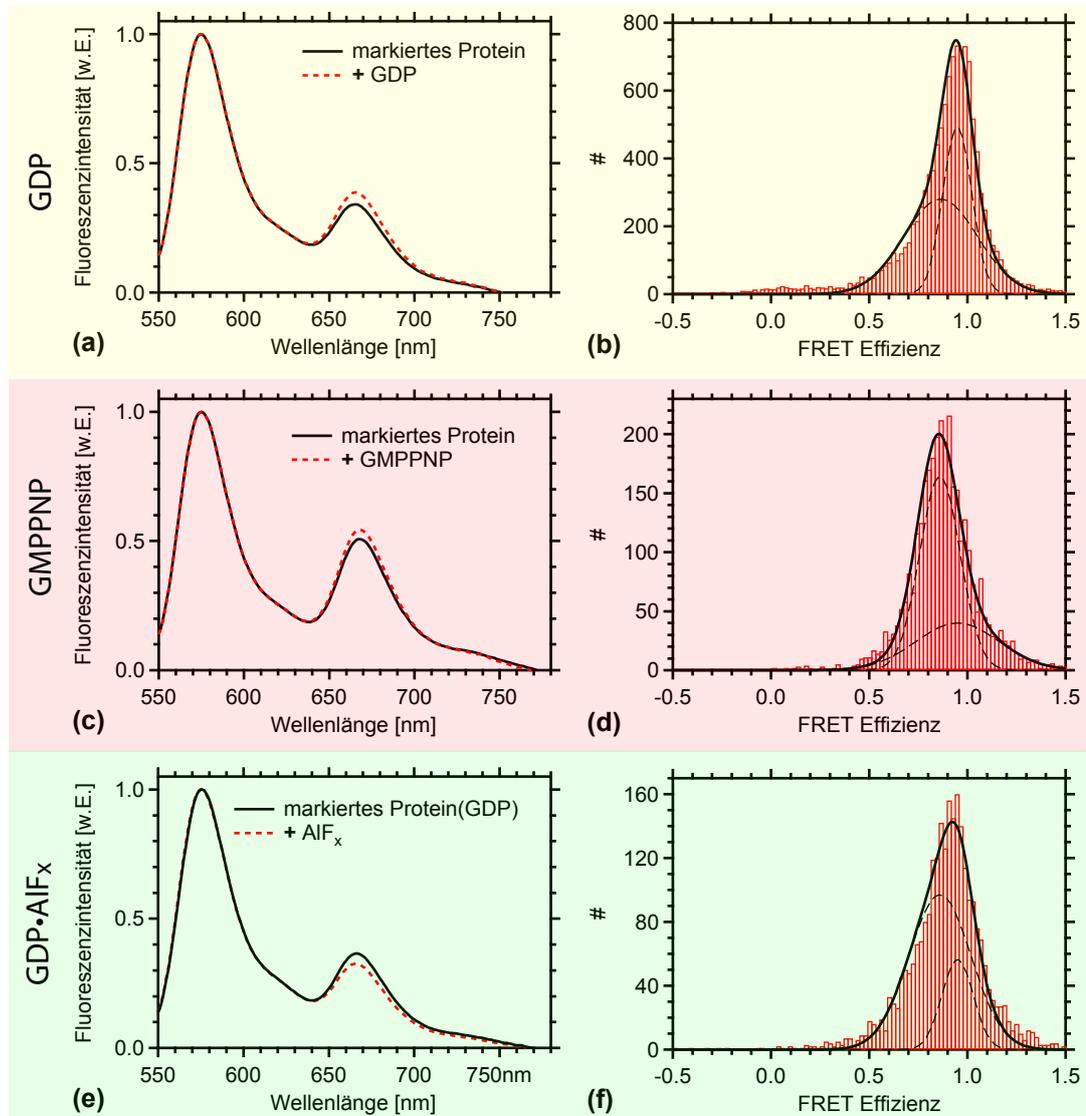


Abbildung 4.7 Einfluss des gebundenen Nukleotids links) Fluoreszenzspektren des markierten *psToc34_{SZ}V78C* Homodimers vor (schwarz) und nach (rot, gestrichelt) Zugabe von a) 1 mM GDP, c) 1 mM GMPPNP und e) 10 mM AIF_x. rechts) Histogramme der in Einzelmolekülmessungen ermittelten FRET-Effizienzen des markierten *psToc34_{SZ}V78C* Homodimers in Anwesenheit von b) GDP (äquimolar), d) GMPPNP (50 nM) und f) 10 mM AIF_x. Die FRET-Histogramme wurden jeweils mit zwei Zuständen angepasst deren Maxima bei 0,86 und 0,95 liegen und als schwarze schwarze, gestrichelte Linien gekennzeichnet sind und deren Summe als schwarze, durchgezogene Linie eingezeichnet ist.

4.2 Einfluss der Nukleotide auf die Struktur des *psToc34* Homodimers

| Nukleotid | Akzeptorfluoreszenz [w.E.] | Prozentualer Anteil der FRET-Effizienz bei 0,86 | Prozentualer Anteil der FRET-Effizienz bei 0,95 |
|----------------------|-------------------------------|---|---|
| GDP | 0,34 → 0,39 | 59% | 41% |
| GMPPNP | 0,51 → 0,54 | 67% | 33% |
| GDP•AIF _x | 0,37 → 0,33 | 77% | 23% |

Tabelle 4.3 Änderungen der Akzeptorfluoreszenz induziert durch Nukleotidzugabe; Anteile der FRET-Effizienz für die zwei gefundenen Populationen bei 0,86 und 0,95 an der gesamten FRET-Effizienz für unterschiedliche nukleotidgebundene *psToc34* Zustände.

Auch das FRET-Histogramm für das mit GDP•AIF_x geladene *psToc34* Homodimer in Abbildung 4.7f lässt sich gut durch die Summe (schwarze, durchgezogene Linie) aus zwei Gaußverteilungen (schwarze, gestrichelte Linien) bei den beiden FRET-Effizienz von 0,86 und 0,95 beschreiben. Unter der Gaußkurve bei 0,86 befindet sich ein Anteil von 77% an der gesamten FRET-Effizienz und entsprechend ist der Zustand bei 0,95 nur noch zu 23% bevölkert. Alle genannten FRET-Effizienzen mit ihren prozentualen Verteilungen auf die zwei beschriebenen Zustände sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einer Bestimmung der FRET-Effizienzen von einem geschätzten systematischen Fehler von 0,1 ausgegangen werden muss. Die gemessenen Effizienzen unterscheiden sich zwar nicht signifikant voneinander, jedoch ist eine Tendenz für eine etwas „geöffneter“ Konformation des GDP•AIF_x gebundenen *psToc34* Homodimers zu erkennen. Gerade die Ensemblemessungen unterstreichen diese Beobachtung, auch hier liegen die Änderungen nur knapp über dem geschätzten Fehler von $\pm 0,02$ w.E., jedoch wird nur im Fall von GDP•AIF_x reproduzierbar eine verringerte Akzeptorfluoreszenz detektiert. Anzumerken ist, dass auch hier keine Dynamik innerhalb der Einzelmolekül-FRET-Kurven zu beobachten ist, sie ähneln prinzipiell der in Abbildung 4.2 unten gezeigten FRET-Kurve.

4.3 Einfluss des Transitpeptids auf die Struktur des *psToc34* Homodimers

Es wird weitgehend angenommen, dass Toc34 ein Rezeptor für Vorstufenproteine ist [18]. In Oreb *et al.* [27] wurde gezeigt, dass diese Vorstufenproteine einen Einfluss auf die Dimerisierung des *psToc34* haben. Sie trennen das Dimer auf und beschleunigen dadurch einen Nukleotidaustausch. In Abschnitt 4.1 wurde bereits gezeigt, dass für monomeres *psToc34V78C* höhere k_{on} Raten für das Binden von mantGMPPNP erreicht werden als für das Binden an den artifiziellen Dimer *psToc34_{SZ}V78C*. Nun soll in diesem Abschnitt untersucht werden, welchen Einfluss das in Oreb *et al.* [27] genutzte Transitpeptid (siehe Abschnitt 3.3) auf die mit unterschiedlichen Nukleotiden gebundenen *psToc34* Homodimere hat.

In Abbildung 4.8 sind Fluoreszenzspektren des markierten *psToc34_{SZ}V78C* bei jeweils unterschiedlichen Nukleotidbedingungen bzw. in An- oder Abwesenheit von Transitpeptid gezeigt. Alle Spektren sind bei einer Proteinkonzentration von 5 μ M aufgenommen, die hinzupipettierten Nukleotide GDP und GMPPNP haben final eine Konzentration von 2 mM, für die Messungen mit Aluminiumfluorid ergibt sich eine 10 mM Aluminiumfluoridkonzentration und nach Zugabe des Transitpeptids liegt eine 1 mM Konzentration hiervon vor.

Bei den auf der linken Seite dargestellten Spektren wird zunächst das Spektrum des nukleotidgebundenen Proteins gezeigt (schwarze, durchgezogene Linie), bevor die Zugabe von Transitpeptid erfolgt und anschließend erneut ein Spektrum aufgenommen wird (rote, gestrichelte Linie). Bei den Spektren auf der rechten Seite wird zum (größtenteils GDP gebundenen) *psToc34* Dimer zunächst Transitpeptid gegeben und ein Spektrum ermittelt (schwarze, durchgezogene Linie) bevor anschließend die Nukleotide hinzu pipettiert und ein zweites Fluoreszenzspektrum (rote, gestrichelte Linie) gemessen wird.

Abbildung 4.8a zeigt deutlich, dass nach Zugabe von Transitpeptid zum GDP gebundenen *psToc34* Dimer die FRET-Effizienz sinkt. Das Akzeptormaximum fällt von 0,39 w.E. auf 0,23 w.E., was mit dem Dissoziieren des Dimers erklärt werden kann. Um zu prüfen, ob die Zugabe von GDP im Überschuss ein erneutes Dimerisieren hervorrufen kann, wird in Abbildung 4.8b dem (größtenteils GDP gebundenen) *psToc34* Dimer zunächst Transitpeptid angeboten und anschließend GDP hinzu pipettiert. Ein Unterschied zwischen beiden Spektren ist nicht erkennbar. Das Akzeptormaximum steigt erst in der vierten Nachkommastelle, was bei einem geschätzten Fehler von $\pm 0,02$ zu vernachlässigen ist.

4.3 Einfluss des Transitpeptids auf die Struktur des *psToc34* Homodimers

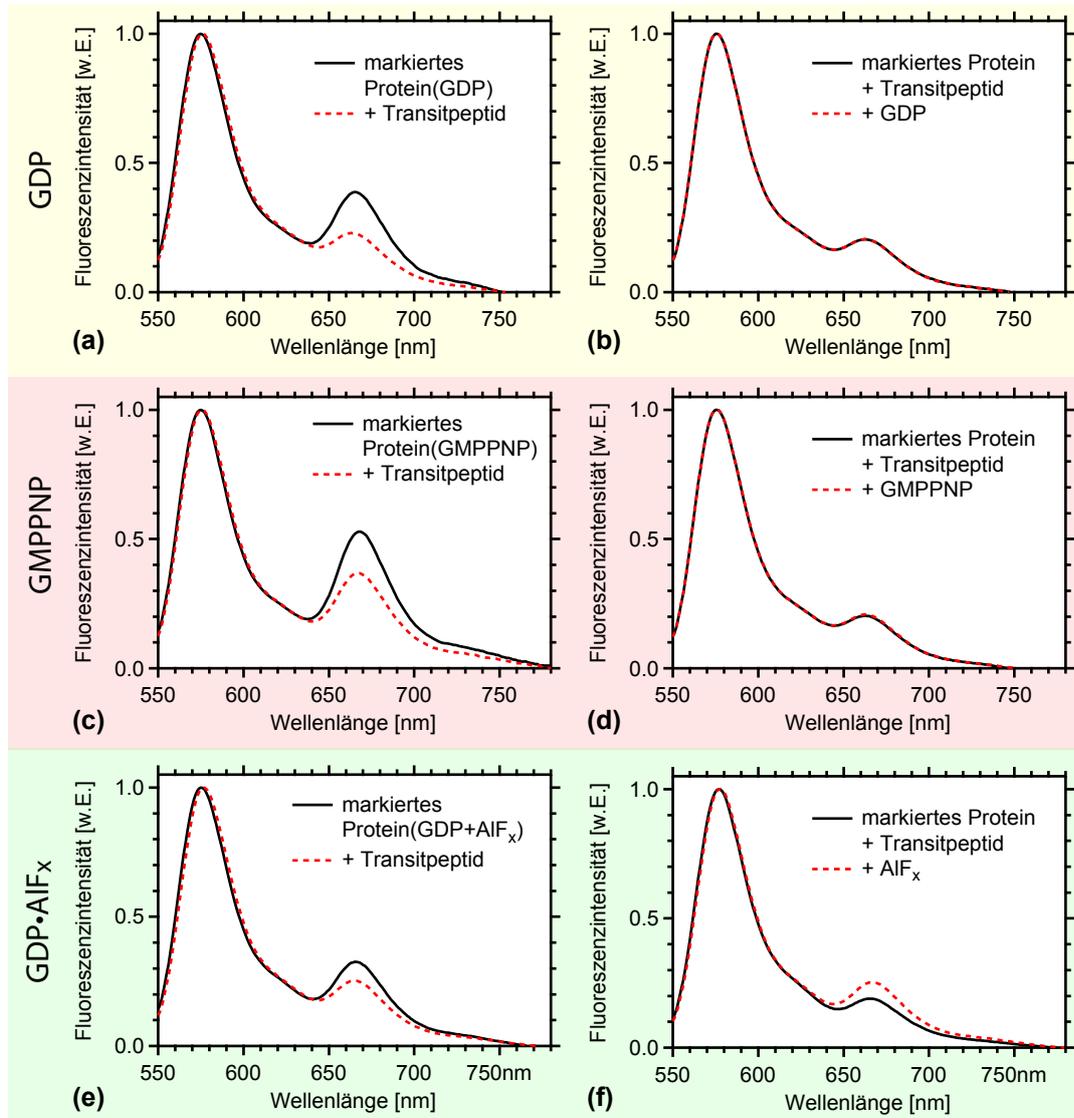


Abbildung 4.8 Dargestellt sind jeweils zwei am fluoreszenzmarkierten *psToc34* Homodimer ermittelten Fluoreszenzspektren die gemessen werden, bevor (schwarz) und nachdem (rot, gestrichelt) Transitpeptid (links) oder Nukleotid (rechts) hinzugegeben wird. Die entsprechende Zugabe findet in Anwesenheit von Nukleotid (links) bzw. in Anwesenheit von Transitpeptid (rechts) statt. Bei allen Spektren wurde die maximale Donorintensität auf Eins normiert. Finale Konzentrationen: *psToc34* 5 μ M, Transitpeptid 1 mM, **b)** GDP 1 mM, **c)** und **d)** GMPPNP, 1 mM, **e)** und **f)** AIF_x, 10 mM.

Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei den Messungen mit GMPPNP. In Abbildung 4.8c ist zu erkennen, dass die Akzeptorintensität im Maximum von 0,54 w.E. auf 0,37 w.E. fällt. Das GMPPNP gebundene Dimer lässt sich also ebenfalls durch Zugabe von Transitpeptid öffnen. Abbildung 4.8d zeigt keinen Unterschied zwischen den Spektren des (größtenteils GDP gebundenen) *psToc34* Dimer, dem bereits Transitpeptid zugegeben ist, und dem Spektrum nach Zugabe von GMPPNP. Das Akzeptormaximum steigt in der dritten Nachkommastelle von 0,203 w.E. auf 0,209 w.E. Auch hier kann also durch Zugabe von Nukleotid im Überschuss kein Anstieg beobachtet werden.

Anders verhält es sich jedoch, wenn diese Untersuchungen mit Aluminiumfluorid durchgeführt werden. Zunächst lässt sich in Abbildung 4.8e ebenfalls ein Rückgang des Akzeptormaximums von 0,33 w.E. auf 0,25 w.E. beobachten, wenn Transitpeptid zum $\text{GDP}\bullet\text{AlF}_x$ gebundenen *psToc34* Dimer gegeben wird. Wird die Reihenfolge jedoch vertauscht, so ist zu erkennen, dass das (größtenteils GDP gebundene) Dimer, welches zuvor mit Transitpeptid inkubiert wird, eine im Mittel höhere FRET-Effizienz aufweist, wenn Aluminiumfluorid hinzupipettiert wird. Das Akzeptormaximum steigt von 0,19 w.E. auf 0,25 w.E.. Aluminiumfluorid bringt das Dimer also im zeitlichen Mittel in einen etwas geschlosseneren Zustand. Die genannten Intensitätsänderungen der Akzeptorfluoreszenz sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Ein weiteres sehr interessantes Verhalten zeigt das $\text{GDP}\bullet\text{AlF}_x$ gebundene Dimer in Bezug auf die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Transitpeptid. Abbildung 4.9 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzmaxima des Donors (schwarz) und des Akzeptors (rot) kurz vor und nach Zugabe von Transitpeptid (links) bzw. Nukleotid (rechts). Die Zugabe erfolgt außerhalb des Fluoreszenzspektrometers, weshalb zu diesem Zeitpunkt keine Messdaten gezeigt sind (zumeist nach circa 20 Sekunden). Die Fluoreszenzverläufe in Abbildung 4.9a sind gemessen, nachdem das in Abbildung 4.8a schwarz markierte Spektrum gemessen wurde und bevor das rot gestrichelte Spektrum gemessen ist. Entsprechend verhält es sich für die in Abbildung 4.9b bis f gezeigten Zeitverläufe.

Während für die gezeigten Fluoreszenzverläufe in Abbildung 4.9a bis d und f die Änderung der Fluoreszenzintensitäten der Donor- und Akzeptormaxima nahezu sofort nach Zugabe von Transitpeptid bzw. Nukleotid beobachtet werden kann, zeigt sich für die in Abbildung 4.9e gezeigten Fluoreszenzverläufe eine verzögerte Änderung. Erst ab etwa 200 Sekunden bleiben die Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor konstant. Die durch Transitpeptid induzierte Änderung, die für alle drei nukleotidegebundenen Zustände beobachtet wird, ist also im $\text{GDP}\bullet\text{AlF}_x$ gebundenen Zustand, bzw. in Anwesenheit von Aluminiumfluorid stark verzögert.

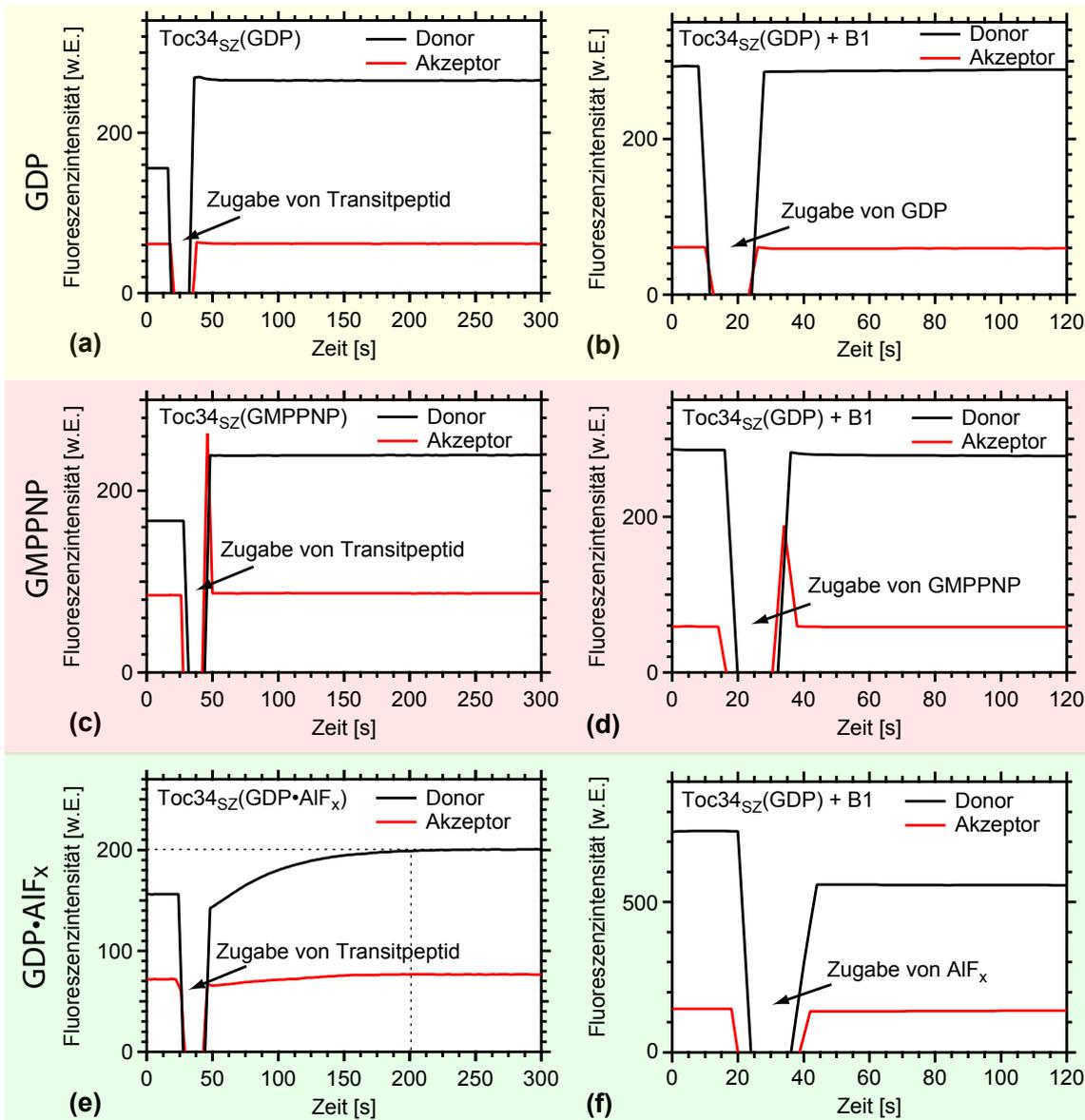


Abbildung 4.9 Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzmaxima von Donor (schwarz) und Akzeptor (rot) des fluoreszenzmarkierten *psToc34* Homodimers bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm. **links**) vor und nach Zugabe von Transitpeptid in Anwesenheit der entsprechenden Nukleotide und **rechts**) vor und nach Zugabe von Nukleotid in Anwesenheit von Transitpeptid. Die Fluoreszenzverläufe wurden zwischen den jeweils zwei in Abbildung 4.8 gezeigten Spektren gemessen. Finale Konzentrationen: *psToc34* 5 μ M, Transitpeptid 1 mM, **b**) GDP 1 mM, **c**) und **d**) GMPPNP, 1 mM, **e**) und **f**) AIF_x, 10 mM.

| Nukleotid | Akzeptorfluoreszenz [w.E.] [Toc+Nukleotid]+Transitpeptid | Akzeptorfluoreszenz [w.E.] [Toc34+Transitpeptid]+Nukleotid |
|----------------------|---|---|
| GDP | 0,39 → 0,23 | 0,2049 → 0,2051 |
| GMPPNP | 0,54 → 0,37 | 0,203 → 0,209 |
| GDP•AIF _x | 0,33 → 0,25 | 0,19 → 0,25 |

Tabelle 4.4 Änderungen der Akzeptorfluoreszenz für unterschiedlich gewählte Nukleotid-Transitpeptid Kombinationen. zweiten Spalte: Änderungen des Akzeptormaximums, die durch Zugabe von Transitpeptid zum nukleotidgebundenen Protein hervorgerufen werden; dritte Spalte: Änderungen, induziert durch die Zugabe des Nukleotids zum mit Transitpeptid inkubierten Protein. Konzentrationen: Protein 5 μ M; Transitpeptid 1 mM; GMPPNP und GDP jeweils 2 mM, AIF_x 10 mM.

Nachdem in den Ensemblemessungen festgestellt wird, dass die Zugabe von Transitpeptid einen im zeitlichen Mittel größeren Abstand zwischen den Fluorophoren hervorruft, werden Einzelmolekülfluoreszenzmessungen an (größtenteils) GDP gebundenen und GDP•AIF_x (AIF_x 10 nM) gebundenen *psToc34_{SZ}V78C* durchgeführt, die eben dieses Verhalten genauer charakterisieren sollen. Bei diesen Messungen wird das Transitpeptid in einer 0,1 mM Konzentration dem Messvolumen hinzugefügt. Abbildung 4.10a zeigt das ermittelte FRET-Histogramm der Messungen am GDP gebundenen Protein in Anwesenheit von Transitpeptid. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Verbreiterung zu kleinen FRET-Effizienzen hin stattgefunden hat, die Fluoreszenzfarbstoffe und damit die einzelnen Protomere also einen größeren Abstand zueinander einnehmen, was in Einklang mit den Ergebnissen der Ensemblemessungen steht. Das Anpassen der FRET-Effizienzen mit nur zwei Gaußverteilungen bei 0,86 und 0,95 ist mit einem nicht zufriedenstellend gelungen, ein χ^2_{red} -Test ergibt einen Wert von 13,0, im Vergleich hierzu ergibt sich ein Wert von nur 3,72 beim berücksichtigen einer dritten „Population“. Sie hat ihr Effizienzmaximum bei 0,74 und eine außergewöhnlich große Halbwertsbreite von FWHM = 0,5, die allerdings dadurch erklärt werden kann, dass die dritte Population alle möglichen offenen Zustände beschreibt. Die Summe (schwarze, durchgezogene Linie) dieser drei Gaußverteilungen (schwarze, gestrichelte Linien) stellt eine sehr gute Beschreibung der Gesamteffizienz dar. Anzumerken ist, dass jedoch auch hier keine ausgeprägte Dynamik in den Fluoreszenzintensitäten beobachtet wird. Der jeweilige Anteil der FRET-Effizienzen für die Populationen bei den FRET-Effizienzen um 0,74, 0,86 und 0,95 beträgt 56%, 34% und 10%, was in Tabelle 4.5 noch einmal zusammengestellt ist. In Abbildung 4.10b sind die FRET-Effizienzen dargestellt, die am GDP•AIF_x (AIF_x 10 nM) gebundenen *psToc34* Homodimer in Anwesenheit von Transitpeptid ermittelt werden. Deutlich zu erkennen ist eine weitere Verbreiterung des Histogramms zu niedrigeren FRET-Effizienzen. Bei den FRET-Effizienzen um

0,65 und 0,86 fallen zwei Maxima auf.

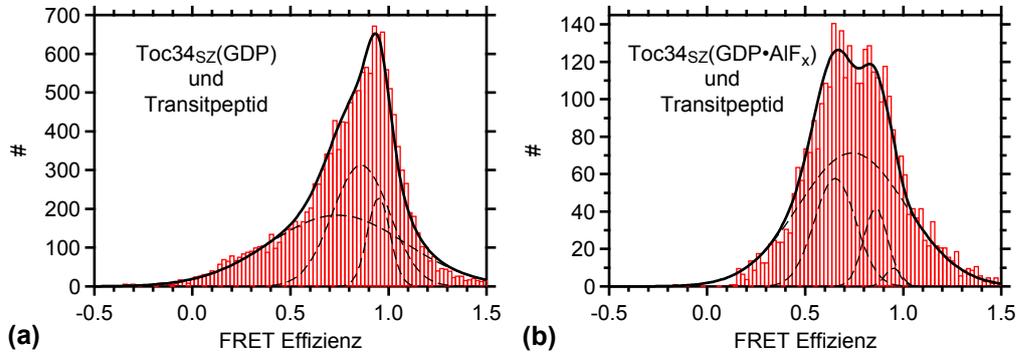


Abbildung 4.10 Histogramme der in Einzelmolekülmessungen ermittelten FRET-Effizienzen des fluoreszenzmarkierten *psToc34_{SZ}V78C* in Anwesenheit von Transitpeptid (100 μ M) **a**) im GDP gebundenen Zustand und **b**) in Anwesenheit von AlF_x 10 nM. Die vier Gauß-Verteilungen sind als schwarze, gestrichelte Linien gekennzeichnet, ihre Summe als schwarze, durchgezogene Linie, näheres hierzu im Text.

Um zu testen, ob eines dieses Maxima nur durch eine einzige Kurve, also ein einziges Donor-Akzeptor Paar hervorgerufen wird und damit möglicherweise ein Artefakt ist, werden die FRET-Effizienzen jedes einzelnen Donor-Akzeptor Paares farblich unterschiedlich markiert und in zwei weiteren Diagrammen gezeigt. Die Auswahl der Kurven erfolgt zufällig. Es sind insgesamt 20 Kurven, die ersten zehn sind in Abbildung 4.11a dargestellt, die anderen in 4.11b. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind sie in zwei verschiedenen Histogrammen dargestellt, da sonst einzelne Farben sehr viel schlechter als zusammenhängende Flächen wahrgenommen werden können. Gerade in Abbildung 4.11b ist deutlich zu erkennen, dass es sich erstens um jeweils mehrerer Messkurven handelt, die zur Ausprägung der beiden Maxima führen und sich zweitens circa die Hälfte der Kurven explizit einem der Maxima zuordnen lassen können. Aus diesem Grund wird zum Anpassen der FRET-Effizienzen in Abbildung 4.10b eine vierte Population hinzugefügt, deren Effizienzmaximum bei einer FRET-Effizienz von 0,65 gefunden wird. Die vier Gauß-Verteilungen (schwarze, gestrichelte Linien) und ihre Summe (schwarze, durchgezogene Linie) sind eingezeichnet. Zu erkennen ist, dass die Gauß-Verteilung um die FRET-Effizienz von 0,96 nur einen sehr geringen Anteil an allen ermittelten Effizienzen annimmt (nur 1,5%), weshalb diese Population zwar nicht überbewertet werden soll, es sich hierbei aber auch nicht um ein Artefakt handelt. Trotzdem könnte das Histogramm ebenso gut mit nur drei Verteilungen um 0,65, 0,74 und 0,86 angepasst werden. Aus bioche-

| Nukleotid | Prozentualer Anteil der FRET-Effizienz | | | |
|----------------------|--|----------|----------|----------|
| | bei 0,65 | bei 0,74 | bei 0,86 | bei 0,95 |
| GDP | – | 56% | 34% | 10% |
| GDP•AIF _x | 20% | 70% | 8,5% | 1,5% |

Tabelle 4.5 Anteile der FRET-Effizienz für die drei (GDP) bzw. vier (GDP•AIF_x) gefundenen Populationen bei 0,65, 0,74, 0,86 und 0,95 an der gesamten FRET-Effizienz.

mischer Sicht ist jedoch zu erwarten, dass diese Population auch weiterhin vorhanden ist. Die prozentuale Verteilung der Anteile der einzelnen Populationen ist in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

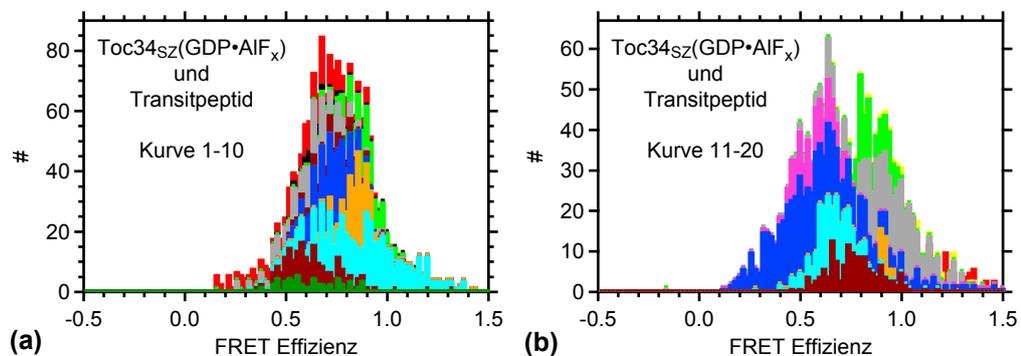


Abbildung 4.11 Darstellung der in Abbildung 4.10b gezeigten FRET-Effizienzen mit einem jeweils eigenen Farbcode für jede einzelne FRET-Effizienzkurve eines Donor-Akzeptorpaares. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Effizienzen (zufällig) auf zwei Histogramme verteilt.

4.4 Einfluss der Nukleotide auf die Bindung des Transitpeptids

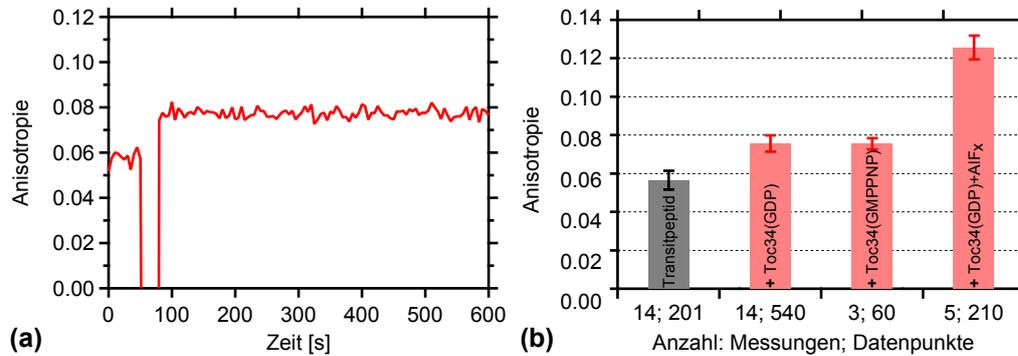


Abbildung 4.12 a) Anisotropie des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids (10 μM , davon 1% mit ATTO 550 markiert; 0 bis 50 Sekunden: vor Zugabe von Protein; 50-80 Sekunden: Zugabe von Protein; ab 80 Sekunden: nach Zugabe von größtenteils GDP gebundenem *psToc34_{SZ}* (10 μM). Die Anisotropie steigt von $r = 0,058 \pm 0,0031$ auf $r = 0,077 \pm 0,0021$. **b)** Balkendiagramm mit den ermittelten Anisotropien des ungebundenen Transitpeptids und des Transitpeptids in Anwesenheit des *psToc34* Homodimers in unterschiedlichen Nukleotid gebundenen Zuständen.

Sowohl aus den Ensemblemessungen als auch aus den Einzelmolekülmessungen im vorangegangenen Kapitel geht hervor, dass die Anwesenheit von Transitpeptid zu einer geöffneten Konformation des artifiziiellen Dimers *psToc34_{SZ}* führt. In diesem Abschnitt soll überprüft werden, inwiefern die Bindung des Transitpeptids vom Nukleotid-Zustand des Dimers beeinträchtigt wird. Hierzu werden Fluoreszenzanisotropiemessungen am fluoreszenzmarkierten Transitpeptid durchgeführt, welches mit dem Farbstoff ATTO 550 markiert ist. Mit Hilfe dieser Messmethode können Aussagen über die Beweglichkeit von Fluorophoren und damit vom Transitpeptid gemacht werden (siehe Kapitel 2.2. Beispielhaft ist in Abbildung 4.12a eine solche Anisotropiemesskurve gezeigt. Zunächst wird in den ersten 50 Sekunden die Anisotropie des frei beweglichen fluoreszenzmarkierten Transitpeptids (10 μM , davon 1% fluoreszenzmarkiert) bestimmt, welche bei einem Wert von $r = 0,058 \pm 0,0031$ liegt. In den nächsten 30 Sekunden wird das *psToc34* Homodimer hinzu pipettiert (10 μM). Da dies außerhalb des Spektrofluorimeters durchgeführt wird, liegen für diesen Zeitraum keine Daten vor. Ab einer Zeit von circa 80 Sekunden wird die Anisotropie des Transitpeptids in Anwesenheit von (größtenteils GDP gebundenem) *psToc34* Homodimer gemessen. Es ist zu erkennen, dass sich bereits ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und ungebundenem Transitpeptid eingestellt

| Transitpeptid +... | Anisotropie |
|--------------------------------|--------------------|
| - | $0,057 \pm 0,0049$ |
| ...Toc34(GDP) | $0,076 \pm 0,0043$ |
| ...Toc34(GMPPNP) | $0,075 \pm 0,0030$ |
| ...Toc34(GDP) + AlF_x | $0,127 \pm 0,0062$ |

Tabelle 4.6 Anisotropie des Transitpeptids in Abhängigkeit vom Nukleotid-Zustand des *psToc34* Homodimers.

hat, da für den restlichen Zeitraum eine konstante Anisotropie von $r = 0,077 \pm 0,0021$ beobachtet wird. Diese Messung wird mehrfach durchgeführt mit GDP-, GMPPNP und $\text{GDP} \bullet \text{AlF}_x$ (AlF_x 10 nM) gebundenem *psToc34* Homodimer. Die Nukleotide waren hier jeweils im Überschuss vorhanden. Alle ermittelten Anisotropien sind im Balkendiagramm in Abbildung 4.12b dargestellt. Sowohl die Anzahl der Messungen als auch die Anzahl der Datenpunkte zur Ermittlung der Anisotropie ist jeweils angegeben und die ermittelten Werte der Anisotropie sind in Tabelle 4.6 zusammengestellt.

Für die Messungen an GDP- und GMPPNP gebundenen Protein ergeben sich Anisotropien von $r = 0,75$ und $r = 0,76$, womit im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied detektiert werden kann, das heißt die Dissoziationskonstante ist in beiden Fällen die gleiche. Anders verhält es sich bei der Zugabe von Aluminiumfluorid. Hier steigt die Anisotropie auf $r = 0,127$, was sich deutlich von den vorher gemessenen Anisotropien unterscheidet.

Um die Dissoziationskonstante des Transitpeptids zu bestimmen, werden Titrationsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4.13a gezeigt sind. Hier wird die Anisotropie des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids in unterschiedlichen Konzentrationen in Anwesenheit von je 10 μM GDP gebundenem (rot) und $\text{GDP} \bullet \text{AlF}_x$ gebundenem (grün) Dimer gemessen. Zum Vergleich ist die Anisotropie des ungebundenen Transitpeptids (schwarz) gezeigt, welche wie erwartet konzentrationsunabhängig ist und eine mittlere Anisotropie von $r = 0,055$ erreicht. Die Messdaten sind mit Gleichung 3.17 angepasst und es ergibt sich für das Binden an das GDP gebundene Toc34 Homodimer eine Dissoziationskonstante von $K_D = 30 \pm 8,5 \mu\text{M}$ und für das Binden an das $\text{GDP} \bullet \text{AlF}_x$ gebundene Dimer eine Dissoziationskonstante von $K_D = 18 \pm 8,9 \mu\text{M}$. Beim Anpassen der Anisotropie ist die Randbedingung $r(c_{\text{TP}} \rightarrow \infty) = 0.055$ gewählt. Es ist gut zu erkennen, dass der am $\text{GDP} \bullet \text{AlF}_x$ gebundenen Dimer ermittelte Fit mit einem großen Fehler behaftet ist. Ein χ^2_{red} -Test liefert einen Wert von 2,56. Sehr deutlich zu sehen ist dies für die Anisotropie bei 50 und 100 μM . Diese Datenpunkte liegen weit oberhalb der grün dargestellten Fitfunktion. Das liegt wahrscheinlich

darin begründet, dass sich bei den Messungen in Anwesenheit von Aluminiumfluorid (bei hohen Transitpeptidkonzentrationen) Aggregate bilden. Eine Aggregatbildung wirkt sich auf zwei verschiedene Weisen auf die ermittelte Anisotropie aus. Beide bewirken einen Anstieg der Anisotropie. Erstens führt sie zu einer verlangsamten Rotationsdiffusion des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids und damit zu einer erhöhten Anisotropie. Zweitens sedimentieren Aggregate und verlassen damit das Messvolumen der Küvette, was zu einer geringeren Konzentration der Fluorophore im Messvolumen führt und damit zu einer Anisotropie, welche einer geringeren Konzentration zuzuordnen wäre, in diesem Fall also einer höheren Anisotropie. Bei Vernachlässigung der Datenpunkte bei 50 und 100 μM Transitpeptid ergibt sich der in Abbildung 4.13b grün gestrichelt dargestellte Fit mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 8,4 \pm 3,6 \mu\text{M}$. Ein hier durchgeführter χ^2_{red} -Test liefert einen besseren Wert von 1,72. Die Randbedingung bleibt mit $r(c_{TP} \rightarrow \infty) = 0.055$ erhalten. Während die Standardabweichung einer einzelnen Messkurve teilweise bei lediglich ± 0.0001 liegt, zeigt eine Wiederholung der Messung einen sehr viel größeren systematischen Fehler, weshalb allen Messpunkten der größte ermittelte Fehler der jeweiligen Messreihe zugeordnet wird.

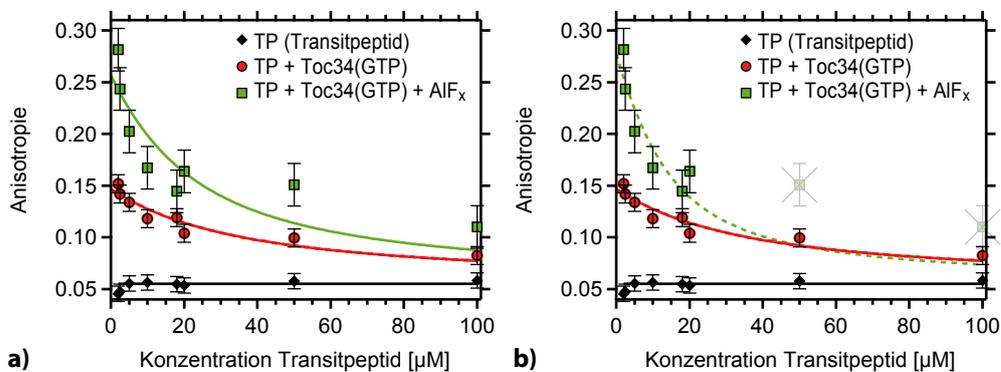


Abbildung 4.13 Titrationen zur Anisotropie des Transitpeptids: Konzentrationsunabhängige Anisotropie des ungebundenen Transitpeptids (schwarz) **a)** Anisotropie des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids in unterschiedlichen Konzentrationen in Anwesenheit von GDP gebundenem (rot) und GDP•AlF_x gebundenem (grün) Dimer, mit jeweils nach Gleichung 3.17 berechnetem Fit. **b)** Der grün gestrichelt dargestellte Fit ergibt sich bei Vernachlässigung der Datenpunkte bei 50 und 100 μM Transitpeptid.

4.5 Ensemble FRET-Messung am *psToc34-Toc159* Heterodimer

In Becker *et al.* [31] wurde vorgeschlagen, dass die Proteine *psToc159* und *psToc34* einen funktionalen Heterodimer ausbilden. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen soll deshalb untersucht werden, ob ein Heterodimer tatsächlich beobachtbar ist. Hierfür wird die G-Domäne des *psToc159* mit ATTO 647N (10 μ M) markiert und zunächst das Fluoreszenzspektrum dieses markierten Proteins bei Donoranregung gemessen. Das Spektrum ist in Abbildung 4.14a schwarz dargestellt. Hiermit wird lediglich getestet, wie stark der Akzeptor von selbst fluoresziert, ohne dass ein Energietransfer dafür nötig ist. Das rot gestrichelte Spektrum wird gemessen, nachdem die in Abbildung 4.14b dargestellte Messung durchgeführt wurde. Im Folgenden wird der in Abbildung 4.14b dargestellte Fluoreszenzzeitverlauf aufgenommen. Während der gesamten Zeit wird mit einer Wellenlänge von 532 nm die Fluoreszenz angeregt, wobei abwechselnd die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Maximums von Donor (schwarz, 574 nm) und Akzeptor (rot, 665 nm) detektiert wird. In den ersten 20 Sekunden befindet sich lediglich der *psToc159* (Akzeptor, rot) im Messvolumen. Zwischen circa 20 und 40 Sekunden wird der fluoreszenzmarkierte *psToc34_{SZ}* (final 8 μ M Protein, 2 μ M ATTO 550) zum *psToc159* hinzu pipettiert. Die Fluoreszenzintensität des Donors steigt schlagartig auf etwa 280 w.E. und die des Akzeptors ist bereits gestiegen, obwohl durch die Proteinzugabe sogar eine Konzentrationsverringerung stattgefunden hat, weshalb eine geringere Fluoreszenzintensität zu erwarten wäre, wenn kein Energietransfer stattfinden würde. Im weiteren Verlauf steigt die Fluoreszenz des Akzeptors sogar noch an, während die des Donors fällt. Dies kann erklärt werden durch eine Bindungskinetik zwischen dem *psToc159* und dem *psToc34_{SZ}*, was umso erstaunlicher ist, da der *psToc34* selbst seine homodimere Struktur dafür aufgeben muss. Nachdem eine konstante Intensität für die Akzeptor- und Donorfluoreszenz erreicht ist, wird erneut ein Spektrum gemessen, welches in 4.14a rot gestrichelt dargestellt ist. Im Vergleich zum zuvor gemessenen Spektrum ist erwartungsgemäß ein Donorfluoreszenzmaximum hinzugekommen und das Akzeptormaximum hat (trotz einer Verdünnung der Konzentration von 10 μ M auf 7,5 μ M durch die Zugabe des *psToc34*) an Intensität sogar noch zugenommen. Ein direkter Vergleich der Akzeptorintensitäten ist jedoch nicht quantifizierbar, da bei jedem Pipettiervorgang aufgrund der Adhäsion Proteine unspezifisch an der Pipettenspitze kleben bleiben, weshalb sich die Konzentration zwar geringfügig jedoch nicht vernachlässigbar verändert.

Desweiteren wird untersucht, ob sich durch die Zugabe von GMPPNP eine Veränderung der

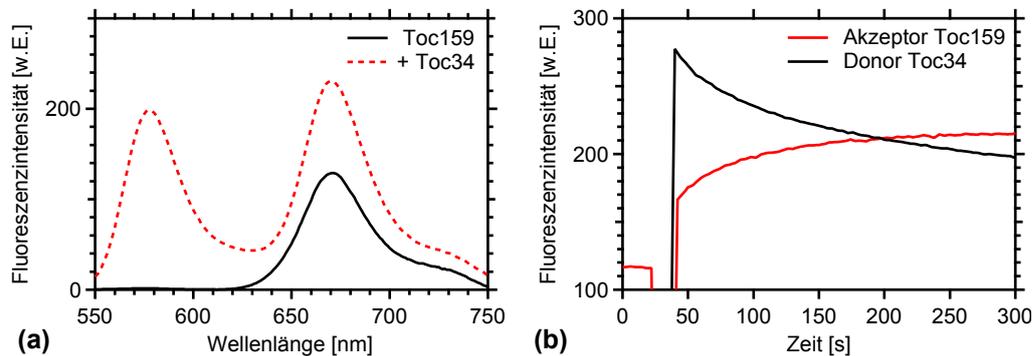


Abbildung 4.14 a) Fluoreszenzspektrum (schwarz) der ATTO 647N markierten G-Domäne des *psToc159* (10 μM) angeregt mit 532 nm vor Zugabe von *psToc34*; Fluoreszenzspektrum (rot, gestrichelt) des zu 25% mit ATTO 550 markierten *psToc34_{SZ}* (8 μM) und der ATTO 647N markierten G-Domäne des *psToc159* (8 μM) **b)** Fluoreszenzintensitätszeitverlauf der Maxima von Donor- (schwarz) und Akzeptorfluoreszenz (rot) bei Anregung mit 532 nm; In den ersten 20 Sekunden ist die Fluoreszenz des mit Akzeptor markiertem *psToc159* zu beobachten, nach Zugabe (zwischen 20 und 40 Sekunden) von mit Donor markiertem *psToc34* steigt ab circa 40 Sekunden sowohl die Donor- als auch die Akzeptorintensität stark an. Im Verlauf der weiteren Messzeit ist ein Anstieg der FRET-Effizienz beobachtbar.

FRET-Effizienz hervorrufen lässt, also ob dies zu einer Dissoziation des Heterodimers oder zu einer gesteigerten Dimerisierung führt. Hierzu wird der in 4.14a und b vermessenen Probe GMPPNP (100 μM) hinzu gefügt und erneut ein Fluoreszenzspektrum gemessen, welches in Abbildung 4.15 rot gestrichelt und bei der maximalen Donorintensität auf Eins normiert abgebildet ist. Zum Vergleich ist auch das normierte Spektrum der Messung ohne GMPPNP gezeigt (schwarze, durchgezogene Linie). Es ist deutlich zu erkennen, dass beim Heterodimer die Zugabe von GMPPNP eine im zeitlichen Mittel erhöhte FRET-Effizienz hervorruft, was einem höheren Anteil an Dimeren oder einer noch engeren Konformation entspricht. Diese Eigenschaft kann am Homodimer nicht beobachtet werden (siehe Kapitel 4.2).

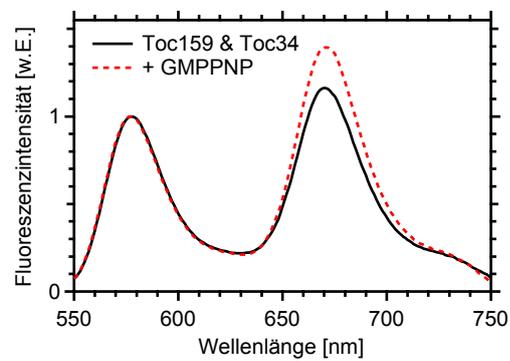


Abbildung 4.15 Fluoreszenzspektren vor (schwarzes Spektrum) und nach (rotes, gestricheltes Spektrum) Zugabe von GMPPNP (100 μM) Heterodimer zu ATTO 550 (2,5 μM) fluoreszenzmarkiertem *psToc34_{SZ}* (10 μM) und der ATTO 647N markierten GDomäne des *psToc159* (10 μM).

Kapitel 5

Diskussion

Seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur des *psToc34* in Sun *et al.* 2002 [26] wird darüber diskutiert, welche physiologische Rolle das homodimere Toc34 spielt. Im Folgenden wird ein aktuelles Modell des Proteinimportzyklus vorgestellt, an dem die Messdaten diskutiert werden. Die ermittelten Messergebnisse erlauben eine explizite Verifizierung der wesentlichen Schritte in diesem Modell und erlauben die Charakterisierung des GTP-Hydrolysezustandes des *psToc34*. Schließlich wird eine Heterodimerisierung zwischen *psToc34* und *psToc159* diskutiert.

5.1 Ein aktuelles Modell zum Proteinimport

In Abbildung 5.1 ist ein aktuelles Modell vorgestellt, in dem das Zusammenspiel zwischen Toc34 und Toc159 in ihrem jeweiligen GTPase Zyklus dargestellt ist [63]. Die einzelnen Schritte in diesem Zyklus sind nummeriert, um die am Toc34 in Kapitel 4 vorgestellten Daten in diesen Zyklus einordnen zu können. Die Position des ersten Schritts ist willkürlich gewählt, hier erfolgt die Dissoziation (1) des Heterodimers Toc34-Toc159, nach der Toc34 in einem monomeren GDP gebundenen Zustand vorliegt, bevor es zur Homodimerisierung (2) des GDP gebundenen Toc34 kommt. Das Binden des Vorstufenproteins (3) an das GDP gebundenen Dimer führt zur Dissoziation des Dimers (4). Im monomeren Zustand des Toc34 findet nun der Nukleotidaustausch (5) statt, hierbei wird GDP durch GTP ausgetauscht und es folgt eine Heterodimerisierung mit dem GTP gebundenen Toc159. Eine gegenseitige Stimulierung zur GTP Hydrolyse (6) mittels der sogenannten Argininfinger beider Proteine Toc34 und Toc159 führt zur Übergabe des Vorstufenproteins an die Translokationspore Toc75 (nicht eingezeichnet)

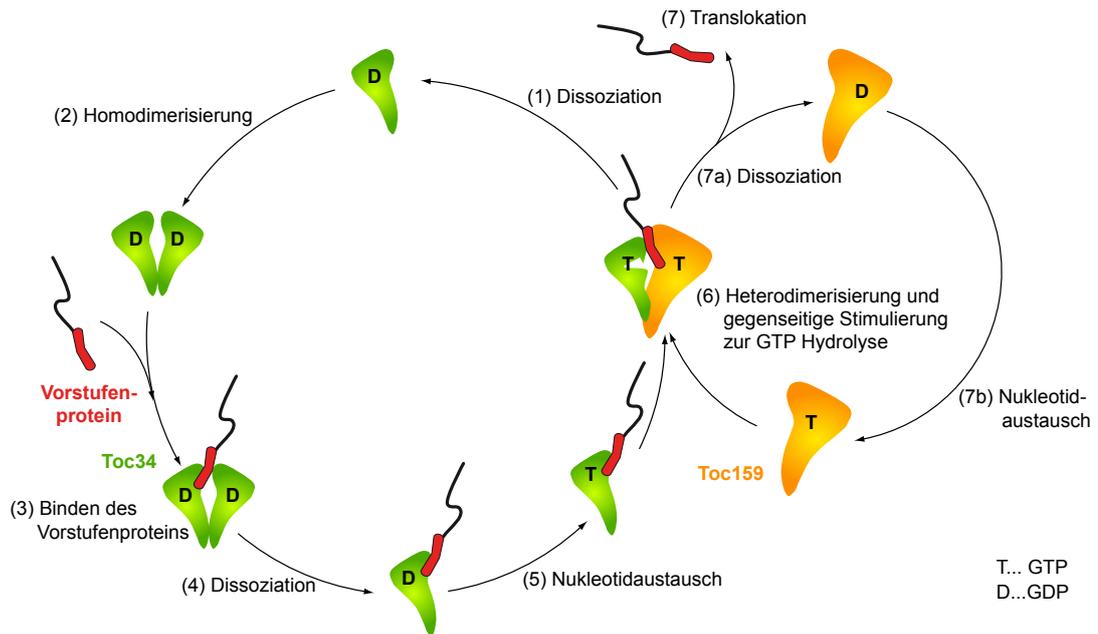


Abbildung 5.1 Vereinfachtes Modell des Toc34 GTPase Zyklus basierend auf [63]; (1) Dissoziation des Heterodimers zu monomeres GDP gebundenem Toc34 und GDP gebundenem Toc159; (2) Homodimerisierung des GDP gebundenen Toc34; (3) Binden des Vorstufenproteins an das GDP gebundene Toc34 Homodimer mit anschließender, dadurch induzierter (4) Dissoziation des Dimers; (5) Austausch von GDP durch GTP am Toc34; Heterodimerisierung von Toc34 und Toc159 mit anschließender gegenseitiger Stimulierung zur GTP-Hydrolyse (6) und einem dadurch hervorgerufenen Transfer (7) des Vorstufenproteins durch den Translokationskanal Toc75 (nicht eingezeichnet); Dissoziation des Heterodimers zu monomeres (1) Toc34 und (7a) Toc159; (7b) Austausch von GDP durch GTP am Toc159.

und hiermit zur Translokation des Vorstufenproteins (7) in den Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Hülle des Chloroplasten. Nach anschließender Dissoziation des Heterodimers (1 und 7a) in die entsprechenden Monomere folgt für den GDP gebundenen Toc159 ein Nukleotidaustausch mit GTP (7b) und für den GDP gebundenen Toc34 beginnt der Zyklus mit Schritt 1 von „vorne“.

5.2 Monomer oder Dimer, das ist hier die Frage

Wie einleitend bereits erwähnt, gibt es zum Toc34 konträre Meinungen bezüglich des Vorhandenseins eines Toc34 Dimers. So gibt es z.B. in Sveshnikova *et al.* [64] einen Modellzyklus ohne dimerisiertes Toc34. Auch in Jelic *et al.* [65] wird der Proteinimport ohne ein Toc34 Homodimer diskutiert. Jedoch wird seit einiger Zeit vermutet, dass für einige GTPasen eine

Dimerisierung essentiell für die Regulierung der GTP-Hydrolyse-Zyklen ist [12]. Erste Hinweise dafür, dass auch Toc34 zu dieser Familie gehört, konnten in Oreb *et al.* [27] gefunden werden. (Hier wurde gezeigt, dass für *at*Toc33 die Nukleotidbindetasche vermutlich an der Dimerisierungsgrenzfläche liegt.) Da die Dissoziationskonstante des GDP gebundenen Toc34 Dimers (ohne Membrananker!) auf $50 \pm 20 \mu\text{M}$ bestimmt wurde [25], was etwa sechs Größenordnungen zu hoch ist, um damit Einzelmolekülmessungen durchzuführen, wurden für diese Studie artifizielle Dimere hergestellt, wobei zwei Toc34 Proteine über ein „Spacer-Zipper“ Konstrukt zueinander in räumliche Nähe gebracht werden. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Messungen an den in Abschnitt 4.1 vorgestellten Cysteinmutanten des artifiziellen Toc34 Homodimers durchgeführt. In Abschnitt 4.1 wurde gezeigt, dass die gemessenen FRET-Effizienzen im Rahmen der Messgenauigkeit mit denen übereinstimmen, die anhand der aus der Kristallstruktur (siehe Abbildung 4.1) ermittelten Abständen berechnet werden. Die Ergebnisse stützen somit die Vermutung, dass Toc34 auch *in vitro* in der in Sun *et al.* gezeigten Orientierung dimerisiert [26].

Der in Abbildung 5.1 schematisch dargestellte GTPase Zyklus des Toc34 zeigt in Schritt (2) eine Homodimerisierung, nachdem das Heterodimer Toc34-Toc159 dissoziiert ist (1). Die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen am *ps*Toc34_{SZ}V78C zeigen, dass das „Zipper-Spacer“ Konstrukt sowohl im GDP als auch im GTP gebundenen Zustand als über die Zeit stabiles Dimer vorliegt. Beispielhaft dient der Fluoreszenzzeitverlauf von Donor und Akzeptor mit der dazugehörigen FRET-Effizienz in Abbildung 4.2 aus Kapitel 4.1.1, welcher für einen Zeitraum von 96 Sekunden eine im Rahmen der Messgenauigkeit konstante, hohe FRET-Effizienz von 0,95 ergibt. Dass keine Dissoziation beobachtet wird, kann durch eine erhöhte lokale Konzentration erklärt werden, die in Kapitel 3.1.1 zu mindestens $388 \mu\text{M}$ bestimmt wurde. Obgleich bei einer Dissoziationskonstante von $K_D = 50 \mu\text{M}$, die für den GDP gebundene *ps*Toc34 ohne „Spacer-Zipper“ bestimmt wurde, [25] noch 22% der Proteine als Monomer vorliegen sollten, widerspricht dies nicht unseren Beobachtungen eines stabilen Dimers: Erstens kann eine sehr viel höhere lokale Konzentration angenommen werden (aufgrund der random-coil Struktur der Aminosäurekette). Und zweitens muss eine geringere Dissoziationskonstante angenommen werden, da die beiden Toc34 Proteine durch den Zipper in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt sind und zu einer räumlich nahen Position gezwungen werden. Anhand der hier durchgeführten Messungen kann also gezeigt werden, dass ein Dimer im GDP gebundenen Zustand existiert, was der Position (2) im Zyklus aus Abbildung 5.1 entspricht.

Mit Hilfe der Cysteinmutante *psToc34_{SZ}V78C/R133A* wird gezeigt, dass das Arginin R133 im Argininfinger des Toc34 einen unmittelbaren Einfluss auf das Dimerisierungsverhalten von Toc34 hat. Ohne Arginin 133 findet keine stabile Dimerisierung statt. Das in Einzelmolekülmessungen ermittelte Histogramm der FRET-Effizienzen (Abbildung 4.4b) zeigt eine deutliche Verbreiterung zu niedrigeren FRET-Effizienzen und damit nicht nur zu größeren Abständen sondern auch zu einer breiten Verteilung möglicher Abstände. Als Vergleich ist der Fit aus der Messung am GDP gebundenen *psToc34_{SZ}V78C* gezeigt, der diese Verbreiterung verdeutlicht. Ein typischer zeitlicher Verlauf, der an einem einzelnen Dimer ermittelten Effizienz, ist in Abbildung 4.5b dargestellt, und zeigt deutlich, dass über die Zeit kein konstanter Energieübertrag detektiert und damit kein konstanter Abstand zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt werden kann. Obwohl die Argininfingermutante nicht dimerisieren kann [25] werden nicht nur geringe sondern auch sehr hohe FRET-Effizienzen ermittelt. Das Vorhandensein von eben dieser hohen Bandbreite an FRET-Effizienzen zeigt wiederum, dass die „Spacer-Zipper“ Konstruktion die Proteine zwar in eine räumlich nahe Position zueinander zwingt, jedoch eine genügend hohe Flexibilität zulässt, um Abstandsänderungen und Dissoziationen detektieren zu können. Die artifiziellen Dimere können also für Experimente verwendet werden, die das Dimerisierungsverhalten der *psToc34* Proteine aufklären sollen.

5.3 Einfluss der Nukleotide auf Toc34 Homodimere

In diesem Abschnitt wird diskutiert, welchen Einfluss verschiedene Nukleotide auf die Struktur des Toc34 Homodimers haben. Bereits durch die in Abbildung 4.3a und b gezeigten Ensemble- und Einzelmolekülmessungen ist ersichtlich, dass das größtenteils GDP gebundene Toc34 Homodimer sich erstens fluoreszenzmarkieren lässt, und zweitens in einer dimeren Struktur vorliegt. Die in Abschnitt 4.2 vorgestellten Ensemblemessungen ergeben, dass für den größtenteils GDP gebundenen Toc34 eine Zugabe von GDP (Abbildung 4.7a) und GMPPNP (Abbildung 4.7c) im 400fachen molaren Überschuss eine geringe Erhöhung der FRET-Effizienz hervorruft. Da sich der Anteil an nukleotidgebundenem Toc34 und der Anteil an Dimeren erhöht hat, deutet dies darauf hin, dass im nukleotidfreien Zustand eine offenere dimere oder eine monomere Konformation vorliegt. Für das GDP•AlF_x gebundene Dimer, welches einem Zustand während der GTP Hydrolyse entsprechen soll [49] (siehe hierzu Kapitel 3.4) (Abbildung 4.7e) ist eine leichte Abnahme der Effizienz beobachtbar, was auf eine veränderte Konformation oder einen im zeitlichen Mittel geringeren Anteil an Dimeren

hindeutet. Bei der Betrachtung der Einzelmolekülmessungen zeigen sich für alle drei nukleotidgebundenen Zustände (Abbildung 4.7b, d, f) hohe und vor allem über die Zeit konstante FRET-Effizienzen. Das „Zipper-Spacer“-Konstrukt liegt also für alle drei nukleotidgebundenen Zustände als Dimer vor. Es wird aber im Rahmen der Messgenauigkeit kein signifikanter Unterschied zwischen den drei nukleotidgebundenen Zuständen festgestellt. Zusammen mit den Ensemblesmessungen ist jedoch für das GDP•AlF_x gebundene Toc34 Homodimer eine Tendenz zu einer leicht veränderten Konformation zu erkennen, die eine geringere FRET-Effizienz und damit einen größeren oder zumindest veränderten Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen hervorruft.

5.4 Nukleotidaustausch am Monomer oder Dimer?

Ob ein Nukleotidaustausch am *ps*Toc34 wie bei *at*Toc33 bevorzugt am Monomer stattfindet [27], soll in diesem Abschnitt mittels Anisotropiemessungen untersucht werden. In Kapitel 4.1.2 ist in Abbildung 4.6 die Anisotropie des fluoreszenzmarkierten mantGMPPNP beim Binden an verschiedene Toc34 Proteine dargestellt. Das mantGMPPNP ist zunächst frei beweglich in der Pufferlösung, bevor *ps*Toc34 Monomere (rot), artifizielle *ps*Toc34_{SZ}V78C Dimere (schwarz) und die Argininfingermutante des artifiziellen Dimers (welche keine stabile Dimerisierung erreichen kann, grün) hinzupipettiert werden. Dieses Experiment wird bei zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt, einmal bei 5 μM Protein, also unterhalb der Dissoziationskonstante von 50 μM des *ps*Toc34 und einmal bei 100 μM Protein, also oberhalb dieser Konstanten. Bei beiden Proteinkonzentrationen ist erkennbar, dass der Nukleotidaustausch am *ps*Toc34 Monomer und an der Argininfingermutante des „Spacer-Zipper“-Konstrukts *ps*Toc34_{SZ}V78C/R133A mit einer höheren Rate erfolgt, als am *ps*Toc34_{SZ}V78C Dimer (Raten siehe Tabelle 4.2). Das heißt, der im Zyklus als Schritt (5) markierte Nukleotidaustausch findet auch beim *ps*Toc34 mit einer höheren Wahrscheinlichkeit am Monomer statt. Da im nachfolgenden Unterkapitel noch gezeigt werden wird, dass der monomere Zustand zu meist erst durch Binden des Transitpeptids induziert wird, unterstützen die von uns ermittelten Daten die in Abbildung 5.1 vorgeschlagene Abfolge des Zyklus.

5.5 Binden des Transitpeptids mit anschließender Dissoziation des Toc34 Homodimers

Am GDP gebundenen *at*Toc33 konnte bereits gezeigt werden, dass durch Zugabe von Transitpeptid ein beschleunigter Nukleotidaustausch stattfindet. Da am monomeren *at*Toc33 ein im Vergleich zum dimeren *at*Toc33 ebenfalls beschleunigter Nukleotidaustausch zu beobachten war, konnte so indirekt gezeigt werden, dass durch Zugabe von Transitpeptid *at*Toc33 dissoziiert [27]. Ob diese Dissoziation auch am *ps*Toc34 gefunden werden kann, soll in diesem Abschnitt geklärt werden. Des Weiteren wird untersucht, ob das Transitpeptid „nur“ an den GDP gebundenen *ps*Toc34 binden kann oder auch an andere Nukleotid-gebundene Zustände des Proteins.

Das Binden des Transitpeptids an das Toc34 Homodimer und die anschließende Dissoziation des Dimers, im abgebildeten Zyklus entspricht dies den Positionen (3) und (4), ist abhängig vom Nukleotid, welches am Toc34 Homodimer gebunden ist. Während im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede zwischen dem GDP und dem GMPPNP gebundenen Toc34 Homodimer ermittelt werden, zeigen sich signifikant unterschiedliche Messergebnisse beim Binden an GDP•AlF_x gebundenes Toc34 Homodimer. Die hierzu durchgeführten Messungen sowie eine Interpretationsmöglichkeit dieser Messergebnisse sind im folgenden angegeben:

Mittels Anisotropiemessungen wird eine höhere Affinität des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids beim Binden an den GDP•AlF_x gebundenen Toc34 Homodimer ermittelt. Die in Abbildung 4.12 in Kapitel 4.4 vorgestellten Messergebnisse zeigen einen Anstieg der Anisotropie des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids und damit das Binden des Transitpeptids an *ps*Toc34_{SZ}V78C. Es wird derselbe Anstieg der Anisotropie des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids beim Binden an GDP und GMPPNP gebundenes Toc34 Homodimer von $\Delta r = 0,019$ für GDP bzw. $\Delta r = 0,018$ für GMPPNP (siehe Abbildung 4.12) gemessen. Ein deutlich größerer Unterschied zur Anisotropie des ungebundenen Transitpeptids von $\Delta r = 0,07$ ist jedoch für das Binden an das GDP•AlF_x gebundene Dimer zu erkennen, was auf einen erhöhten K_D hinweist. Um diesen Unterschied genauer zu betrachten, wurden Titrationsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4.13 gezeigt sind. Hieraus ergibt sich nach Gleichung 3.17 für das Binden an das GDP gebundene Toc34 Homodimer eine Dissoziationskonstante von $K_D = 30 \pm 8,5 \mu\text{M}$ und für das Binden an das GDP•AlF_x gebundene Dimer eine Dissoziationskonstante von $K_D = 18 \pm 8,9 \mu\text{M}$.

Ensemble-Fluoreszenzmessungen am fluoreszenzmarkierten Dimer ergeben eine höhere FRET-Effizienz am GDP•AlF_x gebundenen Toc34 Homodimer in Anwesenheit von Transitpeptid. Die in Abschnitt 4.3 in Abbildung 4.8 a, c und e gezeigten Fluoreszenzspektren zeigen, dass nach Zugabe von Transitpeptid zum Dimer ein Öffnen des Dimers im GDP, GMPPNP und GDP•AlF_x gebundenen Zustand beobachtet wird, da die FRET-Effizienz in allen drei Fällen abnimmt, wenngleich die Abnahme beim GDP•AlF_x geringer ausfällt. Die im Zyklus beschriebene Position (4), nach der das GDP gebundene Toc34 Homodimer durch Binden des Vorstufenproteins in Monomere dissoziiert, kann also bestätigt werden. Bei den Messungen 4.8 b, d und f wird zunächst zum größtenteils GDP gebundenen Toc34 Homodimer das Transitpeptid hinzugegeben und anschließend der Nukleotidzustand verändert. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist nach Zugabe von GDP und GMPPNP (4.8 b und d) kein Unterschied zur vorherigen FRET-Effizienz erkennbar. Bei Zugabe von Aluminiumfluorid nimmt sie jedoch trotz Vorhandenseins von Transitpeptid wieder leicht zu. Aluminiumfluorid zwingt das Dimer also in einen geschlosseneren Zustand, während das Transitpeptid das Dimer zuvor geöffnet hat.

Zeitaufgelöste Ensemble-Fluoreszenzmessungen ergeben ein verlangsamtes Öffnen des Dimers und damit ein verlangsamtes Binden des Transitpeptids an den GDP•AlF_x gebundenen Toc34 Homodimer. Aus Abbildung 4.9 wird ersichtlich, dass im Vergleich zum GDP und GMPPNP gebundenen Toc34 Zustand (Abbildung 4.9 a und c) eine deutlich verlangsamte Bindung des Transitpeptids an das Toc34 Homodimer stattfindet, wenn dieser im GDP•AlF_x gebundenen Zustand vorliegt (Abbildung 4.9 e). Die k_{on} -Rate wird also kleiner und die Dissoziationskonstante verringert sich ebenfalls. Das heißt, die k_{off} -Rate muss im Verhältnis zur k_{on} -Rate deutlich verringert sein. Daraus folgt, dass das Transitpeptid gleichermaßen gut an das GDP gebundene Toc34 Homodimer (Position (3) im Zyklus) und GMPPNP gebundene Toc34 Homodimer bindet.

Bei Einzelmolekülfluoreszenzmessungen am GDP•AlF_x gebundenen Toc34 Homodimer wird eine Population bei einer FRET-Effizienz von 0,65 gefunden, die in keiner weiteren Messung an diesem Dimer ausgeprägt ist. In Abbildung 4.10a ist das FRET-Histogramm gezeigt, welches am GDP gebundenen Toc34 Homodimer ermittelt wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Vergleich zur Messung ohne Transitpeptid (Abbildung 4.7b) eine Verbreiterung zu kleinen FRET-Effizienzen hin stattgefunden hat, die Fluoreszenzfarb-

stoffe und damit die einzelnen Protomere also einen größeren Abstand zueinander einnehmen, was in Einklang mit den Ergebnissen der Ensemblemessungen steht. In Abbildung 4.10b sind die FRET-Effizienzen dargestellt, die am GDP•AlF_x (AlF_x 10 nM) gebundenen Toc34 Homodimer in Anwesenheit von Transitpeptid ermittelt werden. Deutlich zu erkennen ist eine weitere Verbreiterung des Histogramms zu niedrigeren FRET-Effizienzen. Die beiden Maxima bei 0,65 und 0,86 stellen separate Zustände dar, was mit Hilfe von Abbildung 4.11 veranschaulicht wurde. Während der Zustand bei 0,86 auch in allen vorherigen Einzelmolekülfluoreszenzmessungen (Abbildung 4.7b, d und f und Abbildung 4.10b) gefunden werden kann, ist die Population um 0,65 einzigartig und könnte durch eine veränderte stabile Konformation hervorgerufen sein, die trotz des vergrößerten Abstandes zwischen den Fluorophoren noch immer einen dimeren Zustand widerspiegelt.

Im folgenden wird eine Interpretationsmöglichkeit dieser vier signifikanten Unterschiede diskutiert:

In Koenig et al. [21] wird von einer Stabilisierung des Homodimers gesprochen, wenn sich dieser im GDP•AlF_x gebundenen Zustand befindet. Durch die Zugabe von Aluminiumfluorid zum artifiziellen Toc34 Homodimer wird dieser in einem Hydrolysezustand künstlich gefangen gehalten. Dieser Zustand könnte dem in Einzelmolekülfluoreszenzmessungen gefundenem Zustand bei einer FRET-Effizienz von 0,65 entsprechen. In diesem Zustand könnte z.B. die Zugänglichkeit der Proteinbindetasche verändert sein [26], so dass das Transitpeptid in diesem Zustand schlechter oder nicht binden kann. Tatsächlich ergibt sich auch (wie in Kapitel 4.3 beschrieben) eine deutlich verringerte k_{on} -Rate des Transitpeptids in Anwesenheit von GDP•AlF_x Komplexen (siehe hierzu Abbildung 4.9e). Es ist möglich, dass im durchgeführten Experiment das Binden dieses Transitpeptids erst stattfindet, wenn der GDP•AlF_x Komplex vom Protein dissoziiert ist, das Protein sich also im nukleotidfreien Zustand befindet. Im Zyklus entspricht das einem Zustand nach der Hydrolyse von GTP. Anschließend wird wieder ein GDP•AlF_x gebunden und es bildet sich ein stabiles Dimer aus, welches die Dissoziation des Transitpeptids verhindert bzw. verlangsamt. Dies wiederum könnte die erhöhten Anisotropiewerte des Transitpeptids erklären, welche in Anwesenheit von Aluminiumfluorid detektiert werden. Die Ensemblefluoreszenzmessungen ergeben ein erneutes Dimerisieren des Toc34 durch Zugabe von Aluminiumfluorid, nachdem das Homodimer durch Zugabe von Transitpeptid dissoziierte. Dass eine geringere FRET-Effizienz als vor Zugabe von Transitpeptid erreicht wird, könnte durch die Konformationsänderung des Toc34 erklärt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl aus den Ensemblemessungen als auch aus den Einzelmolekülmessungen hervorgeht, dass das Transitpeptid an GDP und GMPPNP gebundenes Homodimer gleichermaßen bindet und das Dimer in beiden Fällen dissoziiert. Ein Binden an GDP gebundenes Toc34 Dimer (Position (3) im abgebildeten Zyklus) ist also möglich. Für das GDP•AlF_x gebundene Dimer kann zwar auch eine Abstandsvergrößerung zwischen den Farbstoffmolekülen, die an dem artifizialen Dimer *ps*Toc34SZ gebunden sind, beobachtet werden, jedoch finden sich im Vergleich zum GDP bzw. GMPPNP gebundenen Dimer vier signifikant unterschiedliche Eigenschaften in Anwesenheit von Transitpeptid:

1. Durch Zugabe von Aluminiumfluorid zum Toc34 Homodimer in Anwesenheit von Transitpeptid kann eine Steigerung der FRET-Effizienz erreicht werden. Weder die Zugabe von GDP noch von GMPPNP führt zu diesem Verhalten (siehe Abbildung 4.7).
2. Eine (im Vergleich zum GDP und GMPPNP gebundenen Dimer) verlangsamte Bindung des Transitpeptids an den Toc34 Homodimer kann gezeigt werden (siehe Abbildung 4.9).
3. Die Anisotropie des fluoreszenzmarkierten Transitpeptids erreicht einen deutlich höheren Wert beim Binden an GDP•AlF_x gebundenen Dimer als beim Binden an GDP bzw. GMPPNP gebundenen Dimer (siehe Abbildung 4.12).
4. Bei Einzelmolekülmessungen wird eine Population bei einer FRET-Effizienz von 0,65 gefunden, die in keiner weiteren Messung an diesem Dimer ausgeprägt ist (siehe Abbildung 4.10).

Genau hier kann gesagt werden, dass es sich um eine berechtigte Annahme handelt, den GTPase Zyklus des *ps*Toc34 als chemomechanischen Zyklus zu betrachten, denn diese vier Unterschiede könnten durch eine Konformationsänderung erklärt werden, die durch die Hydrolyse hervorgerufen wird und dazu führt, dass sich sowohl der Abstand zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen als auch die Dissoziationskonstante des Transitpeptids verändert.

5.6 Heterodimer

Ein wesentlicher Aspekt des in Abbildung 5.1 gezeigten Modells ist, dass im Laufe des Zyklus ein Heterodimer gebildet wird. Im Folgenden werden erste Messungen diskutiert, bei denen eine Heterodimerisierung beobachtet werden konnte. Anschließend wird diskutiert, ob

anhand der am Homodimer ermittelten Messergebnisse festgestellt werden kann, wann eine Heterodimerisierung zwischen Toc34 und Toc159 stattfinden kann.

In Abschnitt 4.5 wird in Abbildung 4.14 gezeigt, dass eine Heterodimerisierung zwischen Toc34 und Toc159 stattfinden kann, was bei diesem Experiment umso erstaunlicher war, da Toc34 seine sonst stabile homodimere Struktur dafür aufgeben muss. Dies deutet auf eine besonders hohe Affinität zwischen Toc34 und Toc159 hin. Durch Zugabe von GMPPNP wird diese sogar noch erhöht, was dafür spricht, dass die Heterodimerisierung bevorzugt an GTP gebundenen Proteinen stattfindet.

Damit eine Heterodimerisierung stattfinden kann, ist anzunehmen, dass das Toc34 zunächst als Monomer vorliegt bevor es zur Heterodimerisierung kommt. Bei Einzelmolekülmessungen befindet sich Toc34 allerdings in einem stabilen dimeren Zustand, unabhängig davon, ob GDP oder GTP gebunden ist (siehe hierzu Kapitel 5.3). Dieses stabile Homodimer dissoziiert jedoch nach Zugabe von Transitpeptid (siehe hierzu Kapitel 5.5), das heißt, hier besteht eine Bindungsmöglichkeit für Toc159. Tatsächlich wird in Anwesenheit von Transitpeptid eine erhöhte Affinität zur Homodimerisierung festgestellt, (siehe Abbildung 4.8) wenn Toc34 im GDP•AIF_x gebundenen Zustand ist, welcher einem Zustand während der Hydrolyse entspricht. Da die G-Domäne des Toc159 zu der des Toc34 sehr ähnlich ist [26] kann man spekulieren, dass diese erhöhte Affinität auch für das Heterodimer gilt. Das bedeutet, dass vor der Ausbildung des Heterodimers noch ein Austausch des GDP durch GTP stattfinden muss, da es sonst zu keiner Hydrolyse kommen kann. In Kapitel 5.5 wird festgestellt, dass der Austausch von GDP durch das GTP Analogon GMPPNP am monomeren Toc34 mit einer höheren Wahrscheinlichkeit stattfinden kann als am homodimeren Toc34. Dies spricht dafür, dass der Nukleotidaustausch erst stattfindet, nachdem das stabile GDP gebundene Toc34 Homodimer durch das Binden von Vorstufenprotein dissoziiert ist. Es kann also tatsächlich vermutet werden, dass die Ausbildung des Heterodimers an Position (6) des in Abbildung 5.1 gezeigten Proteinimportprozesses stattfindet.

5.7 Zusammenfassung

Die ermittelten Messdaten stützen das in Abschnitt 5.1 vorgestellte Modell zum Proteinimport. Mit Hilfe des „Spacer-Zipper“ Konstruktes *psToc34_{SZ}V78C* konnte gezeigt werden, dass im GDP gebundenen Zustand ein über die Zeit stabiles Dimer vorliegt. Es ist gut vorstellbar, dass

sich nach der Dissoziation des Toc34-Toc159 Heterodimers (Position (1) im Zyklus) ein GDP-gebundenes Toc34 Homodimer (2) ausbildet. Es konnte gezeigt werden, dass Transitpeptid an das GDP-gebundene Homodimer bindet (3) und dieser Bindung unmittelbar eine Dissoziation (4) des Homodimers folgt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ein Nukleotidaustausch am Monomer mit einer größeren Rate stattfindet, als am Homodimer, weshalb vermutet werden kann, dass dieser an Position (5) erfolgt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der G-Domänen von Toc34 und Toc159 können wir anhand der am Homodimer ermittelten Daten spekulieren, dass die Heterodimerisierung tatsächlich an Position (6) erfolgt und wir haben maßgebende Hinweise dafür herausgestellt, dass während der Hydrolyse eine Konformationsänderung des Toc34 erfolgt.

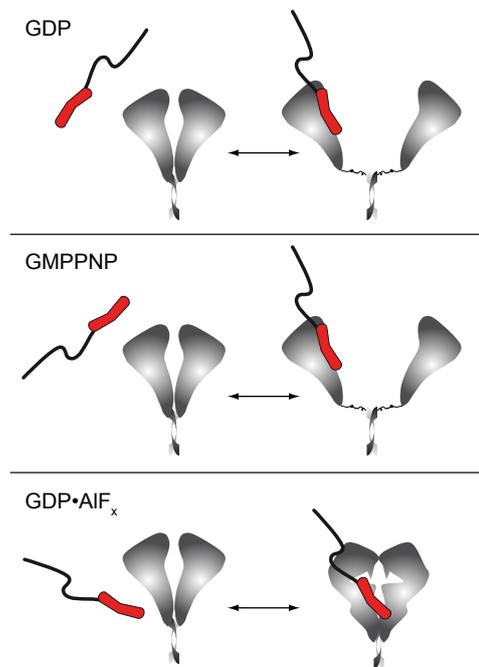


Abbildung 5.2 Dissoziation des GDP und GMPPNP gebundenen Toc34 Homodimers nach Zugabe von Transitpeptid; vermutete Konformationsänderung des GDP•AlF_x- und Transitpeptid gebundenen Toc34 Homodimers.

Während das Toc34 Homodimer unabhängig von seinem nukleotidgebundenen Zustand als stabiles Dimer existiert, soll Abbildung 5.2 veranschaulichen, dass nach Zugabe von Transitpeptid eine deutliche Veränderung dieses Zustands induziert wird. Anhand der ermittelten Daten kann nicht nur gezeigt werden, dass das Binden dieses Transitpeptids zur Dissoziation

des GDP-gebundenen *psToc34* Homodimers führt, was bisher nur für den *atToc33* gezeigt wurde [27], sondern dasselbe Verhalten auch für das GTP-gebundene *psToc34* angenommen werden kann. Des Weiteren wurden die in Kapitel 5.5 ausführlich beschriebenen Unterschiede sowohl für das Binden von Transitpeptid an das GDP•AlF_x-gebundene Toc34 Homodimer als auch für das Dimerisierungsverhalten dieses GDP•AlF_x- und Transitpeptidgebundenen Toc34 Homodimers. Aufgrund dieser Unterschiede ist es wahrscheinlich, dass auch hier ein stabiles Dimer vorliegt, jedoch eine Konformationsänderung stattgefunden hat. Allein mithilfe dieser am Homodimer ermittelten Daten konnte sogar eine Hypothese aufgestellt werden, wann eine Interaktion bzw. Heterodimerisierung mit dem Toc159 im GTPase Zyklus auftreten kann.

Die Messungen in dieser Arbeit unterstützen prinzipiell den in [63] vorgeschlagenen GTPaseZyklus, dieser muss jedoch durch weitere Pfade ergänzt werden. In Abbildung 5.3 sind zusätzlich zu den in Abbildung 5.1 gezeigten Pfaden im chemomechanischen Zyklus jene alternativen Wege gezeigt, bei denen nach der Dissoziation des Heterodimers eben keine Homodimerisierung auftritt, sondern zunächst ein Nukleotidaustausch (A1) stattfindet oder das Binden des Transitpeptids an das Toc34 Monomer (A5) erfolgt. Im Folgenden werden jene möglichen anderen Pfade diskutiert, welche bisher nicht betrachtet wurden:

Wie in Kapitel 5.2 beschrieben, liegt das „Spacer-Zipper“ Konstrukt im GDP-gebundenen Zustand als stabiles Dimer vor. Dass keine Dissoziation beobachtet wird, ist durchaus auf die hohe lokale Proteinkonzentration zurückführbar, die durch den künstlichen Zipper verursacht wird. Ob also ein Nukleotidaustausch oder das Binden von Vorstufenprotein bereits an monomeres GDP-gebundenes Toc34 stattfindet, was den alternativen Pfaden (A1) und (A5) entspricht, kann anhand der diskutierten Daten weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Selbiges ergibt sich hiermit für die Wege über (A2) und (A6). Es bleibt noch die Möglichkeit, dass der Nukleotidaustausch am Homodimer erfolgt, einmal vor dem Binden (A7) und einmal nach dem Binden (A8) des Vorstufenproteins. Die in Kapitel 5.4 diskutierten Daten zeigen, dass am monomeren Toc34 eine höhere Nukleotidaustauschrate gefunden wird als am dimeren Toc34, weshalb der Weg über (A7) zwar nicht ausgeschlossen werden kann, jedoch stützen die in dieser Arbeit ermittelten Daten die in Abbildung 5.1 gezeigte Position (5) als Ort für den Nukleotidaustausch innerhalb des Zyklus. Ebenso verhält es sich mit dem Weg über die (A8). Die ermittelten Daten zeigen als Folge des Bindens von Transitpeptid an das GDP-gebundene Homodimer eine Dissoziation, weshalb auch hier Position (5) als Ort für den Nukleotidaustausch befürwortet wird. Für die alternativen Pfade (A3) und (A4) gilt dieselbe Argumentation wie bei (A2) und (A6), beide Pfade sind möglich.

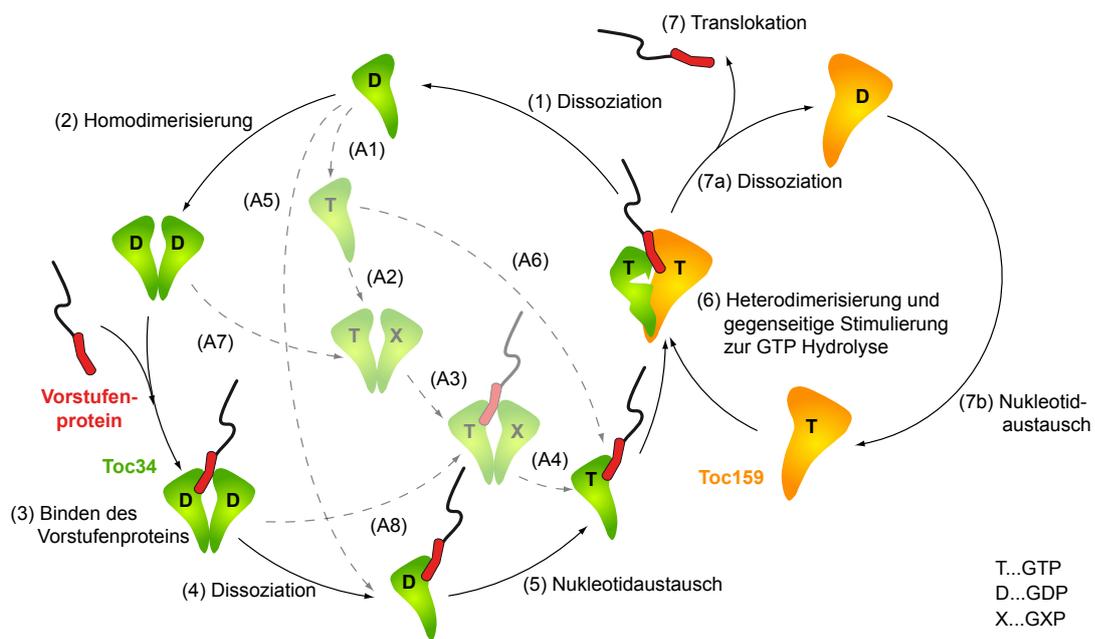


Abbildung 5.3 Kompletter chemomechanischer Zyklus. Alternative Pfade im vereinfachten Modell des in Abbildung 5.1 gezeigten Toc34 chemomechanischen GTPase Zyklus; (A1), (A7) und (A8) zeigen mögliche andere Pfade für den Nukleotidaustausch, (A2) die Homodimerisierung des GTP gebundenen Homodimers, (A3), (A5) und (A6) zeigen alternative Vorschläge für das Binden von Transitpeptid und (A4) beschreibt die Dissoziation des GTP-gebundenen Homodimers nach Binden von Transitpeptid.

Kapitel 6

Ausblick

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET am *psToc34* erstmals eine Methode etabliert, den chemomechanischen GTPase-Zyklus des *psToc34* direkt zu beobachten. Die Assoziation und die Dissoziation des Homodimers in Abhängigkeit von Transitpeptid und Nukleotid wurde eingehend charakterisiert, so dass eine bisher unbekannte Konformationsänderung im $\text{GDP}\bullet\text{AlF}_x$ Zustand gezeigt werden konnte, welcher einem Zustand während der Hydrolyse entsprechen soll. Aufbauend auf den bisher erzielten Ergebnissen können folgende Experimente weiteren Aufschluss über den sehr komplexen chemomechanischen Proteinimportzyklus geben.

6.1 Übergangszustand

- **Weitere Immitate für den Übergangszustand**

Mittels Aluminiumfluorid kann das GDP-gebundene *psToc34* in einen Zustand übergehen, der einem Übergangszustand während der GTP Hydrolyse entspricht. In diesem Zustand wurden in Anwesenheit von Transitpeptid signifikante Unterschiede gegenüber dem GDP/GMPPNP-Zustand ermittelt. Die Chemikalien Berylliumfluorid und Vanadat haben eine vergleichbare Wirkung [66, 67]. Dabei entspricht Vanadat eher noch einem Zustand kurz nach der Hydrolyse, weshalb zum einen Messungen mit Berylliumfluorid die mit AlF_x ermittelten Daten stützen könnten und zum anderen Messungen mit Vanadat weiter Aufschluss über die während der Hydrolyse auftretenden Konformationsänderungen liefern können.

- **Konformationsuntersuchungen mittels weiterer Cysteinmutanten**

In Kapitel 4.3 wurde eine Konformationsänderung des *psToc34* im $\text{GDP}\bullet\text{AlF}_x$ gebun-

denen Zustand beobachtet, welcher einem Zustand während der Hydrolyse entspricht. Diese Beobachtung fordert regelrecht dazu heraus, weitere Cysteinmutanten herzustellen. Mit Hilfe dieser Cysteinmutanten, die spezifisch mit Maleiminimid-Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden können, kann diese neue räumliche Struktur mittels Einzelmolekülfluoreszenzmessungen „vermessen“ werden, was zum Verständnis des Importzyklus einen wichtigen Beitrag leisten wird.

6.2 Heterodimer

- **Einfluss von Nukleotiden und Transitpetid auf die Konformation des Heterodimers**
Es wurde bereits in ersten Ensemblemessungen (Kapitel 4.5) gezeigt, dass die Ausbildung eines Heterodimers durch Zugabe von GMPPNP forciert werden kann. Durch ein „Spacer-Zipper“-Konstrukt, welches eine räumlich hohe Konzentration von *psToc34* und *psToc159* hervorruft, kann dieses Heterodimer näher untersucht werden. So kann beispielsweise die Nukleotidabhängigkeit genauer charakterisiert werden, um herauszufinden, ob auch hier in Anwesenheit von Transitpeptid eine Konformationsänderung während der Hydrolyse beobachtbar ist.
- **Vielfarben-FRET**
Mit Hilfe von z.B. Trippel-FRET können Aussagen darüber getroffen werden, ob während der Hydrolyse tatsächlich eine „Übergabe“ des Transitpeptids vom *psToc34* auf den *psToc159* stattfindet. Von großem Interesse wäre eine Aussage darüber, ob im Anschluss an diese „Übergabe“ eine Dissoziation des Heterodimers erfolgt oder ob beide GTPasen dimerisiert bleiben, um das Transitpeptid gemeinsam durch die *psToc75* Pore zu schleusen.
- **Bestimmung der Nukleotidaustauschrate**
Eine genauere Klassifizierung der Toc-GTPasen *Toc34* und *Toc159* kann mit Hilfe von GTPase Aktivitätsmessungen durchgeführt werden. Es könnte bestimmt werden, ob die GTPase-Rate des Heterodimers durch die Anwesenheit von Transitpeptid erhöht werden kann. Dadurch könnte ermittelt werden, ob das Transitpeptid eine Co-GAP Funktion im Rahmen des GTPase-Zyklus des Toc-Komplexes einnimmt oder ob allein die Ausbildung eines Heterodimers bereits zu einer erhöhten GTPase-Rate führt.

6.3 Magnetische Pinzette

Aufgrund des geringen Innendurchmessers der psToc75 Pore von 0,8-0,9 nm liegt das Vorstufenprotein während des Imports sehr wahrscheinlich im ungefalteten Zustand vor [68, 69]. Es ist jedoch noch unklar, ob der dafür notwendige Energieaufwand für der Entfaltung durch die GTPasen selbst [70] oder durch andere am Import beteiligte (Hitzeschock-) Proteine erfolgt, was aus den in Ruprecht *et al.* gezeigten Daten geschlussfolgert werden könnte [71]. Diese hochaktuelle Fragestellung, ob der Import also nach dem Prinzip der „molekularen Ratsche“ erfolgt oder aber tatsächlich von einem der Toc-Komplex-Komponenten Kraft aufgewendet wird, kann mit Hilfe der magnetischen Pinzette beantwortet werden. Hierzu könnten rekonstituierte Proteine in eine gestützte Lipiddoppelschicht oder einen Lipidvesikel eingebracht werden, so dass sie in dieser Membran einen Proteinimportkomplex ausbilden können. An das Transitpeptid würde eine magnetische Kugel über einen ausreichend langen Linker angebracht werden. Mit Hilfe der Magnetischen Pinzette könnten beide Modelle voneinander unterschieden werden. Überdies kann im Falle einer Krafterzeugung durch eine dieser GTPasen diese Kraft quantifiziert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] S.D. Dyal, M.T. Brown, and P.J. Johnson. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 304(5668):253, 2004.
- [2] G.G. van Dooren, S.D. Schwartzbach, T. Osafune, and G.I. McFadden. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1541(1-2):34–53, 2001.
- [3] R. Bock and J.N. Timmis. Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays*, 30(6):556–566, 2008.
- [4] D. Leister. Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics*, 19(1):47–56, 2003.
- [5] J. Tripp, M. Sommer, and E. Schleiff. Freier eintritt ins grüne? toc als türsteher der plastiden. *Bioforum*, 32(6):30–31, 2009.
- [6] J. Soll and E. Schleiff. Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3):198–208, 2004.
- [7] B. Zybailov, H. Rutschow, G. Friso, A. Rudella, O. Emanuelsson, Q. Sun, and K.J. Van Wijk. Sorting signals, n-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One*, 3(4):e1994, 2008.
- [8] M. Oreb, I. Tews, and E. Schleiff. Policing tic 'n' toc, the doorway to chloroplasts. *Trends in Cell Biology*, 18(1):19–27, 2008.
- [9] E. Schleiff and J. Soll. Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO reports*, 6(11):1023–1027, 2005.
- [10] E. Schleiff, J. Soll, M. Kuchler, W. Kuhlbrandt, and R. Harrer. Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *Journal of Cell Biology*, 160(4):541–551, 2003.

- [11] S. Qbadou, T. Becker, O. Mirus, I. Tews, J. Soll, and E. Schleiff. The molecular chaperone hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor toc64. *The EMBO journal*, 25(9):1836–1847, 2006.
- [12] R. Gasper, S. Meyer, K. Gotthardt, M. Sirajuddin, and A. Wittinghofer. It takes two to tango: regulation of g proteins by dimerization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6):423–429, 2009.
- [13] K. Scheffzek and M.R. Ahmadian. Gtpase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cellular and molecular life sciences*, 62(24):3014–3038, 2005.
- [14] I.R. Vetter and A. Wittinghofer. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545):1299, 2001.
- [15] J. L. Bos, H. Rehmann, and A. Wittinghofer. Gef's and gaps: Critical elements in the control of small g proteins (vol 129, pg 865, 2007). *Cell*, 130(2):385–385, 2007.
- [16] C. DerMardirossian and G.M. Bokoch. Gdis: central regulatory molecules in rho gtpase activation. *Trends in cell biology*, 15(7):356–363, 2005.
- [17] D.D. Leipe, Y.I. Wolf, E.V. Koonin, and L. Aravind. Classification and evolution of p-loop gtpases and related atpases1. *Journal of molecular biology*, 317(1):41–72, 2002.
- [18] E. Schleiff and T. Becker. Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1):48–59, 2010.
- [19] M. S. Sommer and E. Schleiff. Molecular interactions within the plant toc complex. *Biological Chemistry*, 390(8):739–744, 2009.
- [20] J. H. Lee, F. Wang, and D. J. Schnell. Toc receptor dimerization participates in the initiation of membrane translocation during protein import into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45):31130–31141, 2009.
- [21] P. Koenig, M. Oreb, K. Rippe, C. Muhle-Goll, I. Sinning, E. Schleiff, and I. Tews. On the significance of toc-gtpase homodimers. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34):23104–23112, 2008.

- [22] M. Oreb, A. Hofle, O. Mirus, and E. Schleiff. Phosphorylation regulates the assembly of chloroplast import machinery. *Journal of Experimental Botany*, 59(9):2309–2316, 2008.
- [23] S. Shan, S.L. Schmid, and X. Zhang. Signal recognition particle (srp) and srp receptor: a new paradigm for multistate regulatory gtpases. *Biochemistry*, 48(29):6696–6704, 2009.
- [24] Y. H. Yeh, M. M. Kesavulu, H. M. Li, S. Z. Wu, Y. J. Sun, E. H. E. Konozy, and C. D. Hsiao. Dimerization is important for the gtpase activity of chloroplast translocon components at toc33 and pstoc159. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18):13845–13853, 2007.
- [25] P. Koenig, M. Oreb, A. Hofle, S. Kaltofen, K. Rippe, I. Sinning, E. Schleiff, and I. Tews. The gtpase cycle of the chloroplast import receptors toc33/toc34: Implications from monomeric and dimeric structures. *Structure*, 16(4):585–596, 2008.
- [26] Y. J. Sun, F. Forouhar, H. M. Li, S. L. Tu, Y. H. Yeh, S. Kao, H. L. Shr, C. C. Chou, C. P. Chen, and C. D. Hsiao. Crystal structure of pea toc34, a novel gtpase of the chloroplast protein translocon. *Nature Structural Biology*, 9(2):95–100, 2002.
- [27] Mislav Oreb, Anja Höfle, Patrick Koenig, Maik S Sommer, Irmgard Sinning, Fei Wang, Ivo Tews, Danny J Schnell, and Enrico Schleiff. Substrate binding disrupts dimerization and induces nucleotide exchange of the chloroplast gtpase toc33. *Biochem J*, 436(2):313–319, Jun 2011.
- [28] H. Aronsson, J. Combe, R. Patel, B. Agne, M. Martin, F. Kessler, and P. Jarvis. Nucleotide binding and dimerization at the chloroplast pre-protein import receptor, attoc33, are not essential in vivo but do increase import efficiency. *The Plant Journal*, 63(2):297–311, 2010.
- [29] J. Bauer, A. Hiltbrunner, P. Weibel, P.A. Vidi, M. Alvarez-Huerta, M.D. Smith, D.J. Schnell, and F. Kessler. Essential role of the g-domain in targeting of the protein import receptor attoc159 to the chloroplast outer membrane. *The Journal of cell biology*, 159(5):845, 2002.
- [30] P. Weibel, A. Hiltbrunner, L. Brand, and F. Kessler. Dimerization of toc-gtpases at the chloroplast protein import machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39):37321–37329, 2003.

- [31] T. Becker, M. Jelic, A. Vojta, A. Radunz, J. Soll, and E. Schleiff. Preprotein recognition by the toc complex. *Embo Journal*, 23(3):520–530, 2004.
- [32] K. Scheffzek, M.R. Ahmadian, and A. Wittinghofer. Gtpase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends in biochemical sciences*, 23(7):257–262, 1998.
- [33] G. Weber. Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. theory and experimental method. *Biochemical Journal*, 51(2):145, 1952.
- [34] L. Stryer. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry*, 47(1):819–846, 1978.
- [35] D. Wöhrle, M. Tausch, and W.D. Stohrer. *Photochemie*. Wiley-VCH, 1998.
- [36] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Baltimore, 3 edition, 2006.
- [37] K.P.C. Vollhardt and N.E. Schore. *Organische chemie*, vch, 1990.
- [38] T. Förster. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [39] T. Förster. *Fluoreszenz organischer Verbindungen*. Gottingen, 1951.
- [40] T.W.J. Gadella. *FRET and FLIM techniques*, volume 33. Elsevier Science, 2008.
- [41] R. M. Clegg. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol*, 211:353–388, 1992.
- [42] R. M. Clegg. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, volume 137. Wiley-Interscience, 1996.
- [43] T. Ha, A.Y. Ting, J. Liang, W.B. Caldwell, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz, and S. Weiss. Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3):893, 1999.

- [44] C. Biskup, T. Zimmer, L. Kelbauskas, B. Hoffmann, N. Klöcker, W. Becker, A. Bergmann, and K. Benndorf. Multi-dimensional fluorescence lifetime and fret measurements. *Microscopy research and technique*, 70(5):442–451, 2007.
- [45] T. Bornschlögl and M. Rief. Single molecule unzipping of coiled coils: sequence resolved stability profiles. *Physical review letters*, 96(11):118102, 2006.
- [46] T. Bornschlögl and M. Rief. Single-molecule dynamics of mechanical coiled-coil unzipping. *Langmuir*, 24(4):1338–1342, 2008.
- [47] M. Mickler, M. Hessling, C. Ratzke, J. Buchner, and T. Hugel. The large conformational changes of hsp90 are only weakly coupled to atp hydrolysis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3):281–286, 2009.
- [48] H. Dietz and M. Rief. Protein structure by mechanical triangulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5):1244, 2006.
- [49] A. Wittinghofer. Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Current Biology*, 7(11):R682–R685, 1997.
- [50] R. Mittal, M.R. Ahmadian, R.S. Goody, and A. Wittinghofer. Formation of a transition-state analog of the ras gtpase reaction by ras· gdp, tetrafluoroaluminate, and gtpase-activating proteins. *Science*, 273(5271):115, 1996.
- [51] J.M. Walker. *The proteomics protocols handbook*. Humana Pr Inc, 2005.
- [52] P. Gyoergy, C.S. RoSE, R.E. Eakin, E.E. Snell, and R.J. Williams. Egg-white injury as the result of nonabsorption or inactivation of biotin. *Science*, 93(2420):477, 1941.
- [53] G.T. Hermanson. *Bioconjugate techniques*. Academic Pr, 1996.
- [54] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714):50–53, 1999.
- [55] R. Roy, S. Hohng, and T. Ha. A practical guide to single-molecule fret. *Nature Methods*, 5(6):507–516, 2008.

- [56] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, and D. Stüber. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnology*, 6(11):1321–1325, 1988.
- [57] Jasco. *Model FP-6500/6600 Hardware Handbuch*. Jasco Deutschland GmbH, 2005.
- [58] E. Hecht. Optics 4th edition. *Optics 4th edition by Eugene Hecht Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Company, 2001*, 1, 2001.
- [59] P.R. Selvin. *Single-molecule techniques: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2008.
- [60] T. Ha. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods*, 25(1):78–86, 2001.
- [61] D. Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11):764–774, 2001.
- [62] M. Mickler. *Der ATPase-Zyklus von Hsp90 in Einzelmolekül-FRET-Experimenten*. PhD thesis, TU München, 2008.
- [63] I.M. Oreb. *Toc34, a Dimer-forming GTPase at the Chloroplast Translocon*. PhD thesis, Frankfurt (Main), 2009.
- [64] N. Sveshnikova, J. Soll, and E. Schleiff. Toc34 is a preprotein receptor regulated by gtp and phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9):4973, 2000.
- [65] M. Jelic, N. Sveshnikova, M. Motzkus, P. Hörth, J. Soll, and E. Schleiff. The chloroplast import receptor toc34 functions as preprotein-regulated gtpase. *Biological chemistry*, 383(12):1875–1883, 2002.
- [66] J.D. Robinson, R.L. Davis, and M. Steinberg. Fluoride and beryllium interact with the (na+ k)-dependent atpase as analogs of phosphate. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18(6):521–531, 1986.
- [67] J. Bigay, P. Deterre, C. Pfister, and M. Chabre. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on g-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of gtp. *The EMBO journal*, 6(10):2907, 1987.

- [68] S.C. Hinnah, R. Wagner, N. Sveshnikova, R. Harrer, and J. Soll. The chloroplast protein import channel *toc75*: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophysical journal*, 83(2):899–911, 2002.
- [69] R. Bredemeier, T. Schlegel, F. Ertel, A. Vojta, L. Borissenko, M.T. Bohnsack, M. Groll, A. von Haeseler, and E. Schleiff. Functional and phylogenetic properties of the pore-forming β -barrel transporters of the *omp85* family. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3):1882, 2007.
- [70] E. Schleiff, M. Jelic, and J. Soll. A gtp-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8):4604–4609, 2003.
- [71] M. Ruprecht, T. Bionda, T. Sato, M.S. Sommer, T. Endo, and E. Schleiff. On the impact of precursor unfolding during protein import into chloroplasts. *Molecular plant*, 3(3):499–508, 2010.

Danksagung

Zum Gelingen der vorliegenden Arbeit hat eine Vielzahl von Personen beigetragen. Ihnen meinen Dank auszudrücken, möchte ich die letzten Zeilen dieser Arbeit nutzen. Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thorsten Hugel, der diese Arbeit natürlich schon dadurch überhaupt erst ermöglicht hat, dass er sie mir gab und betreut hat, und der aber weit darüber hinaus auch den wichtigen Rahmen für ein selbständiges und erfolgreiches Arbeiten geschaffen hat.

Dankbar bin ich für die Unterstützung durch Mislav Oreb für die kritische Diskussion meiner Messergebnisse, die hilfreichen Tipps, die tatkräftige Unterstützung und sein elefantöses Gedächtnis, auf das ich ab und zu zugreifen durfte.

Ich danke den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für das kollegiale Arbeitsverhältnis, insbesondere danke ich Witold Jaworek, der im Rahmen seiner Bachelorarbeit das Projekt sehr gut mit erfolgreichen Messungen unterstützte.

Mein Dank gilt den Kollegen, die mir fachlich und persönlich zur Seite standen und dadurch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Auflistung erfolgt in historischer Reihenfolge: Oliver Lieleg für seinen Beistand schon beim ersten Vortrag, Michael Schlierf für das Interesse an fachfremden Problemstellungen und die darauf folgende Hilfsbereitschaft, Morten Berts und Simone Köhler, meinen persönlichen Biochemikern, die einfach alles wissen, Monika Rusp für eine Freundschaft, die so manches mal sehr hilfreich war, Felix Berkemeier und Melanie Brunnbauer für ein tolles Büroklima und die unzähligen Tipps und Hilfestellungen, die im Kampf mit den Daten sehr hilfreich waren, Christine Wurm für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die seelische und moralische Unterstützung, sowie ihren Bürokollegen Volker Schaller, Simone Köhler und Jona Kayser, die mich gerade in der letzten Phase des Zusammenschreibens ertragen mussten. Natürlich danke ich auch den Jammerladenmitbesitzern Markus Jahn und Philipp Wortmann für die hervorragende Aufrechterhaltung des Winseln-

veaus und nicht zu vergessen gilt mein Dank Ms. Coffee Sonja Schmid für die Sicherstellung eines entsprechenden Koffeinspiegels und die Möglichkeit für fachlichen Austausch, der zu bestimmten Tageszeiten auch mit Björn Hellenkamp sehr gut möglich war, bei dem ich mich dafür auch bedanken möchte!

Ein besonderer Dank gilt dem Laborteam bestehend aus Claudia Antrecht (Alumni), Gabriele Chmel, Monika Rusp, Daniela Scheikl (Alumni) und Karin Vogt, ohne die hier nichts funktionieren würde, sowie Rudolf Lehrhuber, der für mechanische Fragestellungen der richtige Ansprechpartner war.

Zuletzt, aber sicherlich nicht am wenigsten, danke ich meinen Eltern Martin und Brigitte, ohne die nichts funktioniert hätte und denen ich alles zu verdanken habe!